

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890106

研究課題名（和文） 腫瘍微小環境を標的とした肺癌治療

研究課題名（英文） Therapeutic perspective of tumor microenvironment in non-small-cell lung cancer.

研究代表者

新谷 康 (Yasushi Shintani)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90572983

研究成果の概要（和文）：

癌を取り巻く間質や細胞は、腫瘍の微小環境に寄与し、腫瘍の進展に深く影響している。我々は、癌細胞とその微小環境との関わりを標的とした癌治療の開発を目的とした研究を進めてきた。上皮細胞が極性を失って運動性が亢進し間葉系の形質を獲得する上皮間葉転換 EMT に注目し、肺癌細胞は、腫瘍間質や成長因子によって EMT が誘導され、浸潤・転移能を獲得し、さらに抗癌剤や分子標的薬への耐性を獲得することを発見した。

研究成果の概要（英文）：

Our recent focus has been signaling pathways that promote Epithelial to mesenchymal transition (EMT) in response to tumor microenvironment such as growth factors as well as extracellular matrix. Tumor stroma in non-small cell lung cancer (NSCLC) is of interest in the entity as both biomarkers and therapy targets. We can assume that anticancer therapeutics targeting EMT pathways and signaling elements will bring additional ways for the treatment of NSCLC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,230,000	369,000	1,599,000
2011 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,280,000	684,000	2,964,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：胸部外科学

キーワード：肺癌、癌微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、癌微小環境の機能調節に重要な役割を果たしている上皮間葉転換 EMT (Epithelial Mesenchymal Transition) に注目し、肺癌周囲間質 tumor stroma に含まれる EGF、FGF、KGF や TGF- $\beta$  などの増殖因子や collagen から誘導される EMT シグナル伝達経路について報告してきた。EMT とは、上皮細胞が上皮としての形質を失い、線維芽細胞などの間

葉系の形質を獲得する現象であり、細胞極性の消失、細胞間接着の減少、細胞遊走能の亢進、アクチン系細胞骨格の改築を特徴とする。間葉系の形質を得た癌細胞は、より遊走能を獲得し、浸潤、転移を起こす。我々は、TGF- $\beta$  や I 型 Collagen による EMT シグナルを明らかにし、EMT を抑制することで EMT を制御し、癌細胞の浸潤能、転移能が低下することを報告してきた。

一方、癌幹細胞は抗癌剤や放射線治療に抵抗性であり、治療によって腫瘍が縮小しても、死滅しているのは分化した癌細胞だけで、癌幹細胞は生き残って再発・転移を起こし得るとされる。さらに、癌幹細胞は、特別な微小環境 niche 内で休眠状態として存在しているため、増殖する細胞を標的とする従来の癌治療は効果が少ない。最近、EMT が癌幹細胞様形質獲得に重要な役割を果たす可能性が報告され始めた。

## 2. 研究の目的

EMT シグナルを制御することで肺癌を dormant な状態に維持することができれば、外科治療や放射線治療といった局所制御、全身治療である抗癌剤に加える有用な癌治療法になると考えられる。本研究の目的は、癌微小環境を調節する EMT の関連シグナル分子を明らかにし、癌細胞の EMT を制御することであり、新たな癌治療の開発につながると考えている。さらには、EMT と癌幹細胞様形質転換についての関連を明らかにし、癌の治療抵抗性についての分子機構を明らかにしたい。薬剤耐性を生じやすい癌細胞に比較して、間質細胞や間質成分を標的とした場合には治療抵抗性を生じにくいと予測され、既存の癌治療に多大な相乗効果を見込めると期待される。

## 3. 研究の方法

肺癌周囲の間質 tumor stroma を形成する微小環境に注目し、癌細胞と周囲の間質細胞や細胞外基質のクロストークを解析する。中でも、癌細胞の EMT 誘導・癌幹細胞様形質転換における線維芽細胞(Cancer associated fibroblast: CAF)との役割を明らかにし、そのシグナル伝達経路を制御することで癌細胞の悪性を抑制できるか検討する。

(1)細胞株を用いた肺癌微小環境の再現：肺癌細胞株、肺癌関連線維芽細胞株 CAF を用いて、共培養を行い、EMT 関連分子の変化を解析した。共培養には、液性因子が往来できるフィルター付のチャンバーを用いた。

(2)肺切除標本を用いた肺癌微小環境の再現：術前に Informed Consent を得られた症例の肺癌切除標本から肺癌細胞、間質細胞を採取し、実験材料を得た。

