

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19535

研究課題名（和文）血行性がん転移における循環クラスターニッチの全貌解明

研究課題名（英文）Elucidation of circulating cluster niche for hematogenous metastasis

研究代表者

石本 崇胤（Ishimoto, Takatsugu）

熊本大学・病院・特任准教授

研究者番号：00594889

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：循環腫瘍細胞（CTCs）が血小板・マクロファージ・線維芽細胞などの非がん細胞とクラスターを形成する意義を明らかにすることを目的として研究をおこなった。転移を有する胃癌患者の血液および血行性がん転移マウスモデルの血液中にがん細胞と非がん細胞のクラスターを検出した。抗血小板抗体を用いてクラスターを破壊すると、有意に血行性転移が抑制されることを証明した。さらに生体イメージング技術を用いて、血管内を循環するCTCクラスターを撮影し、その存在を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血行性がん転移に関する研究は長年にわたり行われてきたが、未だ転移を制御するまでに至っていない。本研究によって循環腫瘍細胞（CTCs）クラスターの形成が血行性転移形成に重要な意義を有していることが明らかになり、血行性転移や再発のバイオマーカーとしての循環腫瘍細胞（CTCs）検出に留まらず、がん細胞の生存をサポートするCTCクラスターを制御することで再発・転移を抑制する革新的な治療法開発に繋がることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the significance of circulating tumor cells (CTCs) forming clusters with non-cancer cells such as platelets, macrophages, and fibroblasts. Clusters of cancer and non-cancer cells were detected in the blood of gastric cancer patients with distant metastasis and in a mouse model of hematogenous cancer metastasis. We demonstrated that disruption of the clusters with anti-platelet antibodies significantly suppressed hematogenous metastasis. Moreover, using in vivo imaging techniques, we captured CTC clusters circulating in blood vessels and showed their presence.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：血行性がん転移 CTCs 血小板 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

血行性がん転移に関する研究は長年にわたり行われてきたが、未だ転移を制御するまでに至っていない。これまでがん細胞に起こる Epithelial Mesenchymal Transition (EMT)/ Mesenchymal Epithelial Transition (MET)は転移巣形成に重要な特性変化として報告されてきた。しかし、がん細胞が血行性に転移するプロセスにおいて循環する血液内でシングルセル状態のがん細胞が生存し、転移臓器で増殖・コロニーを形成するのは極めて困難である。近年の知見では循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cells: CTCs) は血小板・マクロファージなどの非がん細胞とクラスターを形成し、ホストの免疫や様々なストレスを回避していることが示唆されていたが、CTCs を包み込むクラスターニッチの本質的意義は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

