

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09182

研究課題名（和文）癌関連間質細胞の機能獲得機構の網羅的解析に基づく標的分子の探索

研究課題名（英文）Search for target molecules based on comprehensive analysis of functional gain in mechanisms of cancer-associated stromal cells

研究代表者

上田 和弘（Ueda, Kazuhiro）

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：90420520

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：癌組織内の間質細胞の特性獲得機構を解明し、間質細胞の治療標的分子を明らかにすることを目的とした。具体的に35症例の手術検体から癌組織の内部、近隣部、遠隔部の3箇所の新鮮組織標本を採取し、間質細胞を培養増幅した。2代目の接着細胞（癌細胞ではない）を採取した。蛍光免疫染色でVimentinとCytokeratinの両方に染まる細胞を認めた。細胞外マトリックスと接着分子の候補を含むRT2 PROFILERキットを使用してPCRでcDNAの発現を調べた。癌の辺縁部や遠隔部と比較して癌中心部でより高発現した分子の候補を認め、その中から4症例中全てに共通して高発現したCOL11A1に着目した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤は注目されているが治療効果を鋭敏に予測できる特異的なバイオマーカーは特定されていない。バイオマーカーの探索においては癌細胞に限定するのではなく癌の微小環境を対象に入れた探索を行う必要がある。免疫細胞（マクロファージ）、間質細胞の働きにより細胞障害性T細胞の活性を抑制し、制御性T細胞の浸潤を促すことで抗腫瘍免疫が抑制されると考えられている。本研究により明らかとなった間質細胞の標的遺伝子異常（COL11A1）は、新しい標的治療の開発の突破口となることが期待される。さらに、将来的には免疫チェックポイント阻害療法の適応を決める有用なバイオマーカーとなる可能性もある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the characteristic acquisition mechanism of stromal cells in cancer tissue and to clarify therapeutic target molecules for stromal cells. Specifically, three fresh tissue specimens were collected from 35 surgical specimens, i.e., internal, adjacent, and distant cancer tissues, and stromal cells were cultured to amplify stromal cells. Adherent cells (not cancer cells) of the second generation were collected. Cells stained with both vimentin and cytokeratin were observed by fluorescence immunostaining. cDNA expression was examined by PCR using the RT2 PROFILER kit containing candidate extracellular matrix and adhesion molecules. We found candidate molecules that were highly expressed in the central part of the cancer compared to the peripheral and distant parts of the cancer, and focused on COL11A1, which was highly expressed in all 4 cases.

