

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17664

研究課題名（和文）大腸癌転移形成ニッチにおける線維芽細胞の役割

研究課題名（英文）Role of fibroblasts in the colorectal cancer metastasis niche

研究代表者

水越 幸輔（mizukoshi, kousuke）

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：20794605

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、大腸癌転移ニッチにおけるCAFの役割を明らかにするため、ヒト大腸癌部および非癌部より採取された検体を酵素処理後、primary cultureし、21症例のCAFおよびコントロールの線維芽細胞を樹立した。また、癌組織の一部を酵素処理し8症例の大腸癌オルガノイドも樹立した。免疫組織染色を施行し純度の高い線維芽細胞が樹立されていることが確認された。また、RNA-sequencingにより非癌部由来の対照線維芽細胞と比較して、CAFにおいて有意に発現が亢進している遺伝子が複数同定された。研究に必要な臨床サンプルからの線維芽細胞とヒト大腸癌オルガノイドの樹立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌死亡の90%は転移に起因しているが、転移のメカニズムは未だ明らかでない。大腸癌細胞が遠隔臓器に転移した後、癌細胞の増殖を促進するための微小環境（ニッチ）が形成されることが知られている。しかしながら、転移ニッチは血管構成細胞や炎症免疫細胞などの様々な非癌細胞より構成されており、癌細胞増殖に重要な遺伝子やシグナルの同定は不十分である。本研究では患者大腸癌よりCAFや癌オルガノイドを樹立しヒト大腸癌モデルを作製し、転移巣で形成されたニッチでの細胞-細胞相互作用や分子メカニズム調査することにより転移の機序を解明することが可能である。

研究成果の概要（英文）：In this study, in order to clarify the role of CAFs in the metastatic niche of colorectal cancer, we isolated CAFs and control fibroblasts after enzymatic treatment of specimens collected from human colorectal cancer and non-cancer areas in 21 colon cancer patients. We also established 8 colon cancer organoids by enzymatically treating a part of the cancer tissue. Immunohistochemical staining confirmed the establishment of highly pure fibroblasts. In addition, RNA-sequencing identified multiple genes that were significantly upregulated in CAFs compared to non-cancerous control fibroblasts. We have thus successfully established fibroblasts and human colon cancer organoids from clinical samples required for research.

研究分野：癌生物学

キーワード：大腸癌 癌微小環境 転移 オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

癌は全身に影響を及ぼす疾患として考えられている。近年、原発巣が産生する増殖因子であるサイトカインやエクソゾームが遠隔臓器に作用し、転移した癌細胞が生着しその増殖を支持するニッチを形成することが複数の動物モデルを使用した実験により示唆されている(McAllister SS, et al., Nat. Cell Biol.,16, 717-27, 2014)。転移ニッチは血管構成細胞、炎症免疫細胞や線維芽細胞などの様々な非癌細胞より構成されていることが知られている。これまでに乳癌細胞株を使用した肺転移ニッチに関する報告は複数あるが (Malanchi I., et al. Nature. 2012, 481, 85-9)、大腸癌の肝臓や肺転移ニッチに関する報告は僅かであり、転移巣で癌細胞がどのように増殖し悪性化するのかが不明な点が多い。このような背景のもと、本研究の目的は、転移巣で CAFs が集積されてどのように転移ニッチを形成し、癌細胞の増殖を促進するのか明らかにすることである。大腸癌細胞と CAFs の相互作用を分子レベルで解明し、抗転移治療の開発に役立てる計画である。

従来の研究では株化された細胞株が転移ニッチの研究に使用された。これらの癌細胞株は長期の研究室での培養過程において、特定の培養条件に適応し、生体内の患者癌の性質と異なったものに変化している可能性が危惧されている。研究代表者は手術により切除された患者大腸癌組織や培養患者大腸癌オルガノイドを使用して、肝臓や肺への自発転移を発症する patient-derived xenograft (PDX)モデルを作製し、大腸癌患者を模倣するマウスモデルを樹立した実績がある。この PDX モデルは従来の癌細胞を使用する場合と比較して、より生体内での癌に近い挙動を示すことが期待されている。

以上のことから本研究では、大腸癌 PDX モデルを使用し、CAFs の転移巣への集積、転移ニッチ形成、転移巣での癌細胞増殖の促進に寄与する遺伝子やシグナル伝達を同定する。そして前臨床マウスモデルを使用して新規転移ニッチ抑制治療への応用に役立てることを計画している。