(3)癌微小環境による肺癌細胞変化の解析：肺癌細胞と CAF 間のシグナル伝達経路を明らかにするために、強力な EMT 誘導因子である TGF- $\beta$  に注目し、その inhibitor SB431542 を用いて TGF- $\beta$  シグナルを抑制することで生じる現象を調べた。

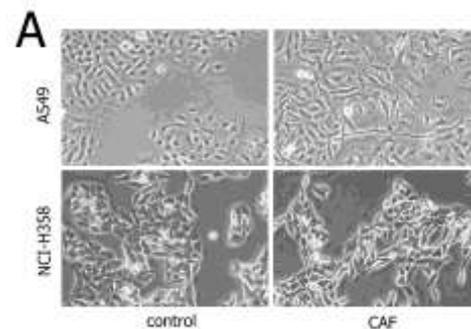
(4)癌細胞による間質細胞変化の解析：癌細胞と接触させた癌間質細胞の変化を解析した。間質細胞が産生する TGF- $\beta$ , EGF, FGF, VEGF, コラーゲンなどの EMT 誘導因子や IL-6, IL-10, CSF-1, Chemokine ligand (CCL)などのサイトカインを測定し、癌浸潤の場をいかに提供するのかを明らかにした。

(5)マウス共接種モデルを用いた癌微小環境の解析：肺癌細胞と間質細胞を同時にヌードマウスに接種する共接種モデルを用いて、癌微小環境を生体内で再現した。形成する腫瘍のサイズ、マウスの生存、また腫瘍を形態や免疫組織学的に解析した。

(6)肺癌の臨床検体における EMT 誘導と治療抵抗性獲得の解明：放射線化学療法後の残存病巣において EMT が誘導され、EMT マーカーが再発予測因子となりえるかどうかを検討した。放射線化学療法後に肺切除を施行した症例を対象とし、術前生検組織と切除標本が比較できた42例の上皮マーカー(AE1/AE3, E-cadherin)と間葉系マーカー(N-cadherin, Vimentin)を免疫染色で評価した。同時期の EF3 症例 18 例は解析から除外した。

## 4. 研究成果

(1)肺癌細胞は、肺癌関連線維芽細胞株 CAF との共培養によって、上皮様形態から Spindle な細胞に変化し、E-cadherin などの上皮系マーカーは減少し N-cadherin や Vimentin などの間葉系マーカーが上昇した。



遊走能を Boyden Chamber assay により測定したところ、CAF の上清での刺激で遊走が上昇し、さらに CAF の上清を加えることで抗癌剤や分子標的薬への耐性を獲得した。また足場非依存的培養で CAF の上清の有無で分けたところ、sphere 形成能が CAF の上清の存在下で高くなっていることがわかった。以上より、CAF から分泌された液性因子によって癌細胞で EMT が誘導されることが明らかになった。また CAF の上清によって EMT を誘導することによって癌幹細胞形質を獲得する可能性が示唆された。実際、CAF の上清によって EMT を誘導することで、癌細胞における CD44, Bmi1 などの幹細胞マーカー発現が上昇した。

(2)手術標本から腫瘍周囲の癌関連線維芽細胞 CAF を初代培養し、癌細胞株と共培養したところ、①と同様に EMT が誘導された。この現象は、同時期に初代培養で得られた正常肺線維芽細胞 NF と共培養した場合よりも EMT 誘導が迅速であり、CAF から分泌される液性因子の方が、NF に比して EMT 誘導効果が強いことが示された。

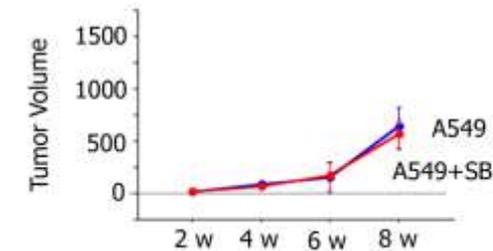
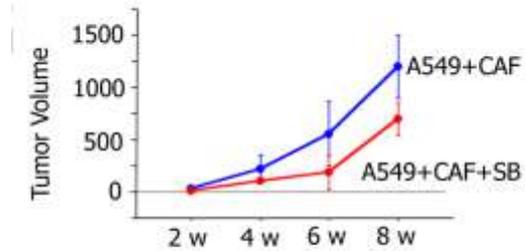
(3)TGFR inhibitor (SB43154)によって、①や②で誘導された EMT が抑制されることから、CAF-癌細胞の相互作用には TGF-βシグナルが関与することが判明した。さらに、TGFR inhibitor によって、抗癌剤や分子標的薬に対する感受性が上昇し、sphere 形成能も抑制されることから、TGF-βシグナルは癌幹細胞形質獲得にも関与していると考えられた。



