

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08707

研究課題名（和文）消化器癌のリンパ節転移における細網線維芽細胞の意義と機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of reticulofibroblasts in lymph node metastasis of gastrointestinal cancer

研究代表者

谷 眞至（Tani, Masaji）

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：60236677

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）：大腸癌だけではなく、胃癌においても転移リンパ節のFRCが予後に影響を与えることが明らかとなり、様々な消化器癌において転移リンパ節に存在する細網線維芽細胞（Fibroblastic reticular cell：FRC）がリンパ節転移促進に寄与する可能性が示唆された。また、臨床検体を用いて腫瘍組織とその近傍の正常組織および転移リンパ節から線維芽細胞株を樹立したことにより、これらの局在の差がどのような機能の差を生むのかを解析することが可能となった。今後はFRCを標的とした消化器癌に対する新規治療戦略の開発を行っていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの転移先として最も一般的なリンパ節に存在するFRCががん進展に対しどのような機能を有しているかを臨床検体を用いて解析を行い、生体内でのがん悪性化に対するFRCの役割を解明することで、消化器癌に対する新規治療戦略の開発を目指すことが可能となった。

研究成果の概要（英文）：The prognostic impact of FRC in metastatic lymph nodes was found not only in colorectal cancer but also in gastric cancer, suggesting that fibroblastic reticular cells (FRC) in metastatic lymph nodes may contribute to lymph node metastasis promotion in various gastrointestinal cancers. The establishment of fibroblast cell lines from tumor tissue, adjacent normal tissue, and metastatic lymph nodes using clinical specimens made it possible to analyze how differences in their localization may lead to differences in function. In the future, they plan to develop novel therapeutic strategies for gastrointestinal cancers targeting FRC.

研究分野：消化器外科

キーワード：細網線維芽細胞 リンパ節転移 胃癌 予後

### 1. 研究開始当初の背景

がん治療において転移の制御は解決すべき喫緊の課題である。多くの癌腫でリンパ節転移は強い予後規定因子であり、リンパ節転移を制御することで、がん患者の予後の改善が期待される。上皮間葉移行 (EMT) や血管内浸潤、colonization など多段階のステップを経て、がん細胞は転移するが、血管内皮細胞、免疫担当細胞や線維芽細胞などで構成されるがん微小環境もがんの浸潤・転移に重要な因子である (Kalluri R et al, Nat Rev Cancer. 2006)。

これまでに血行性転移はさまざまな実験モデルから、血管新生阻害薬が臨床で成果を上げている。一方で、リンパ節は異物や細菌に対し免疫応答が行われる最初の場であるにもかかわらず、リンパ節転移機序に基づいた創薬は皆無である。リンパ節に存在する間葉系細胞である細網線維芽細胞 (Fibroblastic reticular cell; FRC) は傍皮質領域における 3 次元の骨格形成を担い、IL-7 や CCL19 を介して T 細胞の恒常性を維持し、感染から生体を防御している (Fletcher, Nat Rev Immunol. 2015)。しかし、FRC が免疫担当細胞として、どのようながん細胞との相互作用を有するかは明らかではない。

申請者らは原発巣でのがん先進部における線維化ががんの進展、転移に重要な役割を果たしているだけでなく、大腸癌の転移リンパ節における間質の線維化が予後不良因子であり、転移リンパ節の間質で増殖した細胞の多くが FRC であること (図 1,2) を報告した (D Ikuta, M Tani et al, Oncotarget 2018)。このことは転移リンパ節において FRC とがん細胞の相互作用が予後因子として重要であることを示唆するが、がん細胞に対する分子生物学的機序は未だ明らかではない。そこで申請者らは、「がん細胞に対する FRC はどのような分子生物学的機序で予後因子として関わっているのか?」という問いを解明すべく、本研究をスタートさせた。

