

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462020

研究課題名(和文) 転移メカニズムにおける循環血液中がん微小環境の解明と新規癌治療法の開発

研究課題名(英文) Therapeutic potential of circulating tumor microenvironment based on metastatic mechanism

研究代表者

白川 靖博 (Shirakawa, Yasuhiro)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：60379774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： FACS解析より、食道癌患者検体においてcontrol群の健常人検体と比べ有意に循環血液中癌関連線維芽細胞(cCAF)数の増加を確認した。

ELISA解析より、in vitroにて活性化線維芽細胞である癌関連線維芽細胞(CAF)の上清においてFAPの過剰発現を確認した。

食道癌切除症例におけるCAFsの特異マーカーであるFAPの臨床病理学的な検討を行い、予後やリンパ節転移、また遠隔転移に影響があるのかを検討した。結果としては、N因子、脈管侵襲と相関を認めた。さらにFAP陽性線維芽細胞も予後に有意に関与していた。

研究成果の概要(英文)：The FACS analysis showed the significant increase in the number of cCAF in patients with esophageal cancer specimens compared to a healthy person specimen of the control group. The ELISA analysis indicated the over-expression of FAP in the supernatant of CAF which is the activated fibroblasts in vitro. FAP expression at tumoral stroma was a significant predictive factor for tumor size, lymph node metastasis and vessel invasion. In survival analysis of DFS (disease free survival) and OS (overall survival), FAP high stroma was associated with shorter period to recurrence and death than those of FAP low stroma.

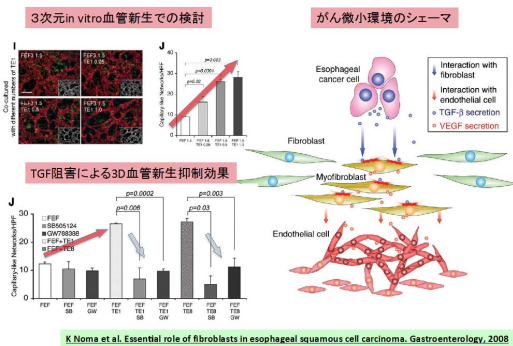
研究分野：消化器外科

キーワード：がん微小環境 がん関連線維芽細胞 食道がん 新規治療薬

1. 研究開始当初の背景

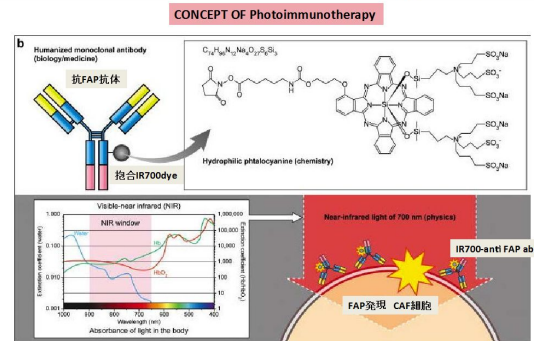
癌とがん微小環境の相互作用については以前より多く報告されている。がん微小環境は直接的に癌の増殖や転移に関わっており、その中でも中心的役割を担っているのが癌関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblasts: CAFs) といわれている。我々は以前より特に CAF 細胞に着目し、分子標的となり得るシグナルの解析を行って来た。そこで癌細胞由来の TGF β を阻害することで CAF 細胞が不活性化し、VEGF の過剰産生が抑制され血管新生が阻害されることを発見し報告した (Noma et al. Gastroenterology 2008) (図 1)。

図1 癌由来TGF β 阻害によるCAF細胞への活性化阻害



また、実際に CAF 細胞自体を標的とした新規治療法の開発を進め、現在 NIH 小林久隆先生らと協力し CAF 細胞特異的な表面マーカー: FAP (Fibroblast Activation Protein) を標的とした *Photoimmunotherapy* を展開してきた。(Kobayashi et al. Nat Med 2011) (図 2)。そこでの *in vivo* 実験にて、CAF 細胞を制御することでの制癌作用を確認することが出来た。このように癌の増殖に関しては、従来の抗癌剤や“がん微小環境”の制御により、ある一定の抗腫瘍効果を期待できると考えられる。

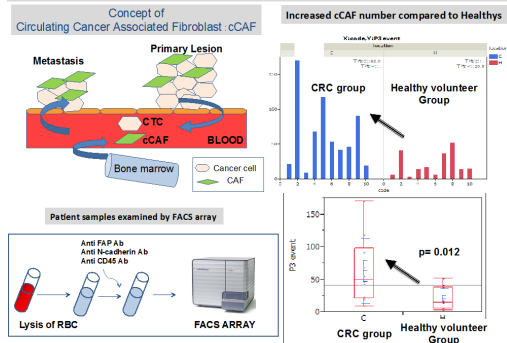
図2 FAP-IR700dye Photoimmunotherapy for CAFs



Mitsunaga M, Kobayashi H et al. Cancer cell-selective *in vivo* near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. Nat Med, 2011