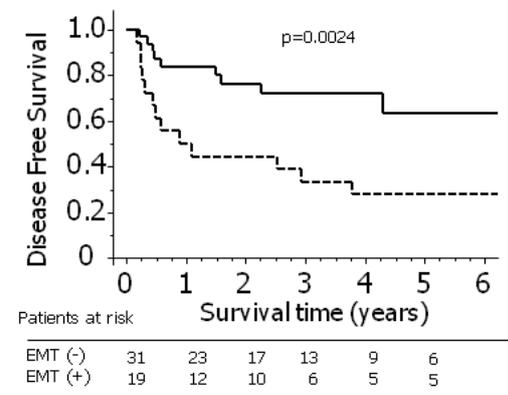
(4)肺癌細胞は CAF と相互作用することで、肺癌細胞だけでなく線維芽細胞から IL-6 などの炎症性 Cytokine 産生が上昇した。実際に、TGF-βに IL-6を加えると、TGF-βによる EMT 関連分子の発現変化を増強し、癌細胞の抗癌剤や分子標的薬への耐性獲得が増強した。以上より IL-6は EMT や癌幹細胞形質獲得効果を増強する可能性が示唆された。さらに、線維芽細胞における TGF-β, EGF, FGF, VEGF, コラーゲンなどの EMT 誘導因子や IL-10, CSF-1, Chemokine ligand (CCL)などのサイトカイン発現も、TGF-β単独に比して TGF-βに IL-6を加えることで産生増加を認め、線維芽細胞においても IL-6は TGF-βシグナルを増強する可能性が示唆された。

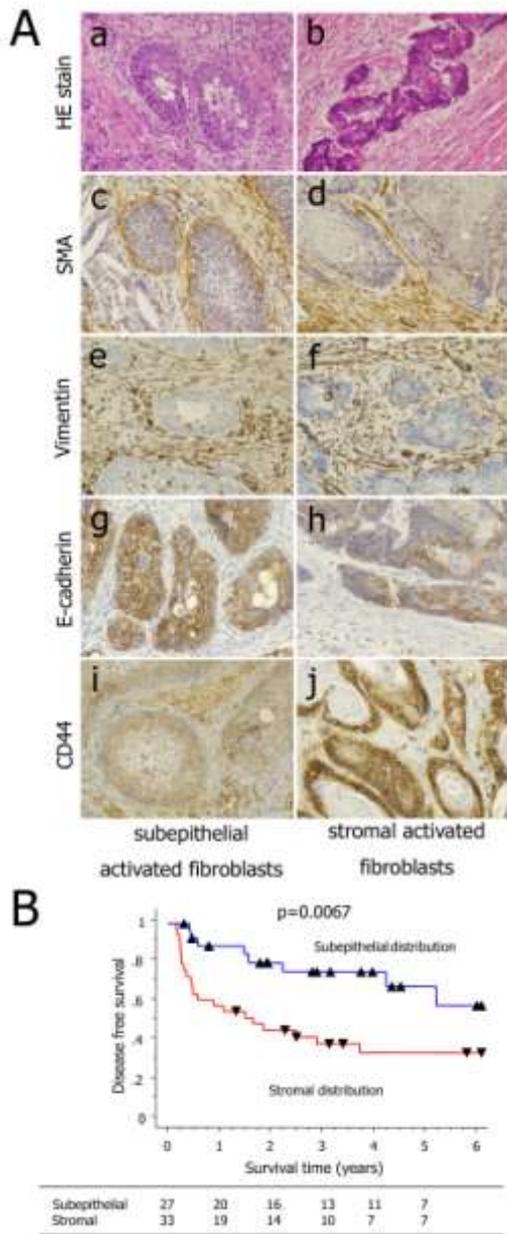
(5)肺癌細胞株と CAF を動物皮下に接種する共移植モデルでは、CAF の存在により、腫瘍増大速度の上昇、血管新生促進、抗癌剤耐性化、幹細胞マーカー高発現を認めた。また、これらの変化は TGF-βシグナル阻害薬の腹腔腔内投与によって、癌細胞単独接種群と同程度の腫瘍形成能へ抑制されることが明らかになった。以上より、生体内でも TGF-βシグナルを介して、CAF が腫瘍形成能を増加すると考えられた。さらに、肺癌細胞株と CAF を共接種することによって、肺癌細胞株のみの接種群よりも、Cisplatin による抗癌剤治療に抵抗性をもつことを示し、この効果も TGF-βシグナル阻害薬を抗癌剤と同時に接種

