

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461942

研究課題名(和文) 乳癌進展における脂肪組織環境の果たす役割の解明

研究課題名(英文) Characterization of cancer-associated adipocytes and evaluation of its role in breast cancer

研究代表者

藤本 浩司 (FUJIMOTO, Hiroshi)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：60456027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞は乳腺の重要な構成成分であるが、癌微小環境における脂肪細胞の特徴および働きは明らかではない。今回、我々は癌周囲および非癌部から脂肪組織を単離し、それぞれCancer associated adipocyte (CAA) 及びNormal breast adipocyte (NBA) として培養、その形態学的特徴及び増殖性について比較検討を行った。CAAは成熟脂肪細胞で発現するC/EBP $\beta$  の発現がNBAと比べて有意に低下しており、乳癌微小環境において脂肪細胞はより未分化な状態で存在することが分かった。また、脂肪細胞由来のIL-6やMCP-1は乳癌細胞の走化性やEMTに寄与することが分かった。

研究成果の概要(英文)：To investigate the role of adipocytes in tumor microenvironment, we isolated and embedded primary adipocytes from human breast cancer tissue into a three-dimensional collagen gel. Then, we compared the phenotype of normal breast adipocytes (NBAs) and cancer-associated adipocytes (CAAs). In collagen gel culture, CAAs had a more immature phenotype than NBAs. Furthermore, we examined the effect of media conditioned by NBAs and CAAs on breast cancer cells. These cells showed significantly higher migration in a CAA-conditioned medium than in an NBA-conditioned medium. A cytokine array showed higher levels of interleukin-6 (IL-6) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the CAA-conditioned medium. Neutralizing antibodies against IL-6 and MCP-1 significantly reduced the migration of cancer cells. From these data, we concluded that adipocytes revert to an immature phenotype in the presence of cancer cells, and promote cancer cell migration via adipokines including IL-6 and MCP-1.

研究分野：乳腺外科学

キーワード：癌間質相互作用 脂肪細胞 乳癌

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) 癌組織は癌細胞以外にも様々な細胞で構成され、線維芽細胞、免疫細胞、血管内皮細胞、細胞外マトリクスの癌微小環境における働きはこれまでも数多く報告されている。一方で脂肪細胞は乳房の重要な構成成分であるが、培養の困難さも手伝い、近年までその役割が十分に解明されてこなかった。

2. 研究の目的

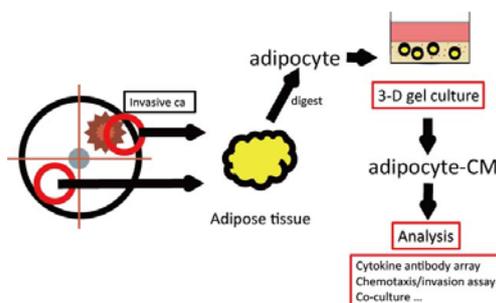
脂肪組織は乳腺を特徴づける最も豊富な間質であるにもかかわらず、単なるエネルギー貯蔵組織と考えられてきた。また、通常の培養も困難であり、近年まで癌との相互作用について十分な研究がなされてはいない。我々は 3 次元コラーゲンゲル培養内に脂肪細胞を埋入することで、初代培養を可能とし、癌微小環境における脂肪細胞の特徴および働きについて検討した。これにより脂肪組織の subtyping による個別化治療や乳癌周囲脂肪組織のプロファイリングによる浸潤リスクのスクリーニングといった臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

(1) 乳房全摘術症例より癌周囲および非癌部から脂肪組織を採取、コラーゲナーゼ処理後、脂肪細胞を単離した。得られた脂肪細胞をそれぞれ Cancer associated adipocyte (CAA) 及び Normal breast adipocyte (NBA) として 3 次元コラーゲンゲル培養内に埋入することで、初代培養を行い、その形態学的特徴及び増殖性について比較検討を行った。

(2) 3 次元培養で得られた培養上清を乳癌細胞株に添加し、乳癌細胞の増殖性、走化性及び上皮間葉転換 (EMT)、エストロゲン産生に関する効果についても比較検討した。

