

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590442

研究課題名(和文) 癌微小環境における間質線維芽細胞の組織型による機能比較

研究課題名(英文) Histological comparison of fibroblastic stromal cells in cancer microenvironment

研究代表者

三木 康宏 (Miki, Yasuhiro)

東北大学・災害科学国際研究所・講師

研究者番号：50451521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞周囲の間質細胞(fibroblast-like stromal cell: FSC)由来の因子が癌細胞の増殖・浸潤などに影響を及ぼすことが報告されているが、その組織型による機能の際は明らかではない。本研究では乳癌と肺癌由来のFSCを用い、組織型による癌細胞の増殖と血管新生能への影響を検討した。結果、癌細胞の増殖には明らかな組織型(扁平上皮癌、腺癌)による差異は認められなかったが、血管新生については組織型の影響を受けると示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is well known that intratumoral stromal cells exert important role on cancer proliferation and invasion in several types of cancer. However, the histological differences in the cell growth and angiogenesis of cancer remain unclear. In this study, we established fibroblast-like stromal cell (FSC) derived from breast and lung carcinoma tissues, respectively. There were no differences in the cancer cell growth between the FSC derived from squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung, but considerable differences in tubular formation of endothelial cells were observed between the two histologic types.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：癌間質細胞 肺癌 乳癌 癌間質相互作用 血管新生

1. 研究開始当初の背景

組織の線維化では、局所の線維芽細胞 (fibroblast) のみならず、血液中に存在する骨髄由来の間葉系細胞 (fibrocyte) の関与が報告されている (Bucala R. et al, Mol Med, 1994)。Fibrocyte は CD34(+) であるが、組織中に浸潤して分化を遂げると CD34(-)/ α -SMA(+) の myofibroblast 様*の性質を獲得する (Barth PJ. et al, Virchows Arch, 2002)。一方、癌組織中においては、癌細胞周囲の間質細胞 (fibroblast-like stromal cell: FSC) 由来の因子が癌細胞の増殖・浸潤などに影響を及ぼすことが報告 (Kalluri R. and Zeisberg M, Nat Rev Cancer, 2006) されており、癌微小環境全体が病態を形成しているとして注目されている (図1)。癌微小環境は近年あらたな展開を示しており、“cancer-associated fibroblast (CAF)” と総称される線維芽細胞の形態を示す細胞の癌病態に対する作用が注目されている (Orimo A. et al, Cell, 2005)。

これまでに我々は癌組織由来の FSC を初代培養し、乳癌、子宮内膜癌および肺癌のエストロゲン依存性への影響をモニターする実験系を構築してきた (Miki Y. et al, Cancer Res, 2007 & 2010; Takahashi-Shiga N. et al, Clin Cancer Res, 2008)。

癌腫 = 悪性上皮性腫瘍の発生源組織は主に扁平上皮や腺上皮であり、組織型としてはそれぞれ扁平上皮癌、腺癌となる。本研究で注目する乳癌、口腔癌の主な組織型はそれぞれ腺癌、扁平上皮癌であり、肺癌は腺癌と扁平上皮癌が主な組織型である。これら組織型で癌細胞自身の性質が異なることは明らかであり、葉酸拮抗剤が肺腺癌と肺扁平上皮癌で臨床効果が異なる (Hanna N. et al, J Clin Oncol. 2004) など、薬物療法の選択にも組織型は重要な因子であると考えられている。一方、肺癌において腫瘍血管の量は腺癌と扁平上皮癌で異なることが知られており、CAFでの過去の報告と我々の FSC サイトカインの結果から、「FSC の癌組織におよぼす影響が臓器 / 組織型で大きく異なるのでは」という仮説につながり、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では以下の3つの検討を行い、FSC の細胞増殖への影響と血管形成への影響を確認し、組織型による FSC の差異を明らかに

することを目的とした。

- (1) FSC の癌細胞の増殖に及ぼす影響
- (2) 3D 培養での癌細胞増殖に対する FCS の影響
- (3) FSC の血管新生に及ぼす影響

3. 研究の方法

本研究では乳癌および肺癌組織からコラゲナーゼ / 遠心分離法 (Yamaguchi Y. et al, Cancer Res, 2006) によって FSC を分離・培養した。

- (1) FSC の癌細胞の増殖に及ぼす影響

FSC と癌細胞との相互作用の検討には共培養システム (ThinCert : 0.4- μ m pore : greiner bio-one) を用いた (Miki Y. et al, Cancer Res, 2010)。メンブレン側 (インサート) に FSC を培養し、ウェル側に癌細胞を培養した。FSC の癌細胞の増殖に対する影響については直接細胞数の計測を行った。また、細胞増殖シグナルの検討のため、ヒト レセプターチロシンキナーゼリン酸化抗体アレイ (R&D Systems) を用いて、チロシンキナーゼ受容体ファミリーのリン酸化を網羅的に解析した。

