

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591161

研究課題名(和文)非小細胞肺癌の病態における癌関連肺線維芽細胞の役割

研究課題名(英文)The role of cancer associated fibroblast in non small cell lung cancer

研究代表者

十合 晋作(Togo, Shinsaku)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80365634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：非小細胞肺癌の手術症例より、癌関連線維芽細胞(CAF)の分離培養を行いCAFの生理活性機能を行った。CAFの遊走及びコラーゲンゲルの収縮を促進した。非小細胞肺癌間質内のCAFは、 α -SMA陽性の筋線維芽細胞を多く含む活性化した線維芽細胞で構成されていた。肺癌細胞との共存下では、より活性化された筋線維芽細胞となり癌の進展に重要な役割を担っていると考えられた。非小細胞肺癌間質内の癌関連線維芽細胞は、 α -SMA陽性の筋線維芽細胞を多く含む活性化した線維芽細胞で構成されていた。癌関連線維芽細胞は、癌細胞との連携のもと、癌進展において重要な役割を担うことが考えられた。

研究成果の概要(英文)：The activated fibroblasts that are found in association with cancer cells are known as cancer-associated fibroblasts (CAFs). CAFs probably promote tumor progression through specific communications with cancer cells. Methods: Control: derived from normal lung tissue and CAFs: derived from tumor in same donors were prepared from surgical tissues. The ability of fibroblasts to mediate contraction of three dimensional type I collagen gels and Fibroblasts chemotaxis were evaluated. Fibroblasts cell viability by chemoreagents was assayed. Primary fibroblasts preserved their ability to induce migration and collagen gel contraction, which was greater with CAFs than NFs and the condition media from CAFs stimulated more A549 chemotaxis. The cell viability of CAFs against CDDP showed higher than that of controls. These results showed that CAFs can maintain the phenotypic properties of myofibroblasts and be further activated through myofibroblast activity interaction with carcinoma cells.

研究分野：肺癌

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：癌関連線維芽細胞 非小細胞肺癌

1. 研究開始当初の背景

肺癌は、日本における癌死の第一位である。近年一部の非小細胞肺癌において分子標的治療が奏効率を高めているものの、非常に予後の悪い疾患である。より効果的な治療法の解明は、肺癌治療を主体とする呼吸器内科医にとっては必務である。生体内における癌細胞の増殖、浸潤、転移などの生物学的多様性は、癌組織内微小環境によって規定されている。癌細胞は間質組織との密接な連携のもとにはじめて生存可能であり、癌組織内微小環境の理解なしに癌細胞の制御は不可能と考えられる。近年、癌間質線維芽細胞の病理形態像の検討より、癌間質量や線維芽細胞増殖の高さが患者予後と強く相関し、癌間質線維芽細胞の存在様式は、癌悪性度と強く相関していることが、数多く報告されている。

癌微小環境の主な構成成分である線維芽細胞は、癌関連肺線維芽細胞CAF(Cancer-associated fibroblast)と称され、癌細胞との共培養やマウスへの混合移植モデルを用いた研究によって、CAFが癌の進展を多面的に促進させる事が実証されつつある(Kalluri, R et al: Nat. Rev. Cancer, 6:392-401, 2006) (Micke, P et al: Lung. Cancer, 45:163-175, 2004)。CAFは、癌治療の新たな標的として世界的な注目を集めている。癌組織における肺線維芽細胞を主体とする間葉系細胞は、抗癌剤に対して治療抵抗性であり、予後不良因子である(Monifar, F et al: Cancer. Res, 60:2562-2566, 2000) (Hida, K et al: Cancer. Res, 60:8249-8255, 2004)。癌関連肺線維芽細胞を介する癌細胞の進展を阻止するため、癌関連肺線維芽細胞

の特性を研究することは、今後の肺癌患者の治療方針上極めて重要な情報となりうることが多いに期待される。個々の癌関連肺線維芽細胞に対する、抗癌剤の薬剤感受性結果より、癌関連肺線維芽細胞を標的とする治療効果の予測が可能となる。よって、個々の肺癌に対して、癌関連肺線維芽細胞も含めた分子標的治療の選択が可能となり、患者に対するオーダーメイド治療による治療奏効率の更なる向上が期待される。また、癌関連肺線維芽細胞の発現する再発予測因子の同定からも、術後の追加化学療法への適応を検討することができる。

癌関連肺線維芽細胞の特性を研究することは、今後の癌死亡原因の一位であると同時に極めて予後不良の肺癌治療において大きな利益をもたらすものと考えられる。

2. 研究の目的

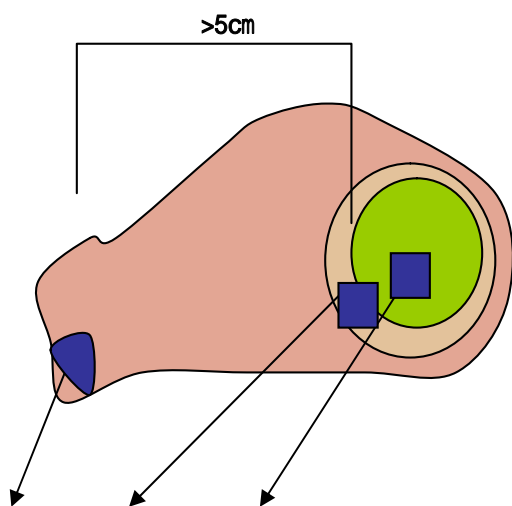
本研究では、癌組織中の癌関連肺線維芽細胞を分離培養し、癌間質へ選択的かつ効率的に遊走し動員される線維芽細胞の生物学的特性を非癌部の肺線維芽細胞と比較検討を行い、その現象を解明して、癌治療法を全く新しい領域からアプローチすることを本研究の主目的とする。

