

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791369

研究課題名(和文) 乳腺脂肪環境の癌発育における特異性の検証と環境修飾による癌間質相互作用の制御

研究課題名(英文) Characterization of breast adipose tissue as a niche in cancer progression

研究代表者

藤本 浩司 (FUJIMOTO, HIROSHI)

千葉大学・総合安全衛生管理機構・助教

研究者番号：60456027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は乳腺を特徴づける最も豊富な間質である脂肪組織に着目し、癌進展における脂肪組織の役割の解明を目指すものである。臨床検体における癌部、非癌部脂肪組織よりコラゲナーゼ処理により浮遊脂肪細胞を単離し、コラーゲン3次元培養を用いて、そのプロファイルの検討を行った。結果、癌部脂肪細胞は非癌部脂肪細胞より未分化な細胞へと変化していると考えられ、IL-6やMCP-1といった液性因子を介して癌細胞の走化性上昇に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Though the adipocyte represents one of the most abundant cell types surrounding breast cancer cells, little attention has been given to it. The purpose of this study is to unravel the role of adipose tissue as a niche in breast cancer progression. Cancerous or non-cancerous breast adipose tissue derived from surgical specimen was digested with collagenase and adipocyte was isolated. Isolated mature adipocyte was cultivated in three-dimensional collagen gel culture system. The difference between cancer-associated adipocytes (CAA) and non-CAA was evaluated. CAA exhibited a more undifferentiated phenotype than non-CAA in collagen gel culture. Furthermore, Soluble factor including IL-6 and MCP-1 from CAA promote d chemotaxis of breast cancer cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：乳腺外科学 癌間質相互作用 脂肪組織

1. 研究開始当初の背景

①我が国における乳癌の罹患率は1990年代に入り女性の乳癌の中で第1位となり現在も、かつ今後も増加が予想される。しかも40から50歳代という社会や家庭において第一線での活躍が求められる時期に発症のピークがあり、その克服が急務である。

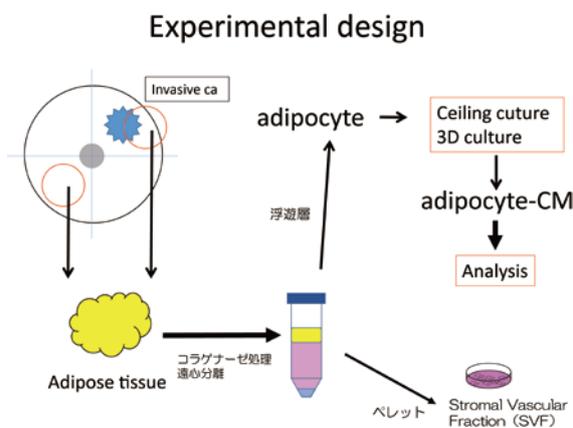
②癌組織における過去の研究において様々な検討がなされてきたが、未だ十分な成果を挙げているとは言い難い。それには腫瘍自身のもつ生物学的特性に多く光が当てられ、周囲の間質の影響が軽視されてきたという点にも問題がある。脂肪組織は乳腺を特徴づける最も豊富な間質であるにもかかわらず、単なるエネルギー貯蔵組織と考えられ、通常の培養は困難であるため、癌との相互作用についての研究は少ない。

2. 研究の目的

①乳腺は脂肪組織の中で育まれ、発達と退縮というリモデリングを起こす。マクロファージと脂肪細胞は同様のリモデリング過程である肥満において協調的に働いていることが示されている。本研究では乳癌手術および再建術時に得られる脂肪組織の初代培養を行い、得られた細胞を癌やマクロファージとの共培養系に導入することで、浸潤過程及び部位による脂肪環境を比較し、乳腺脂肪の特殊性と乳癌進展時における役割を解明し、脂肪組織のsubtypingによる個別化治療や乳癌周囲脂肪組織のプロファイリングによる浸潤リスクのスクリーニングといった臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

乳房全摘症例から採取した癌部、非癌部の脂肪組織から成熟脂肪細胞、SV-fractionを分離し、それぞれの初代培養を行い。得られた培養上清の解析および癌細胞株との共培養系を用い、癌と脂肪組織の相互作用を明らかにする。



◎培養方法

<天井培養法による脂肪培養>

採取された脂肪組織を小片に裁断し、37度で0.2%コラーゲナーゼ処理。懸濁液を濾過後、

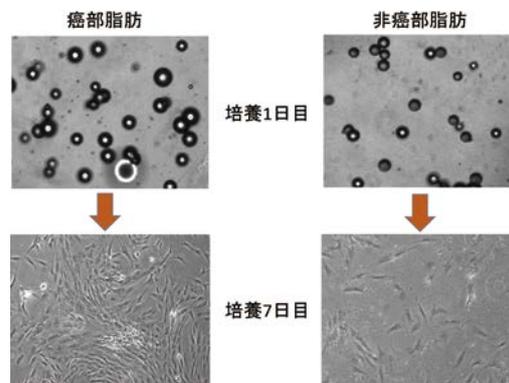
洗浄・遠心を繰り返した後、100%充填させたフラスコに細胞を撒き、天井面に浮遊した成熟細胞が接着したのを確認した後、上層の浮遊成熟脂肪細胞を天井培養、下層の前脂肪細胞を通常培養する。