独自に開発したアプタマー修飾フィルターを用いて、循環血液中の CTC クラスターを捕捉しクラスターニッチの全貌を明らかにすることであった。

3. 研究の方法

(1) 血行性がん転移マウスモデルおよび転移巣の評価系の確立

(2) 独自に開発したアプタマー修飾フィルターを用いて胃癌患者と血行性がん転移マウスモデルにおける CTC クラスターの検出

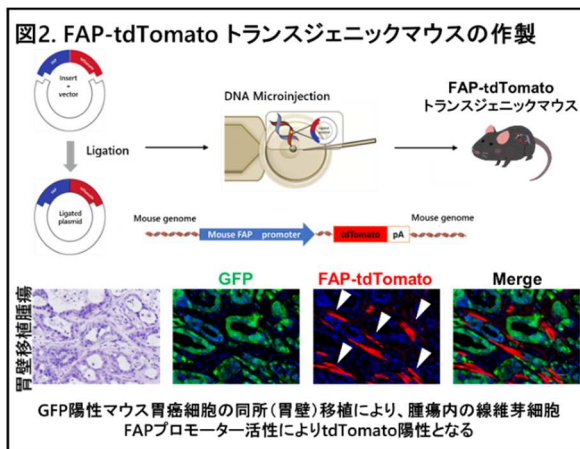
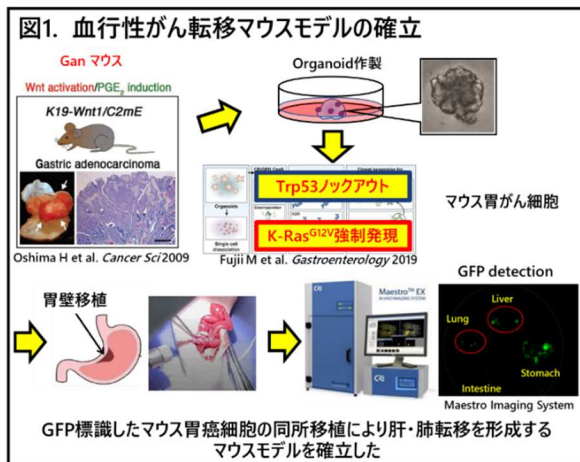
(3) 二光子顕微鏡を用いて CTCs を観察するために生体イメージング法の確立

4. 研究成果

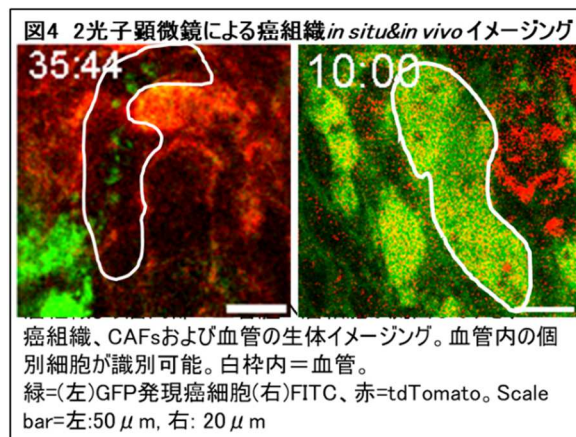
(1) マウス胃癌細胞 (DT-p53KO-KRASm-IB-LUC) を用いた胃壁への同所移植により肝・肺への血行性転移を形成する系を確立している。マウス胃癌細胞はレポータータンパク質として GFP を発現しており、胃壁移植から 2 8 日後に Maestro イメージングシステムを用いて転移巣を検出している (図 1)。これまでの結果から WT-C57BL6 マウスへの移植をおこなった場合、2 8 日後の肝転移陽性率は約 5 0 % であるのに対して、肺転移陽性率は 20% 以下であることを明らかにした。

(2) フィルターの孔径を 10um-50um の様々な条件で作製し、胃癌細胞株とともに健康人の血液をフィルターに送液し、CTCs 捕捉のために最適な孔径の検討をおこなった。さらにフィルターの表面を EpCAM に特異的なアプタマーで修飾し、がん細胞を効率よくフィルターにトラップできることを確認した。CTC クラスターをトラップするため、孔径の大きなフィルターを同時に準備し、シングルセル CTCs と CTC クラスターを同時に捕捉するために最適なフィルター条件を同定した。その結果、転移を有する胃癌患者の血液および血行性がん転移マウスモデルの血液中にがん細胞と非がん細胞のクラスターを検出した。

(3) 線維芽細胞は活性化により FAP (fibroblast activation protein) 発現が陽性となることが知られており、FAP 陽性線維芽細胞はコラーゲンの産生量が顕著に上昇するため、臓器の線維化や癌進展と深く