3. 研究の方法

非小細胞肺癌の手術症例より、患者の同意のもと、手術肺検体から、同一肺葉内において、非癌部(C: Control)、およびCAF群として癌と正常組織の境界部(B: Border)、癌部(T: tumor)、より、それぞれ組織を切り出し、Culture Dish上で肺線維芽細胞の分離培養を行う。尚、腫瘍部位に隣接する境界部も含め非癌部以外の肺線維芽細胞をCAFと定義し

た。

上記3群間での肺線維芽細胞Ex vivoにおける生理機能解析の比較検討を行った。非癌部の肺線維芽細胞と比較して境界部及び癌部の肺線維芽細胞の生理活性機能を特に肺線維芽細胞の遊走能(1) 3次元collagen gel contraction assay法(2) 増殖能(3)に着目しin Vitroによる機能解析を行う。具体的には、以下に示す。



1)非癌部、2)境界部、3)癌部位(CAF)の3群間で機能解析の比較検討を行う

- 1 肺線維芽細胞のchemotaxis assayをBoyden chemotaxis chamber法を用いて行う。Fibronectin、PDGFBB等、に対する遊走能を検討する。
- 2 3次元collagen gel contraction assay法を用いた。Type I collagen中の肺線維芽細胞を含むgelを作成しMedium中にfloating gelとしてリリースする。collagen gelのサイズを経時的に測定し縮小した場合は、CAFがaSMA陽性細胞の活性化した筋線維芽細胞に分化している事を意味している。
- 3 増殖能は、Brd-U ELISA kitを使用して比較する。

また、非小細胞肺癌上皮系細胞株(A549)との共培養系を構築し癌細胞-間葉系細胞の相互関与において検討を行う。増殖及び遊走能

に着目して検討を行う。肺線維芽細胞のConditioned mediaをChemoattractantとして用いA549の遊走能を検討する。肺線維芽細胞のConditioned mediaをA549の培養液として用い増殖能を検討する。肺線維芽細胞のConditioned mediaをA549培養液に加え上皮癌細胞-間葉変換(EMT)がCAF群でより起こりやすいかをEMTのマーカを用いて検討する。EMTのマーカをWestern-Blotting法及び免疫染色を用いて同定する。種々の抗癌剤に対する薬剤感受性を、MTAssayおよびFACSによりApoptosis Assayを行う。

4 . 研究成果

1. chemotaxis assay : CAFの遊走がより亢進し、その程度が臨床病期を反映している可能性を示した。しかし、増殖には差を認めなかった。

2.TypeI collagen Gel assay : コラーゲンゲルでの3次元培養環境下では、CAFは、より著明にゲルの収縮を促進した。A549細胞との共培養下では、CAFは、Control群と比較してさらにゲルの収縮を促進した。

3. CAFは、a-SMAの発現量がより増加しており、コラーゲンゲル内のCAFにおいても、Control群と比較してa-SMAの発現量がより増加していた。また、A549細胞との共培養下では、CAFは、さらにa-SMAの発現量が増強した。非小細胞肺癌間質内の癌関連線維芽細胞は、a-SMA陽性の筋線維芽細胞を多く含む活性化した線維芽細胞で構成されていた。肺癌細胞との共存下では、より活性化された筋線維芽細胞となり癌の進展に重要な役割を担っていると考えられた。

4. CAFがより抗癌剤のシスプラチン

に対して耐性であった。

5. CAFが肺癌上皮細胞の遊走およびEMTを刺激する事をCAFの培養上清液を用いて証明したことを確認した。

以上結果より非小細胞肺癌間質内の癌関連線維芽細胞は、 α -SMA陽性の筋線維芽細胞を多く含む活性化した線維芽細胞で構成されていた。癌関連線維芽細胞は、癌細胞との連携のもと、癌進展において重要な役割を担う事が考えられた。

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1件)

1. Togo, S.; Polanska, U.M.; Horimoto, Y.; Orimo, A. Carcinoma-Associated Fibroblasts Are a Promising Therapeutic Target. *Cancers*, 2013;5:149-169

[学会発表](計2件)

1. 長浜 久美、十合 晋作、非小細胞肺癌間質内における筋線維芽細胞の機能解析。
第51回日本呼吸器学会学術集会、東京2011

2. 十合 晋作、非小細胞肺癌間質内における筋線維芽細胞の機能解析の検討。
第52回日本肺癌学会総会、大阪2011

3. Togo S. Stromal fibroblasts associated with cancer cells enhanced trans differentiation in myofibroblast.
American Thoracic Society. San Francisco, May 23, 2012

[図書](計1件)

十合 晋作、高橋 和久。肺癌と癌関連線維芽細胞。中外医学社 Annual Review 呼吸器 2012,99-106

6. 研究組織

(1)研究代表者

十合 晋作(TOGO, Shinsaku)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：80365634