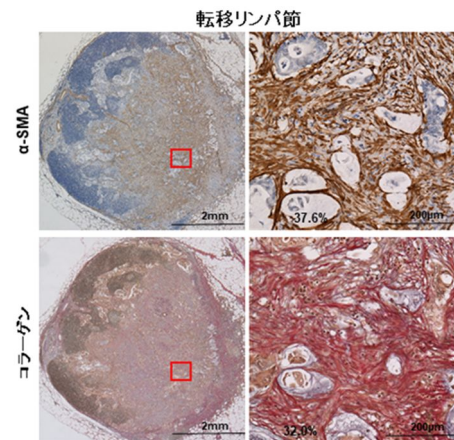


図 1. 転移リンパ節の -SMA(上)とコラーゲン(下)の発現。

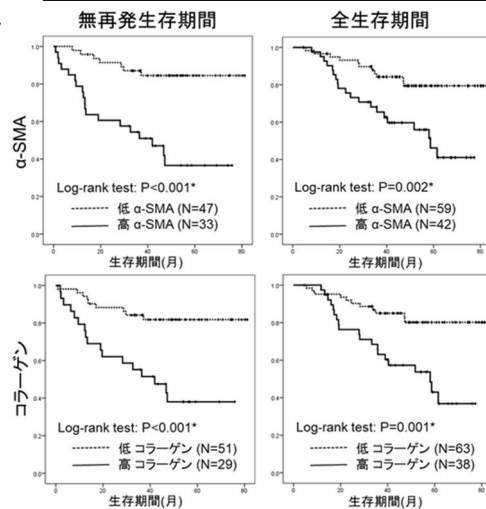


図 2. 転移リンパ節における -SMA(上)とコラーゲン(下)の発現による生存曲線。線維化が強いと生存率が低下した。

### 2. 研究の目的

多くの癌腫で強い予後規定因子となるリンパ節転移であるが、リンパ節転移におけるがん細胞以外の様々な細胞の役割については未だに解明されておらず、リンパ節転移機序に基づいた治療戦略も確立されていない。申請者らは、先行研究から大腸癌において転移リンパ節に存在する FRC がリンパ節転移に寄与する可能性を見出した。本研究では、がんの転移先として最も一般的なリンパ節に存在する FRC ががん進展に対しどのような機能を有しているかを臨床検体を用いて解析を行い、生体内でのがん悪性化に対する FRC の役割を解明することで、消化器癌に対する新規治療戦略の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 胃癌における転移リンパ節の線維化量と予後の関連性の検討

2011-2016 年に当院で胃癌に対しリンパ節郭清を伴う胃切除術を施行し、病理学的にリンパ節転移陽性と診断された症例 84 例の臨床検体を用いて、後方視的に転移リンパ節組織における線維化量と腫瘍学的因子および予後との関連を検討する。転移リンパ節組織における線維化量については -SMA の免疫染色を用いて測定する。癌を含むリンパ節のうち最大径のものから、腫瘍部分をランダムに 3 か所選択し、Image J を用いて aSMA 陽性部分の面積の割合を算出する。ROC 曲線から全生存期間に対する線維化量のカットオフ値を算出し、それを用いて転移リンパ節高線維化群と低線維化群に分け、腫瘍学的因子や予後につい

て比較検討を行う。

(2) 胃癌もしくは大腸癌患者の切除直後の臨床検体から胃もしくは大腸の正常組織と癌組織、転移リンパ節組織を採取し、正常部分由来線維芽細胞と腫瘍部分由来線維芽細胞、転移リンパ節由来線維芽細胞を樹立する。採取した各検体を細かく裁断し、コラゲナーゼとDNase I を用いて溶解して培養器に播種し、増殖と継代を行い、10 回以上継代可能な細胞株の第 6 代培養までを実験に用いる。