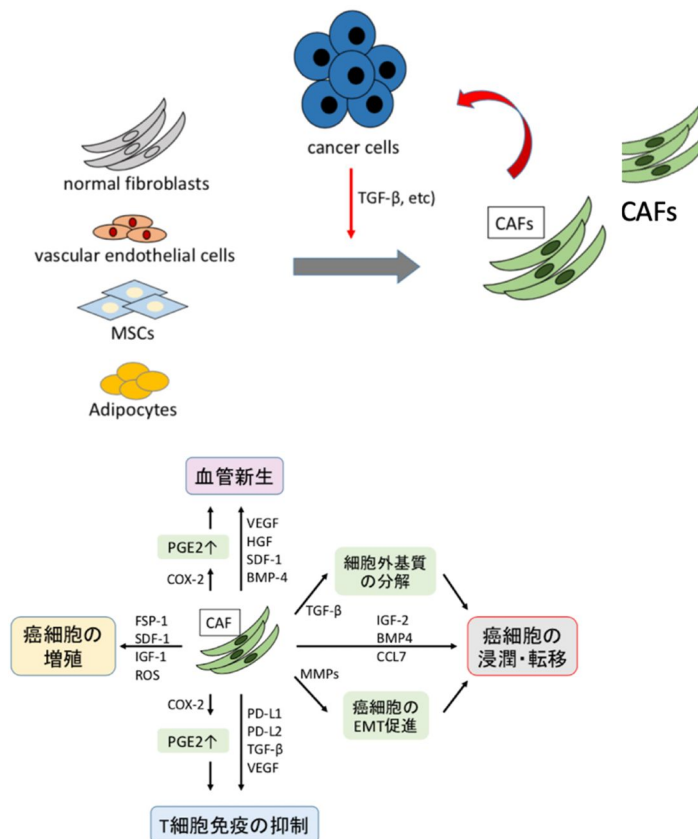
研究分野：呼吸器外科

キーワード：癌関連間質細胞 細胞外マトリックス 接着分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

原発性肺癌の研究においては癌細胞に着目した研究と癌細胞以外の周辺細胞(免疫担当細胞を含む)に着目した研究に2分される。免疫チェックポイント阻害剤は免疫担当細胞に着目した研究とした大きな成果を上げた。T細胞と腫瘍細胞との相互作用の解明が成果を導く結果となった。癌細胞を取り巻く微小環境には様々な種類の細胞が存在する。代表的な細胞として癌関連線維芽細胞(Cancer-associated fibroblast; CAF)が挙げられる。CAFは癌細胞の増殖、浸潤・転移などに密接に関わる細胞として注目されている。CAFは正常臓器に存在する線維芽細胞のみならず脂肪細胞、血管内皮細胞、間葉系幹細胞(MSC)などから由来し、これらの細胞が腫瘍細胞からのTGF- β などのサイトカイン刺激を受けることによりCAFに変化すると考えられている(図上)。CAFは様々なサイトカインシグナルを介して血管新生、癌細胞の増殖、浸潤・転移、腫瘍免疫の抑制に関与しており癌の進展を強力にサポートしている(図下)。



CAFsの起源の一つである肺実質内の線維芽細胞は癌細胞の存在下で癌からの液性因子による刺激を受け、CAFsへ段階的に形質変化し、癌の進展に有利な形質を獲得すると推測される。逆にCAFsは癌細胞が不在となることで癌の進展に必要な形質を失い、正常の線維芽細胞に復帰すべく形質変化することが推測される。

2. 研究の目的

組織の線維芽細胞は癌細胞からの刺激に应答して自身の遺伝子情報、タンパク発現を段階的に変化させ、癌の浸潤・転移をサポートするCAFsへと変化することを証明する。また、具体的な変化を遺伝子レベル、タンパクレベルで明らかにし、標的分子の制御による癌組織内間質細胞の機能制御を介した、新たな癌治療法を開発する。

以下の3点を明らかにする:

- (1) 腫瘍内間質細胞(CAFs)における分子・細胞生物学的特性
- (2) 腫瘍内間質細胞(CAFs)の生物学的特性を規定する分子
- (3) 標的分子の制御によるCAFsの形質転換、並びに癌細胞の増殖や遊走機能への影

3. 研究の方法

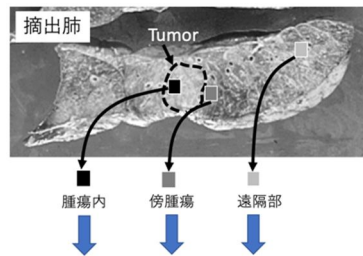
(詳しい方法は我々の論文 *J Surg Res.* 2015;200: 690-7 に記載あり)

- (1) 腫瘍内間質細胞(CAFs)における分子・細胞生物学的特性の解明

対照患者: 鹿児島大学呼吸器外科で肺葉切除術が施行された Invasive adenocarcinoma または

Squamous cell carcinoma(いずれもT1bN0M0以上)を対象(n=50)とする。

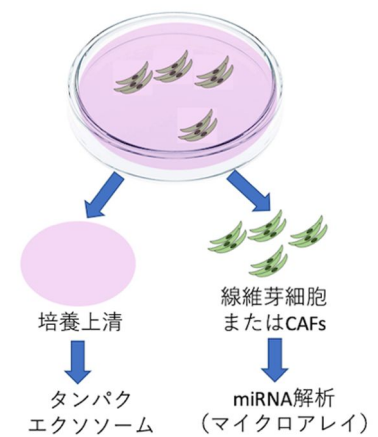
組織標本採取: 外科的に肺を摘出後、直ちに無菌状態で腫瘍、腫瘍に隣接する(辺縁から5-10 mm)肺実質、腫瘍から30 mm以上離れた肺実質をそれぞれ採取する(下図)。