また、FSC 由来のサイトカインを検出するために、サイトカインアレイ (RayBiotech) (Miki Y. et al, Cancer Res, 2010) を用いた。

- (2) 3D 培養での癌細胞増殖に対する FCS の影響

癌細胞の 3D 細胞集塊形成におよぼす FCS の影響を検討した。3D 培養には Rotary Cell Culture System (Synthecon) を用いた。このシステムでは、細胞培養チェンバー (培養ベセル, Synthecon) を回転させることで重力の影響を減少させた特殊な環境を作りだすことができる。その結果、培地中の細胞を常に浮遊した状態下 (無重力状態) に置かれ、その中で培養された細胞は細胞集塊を形成する。FCS を培養後の培地を回収し、conditioned medium とした。この conditioned medium で癌細胞を 3D 培養し、細胞集塊の大きさを比較した。

- (3) FSC の血管新生に及ぼす影響

正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の管腔形成能を利用した血管新生キット (クラボウ) を用い、FSC の血管新生能を検討した。

(1) と同様に共培養システムを用い、インサートに FSC を培養し、ウェルに HUVEC を

培養した。5日間の培養の後、ウェルのHUVECの状態を観察するために、血管内皮細胞のマーカであるCD31を用いた免疫細胞化学を行った。

4. 研究成果

(1) FSCの癌細胞の増殖に及ぼす影響

肺癌および乳癌組織(各10例)からFSCを分離した。肺癌FSC(2株:LK1S、LK2S)と肺癌培養細胞A549とRERF-LC-OKを用い、共培養による癌培養細胞の増殖を検討した。結果、A549とRERF-LC-OKの増殖はLK1SとLK2Sそれぞれとの共培養によっていずれの細胞も有意に増加した。また、血清を含まない(FBS-Free)条件下でA549を培養すると、small-cell fraction(細胞死)の細胞数が増加するが、この細胞死はFSCとの共培養によって有意に抑制された(図1A)。FBS-Free条件下で、さらにA549の増殖経路をReceptor tyrosine kinases(RTK)リン酸化抗体アレイにて検討した結果、複数のRTKのリン酸化が確認できた。そのうち、Axlの変動が顕著に高かった(図1B)。

一方、乳癌培養細胞を用いた検討では、乳癌FCS(BK1S)と乳癌培養細胞MCF-7との共培養を行った結果、肺癌と同様にMCF-7の細胞数はBK1Sの存在によって有意に増加した。またBK1Sから分泌されるサイトカインを抗体アレイにて解析し、MCF-7との共培養によるサイトカイン発現プロファイルの変動を確認した。結果、MCF-7と共培養することによってBK1Sサイトカイン発現プロファイルは変動し、特にFGF-4およびEGFの発現が増加した(図2)。

以上の結果から、癌細胞と間質細胞の相互作用にサイトカイン(間質細胞側)とRTKシグナル(癌細胞側)が重要な役割を担っていると考えられる。

(2) 3D培養での癌細胞増殖に対するFCSの影響

3D培養には口腔扁平上皮癌培養細胞HSE-4を用いた。HSE-4は3D培養によって約5mmの細胞集塊を形成した。FCS conditioned mediumは肺癌扁平上皮癌由来LKsq1および腺癌由来LKad1から調整した。これらconditioned mediumを用いた3D培養ではHSE-4の細胞集塊の大きさに顕著な差は認められなかった。一方、MCF-7を用いた

3D培養では、数細胞(5-10細胞)の集塊を作るに過ぎず、各FCS conditioned mediumの添加においても変化は認められなかった。

(3) FSCの血管新生に及ぼす影響

共培養には肺癌FSC(LKsq1-3およびLKad1-3)を用いた。HUVECの管腔形成能はVEGF(陽性コントロール)の添加によって誘導され、それを上回る管腔形成がいずれのFCSとの共培養においても確認することができた(図3)。その管腔形成能は扁平上皮由来のFSCで高い傾向が認められた。

本研究結果からFSC由来のサイトカインが癌細胞の増殖シグナルを誘導し、癌細胞増殖に影響をおよぼしていると考えられた。さらに、癌の由来臓器や組織型を替えても同様の増殖シグナル誘導が得られると考えられた。一方、FSCは血管申請も誘導すると考えられ、血管新生については組織型の影響を受けると示唆された。我々は肺癌における血管新生能が組織型(扁平上皮癌と腺癌)によって異なることを報告(Yazdani S, Miki Y, et al, Hum Pathol. 2013)しており、この差異はFSCの差異に起因するのではと考えられる。今後、新たな血管新生阻害の観点として、癌間質細胞の特性に関する更なる検討が必要である。