<コラーゲン3次元培養>

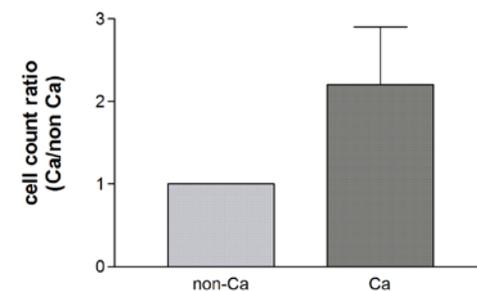
I型コラーゲン酸溶液に緩衝液を入れ、ゲル化する前に、上記の脂肪組織より得られた成熟脂肪細胞および前脂肪細胞を混ぜ込み包埋培養する。

4. 研究成果

①癌部と非癌部の脂肪組織をコラーゲナーゼ処理した後、得られた細胞を分離し、浮遊細胞層(成熟脂肪細胞)と下層(SV-fraction)に分けた。SV-fractionからマクロファージ抽出を試みたが、困難であったため、ひとまず、浮遊細胞層にある成熟脂肪細胞にターゲットを絞り、実験を進めた。



成熟脂肪細胞による天井培養を行うと、回収された脂肪細胞は癌部において非癌部の平均2.2倍と増加を認めた。

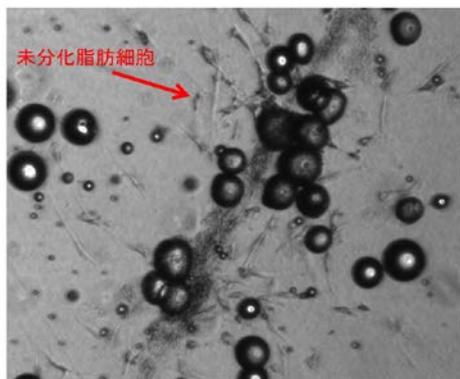
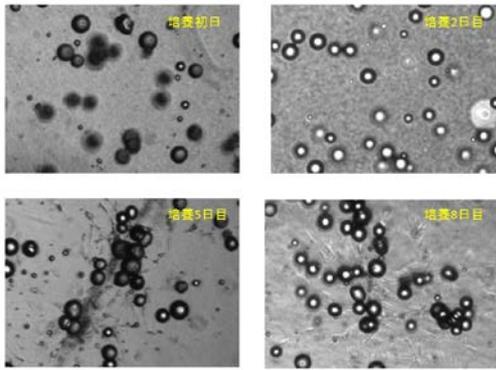


しかし、回収量は $0.31 \sim 8.91 \times 10^4$ 個/gと幅があり、実験を継続するのに十分な量ではなかった。

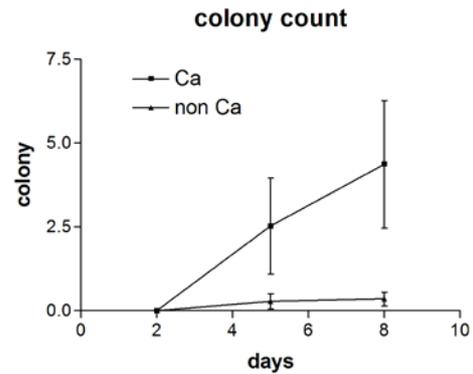
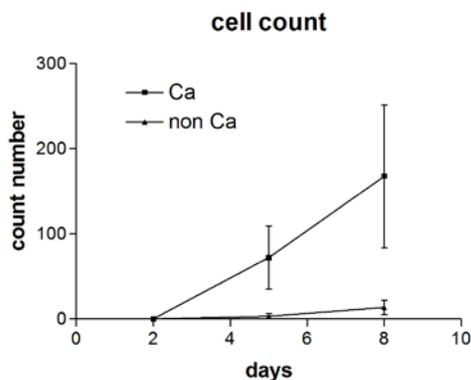
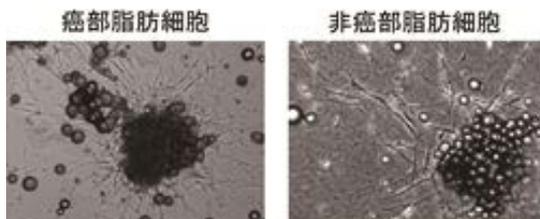
天井培養法において、臨床検体から天井接着脂肪細胞を安定して回収することは困難であったが、癌組織においてより未分化と考えられる天井接着脂肪細胞が回収されたと考えられた。

②上記手法でコラーゲナーゼ処理された浮遊細胞層(成熟脂肪細胞)に対しコラーゲン3次元培養を行った。コラーゲン内に包埋された成熟脂肪細胞はしばらくすると、紡錘形の未分化脂肪細胞と