することによって、獲得した治療抵抗性が減弱した。以上より、生体内においても、TGF-βシグナルを介して、抗癌剤耐性獲得が誘導されると考えられた。



(6)42 例中 4 例で術前生検組織内に間葉系マーカーの発現を認めた。上皮マーカーはいずれかがすべての症例で発現していた。生検組織と切除標本を比較し上皮マーカーが減少すること (染色率>70%が<30%へ)、または切除標本で間葉系マーカーが発現していることを EMT 誘導と定義したところ、13 例で EMT 誘導が観察された。内訳は、上皮マーカーの減少 9 例、間葉系マーカーの増加 6 例(重複あり)であった。EMT 誘導群 13 例中 9 例、非誘導群 29 例中 7 例で術後遠隔再発を認め、無再発生存率は有意に EMT 誘導群で低値を示した (p=0.0117)。以上から、臨床検体においても、放射線化学療法による EMT 誘導が肺癌細胞の悪性化に関与しており、再発を規定する因子になり得る可能性がある。





さらに、EMT が誘導されていた腫瘍内の線維芽細胞を smooth muscle actin (SMA) や Fibroblast activating protein(FAP)といった活性化線維芽細胞のマーカーで染色したところ、残存腫瘍内で線維芽細胞が増生していた。とくに、腫瘍周囲だけ (Subepithelial staining pattern) でなく腫瘍間質全体が SMA で染色される場合 (Stromal staining pattern) に、その症例の予後が不良であった。従って、治療によって誘導される活性化した線維芽細胞 (いわゆる CAF) が、癌細胞の EMT を誘導して抗癌剤放射線治療に耐性化させている可能性が示唆された。

従来の癌治療によって癌幹細胞様形質を維持または誘導する niche が誘導され、治療抵抗性を示す癌幹細胞が残存する可能性が示唆された。癌細胞が癌幹細胞様形質を獲得

する過程で癌間質細胞が重要な役割を担っているため、癌細胞と癌間質 niche の相互作用を対象とした癌治療は治療耐性化を抑制し、新しい癌治療につながる可能性がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Shintani Y, Okimura A, Sato K, Nakagiri T, Kadota Y, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Ikeda N, Kawahara K, Matsumoto T, Matsuura N, Ohta M, Okumura M. Epithelial to mesenchymal transition is a determinant of sensitivity to chemoradiotherapy in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* (82):1794-804, 2011. 査読有

② Shintani Y, Inoue M, Funakoshi Y, Matsumura A, Ohta M, Maeda H, Okumura M. Low dihydropyrimidine dehydrogenase correlates with prolonged survival in patients with lung adenocarcinoma treated with 5-fluorouracil. *Anticancer Res* (12):4665-71, 2011. 査読有

[学会発表] (計 9 件)

① 新谷康、癌間質線維芽細胞を標的とした肺癌治療の開発、第 52 回日本肺癌学会総会、2011 年 11 月 4 日、大阪

② 新谷康、上皮間葉移行 EMT を標的とした肺癌治療の開発、第 20 回日本癌病態治療研究会、2011 年 6 月 18 日、東京

③ 新谷康、癌周囲微小環境を標的とした肺癌治療の開発、第 111 回日本外科学会総会、2011 年 5 月 26 日、東京

④ Shintani Y、Therapeutic perspective of epithelial to-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer, 47th Annual Meeting STS(The Society of Thoracic Surgeons), 2011 年 1 月 31 日、San Diego, USA

⑤ Shintani Y、Therapeutic perspective of epithelial to-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer、International symposium on cancer research and therapy、2010 年 11 月 26 日、Tokyo

⑥ 新谷康、肺癌放射線化学療法後の切除標本における上皮間葉転換 EMT マーカーの検討、第 51 回日本肺癌学会総会、2010 年 11 月 4 日、広島

⑦ 新谷康、癌周囲微小環境を標的とした肺癌治療、第 5 回肺癌ワークショップ、2010 年 9 月 18 日、大阪

⑧新谷康、上皮間葉転換 EMT を標的とした肺癌治療、第 27 回日本呼吸器外科学会総会、2010 年 5 月 14 日、仙台

⑨新谷康、連行非小細胞肺癌に対する術前導入化学放射線療法後の手術成績の検討、第 110 回日本外科学会総会、2010 年 4 月 10 日、名古屋

6. 研究組織

(1)研究代表者

新谷 康 (Yasushi Shintani)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：90572983

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：