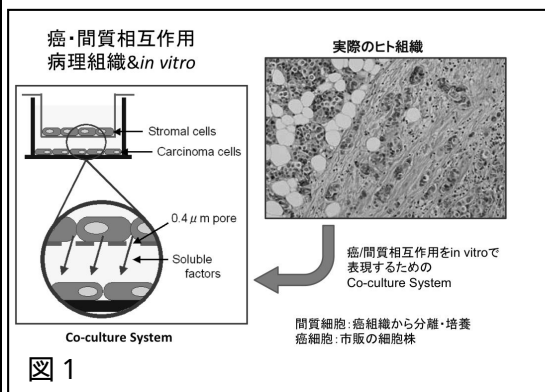


図1

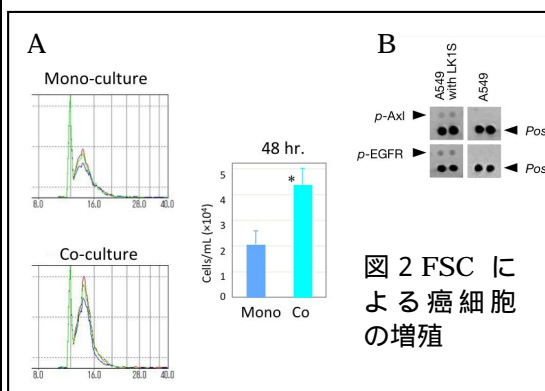


図2 FSCによる癌細胞の増殖

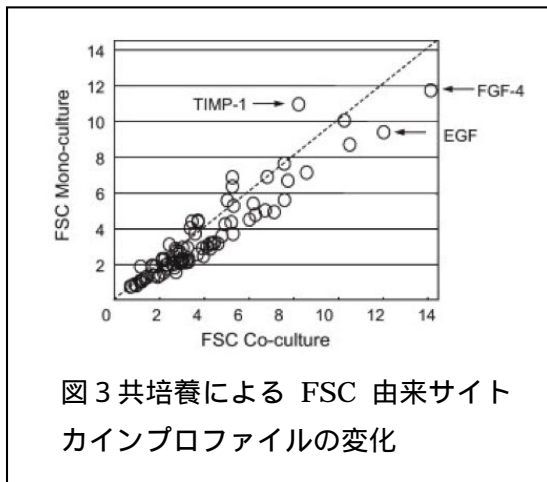


図3 共培養による FSC 由来サイト
カインプロファイルの変化

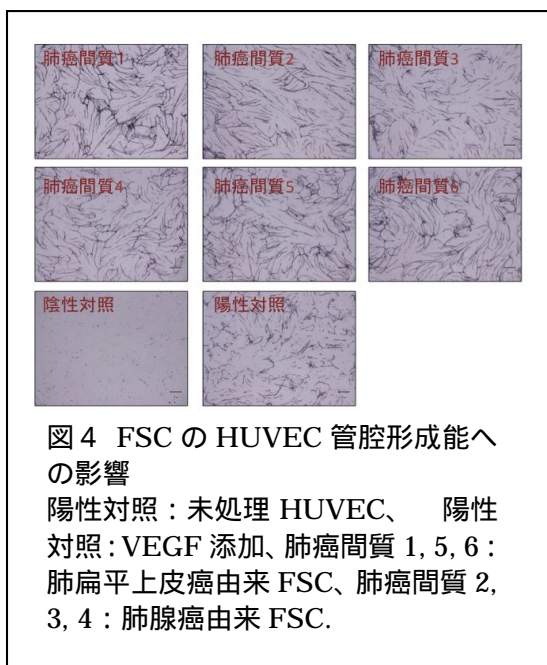


図4 FSC の HUVEC 管腔形成能への影響

陽性対照：未処理 HUVEC、陽性対照：VEGF 添加、肺癌間質 1, 5, 6；肺扁平上皮癌由来 FSC、肺癌間質 2, 3, 4：肺腺癌由来 FSC。

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7件)

1. Taniuchi S, Fujishima F, Miki Y, Abe K, Nakamura Y, Sato S, Kasajima A, Fue M, Ishida K, Watanabe M, Sakakibara T, Maeda S, Suzuki T, Sasano H. Tissue concentrations of estrogens and aromatase immunolocalization in interstitial pneumonia of human lung. *Mol Cell Endocrinol*. 2014 392(1-2):136-43. doi:10.1016/j.mce.2014.05.016. 査読あり
2. Iida S, Miki Y, Suzuki T, Mori K, Saito M, Niikawa H, Kondo T, Yamada-Okabe H, Sasano H. Activation of AXL and antitumor effects of a monoclonal antibody to AXL in lung adenocarcinoma. *Anticancer Res*. 2014 34(4):1821-7. <http://ar.iiarjournals.org/content/34/4/1821.long>. 査読あり

