

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860241

研究課題名(和文) 乳癌の浸潤・転移における非線維性コラーゲンのタイプ別の役割の解明

研究課題名(英文) Expression and function of non fibrillar collagen in the stroma of the invasive breast cancer

研究代表者

塩見 浩介 (SHIOMI, Kosuke)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：70508043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌は癌細胞と間質組織からつくられ、癌の進展にはその周辺環境が重要な役割を果たすことが分かってきています。私たちは、浸潤性乳癌と非浸潤性乳癌ではその間質に発現する非線維性コラーゲンのタイプが異なることを発見しました。試験管下での解析により、間質線維芽細胞では癌細胞あるいは周辺環境からの刺激により14型コラーゲンの発現が低下することを明らかにし、12型コラーゲンとは発現制御機構が異なることが示唆されました。また、間質中の非線維性コラーゲンのタイプは乳癌の動態へ影響を与えませんでした。間質の非線維性コラーゲンタイプの変化は、癌周辺環境に存在する癌細胞以外の細胞の動態に影響するのかもしれませんが。

研究成果の概要(英文)：Cancer is formed of cancer cells and the stroma tissue and it became clear that the tumor microenvironment played an important role in the cancer progression. We found that types of the non-fibrillar collagen in a stroma were different between an invasive ductal carcinoma and non-invasive carcinoma. We analyzed the regulatory mechanism of non-fibrillar collagen expression in fibroblast. We found that the expression of type XIV collagen was downregulated by stimulation from cancer cells or surround environment, and it was suggested that regulatory mechanisms are different among type XII and XIV. We checked influences on breast cancer cell dynamics from non-fibrillar collagen. It did not affect the mobility and invisibility of breast cancer cells by the type of collagen which fibroblast expressed in stroma. The change of the non-fibrillar collagen in stroma that controlled by cancer cells might affect the dynamics of the cell except the cancer cell in cancer microenvironment.

研究分野：発生学

キーワード：癌 乳癌 非線維性コラーゲン 癌微小環境 間質 コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌は癌細胞と間質組織からつくられ、近年、癌の進展にはその周辺微小環境が重要な役割を果たすことが分かってきている。

(2) 私たちは、浸潤性乳管癌と非浸潤性乳管癌の違いを明らかにする目的で、それぞれの間質のプロテオーム解析を行った。発現しているタンパク質を検索した結果、発現の異なる総計 140 個のタンパク質を検出した。その内訳は、浸潤癌での検出頻度が有意に高いもの 56 個、非浸潤癌での検出頻度が有意に高いものは 29 個であった。そのなかで、我々は、タンパク質の検出量が多く、浸潤癌・非浸潤癌間で明瞭な差が見られる、2つのコラーゲン、12 型および 14 型コラーゲンに着目することにした。この 2つのコラーゲンはともに、コラーゲン細線維を形成しないため、非線維性コラーゲンと呼ばれ、角膜や軟骨、腱の発達での役割が知られている。乳腺では 14 型コラーゲンは葉内ではなく葉間の線維芽細胞が産生するとされているが、その役割については未だ明らかでない。12 型コラーゲンは癌組織での発現は報告されているが、癌進展への関与を示唆する報告はなされておらず、癌での非線維性コラーゲンの「入れ替わり」現象に着目した研究はない。

2. 研究の目的

日本における乳癌の罹患数、死亡率は上昇していることから、早急な対策が求められる疾患の一つである。乳癌において、その浸潤性の有無は予後に大きな影響を与える。浸潤性の抑制は癌の予防・治療につながるの考えから、浸潤のメカニズムに関わるプロセスの解明を大きな目的としている。癌の浸潤性に間質の非線維性コラーゲンタイプが影響を与えるとの実験仮説をたて、仮説の検証を行った。実際には、間質線維芽細胞における非線維性コラーゲンの発現制御機構を明らかにし、コラーゲンタイプによって癌浸潤性に違いはあるのかを検討することを目的としている。

3. 研究の方法

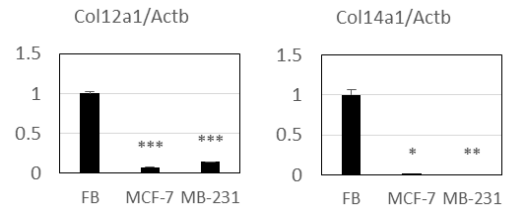
(1) 間質線維芽細胞における非線維性コラーゲンの発現制御に関しては、*in vitro*において様々な培養条件下での線維芽細胞の 12 型、14 型コラーゲンの発現変化を調べた。実際には、いくつかの増殖因子あるいは乳癌細胞の液性因子からの刺激による発現変化、2次元・3次元培養の違いによる発現の違いを調べた。