Experimental design

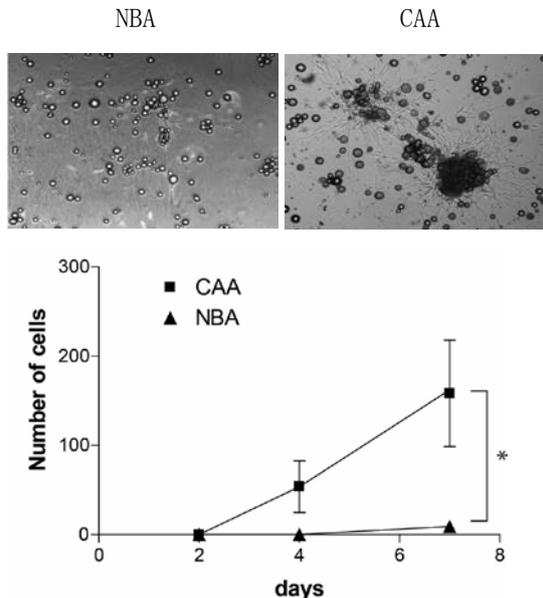


<脂肪組織のコラーゲン 3 次元培養>

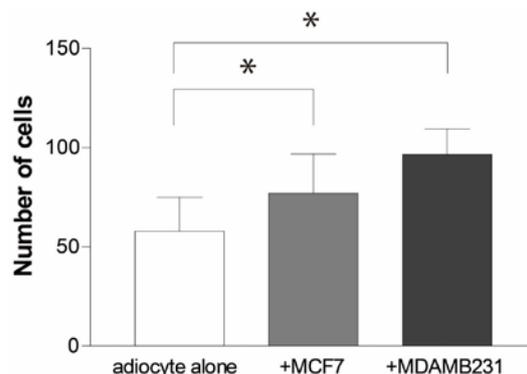
採取された脂肪組織を小片に裁断し、37 度で 0.2% コラーゲナーゼ処理。懸濁液を濾過後、洗浄・遠心を繰り返して成熟脂肪細胞を単離する。I 型コラーゲン酸溶液に緩衝液を入れ、ゲル化する前に、脂肪細胞を混ぜ込み包埋培養する。

4. 研究成果

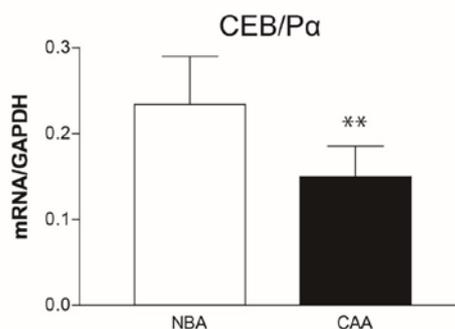
(1) NBA と CAA を 3 次元コラーゲンゲル中で培養し、増殖する脂肪細胞数を測定した。結果、細胞数は CAA で有意に増加した。



(2) NBA を乳癌細胞株と共培養し、同様に計測した。癌細胞と共培養することで脂肪細胞数は有意に増加した。

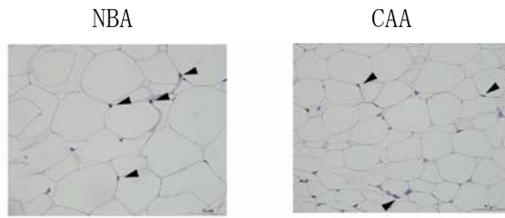


(3) 脂肪分化に関わるマーカーの発現を PCR 法により比較した。⇒成熟脂肪細胞で発現する C/EBP $\alpha$  の発現が CAA で有意に低下した。

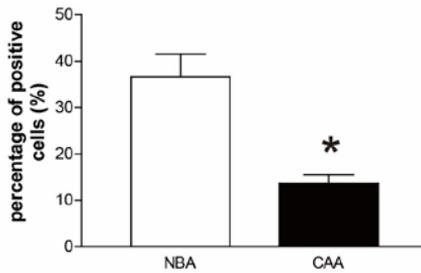


(4) 手術標本を用いて癌部及び非癌部脂肪細胞の大きさと C/EBP $\alpha$  免疫染色割合を計測

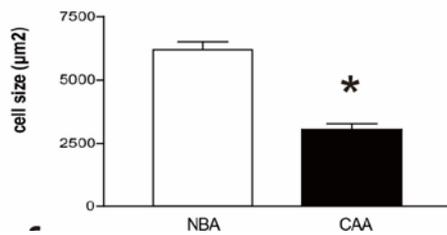
した。  
 ⇒非癌部に比べ癌部脂肪細胞は小さく、  
 C/EBP $\alpha$  の発現も低下していた。



脂肪細胞サイズ



C/EBP $\alpha$  染色細胞



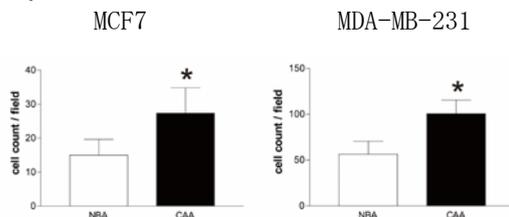
(5) 脂肪培養上清を乳癌細胞株に添加し、乳癌細胞の増殖性、走化性、上皮間葉転換 (EMT) 及びエストロゲン産生能に関する効果について比較検討を行った。

