

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16518

研究課題名（和文）癌関連線維芽細胞に発現するイオン輸送体を標的とした新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel therapeutics against ion transporters expressed in cancer-associated fibroblast

研究代表者

清水 浩紀（Shimizu, Hiroki）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：00756827

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：大腸癌切除検体から分離培養した癌関連線維芽細胞と正常部線維芽細胞の3ペア分から抽出したmRNAを用いたmRNA microarray検査の結果、NFと比較してCAFにおいてアミノ酸輸送体のL-type amino acid transporter 1 (LAT1(SLC7A5))の発現が優位に高いことを見いだした。分離培養した細胞を用いてsiRNA transfection実験を進めようとしたが、分離培養細胞の老化が見られ増殖速度が著しく低下したため計画した細胞実験の実施が困難となった。そのため、CAF実験の実績がある施設に見学に行くなどトラブルシューティングに時間を要した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、正常組織より癌組織癌の線維芽細胞においてLAT1が高発現であることを見い出したが、これがヒト臨床サンプルが元になっていることにまず意義がある。LAT1は大腸癌を含め種々の癌組織で高発現を認め、癌進展に関与していることが報告されているうえ、LAT1阻害剤の開発も進められており癌治療の有望な標的分子である。癌関連線維芽細胞におけるLAT1の意義についてはこれまで報告がないため、それが判明すれば癌治療に応用できる可能性を秘めている。また、細胞実験だけでなく大腸癌切除標本を用いた免疫染色法でも同時に検討を始めており、臨床データを使用できるため実臨床に則した研究であることに意義がある。

研究成果の概要（英文）：Primary cultured cancer associated fibroblast and normal fibroblast obtained from surgical resected specimen of colon cancer patients were used for mRNA microarray analysis and revealed that the expression of L-type amino acid transporter 1 (LAT1(SLC7A5)) was significantly higher in cancer associated fibroblast than normal fibroblast. Although further experiments were planned using siRNA transfection technique, primary cultured fibroblasts got weak due to cell senescence and we could not proceed in-vitro experiments. In order to overcome this problem, we visited other institutes where experiments using primary cultured fibroblasts had been performed and we improved our protocols. We also learned about immortalization of primary cultured fibroblasts and started using these immortalized cells to proceed in-vitro experiments. IHC for LAT1 using colon cancer tissues was also planned to clarify the association between LAT1 expression and clinicopathological features of colon cancer patients.

研究分野：functions of transporters and channels in cancer

キーワード：癌関連線維芽細胞 大腸癌 膜輸送体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

進行再発大腸癌の治療成績は、これまでにいくつかの分子標的薬の出現により向上しているが、更に新たな分子標的薬の研究、開発が望まれる。近年、癌関連線維芽細胞(Cancer associated fibroblast; CAF)について癌細胞の増殖能、浸潤能のみならず抗癌剤耐性や幹細胞性の獲得などに関与すると多数の報告があり、新たな治療標的として注目されている(Nature.2001;411:375-9, Cell.2005;121:335-48)。我々は既に、ヒト大腸癌手術標本より線維芽細胞の分離培養法を確立し、正常組織由来の正常線維芽細胞(normal fibroblast; NF)と癌組織由来のCAFのサンプルを合計10ペア有している。また、近年ではイオン輸送体が細胞機能維持に重要な役割を持つことが報告され、癌の治療標的としても注目されている。我々の教室では、細胞生理学的なアプローチを消化器癌診断や治療に応用すべく、様々なイオン輸送体に焦点を当て研究を進めてきた。しかしながら、CAFにおけるイオン輸送体の発現や役割については、乳癌(CACNA1C・CACNA1H、Biomedicines.2021;9:680)や前立腺癌(TRPA1、Mol Carcinog.2017;56:1851-67)でのCaチャンネル、乳癌でのクロライドチャンネル(CLIC3、Nat Commun.2017;8:14206)など報告がこれまでにあるが、消化器癌については明らかになっていない。また、CAFはサイトカインを中心とした様々な因子を産生・分泌することにより多様な癌進展に関与していると報告されている(Oncogene.2019;38:4887-2901)。しかし、線維芽細胞のイオンチャンネルとサイトカインの関連性について良性の炎症性疾患などで報告はあるものの、CAFに着目した研究はなされていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究は、大腸癌のCAF特異的に発現するイオン輸送体に着目し、セカンドメッセンジャーとしてのCAF細胞内イオン環境変化を介するCAF増殖能やCAFからのサイトカイン産生の制御機序を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1, ヒト大腸癌より分離培養したCAF、NFの機能解析

当教室で保有する10症例分のCAF、NFと大腸癌細胞株を用いてトランスウェルチャンバー(8um孔)にてそれぞれ共培養を行い、大腸癌細胞株の遊走能を各症例それぞれで評価する。その結果、ペアのNFと比較して癌細胞の遊走能を特に促進するCAFを3症例分選出する。