#### 4. 研究成果

(1) リンパ節陽性胃癌症例において、転移リンパ節の線維化量の平均値は 8.47 % (最低値 0.06 % - 最大値 40.01%) であり、症例によって転移リンパ節における線維化量が大きく異なることがわかった。ROC 曲線から癌特異的生存期間に対する転移リンパ節の線維化量のカットオフ値を算出すると 6.09 % となり、これを用いて転移リンパ節高線維化群と低線維化群に分け、腫瘍学的因子や予後について両群間で比較検討を行ったところ、年齢、性別、術前化学療法、術後補助化学療法の有無に有意差はなく、転移リンパ節高線維化群では、ステージが高く、洗浄腹水細胞診陽性や R2 切除が多かった(表 1)。また、代表的な予後不良因子の検討では、病変占拠部位、分化度に有意差はなく、深達度、リンパ節転移、リンパ管侵襲、血管侵襲は高線維化群で多い結果となった(表 1)。次に、R2 切除となった症例を除き、無再発生存期間と全生存期間を算出すると、無再発生存期間(Log-rank test,  $p = 0.178$ ) に関しては有意差を認めなかったが、全生存期間(Log-rank test,  $p = 0.045$ ) に関しては低線維化群で延長を認めた(図 3)。

(2) 胃癌切除患者の臨床検体から採取した線維芽細胞については、正常部分と腫瘍部分からそれぞれ 2 例の線維芽細胞と、転移リンパ節から 1 例の FRC の細胞株樹立に成功し、大腸癌切除患者の臨床検体から採取した線維芽細胞については、正常部分から 3 例、腫瘍部分から 2 例の線維芽細胞と、転移リンパ節から 2 例の FRC の細胞株樹立に成功した。今後これらの線維芽細胞および FRC を用いて、遺伝子解析や癌細胞との相互作用の実験を進めていく。

以上が今回の研究成果である。今回の研究で大腸癌だけではなく、胃癌においても転移リンパ節の FRC が予後に影響を与えることが明らかとなり、様々な消化器癌において転移リンパ節に存在する FRC がリンパ節転移促進に寄与する可能性が示唆された。また、臨床検体を用いて腫瘍組織とその近傍の正常組織および転移リンパ節から線維芽細胞株を樹立したことにより、これらの局在の差がどのような機能の差を生むのかを解析することが可能となった。今後は解析を進め、FRC の腫瘍進展における役割を解明し、消化器癌に対する新規治療戦略の開発を行なっていく。

	低線維化群 n = 43	高線維化群 n = 41	P-value
年齢	68.0 (57.5-78.0)	67.0 (62.0-74.0)	0.872
性別 男 / 女	28 (65%)/15 (35%)	27 (66%)/14 (34%)	0.944
線維化量, %	1.58 (0.70-3.52)	12.96 (9.05-18.87)	<0.001
術前化学療法	7 (16.3%)	11 (26.8%)	0.242
pStage I/II/III/IV	2/7/27/7	2/7/12/20	0.007
洗浄腹水細胞診陽性	3 (7.0%)	13 (31.7%)	0.005
根治度 R0/R1/R2	39/4/0	22/7/13	<0.001
術中温熱化学療法	24 (55.8%)	26 (63.4%)	0.481
術後補助化学療法	38 (88.4%)	33 (80.5%)	0.321
腫瘍部位 上部/中部/下部	14/12/17	6/13/22	0.147
分化度			0.19
Differentiated	32 (74.4%)	25 (61.0%)	
Undifferentiated	11 (25.6%)	16 (39.0%)	
深達度 (pT)			0.062
1	6 (14.0%)	2 (4.9%)	
2	0	4 (9.8%)	
3	13 (30.2%)	8 (19.5%)	
4	24 (55.8%)	27 (68.9%)	
リンパ節転移 (pN)			0.028
1	8 (18.6%)	6 (14.6%)	
2	22 (51.2%)	11 (26.8%)	
3	13 (30.2%)	24 (58.5%)	
リンパ管侵襲	20 (46.5%)	30 (73.2%)	0.012
血管侵襲	12 (27.9%)	23 (56.1%)	0.009

Median (IQR)