以前より癌浸潤・転移を促進するプログラムとして完全型上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT)が広く知られている(Thiery, J.P., et al., (2009). Cell 139, 871-890.)。EMT が誘導されると上皮系の表現型を消失した癌細胞は細胞-細胞接着能を失い、単一の間葉系癌細胞としてその浸潤能を亢進し、遠隔臓器に転移し、間葉上皮移行 (mesenchymal-epithelial transition: MET)を介して上皮系の表現型が再誘導され転移巣を形成する。しかしながら、近年、EMT 非依存的に間葉系の表現型を介することなく上皮系癌細胞集団 (クラスター) が転移する説も報告されている (Cheung, K.J., and Ewald, A.J., Science 352, 167-169, 2016)。また、最近多くの患者癌において、partial (部分的) EMT を介して E-cadherin の弱陽性および間葉系の表現型を有した癌細胞 (epithelial-mesenchymal type: E/M type)が細胞-細胞接着能を維持したクラスターを形成し、浸潤・転移に寄与することも提唱されている (Nieto, M.A., et al., Emt: 2016. Cell 166, 21-45, 2016)。

研究代表者は CAFs が癌細胞に作用し partial EMT を誘導することにより、E/M type の癌細胞クラスター形成を促進することを推測している。この E/M type の癌細胞クラスターは浸潤能および apoptosis 抵抗性を亢進し、高転移性の表現型や治療抵抗性を示すことが推測される。本研究ではこの仮説を分子レベルで解明し、治療応用へ向けての基礎を構築する。

2. 研究の目的

癌死亡の 90%は転移に起因しているが、転移のメカニズムは未だ明らかでない。大腸癌細胞が遠隔臓器に転移した後、癌細胞の増殖を促進するための微小環境 (ニッチ) が形成されることが知られている。しかしながら、転移ニッチは血管構成細胞や炎症免疫

細胞などの様々な非癌細胞より構成されており、癌細胞増殖に重要な遺伝子やシグナルの同定は不十分である。研究代表者は、転移巣に存在する線維芽細胞 (carcinoma-associated fibroblasts: CAFs) が転移ニッチを形成し、癌細胞の増殖に重要な役割を演じていると推測している。研究代表者は、患者大腸癌を模倣した patient-derived xenograft (PDX)モデルを樹立し、単一癌細胞よりも上皮系/間葉系の性質を有した癌細胞集団がより顕著に転移を形成することを明らかにした実績がある。本研究では、大腸癌 PDX モデルを使用し、転移ニッチにおける CAFs の役割を明らかにし、転移巣での癌細胞増殖に必須な遺伝子やシグナル伝達を同定し、前臨床マウスモデルを使用した新規転移抑制治療の基礎を確立することを目標とする。

3. 研究の方法

本研究では転移性大腸癌を抑制する為に、(1) 大腸癌 PDX モデルを使用し、転移ニッチにおける CAFs の局在を明らかにする。(2) さらに、転移巣での CAFs による大腸癌細胞の増殖を促進する遺伝子やシグナル伝達を同定し、(3) 新規の抗転移癌治療法の基礎を前臨床マウスモデルを用いて確立する。

(1) ヒト大腸癌転移ニッチにおける CAFs の局在を明らかにする。

乳癌発症 transgenic mice で生じた肺転移巣ニッチにおける CAFs の存在は、他の研究グループにより既に報告がある (Malanchi I., et al. Nature. 2012, 481, 85-9)。実際に研究代表者らも、ヒト乳癌細胞株を免疫不全マウスに皮下移植した xenograft モデルにおいて、肺転移巣ニッチにおける CAFs の存在を、CAFs マーカーである FN (fibronectin), TN-C (tenascin-C), POSTN (periostin) や α -SMA (α -smooth muscle actin) 抗体を使用した免疫組織染色により確認した (未発表)。

本研究では、癌細胞株を使用することなく、大腸癌 PDX モデルを使用し患者大腸癌の転移ニッチにおける CAFs の役割を研究する。研究代表者らは 13 症例の大腸癌 PDX モデルマウスの樹立に成功し、その内 8 例は肝臓や肺への自発転移を示した。これらの大腸癌組織は凍結保存されており本研究に使用可能である。また、研究代表者は GFP でラベルされた培養大腸癌患者由来癌細胞オルガノイドを高度免疫不全マウスに同所および門脈より注入し、遠隔臓器に微小転移が形成されることを示した (Okazawa Y., Mizukoshi K., et al., J. Vis. Exp. 2018, 14, doi: 10.3791/57374)。