また、がん微小環境が血液中においても形成され、循環血液中腫瘍細胞 (Circulating tumor cell: CTC) と共に血液中を遊走し転移を形成するのではないかと推測している。また FACS での予備実験においても、非担癌群と比べ食道癌担癌群において有意に多くの cCAF 細胞を確認した。(図 3)

図3 Circulating Cancer-associated fibroblasts



2. 研究の目的

本研究においては、血液循環がん微小環境を検討し、循環血液中 CAF 細胞 (circulating CAF: cCAF) を標的とした新規治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 手術または食道癌に対する抗癌剤治療前の患者 10 名及び control 群の健常人 10 名

検体において cCAF 発現の解析を行った .FACS 法にて FAP(Fibroblast Activation Protein) 陽性 ,N-cadherin 陽性 ,CD45 陰性を CAF とし て計測した .

(2) FAP が CAFs の特異マーカーとなるかを 確認するため in vitro (活性化線維芽細胞で ある CAF の上清) 及び in vivo (マウス皮下 腫瘍モデルにおける血中) にて FAP の発現を ELISA 法にて解析を行った .

(3) 食道癌切除症例 (2008 年から 2011 年 までの当科にて切除された胸部食道癌症例 61 症例) において CAFs の特異マーカーであ る FAP 発現の臨床病理学的な検討を行い , 予 後やリンパ節転移 , また遠隔転移に影響があ るのかを検討した .

4 . 研究成果

(1) FACS 解析より , 食道癌患者検体におい て control 群の健常人検体と比べ有意 (P=0.012) な cCAF の増加を確認した .

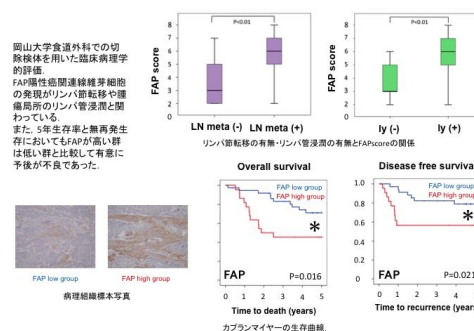
(2) ELISA 解析より , in vitro にて活性化線 維芽細胞である CAFs の上清において FAP の 過剰発現を確認した . in vivo においてはマ ウス皮下腫瘍モデルにおいては血中では検 出されなかった . しかしながら健常人の血中 に FAP がある程度確認されることが確認され たため , 担癌患者での FAP が control 群に比 べ変化があるかは確認可能と考えた .

(3) FAP 陽性線維芽細胞の発現は N 因子 , 脈管侵襲と相関をみとめた . さらに T 因子 , N 因子 , 脈管侵襲ありに加え , FAP 陽性線維 芽細胞も予後に有意に関与していた . また独 立した因子としては N 因子のみが , 有意に関 与するという結果であった . 従って現在は ,

FAP 陽性線維芽細胞が N 因子に , つまりリン パ節転移にどのように相関しているのか統 計学的に検討を行っている . 今後は in vitro にて CAFs 細胞が転移促進因子を高発現し , また in vivo にて実際に遠隔転移を促進す ることを証明する予定である .

CAFs を制御することで予後に最も影響を与 える転移メカニズムを抑えることができる 可能性があると考えている (図 4) .

図4 ヒト食道癌切除検体におけるFAP陽性癌関連線維芽細胞と腫瘍転移・予後の関係



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

野間和広 , 賀島 肇 , 二宮卓之 , 勝部亮 一 , 渡邊伸一郎 , 大原利章 , 田澤 大 , 香川俊輔 , 白川靖博 , 藤原俊義 , 宿主正 常細胞である癌関連線維芽細胞を標的と した新たな食道癌治療法の開発 , 癌と 化学療法 , 査読有 , 42 巻 , 2015 , 1228-1230

[学会発表] (計 3 件)

賀島 肇 , 食道癌における FAP(fibroblast activation protein)陽性 癌関連線維芽細胞の発現と癌転移の関係 , 第 26 回日本消化器癌発生学会 , 2015 年 11 月 19 日 , 米子全日空ホテル・鳥取県・ 米子市

野間和広 , Therapeutic potential of photoimmunotherapy for cancer-associated fibroblast , 第 36 回

癌免疫外科研究会、2015年5月15日、
鹿児島県・奄美
野間和広、がん関連線維芽細胞(Cancer
Associated Fibroblasts)を標的とした新
規癌治療法の開発、第114回日本外科学
会定期学術集会、2014年4月3日、京都
国際会議場・京都府・京都市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

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

[http://www.ges-okayama-u.com/research.h
tml#1](http://www.ges-okayama-u.com/research.html#1)

6. 研究組織

(1)研究代表者

白川 靖博 (SHIRAKAWA Yasuhiro)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教
授

研究者番号：60379774

(2)研究分担者

藤原 俊義 (FUJIWARA Toshiyoshi)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00304303

野間 和広 (NOMA Kazuhiro)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：10534761

(3)研究協力者

賀島 肇 (KASHIMA Hajime)

岡山大学・大学院消化器外科・大学院生

研究者番号：