表 1. 胃癌転移リンパ節高線維化群と低線維化群における患者背景と予後規定因子の比較。

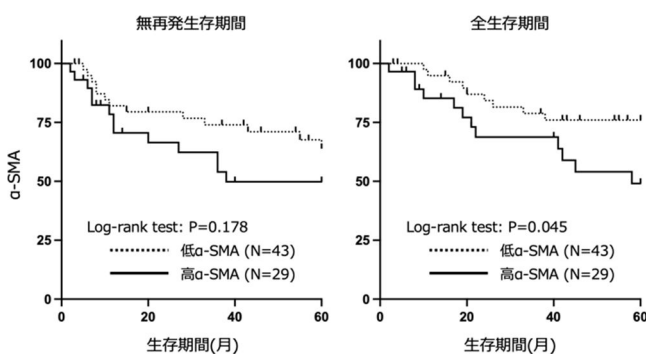


図 3. 胃癌転移リンパ節における α-SMA の発現による生存曲線。転移リンパ節での線維化が強いと生存率が低下した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Hexun Zhang, Miyake Toru, Maekawa Takeru, Mori Haruki, Yasukawa Daiki, Ohno Masashi, Nishida Atsushi, Andoh Akira, Tani Masaji	4. 巻 72
2. 論文標題 High abundance of Lachnospiraceae in the human gut microbiome is related to high immunoscores in advanced colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 315 ~ 326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-022-03256-8	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 -

1. 著者名 Maekawa Takeru, Miyake Toru, Tani Masaji, Uemoto Shinji	4. 巻 12
2. 論文標題 Diverse antitumor effects of ascorbic acid on cancer cells and the tumor microenvironment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 981547-981547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2022.981547	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森 治樹, 三宅 亨, 前平 博充, 飯田 洋也, 新田 信人, 前川 毅, 仁科 勇佑, 貝田 佐知子, 竹林 克士, 谷 眞至
2. 発表標題 膵癌における予後予測マーカーとしてのImmunoscoreの有用性
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田 聡, Sihombing Andreas M., 竹林 克士, 児玉 泰一, 徳田 彩, 下地 みゆき, 貝田 佐知子, 三宅 亨, 森 治樹, 山口 剛, 小島 正継, 前平 博充, 飯田 洋也, 谷 眞至
2. 発表標題 CD44陽性癌細胞の腫瘍造成能と術後腹膜再発との関連
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 前川 毅, 三宅 亨, 谷 眞至, 上本 伸二
2. 発表標題 膵癌におけるアスコルビン酸とアルカリ化によるHIF1 の制御と腫瘍抑制効果の検討
3. 学会等名 第81回日本癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 磯村 久徳, 森 治樹, 梶野 泰祐, 阿部 雄一, 三宅 亨, 谷 眞至, 田口 歩
2. 発表標題 高腹膜播種転移マウス大腸癌細胞株のマルチオミクス解析による大腸癌腹膜播種転移機構の解明
3. 学会等名 第81回日本癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田 聡, シホンピング・アンドレアス・マイケル, 竹林 克士, 児玉 泰一, 北村 直美, 小島 正継, 森 治樹, 北村 美奈, 徳田 彩, 三宅 亨, 目片 英治, 谷 眞至
2. 発表標題 ヒト膵臓がん細胞株T3M4を用いたCD44およびMGST1の発現と細胞死における温熱作用の影響
3. 学会等名 第81回日本癌学会総会
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
研究 分担者	前平 博充  (Maehira Hiromitsu)  (30564918)	滋賀医科大学・医学部・助教    (14202)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	飯田 洋也  (Iida Hiroya)  (30733901)	滋賀医科大学・医学部・非常勤講師    (14202)	
研究分担者	竹林 克士  (Takebayashi Katsushi)  (70452240)	滋賀医科大学・医学部・助教    (14202)	
研究分担者	三宅 亨  (Miyake Toru)  (70581924)	滋賀医科大学・医学部・講師    (14202)	

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