関わると考えられている。研究代表者らは、線維芽細胞の活性化マーカーである FAP に着目して、赤色のタグ付けにより全身の FAP 陽性線維芽細胞が発色するマウス (FAP-Td tomato mouse) を新規に作製した (図 2)。これまでの研究により、2 光子顕微鏡下における胃壁および移植細胞の acute 観察モデル系を確立した (図 3)。高速撮影可能な resonant-scanner 搭載 2 光子顕微鏡 (60-120 枚/秒) を用いることで、周囲組織および血管内をシングルセル解像度で撮影することを可能としている。GFP でラベルされた癌細胞および tdTomato でラベルされた CAFs、血流を同時にイメージングすることに成功している (図 4)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Wei F, Uchihara T, Yonemura A, Yasuda Yoshihara N, Yasuda T, Semba T, Fukuda M, Akiyama T, Kitamura F, Bu L, Hu X, Fu L, Zhang J, Kariya R, Yamasaki J, Aihara K, Yamashita K, Nagano O, Okada S, Baba H, Ishimoto T	4. 巻 -
2. 論文標題 A novel tdTomato transgenic mouse model to visualize FAP positive cancer associated fibroblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16712	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akiyama T, Yasuda T, Uchihara T, Yasuda-Yoshihara N, Tan Benjy J.Y., Yonemura A, Semba T, Yamasaki J, Komohara Y, Ohnishi K, Wei F, Fu L, Zhang J, Kitamura F, Yamashita K, Eto K, Iwagami S, Tsukamoto H, Umemoto T, Masuda M, Nagano O, Satou Y, Saya H, Tan P, Baba H, Ishimoto T	4. 巻 83
2. 論文標題 Stromal Reprogramming through Dual PDGFR / Blockade Boosts the Efficacy of Anti-PD-1 Immunotherapy in Fibrotic Tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 753 ~ 770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-22-1890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Bu L, Yonemura A, Yasuda Yoshihara N, Uchihara T, Ismagulov G, Takasugi S, Yasuda T, Okamoto Y, Kitamura F, Akiyama T, Arima K, Itoyama R, Zhang J, Fu L, Hu X, Wei F, Arima Y, Moroishi T, Nishiyama K, Sheng G, Mukunoki T, Otani J, Baba H, Ishimoto T	4. 巻 113
2. 論文標題 Tumor microenvironmental 15 PGDH depletion promotes fibrotic tumor formation and angiogenesis in pancreatic cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3579 ~ 3592
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15495	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Fu Lingfeng, Yonemura Atsuko, Yasuda-Yoshihara Noriko, Umemoto Terumasa, Zhang Jun, Yasuda Tadahito, Uchihara Tomoyuki, Akiyama Takahiko, Kitamura Fumimasa, Yamashita Kohei, Okamoto Yuya, Bu Luke, Wei Feng, Hu Xichen, Liu Yang, Ajani Jaffer A., Tan Patrick, Baba Hideo, Ishimoto Takatsugu	4. 巻 25
2. 論文標題 Intracellular MUC20 variant 2 maintains mitochondrial calcium homeostasis and enhances drug resistance in gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 542 ~ 557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-022-01283-z	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 該当する

1. 著者名 Kumar V, Ramnarayanan K, Sundar R, Padmanabhan N, Srivastava S, Koiwa M, Yasuda T, Koh V, Huang Kie K, Tay Su T, Ho Shamaine Wei T, Tan Angie Lay K, Ishimoto T, Kim G, Shabbir A, Chen Q, Zhang B, Xu S, Lam Kong-P, Lum Huey Yew J, Teh M, Yong Wei P, So Jimmy Bok Y, Tan P	4. 巻 12
2. 論文標題 Single-Cell Atlas of Lineage States, Tumor Microenvironment, and Subtype-Specific Expression Programs in Gastric Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 670 ~ 691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2159-8290.CD-21-0683	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 該当する

