

令和元年6月3日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08719

研究課題名(和文) プロテアーゼとエピゲノムからアプローチするがん関連線維芽細胞の解析

研究課題名(英文) Analysis of cancer-associated fibroblasts from the perspective of proteinases and epigenetics

研究代表者

下田 将之 (SHIMODA, MASAYUKI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：70383734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：がん間質の主要な構成成分であるがん関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast=CAF)は腫瘍進展に寄与することが知られている。本研究では、ヒト肺がん由来CAFの網羅的解析データとがん移植モデルを用いた生体内腫瘍促進能を統合解析することにより、生物学的に意義のある線維芽細胞集団の遺伝子発現プロファイルの同定・検討を行った。また、がん間質細胞で発現するプロテアーゼの機能解析を行い、一部のプロテアーゼは腫瘍進展に関わることを見出した。以上の結果は、CAFの細胞特性を理解する上で有用であるとともに、腫瘍間質を標的とした治療法開発の基礎的データになりうる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CAFは腫瘍進展を手助けするとともに治療に対する抵抗性を強めることから、今後の新たな治療標的の一つとして注目されているものの、CAFは様々な細胞に由来しその多様性から具体的な治療法の確立に至っていないのが現状である。本研究で得られる成果は、生物学的に意義のあるCAF細胞集団を同定しその性質を明らかにすることで、CAFを標的とした新規治療法や機能的分子病理診断の開発に貢献する可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Cancer-associated fibroblasts (CAFs) within the tumor stroma are known to acquire activated phenotype and have been shown to stimulate tumor cell proliferation, elevate tumor cell invasion and boost angiogenesis. However, CAFs are also thought to derive from multiple origins and make up a heterogeneous population of cells, it is an important question to understand the unique roles of the different subpopulations of CAFs. In this project, we evaluated various CAF lines by analyzing both their biological tumor-promoting properties and gene expression patterns and sought to identify gene signatures characterizing functionally active CAFs. In these analyses, we identified several genes related to cancer progression increased in functionally active CAFs which would be useful for understanding molecular pathways induced in CAFs. Stromal cell-derived proteinases are also involved in tumor progression and might be potential targets for cancer therapy.

研究分野：実験・人体病理学

キーワード：がん 線維芽細胞 腫瘍間質 網羅的解析 プロテアーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん組織は、がん細胞と間質成分から構成され、間質成分としては線維芽細胞、血管内皮細胞、炎症細胞などの多種の細胞、細胞膜表面や細胞間に局在する細胞外マトリックスおよび、それに結合する生理活性物質(増殖因子、サイトカイン、ケモカインなど)が含まれる。その中でも、がん関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast=CAF)は腫瘍間質の主要な構成成分であり、これまでの病理学的な検討から、種々のがん組織において、CAFの存在ががんの悪性度と関連することが報告されるとともに、がん細胞とCAFとの共培養やマウスへの移植モデルを用いた研究により、実験的にもCAFががん細胞の増殖・浸潤や血管新生を促進し、さらにはがん幹細胞の維持や転移促進にも関与することが実証されつつある。メタロプロテアーゼであるMMP(matrix metalloproteinase)とADAM(a disintegrin and metalloproteinase)遺伝子ファミリーは、がん組織内できわめて大量に分泌され、がん進展にかかわる細胞外マトリックス(extracellular matrix=ECM)や生理活性物質代謝において中心的な役割を果たしていることが知られている。一方、ヒアルロン酸(Hyaluronic acid=HA)はグリコサミノグリカンからなるECMの一種で、組織や体液中に存在し、組織形成や恒常性維持に深く関わっている。近年ECMの分解産物が腫瘍進展などに関わる分子として注目されており、低分子HAはその代表的分子として知られている。ハダカデバネズミにおいて高分子HAは発がん抑制に関与する一方で、低分子化したHAは種々のシグナルカスケードを惹起して血管新生や炎症を促進することが知られており、ECM産生・分解は腫瘍内微小環境を理解する上で非常に重要と考えられる。ECMを分解するプロテアーゼの主要な産生源としてがん細胞により呼び寄せられたCAFをはじめとする間質細胞に注目が集まっているが、その詳細なメカニズムについては十分に解明されていない。さらに、CAFはheterogenousな細胞集団であることから、複数のCAFマーカーが報告され、現在のところ治療標的とするべき特定のCAF細胞集団や治療標的分子が同定されていないのも現状である。したがって、網羅的なCAF細胞特性の解析とそれに基づくCAFの層別化も今後の重要な課題の一つとなっている。

2. 研究の目的

がん組織は、がん細胞とそれを取り巻く間質成分から構成される。がん間質中の主要な構成成分であるCAFは腫瘍形成・進展に大きく寄与することが知られている。研究代表者はこれまでにCAF形質維持にメタロプロテアーゼ活性に関わることを報告するとともに、CAFで高発現するプロテアーゼの網羅的探索を行ってきた。本研究では、線維芽細胞で高発現するプロテアーゼの腫瘍形成における役割を解明するとともに、ヒト肺がんCAFの網羅的解析を行い、がん移植モデルを用いた生体内腫瘍促進能の解析と統合することにより、生物学的に意義のある線維芽細胞集団を同定し、CAFを標的とした新規マーカーの探索を行う。