34/4/1821.long. 査読あり

3. Saito R, Miki Y, Hata S, Takagi K, Iida S, Oba Y, Ono K, Ishida T, Suzuki T, Ohuchi N, Sasano H. Aryl hydrocarbon receptor in breast cancer—a newly defined prognostic marker. *Horm Cancer*. 2014 5(1):11-21. doi: 10.1007/s12672-013-0160-z. 査読あり
4. Knower KC, Chand AL, Eriksson N, Takagi K, Miki Y, Sasano H, Visvader JE, Lindeman GJ, Funder JW, Fuller PJ, Simpson ER, Tilley WD, Leedman PJ, Graham J, Muscat GE, Clarke CL, Clyne CD. Distinct nuclear receptor expression in stroma adjacent to breast tumors. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 142(1):211-23. doi: 10.1007/s10549-013-2716-6. 査読あり
5. Hata S, Miki Y, Saito R, Ishida K, Watanabe M, Sasano H. Aromatase in human liver and its diseases. *Cancer Med*. 2013 2(3):305-15. doi: 10.1002/cam4.85. 査読あり
6. Yazdani S, Miki Y, Tamaki K, Ono K, Iwabuchi E, Abe K, Suzuki T, Sato Y, Kondo T, Sasano H. Proliferation and maturation of intratumoral blood vessels in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol*. 2013 44(8):1586-96. doi:10.1016/j.humpath.2013.01.004. 査読あり
7. Miki Y, Ono K, Hata S, Suzuki T, Kumamoto H, Sasano H. The advantages of co-culture over mono cell culture in simulating in vivo environment. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2012 131(3-5):68-75. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.12.004. 査読あり

[学会発表](計8件)

1. 三木康宏、高木清司、鈴木 貴、笹野公伸、伊藤 潔：ストレスホルモンと癌：子宮内膜癌におけるコルチゾール代謝：第15回ホルモンと癌研究会(教育講演)：2014年7月5日：民陵会館(宮城県仙台市)
2. Yasuhiro MIKI, Kiyoshi TAKAGI, Zhulanqiqige DOE, Sota TANAKA, Takashi SUZUKI, Hironobu SASANO, Kiyoshi ITO: Intratumoral Concentration of Stress Hormone, Cortisol in Endometrial Carcinoma：2014年6月22日：16th International Congress of Endocrinology/The 96th Annual Meeting of The Endocrine Society: McCormick Place(Chicago, USA)
3. 飯田慎也、三木康宏、中村保宏、鈴木貴、岡部尚文、笹野公伸: Novel Roles of Axl cleavage by its ligand Gas6 in non-small cell lung carcinoma: 第72回日本癌学会学術総会：2013年10月5日：パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
4. Yasuhiro MIKI, Kiyoshi TAKAGI, Takashi

SUZUKI, Kiyoshi ITO: Intratumoral Concentration of Stress Hormone Cortisol in Endometrial Carcinoma: NIH-Tohoku University-JSPS Symposium: 2013 年 5 月 9 日: 艮陵会館 (宮城県仙台市)

5. 櫻井美奈子、三木康宏、柴原裕紀子、平川久、鈴木 貴、大内憲明、笹野公伸: LIN28B の乳癌における臨床病理学的意義: 第 86 回日本内分泌学会学術総会: 2013 年 4 月 25 日: 仙台国際センター (宮城県仙台市)
6. Yasuhiro MIKI, Takashi SUZUKI, Satoshi SUZUKI, Kiyoshi ITO, Hiroyuki KUMAMOTO, Hironobu SASANO: Endocrine disrupting effects of cigarette smoking: 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer (Symposium): 2012 年 11 月 17 日: 石川音楽堂 (金沢市石川県)
7. Kevin C. KNOWER, Sarah Q. TO, Hoi Tin PUN, Kiyoshi TAKAGI, Yasuhiro MIKI, Hironobu SASANO, Evan R. SIMPSON, Wah Chin BOON, Colin D. CLYNE: Endocrine disruptors and local estrogen production in the breast tumour microenvironment: 15th International Congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer (Symposium): 2012 年 11 月 17 日: 石川音楽堂 (金沢市石川県)
8. Yasuhiro MIKI: Lung Cancer: An Estrogen Target?: The 94th Annual Meeting of The Endocrine Society (Symposium): 2012 年 6 月 23 日: George R Brown Convention Center (Houston, USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三木康宏 (MIKI YASUHIRO)

東北大学・災害科学国際研究所・講師

研究者番号: 50451521

(2) 研究協力者

端 秀子 (HATA SHUKO)

東北大学・医学系研究科・ポスドク

研究者番号: 90466532