間質細胞の培養増幅: 採取した組織片を約1 mm³の薄片に細切し、Fibronectin-Coating培養皿にて“Explant”として混合間質細胞を分離・培養し、これを一定期間継代培養して増幅させる。

培養増幅した間質細胞の特性について以下の解析を行う(右図):

- 細胞表面マーカー (CD45, CD86, CD90, CD105, CD206, SMA, PDGFR- α , FSP-1, Vimentin, Keratin-7) の発現をFlow CytometryおよびWBで定量解析する。
- 全RNAを分離し、遺伝子発現をRT2 Profiler PCR array および miRNA Arrayにより網羅的に解析する。
- 高速比重遠心法により培養上清中のエクソソームを分離し、その中に含まれるタンパクやmiRNAの発現をRT-PCRおよびWBで定量する。
- 細胞または培養上清中の成長因子(TGF-beta, VEGF, EGFなど)をELISAおよびWBで定量する。



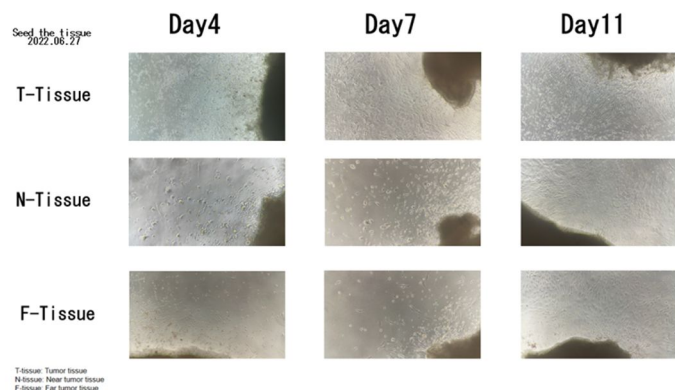
以上の解析により、腫瘍内間質細胞(CAFs)の特性を明らかにすることができる。

(2) 腫瘍内間質細胞(CAFs)の生物学的特性を規定する分子(2021年度)

癌細胞の存在しない環境下での腫瘍内混合間質細胞(CAFs)の長期間継代培養による CAFs の形質変化(p2 vs. p6 vs. p10)について、上述のと同様の解析により明らかにすることができる。

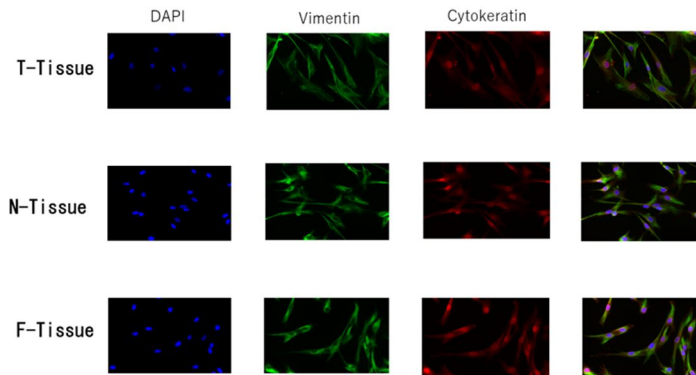
4. 研究成果

鹿児島大学呼吸器外科で肺葉切除術が施行された Invasive adenocarcinoma または Squamous cell carcinoma(いずれも T1bN0M0 以上)の検体を 35 症例収集した。検体採取と同時に癌組織の内部、近隣部、遠隔部の3箇所の新鮮組織標本を採取し、間質細胞を培養増幅させた。癌組織・癌近傍組織・遠隔部肺組織の培養を行い、間質細胞が組織より周囲への伸展が確認された。