なって増加した。

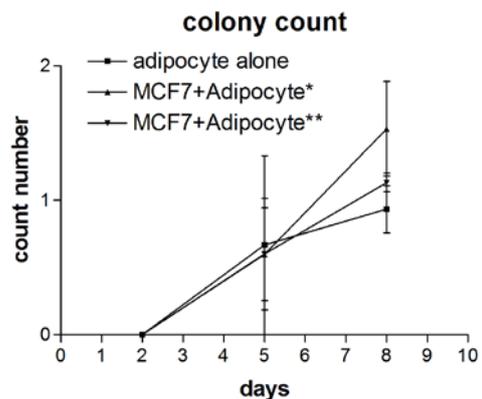
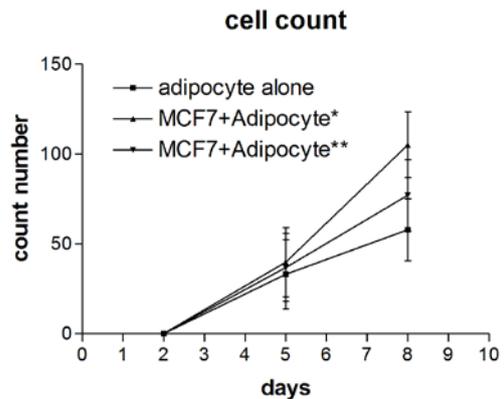


癌部、非癌部それぞれより分離培養した成熟脂肪細胞を3次元コラーゲン培養し、増殖が観察された未分化脂肪細胞の細胞数、増殖コロニー数（脂肪細胞の増殖が起こりだした箇所の数）を計測した。



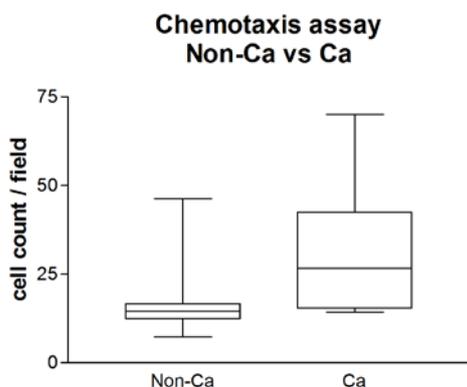
結果、癌部にて有意に未分化脂肪細胞数も増殖コロニー数も増加した。

③さらに、通常非癌部の脂肪細胞が癌細胞の存在により未分化脂肪細胞として増殖するかを確認するため、MCF-7 乳癌細胞株と非癌部脂肪細胞の共培養を行った。結果、脂肪細胞単独に比べ、MCF-7 乳癌細胞株を添加した方が未分化脂肪細胞数、増殖コロニー数ともに増加しており、MCF7 細胞数が増えると、その数は増加した。（\*は\*\*の2倍の癌細胞数）



以上、前出の天井培養結果とも合わせると、脂肪細胞は癌細胞の存在により脱分化、増殖の方向に向かうことが示唆された。

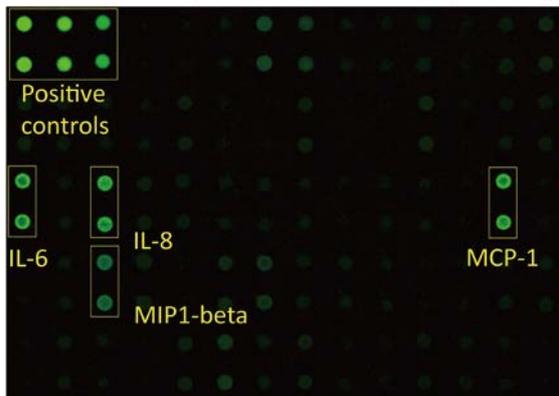
④脂肪細胞の癌進展に果たす役割を確認するため、癌部脂肪細胞と非癌部脂肪細胞の3次元培養上清を作成し、癌細胞の走化性に及ぼす影響を検討した。



非癌部脂肪細胞に対して癌部脂肪細胞より得られた培養上清では上図のように1.8倍移動細胞数が有意に増加した。(p値=0.01)  
同様の結果は、乳癌細胞株と脂肪細胞の共培養から得られた培養上清により走化性アッセイによっても得られた。

⑤これら癌細胞存在下での脂肪細胞より分泌される因子を同定するため、培養上清における抗体アレイを施行した。

### Human adipokine antibody array



癌部脂肪細胞から得られた培養上清では非癌部に比べ、IL-6, IL-8, MCP-1, MIP1-betaといったサイトカインの増加が認められた。

以上より、脂肪細胞は癌の存在により未分化な状態へと脱分化し、癌細胞の走化性を増加させるのに役立っており、その作用は、IL-6, IL-8, MCP-1, MIP1-beta によって介されることが示唆された。

### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 浩司 (FUJIMOTO Hiroshi)

千葉大学 総合安全衛生管理機構 助教

研究者番号：60456027