① 増殖性

乳癌細胞株の増殖性に及ぼす効果は NBA と CAA では有意差を認めなかった。

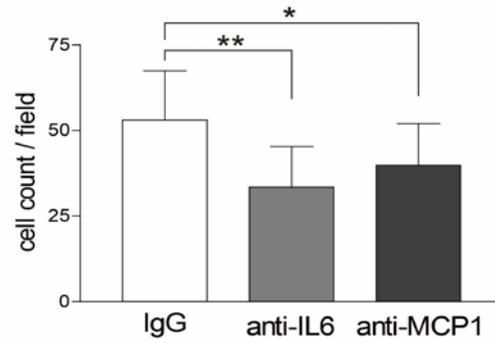
② 走化性

CAA の培養上清は癌細胞株の走化性を増加させた。

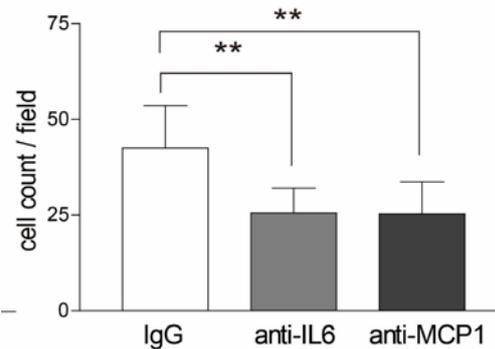


これら癌細胞存在下での脂肪細胞より分泌される因子を同定するため、培養上清における抗体アレイを施行したところ、CAA 培養上清中に IL-6 と MCP-1 の増加を認めた。これら CAA 培養上清に中和抗体を用いることにより乳癌細胞株の走化性は抑制された。

MCF-7



MDA-MB-231



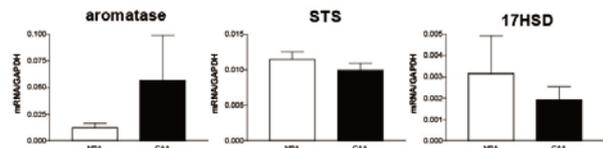
③ 上皮間葉転換 (EMT)

MCF-7 細胞で E-cadherin 発現を上昇、vimentin 発現を低下させた。

④ エストロゲン産生能

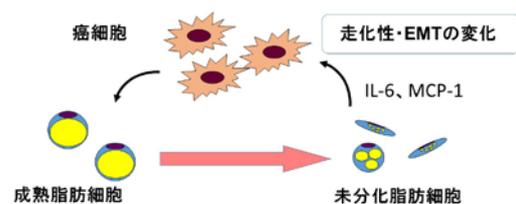
CAA と NBA におけるエストロゲン合成酵素の発現を比較した。

⇒有意差は認められなかった。



以上より

乳癌微小環境において脂肪細胞はより未分化な状態で存在し、IL-6 や MCP-1 を含むサイトカインを介して乳癌細胞の走化性や EMT に影響を与え得ることが確認された。



## 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 1 件)

- ① Fujisaki K, Fujimoto H, Sangai T, Nagashima T, Sakakibara M, Shiina N, Kuroda M, Aoyagi Y, Miyazaki M. Cancer-mediated adipose reversion promotes cancer cell migration via IL-6 and MCP-1. Breast Cancer Res Treat. 誌 査読有 2015 Apr;150(2):255-63. doi:10.1007/s10549-015-3318-2.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 藤本 浩司、cancer-associated adipocyte (CAA) の特徴と癌進展に果たす役割、第 24 回日本乳癌学会学術総会 2016/6/16、東京
- ② FUJIMOTO Hiroshi, Characterization of cancer-associated adipocytes and evaluation of its role in breast cancer, EBCC10 (10TH EUROPEAN BREAST CANCER CONFERENCE) 11, March 2016, Amsterdam, Netherland
- ③ 藤本 浩司、乳癌環境下における脂肪細胞の質的变化と腫瘍細胞の増殖性及び走化性に与える影響、第 23 回日本乳癌学会学術総会、2015/7/2、東京

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤本 浩司 (FUJIMOTO Hiroshi)  
埼玉医科大学 医学部 講師  
研究者番号 : 60456027

### (2) 研究分担者

長嶋 健 (NAGASHIMA Takeshi)  
千葉大学医学部附属病院 准教授  
研究者番号 : 60292710

榊原 雅裕 (SAKAKIBARA Masahiro)  
千葉大学医学部附属病院 助教  
研究者番号 : 70375632

三階 貴史 (SANGAI Takafumi)  
千葉大学医学部附属病院 助教  
研究者番号 : 00375685

宮崎 勝 (MIYAZAKI Masaru)  
千葉大学医学系研究科 教授  
研究者番号 : 70166156

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

(4) 研究協力者

( )