1. 著者名 Yamasaki Juntaro, Hirata Yuki, Otsuki Yuji, Suina Kentaro, Saito Yoshiyuki, Masuda Kenta, Okazaki Shogo, Ishimoto Takatsugu, Saya Hideyuki, Nagano Osamu	4. 巻 113
2. 論文標題 MEK inhibition suppresses metastatic progression of KRAS mutated gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 916 ~ 925
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Itoyama R, Yasuda-Yoshihara N, Kitamura F, Yasuda T, Bu L, Yonemura A, Uchihara T, Arima K, Hu X, Jun Z, Okamoto Y, Akiyama T, Yamashita K, Nakao Y, Yusa T, Kitano Y, Higashi T, Miyata T, Imai K, Hayashi H, Yamashita YI, Mikawa T, Kondoh H, Baba H, Ishimoto T	4. 巻 523
2. 論文標題 Metabolic shift to serine biosynthesis through 3-PG accumulation and PHGDH induction promotes tumor growth in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 29 ~ 42
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2021.09.007	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 Izumi D, Zhu Z, Chen Y, Toden S, Huo X, Kanda M, Ishimoto T, Gu D, Tan M, Koder Y, Baba H, Li W, Chen J, Wang X, Goel A	4. 巻 4
2. 論文標題 Assessment of the Diagnostic Efficiency of a Liquid Biopsy Assay for Early Detection of Gastric Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JAMA Network Open	6. 最初と最後の頁 2121129 ~ 2121129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1001/jamanetworkopen.2021.21129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yasuda T, Koiwa M, Yonemura A, Akiyama T, Baba H, Ishimoto T	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol to establish cancer-associated fibroblasts from surgically resected tissues and generate senescent fibroblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100553 ~ 100553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100553	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasuda T, Koiwa M, Yonemura A, Miyake K, Kariya R, Kubota S, Yokomizo-Nakano T, Yasuda-Yoshihara N, Uchihara T, Itoyama R, Bu L, Fu L, Arima K, Izumi D, Iwagami S, Eto K, Iwatsuki M, Baba Y, Yoshida N, Ohguchi H, Okada S, Matsusaki K, Sashida G, Takahashi A, Tan P, Baba H, Ishimoto T	4. 巻 34
2. 論文標題 Inflammation-driven senescence-associated secretory phenotype in cancer-associated fibroblasts enhances peritoneal dissemination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108779 ~ 108779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.108779	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yasuda Tadahito, Ishimoto Takatsugu, Baba Hideo	4. 巻 17
2. 論文標題 Conflicting metabolic alterations in cancer stem cells and regulation by the stromal niche	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 8 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2021.01.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takatsugu Ishimoto
2. 発表標題 Single-cell proteomic profiling of malignant ascites in gastric cancer reveals the microenvironment promoting peritoneal dissemination
3. 学会等名 JSPS Core-to-Core Program A. Mini-Symposium 「Applications of mass cytometry in basic and clinical research」 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takatsugu Ishimoto
2. 発表標題 Single-cell proteomic profiling of malignant ascites in gastric cancer reveals the microenvironment promoting peritoneal dissemination
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会、フォーラム2F-07 「個体レベルの生命科学の創発」 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石本 崇胤
2. 発表標題 PDGFR阻害によるスキルス胃癌間質リプログラミングを介した複合がん免疫療法
3. 学会等名 第33回日本消化器癌発生学会総会 シンポジウム1 「免疫を考慮した消化器癌研究」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石本 崇胤
2. 発表標題 スキルス胃癌免疫微小環境リモデリングによる治療戦略
3. 学会等名 第93回日本胃癌学会総会、ワークショップ6 「胃癌における微小環境の分子機序の解明と臨床的意義」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石本 崇胤
2. 発表標題 複合がん免疫療法に向けたスキルス胃癌間質リプログラミング分子基盤の解明
3. 学会等名 第29回JDDW 2021シンポジウム8「がん微小環境を標的とした消化器がん治療の新展望」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takatsugu Ishimoto
2. 発表標題 Extracellular vesicles from cancer-associated fibroblasts induce drug resistance.
3. 学会等名 34th Workshop of the European Helicobacter and Microbiota Study Group (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021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	中島 雄太 (Nakashima Yuta) (70574341)	熊本大学・大学院先端科学研究部(工)・准教授 (17401)	
研究分担者	北村 裕介 (Kitamura Yusuke) (80433019)	熊本大学・大学院先端科学研究部(工)・助教 (17401)	

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			
シンガポール	Duke-NUS Medical School			
米国	MD-Anderson Cancer Center			