(2) 間質のコラーゲンタイプによる乳癌の動態への影響について、12 型および 14 型コラーゲンを発現操作した線維芽細胞との共培養系における乳癌細胞の浸潤性について検証した。

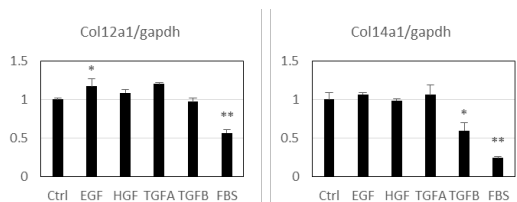
4. 研究成果

(1) 間質線維芽細胞の 14 型コラーゲンの

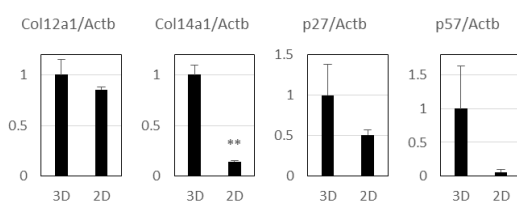
発現は周辺環境による刺激により低下する。間質組織を構成する細胞外基質は、線維芽細胞により分泌されると考えられている。プロテオーム解析により、浸潤・非浸潤癌間で検出頻度に差のあった 2つの非線維性コラーゲンは間質線維芽細胞が発現していると当たりを付けて解析を開始した。乳癌細胞株と乳組織由来線維芽細胞での 12 型、14 型コラーゲンの発現を確認したところ、線維芽細胞において有意に発現が高いことが分かった。線



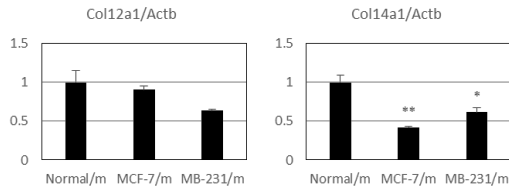
維芽細胞の 12 型、14 型コラーゲンの発現に影響を与える因子を検索する目的で、様々な増殖因子刺激を行った。結果、TGF-による 14 型コラーゲンの発現抑制、fetal bovine serum による 12 型、14 型コラーゲンの発現



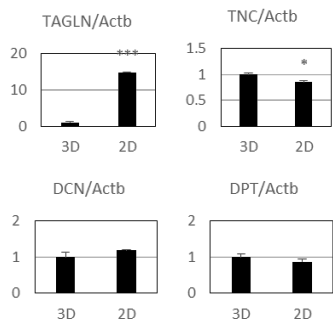
は抑制が見られた。TGF-は線維芽細胞を筋線維芽細胞へ分化誘導するとの報告がある。また、線維芽細胞は intact な組織中では quiescent な状態で存在し、外部からの刺激により activated となることが知られている。TGF-, fetal bovine serum による 14 型コラーゲン発現抑制は、線維芽細胞の活性化と 14 型コラーゲンの発現が関連していることを示唆している。そこで、線維芽細胞の活性状態 (quiescent あるいは activated) が非線維性コラーゲンの発現と挙動を共にするのかを調べた。古典的な細胞周期研究において、無血清条件下での培養では、細胞は休止状態 (G0、あるいは slow G1) となると考えられている。一方、培養下での線維芽細胞の形態を観察すると、二次元無血清培養では activated な細胞で見られる十字型あるいは星型の形態をとるのに対し、1 型コラーゲンゲル三次元無血清培養下では quiescent 細胞のような紡錘型の形態をとる。非線維性コラーゲンの発現を比較すると、三次元において 14 型コラーゲンの発現が有意に高いことが分かった。一方、12 型コラーゲンの発現に差



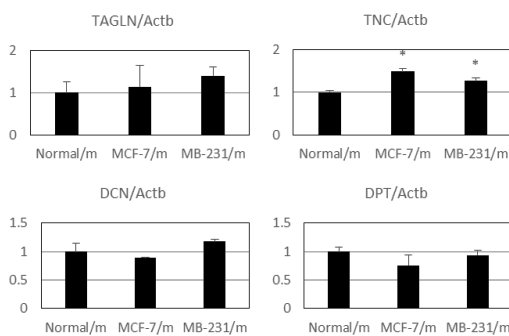
はなかった。細胞周期の休止状態を評価するために p27, p57 の発現を調べたところ、両遺伝子ともに三次元培養での発現に増加傾向が見られた。これ結果は、線維芽細胞の活性化が 14 型コラーゲンの発現抑制に関わること、12 型と 14 型コラーゲンは同様の機構により発現調節されていないことを示唆する。乳癌からの線維芽細胞への影響を三次元培養系で調べた。乳癌細胞株コンディション培地により 14 型コラーゲンの発現が低下し