本研究では、上記の患者由来大腸癌オルガノイドを使用し高度免疫不全マウスに同所移植 2 か月後に生じる肝臓および肺転移巣における CAFs の局在を CAFs マーカーである FN, TN-C, POSTN や α -SMA 抗体を使用した免疫組織染色にて検証する。さらに、2-3 種類の違う患者由来の大腸癌オルガノイドを使用し同様の実験を試み、転移性の大腸癌細胞が肝臓や肺に CAFs の集積を促すか否かを検証する。

(2) CAFs による転移癌細胞の増殖促進作用の分子機構を調査する。

上記の課題 (1) において、もし転移ニッチにおいて CAFs が検出された場合は、転移癌細胞が転移ニッチ形成のために CAFs の集積を促すメカニズムを明らかにする。そのために、GFP 陽性大腸癌オルガノイドを高度免疫不全マウスに同所移植する。2 か月後に生じた肝臓および肺転移巣を collagenase 処理して single cell suspension にし、GFP 陽性大腸癌細胞を FACS sorting により単離する。同時に原発巣に存在する GFP 陽性大腸癌細胞も同様の処理により単離し、原発巣および転移巣に存在する大腸癌細胞の遺伝子プロファイル DNA マイクロアレイ解析により比較する。研究代表者は、転移巣への CAFs の集積を誘導する増殖因子やサイトカインの発現が、転移性大腸癌細胞で亢進していることを予想している。

(3) 大腸癌転移ニッチにおける CAFs を標的にした抗転移治療モデルの確立

上記の課題 (2) において、発現レベルの高い上位 3 種類の増殖因子やサイトカインの

候補遺伝子に対する shRNA を大腸癌オルガノイドに導入する。そして、これらのオルガノイドを高度免疫不全マウスに同所移植 1 - 2 か月後に肝臓や肺で形成される転移の大きさおよび CAFs の集積の程度を対照の GFP-shRNA が導入されたオルガノイドと比較する。研究代表者は、大腸癌細胞における候補遺伝子の発現抑制が、転移ニッチにおける CAFs の集積を阻害し、転移巣の増殖を抑制すると推測している。

さらに抗転移治療法を前臨床マウスモデルを使用して確立するために、GFP 陽性大腸癌オルガノイドが同所移植されたマウスに、候補遺伝子に対する機能抑制抗体を細胞移植後に腹腔内に投与し、30 日後に GFP 陽性転移巣のシグナルおよび CAFs の集積の程度を定量する。加えて、GFP 陽性大腸癌オルガノイドをマウスに経門脈的に注入して作製された実験的肝転移モデルにおいても、候補遺伝子の機能抑制抗体の投与群および非投与群で、GFP 陽性転移巣のシグナルおよび CAFs の集積の程度を評価する。効果がみられた抗体に対しては、ヒト化抗体の作製も検討する。

4. 研究成果

本研究では、大腸癌 patient-derived xenograft (PDX)モデルを使用し、転移ニッチにおける CAFs の役割を明らかにするため、ヒト大腸癌部および非癌部より採取された検体を酵素処理後、primary culture し、21 症例の CAFs およびコントロールの線維芽細胞を樹立した。また、癌組織の一部を酵素処理し 8 症例の大腸癌オルガノイドも樹立した。上皮細胞、間葉系細胞や血球系細胞に特異的な抗体を使用した免疫組織染色を施行し純度の高い線維芽細胞が樹立されていることが確認された。また、RNA-sequencing により非癌部由来の対照線維芽細胞と比較して、CAFs において有意に発現が亢進している遺伝子が複数同定された。現在 bioinformatic な解析を施行中である。研究に必要な臨床サンプルからの線維芽細胞とヒト大腸癌オルガノイドの樹立に成功した。

今後は CAFs と大腸癌オルガノイドの 3D 培養やマウスへの同所共移植モデルを作製し、転移ニッチにおける CAFs の役割を明らかにし、転移巣での癌細胞増殖に必須な遺伝子やシグナル伝達を同定し、新規転移抑制治療の基礎を確立することを目標とする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mizukoshi K, Okazawa Y, Haeno H, Koyama Y, Sulidan K, Komiyama H, Saeki H, Ohtsuji N, Ito Y, Kojima Y, Goto M, Habu S, Hino O, Sakamoto K, Orimo A.	4. 巻 146
2. 論文標題 Metastatic seeding of human colon cancer cell clusters expressing the hybrid epithelial/mesenchymal state	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Cancer	6. 最初と最後の頁 2547-2562
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.32672.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤祐子、目澤義弘、阿部雅明、陳 経権、水越幸輔、岡澤裕、坂本一博、折茂 彰
2. 発表標題 ヒト大腸癌オルガノイドと繊維芽細胞のマウス共移植モデルによる実験的CAFの作製
3. 学会等名 第33回日本消化器癌発生学会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------