#### 2, ヒト大腸癌CAFにおける特異的なイオン輸送体発現の網羅的遺伝子解析

上記1にて選出したCAFとNFのペアサンプル3症例分を用い、total RNAをそれぞれ抽出して遺伝子発現プロファイル変化をマイクロアレイ法にて網羅的解析する。解析ソフトにはIngenuity® Pathway Analysisを用いる。その中で特にイオン輸送体の遺伝子発現変化に注目し、NFと比較してCAFで高発現を示すイオン輸送体を選出する。

#### 3, ヒト大腸癌CAFにおける高発現イオン輸送体の発現機能調整による機能変化の解析

CAFにおいて、上記2にて候補となるイオン輸送体遺伝子のRNA干渉(siRNAトランスフェクション)を行い、大腸癌細胞株との共培養により遊走・浸潤能のみならず細胞増殖(MTT法)、細胞周期(フローサイトメトリー;PI染色)、細胞死(フローサイトメトリー;PI/アネキシンV2重染色)を解析する。さらにCAFの候補イオン輸送体に対する阻害剤を用い、同様の大腸癌細胞株に対する機能解析を行う。

#### 4, CAF高発現イオン輸送体の発現機能とCAF培養液中のサイトカインについての検討

CAF の候補イオン輸送体に対する siRNA トランスフェクションの後、培養液を採取してサイトカイン抗体アレイ法によりコントロールサンプルと比較検討する。候補サイトカインについて、他症例 CAF を用い RNA 干渉にてパリエーション (ELISA 法) を行い確認する。また、候補イオン輸送体に対する阻害剤を用い、同様に培養液中サイトカインについて検証する。

#### 5 , *in vivo* モデルでの CAF 高発現イオン輸送体の阻害による皮下腫瘍進展抑制効果の検討

CAF の候補イオン輸送体に対する shRNA トランスフェクション後、ヒト大腸癌細胞株と混合して Matrigel 含有液に溶解し、BALB/c ノドマウスの皮下に接種し、皮下腫瘍モデルを作成する。皮下腫瘍径・重量・腫瘍新生血管程度・他臓器転移頻度・生存曲線をコントロール群と比較する。また、候補イオン輸送体に対する阻害剤投与の有無別に同様の解析を行い、CAF のイオン輸送体発現や機能の抑制による皮下腫瘍抑制効果を検討する。

#### 6 , ヒト大腸癌組織における CAF 高発現イオン輸送体の発現と予後についての検討

ヒト大腸癌手術標本のパラフィンブロックを用い、CAF 高発現イオン輸送体の免疫染色を行う。間質系マーカーである SMA 染色も行うことにより正常部と癌部の間質組織を確認し、NF と CAF での候補イオン輸送体の発現程度を比較する。さらに、当科の保有する大腸癌手術コホートをを用いて CAF での候補イオン輸送体の発現レベルと組織型・局所進展度・リンパ節転移度などの臨床病理学的因子や、予後・再発形式との相関を解析する。

### 4 . 研究成果

大腸癌切除検体から分離培養した癌関連線維芽細胞 (CAF) と正常部線維芽細胞 (NF) の 3 ペア分から抽出した mRNA を用いた mRNA microarray 検査の結果、イオンチャネルとしては有望な候補はなかったが、NF と比較して CAF においてアミノ酸輸送体の L-type amino acid transporter 1 (LAT1(SLC7A5)) の発現が優位に高いことを見いだした。LAT1 は大腸癌を含め種々の癌組織で高発現を認め、癌進展に関与していることが報告されているうえ、LAT1 阻害剤の開発も進められており癌治療の有望な標的分子であるが CAF における LAT1 の意義についてはこれまで報告がないため、引き続いて大腸癌 CAF における LAT1 の役割について研究を続けることとした。

分離培養した細胞を用いて siRNA transfection 実験を進めようとしたが、分離培養細胞の老化が見られ増殖速度が著しく低下したため計画した細胞実験の実施が困難となった。そのため、CAF 実験の実績がある施設に見学にいき分離培養ならびにその継代方法について改良することに時間を要した。また、分離培養した細胞の不死化も行うこととし、その実験場所と備品の準備ならびに実施に時間を要した。不死化に成功し、不死化 CAF を用いた LAT1 の siRNA transfection も問題なく行えることを確認している。遅れを取り戻すべく細胞実験を再開している。上記理由より研究期間中に研究成果を学会や学術誌に発表することが実現できなかった。まとまった結果がある程度揃い次第、発表する予定としている。

大腸癌切除標本を用いて LAT1 ならびに間質マーカー ( SMA ) による免疫染色を行い、それぞれのタンパク発現の相関ならびに臨床病理学的因子や予後との相関について検討を行うこととした。現在、その染色条件設定ならびに評価法について当院の病院病理部と鋭意検討中である。上記実験の結果が揃い次第、学会や学術誌に発表する予定としている。

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
---------	---------