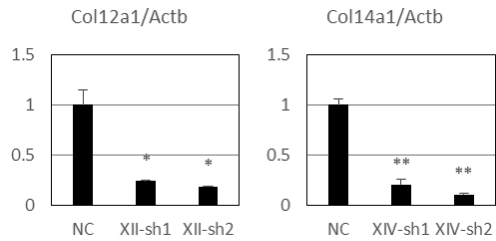
た。一方、12 型に変化は無かった。ここで、プロテオームで出現頻度に違いの見られた 4 つの因子、Transgelin 1 (TAGLN), Tenascin C (TNC), Decorin (DCN), Dermato pontin (DPT) について、発現を調べた。TAGLN, TNC は浸潤癌間質で、DCN, DPT は非浸潤癌間質で高頻度に検出された因子である。TNC は三次元培養により若干の増加が見られ、コンディション培地により若干の増加が見られた。DCN, DPT の発現に有意な差は見られなかった。



TAGLN は三次元培養によって発現が低下したが、コンディション培地では変化しなかった。この結果は、TAGLN の発現が癌細胞の刺激に



依存せず、線維芽細胞の活性化にのみ依存していることを示唆する。また、in vivo 間質における TNC, DCN, DPT の出現頻度の変化は線維芽細胞が担っていないのかもしれない。同様に、浸潤癌間質における 12 型コラーゲン出現頻度の増加は、線維芽細胞以外の細胞によるのかもしれない。他因子の発現と比較することにより、14 型コラーゲンは、線維芽細胞の活性化及び癌による刺激により発現抑制が起こされることが強く示唆された。



(2) in vitro において間質線維芽細胞の非線維性コラーゲンの発現の有無は乳癌細胞の浸潤性に影響しない

間質に存在する非線維性コラーゲンのタイプが乳癌の浸潤性に影響を与えるかを検証するために、12 型、14 型コラーゲンを shRNA によりノックダウンした線維芽細胞を作成した。ノックダウン細胞との共培養下における乳癌細胞株の浸潤性を確認した。使用した細胞株のうち MCF-7 は 1 型コラーゲンゲル中に浸潤可能であり、MDA-MB-231 は浸潤できない。1 型コラーゲンゲル中で線維芽細胞を培養したのち、ゲル上にて乳癌細胞を無血清条件下で培養、ゲル下部に誘引剤として fetal bovine serum を含む培地を配置した。結果、ゲル中の線維芽細胞での 12 型、14 型コラーゲンの発現は、乳癌細胞株の浸潤性に影響を与えなかった。

| 乳癌細胞 | MCF-7 | | | | | |
|------------|-------|----|---------|---------|---------|---------|
| 線維芽細胞 | なし | NC | XII-sh1 | XII-sh2 | XIV-sh1 | XIV-sh2 |
| 乳癌細胞のゲル中浸潤 | - | - | - | - | - | - |

| 乳癌細胞 | MDA-MB-231 | | | | | |
|------------|------------|----|---------|---------|---------|---------|
| 線維芽細胞 | なし | NC | XII-sh1 | XII-sh2 | XIV-sh1 | XIV-sh2 |
| 乳癌細胞のゲル中浸潤 | + | + | + | + | + | + |

癌微小環境を構成する様々な細胞外基質成分を構築する細胞について詳細に特定したという報告はない。本研究において、少なくとも 14 型コラーゲンは間質線維芽細胞が発現し、癌細胞からの刺激によりその発現が抑制されることを示すことができた。また、浸潤癌間質の 12 型コラーゲンは線維芽細胞以外の細胞が発現、蓄積する可能性を示すことができた。非線維性コラーゲンの発現は、癌細胞自体の浸潤性には関与しなかった。非線維性コラーゲンは 1 型コラーゲンと結合することで機能すると考えられている。癌微小環境中には癌細胞、線維芽細胞以外にも炎症細胞など様々な細胞が集合している。非線維性コラーゲンの変化は、1 型コラーゲン環境の構造的な変化を引き起こし、癌細胞ではない他の細胞の局所的集合に関与しているのかもしれない。今後、癌微小環境を構成する分子について、発現に関わる細胞と機能的制約を受ける細胞をカタログ化が進むことで、癌微小環境への理解が進み、がん予防、治療の新たな戦略の発露となることを期待する。

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)

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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

塩見 浩介 (SHIOMI, Kosuke)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：70508043

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

山下 依子 (YAMASHITA, Yoriko)