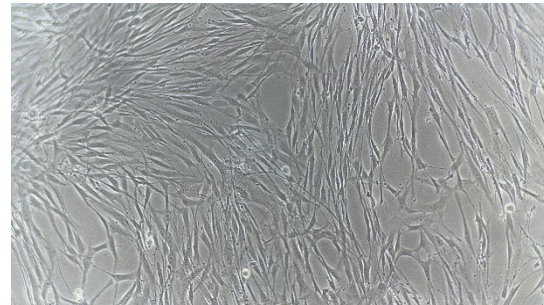


また、伸展した間質細胞を蛍光染色を行い Vimentin (+)、Cytokeratin () が確認された。

2023年4月時点で35症例が蓄積された。その大半が、肺腺癌が症例であった。



組織から伸展した間質細胞のみを採取し、組織がない状態で10回継代を繰り返した。間質細胞は癌組織由来、癌近傍組織由来、遠隔部組織由来でも問題なく、培養、継代可能であった。



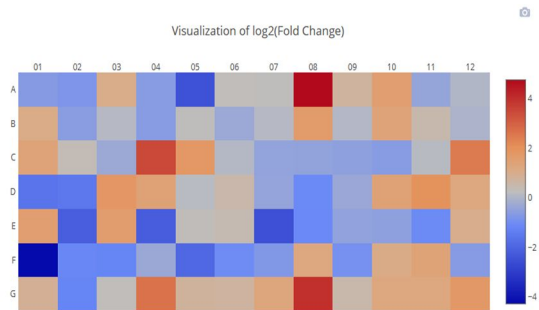
明らかな組織型の違いによる細胞伸展の違いは認めなかった。

肺腺癌症例の癌組織由来、癌近傍組織由来、遠隔部組織由来の継代2回目の間質細胞を用いて、接着分子・細胞外マトリックスに関連する遺伝子の発現をPCRアレイを用いて検索した。

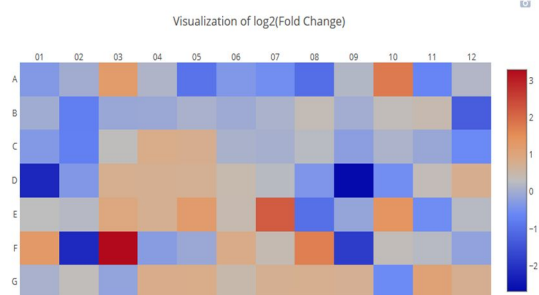
Array layout (96-well)

For 384-well 4 x 96 PCR arrays, genes are present in a staggered format. Refer to the *RT² Profiler PCR Array Handbook* for layout.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ADAMTS1	ADAMTS13	ADAMTS8	CD44	CDH1	CLEC3B	CNTN1	COL11A1	COL12A1	COL14A1	COL15A1	COL16A1
B	COL1A1	COL4A2	COL5A1	COL6A1	COL6A2	COL7A1	COL8A1	CTGF	CTNNA1	CTNNA3	CTNND1	CTNND2
C	DCM1	FN1	HAS1	ICAM1	ITGA1	ITGA2	ITGA3	ITGA4	ITGA5	ITGA6	ITGA7	ITGA8
D	ITGAL	ITGAM	ITGAV	ITGB1	ITGB2	ITGB3	ITGB4	ITGB5	KAL1	LAMA1	LAMA2	LAMA3
E	LAMB1	LAMB3	LAMC1	MMP1	MMP10	MMP11	MMP12	MMP13	MMP14	MMP15	MMP16	MMP2
F	MMP3	MMP7	MMP8	MMP9	NCAM1	PDCAM1	SEL2	SELL	SELP	SOX2	SPARC	SPG7
G	SPP1	TGFB1	THBS1	THBS2	THBS3	TIMP1	TIMP2	TIMP3	TNC	VCAM1	VCAN	VTN
H	ACTB	B2M	GAPDH	HPRT1	RPLP0	MGDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC



癌近傍組織由来の間質細胞



さらに3症例においても同様に PCR アレイを行った。

現在、COL11A1 に着目し、癌組織由来の間質細胞は遠隔部由来に比較し、高発現していたが、癌近傍組織由来では低発現であった。このことは癌の伸展・制御に関して重要な結果と踏まえている。今後は、組織間の発現の違いだけでなく、継代間でも発現の違いがないか引き続き研究を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------