3. 研究の方法

本研究では、2主要研究項目：(1)腫瘍形成における線維芽細胞由来プロテアーゼの生体内機能解析、(2)網羅的解析を用いた機能的がん関連線維芽細胞集団の探索を設定し、研究を行った。(1)では、遺伝子欠損マウスへのがん移植モデルを中心に、腫瘍形成における間質細胞由来MMP-13の機能解析と新規ヒアルロン酸代謝に注目したHybrid遺伝子欠損マウスの表現型解析と腫瘍内微小環境の解析研究を遂行し、腫瘍形成・進展に関わる線維芽細胞由来プロテアーゼの機能解析を行った。(2)では、肺がん由来CAFを用いて網羅的解析を行い、CAFの細胞特性を明らかにするとともに、がん移植モデルを用いた生体内腫瘍促進能解析データと統合することにより、機能的CAF集団を探索した。

4. 研究成果

(1)腫瘍形成における線維芽細胞由来プロテアーゼの生体内機能解析

腫瘍形成における間質細胞由来MMP-13の機能解析

ヒト肺がん由来初代培養CAFでは、MMP-13の発現上昇が見られるとともに、その発現レベルはCAFマーカーの一つであるalpha-smooth muscle actin(alpha-SMA)の発現レベルと正の相関が認められた。また、腫瘍形成における間質細胞由来MMP-13の役割を解析するため、マウスがん細胞株を野生型あるいはMmp13遺伝子欠損マウスの皮下に移植し、それぞれのマウスにおける腫瘍発育や組織学的な変化を観察・比較した。野生型マウスと比べて、Mmp13遺伝子欠損マウスでは腫瘍の縮小傾向が認められ、間質細胞由来MMP-13は腫瘍形成に関与している可能性が示唆された。

新規ヒアルロン酸代謝に注目したHybrid遺伝子欠損マウスの表現型解析と腫瘍内微小環境の解析研究

近年研究代表者所属の研究室ではHA分解に中心的役割を果たす新規糖鎖分解酵素としてHYaluronan-Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization(HYBID; KIAA1199)を同定し、

研究代表者が中心となって *Hybrid* 遺伝子欠損マウスの作製に成功した。*Hybrid* 遺伝子欠損マウスは外見上の大きな異常は示さないものの、生後 1~4 週時に限定した長管骨の骨端板肥大軟骨層延長がみられ、X 線解析では生後 8 週時において長管骨の軽度短縮を認めた。HYBID は、*in situ* hybridization 法により軟骨肥大層 - 骨境界部の肥大軟骨細胞で高発現しており、肥大軟骨層に蓄積した高分子 HA を分解することにより、内軟骨性骨形成時にみられる血管新生や破骨細胞誘導を制御していると考えられた。さらに、マウスがん細胞株を野生型あるいは *Hybrid* 遺伝子欠損マウスの皮下に移植し、それぞれのマウスにおける腫瘍発育や組織学的な変化を観察・比較した。*Hybrid* 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比較し、移植した腫瘍形成能に変化が見られるとともに、組織学的には腫瘍細胞周囲の HA 沈着増加傾向が認められた。以上の結果から、間質細胞由来 HYBID は HA 分解を介して腫瘍形成に関与している可能性が示唆された。

(2) 網羅的解析を用いた機能的がん関連線維芽細胞集団の探索

ヒト肺がん組織より単離・初代培養した CAF とヒト肺がん細胞との免疫不全マウスへの混合移植モデルの作製を行い、腫瘍促進性 CAF と腫瘍非促進性 CAF の選別を行った。さらに、CAF の網羅的トランスクリプトーム解析を行い、生物学的腫瘍促進能のデータと併せて統合的に解析を行った。その結果、腫瘍促進性 CAF には腫瘍非促進性 CAF とは異なる遺伝子発現パターンが認められ、CAF の細胞特性を理解する上で有用と考えられたが、細胞間のばらつきも見られ、今後より多くのサンプルを加えた解析が必要と考えられた。また、腫瘍促進性 CAF では、元の肺がん手術検体における一部の病理学的因子との関連が示唆され、これらは CAF の悪性度を示唆する新たな指標となりうる可能性が考えられた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. **Shimoda M**^{*}. Extracellular vesicle-associated MMPs: A modulator of the tissue microenvironment. *Adv Clin Chem* 88:35-66, 2019. (*, corresponding author) (DOI: 10.1016/bs.acc.2018.10.006) (査読：有)
2. Yoshino Y, Shimazawa M, Nakamura S, Inoue S, Yoshida H, **Shimoda M**, Okada Y, Hara H. Targeted deletion of HYBID (hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization/KIAA1199/CEMIP) decreases dendritic spine density in the dentate gyrus through hyaluronan accumulation. *Biochem Biophys Res Commun* 503:1934-1940, 2018. (DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.07.138) (査読：有)
3. Shimizu H[#], **Shimoda M**[#], Mochizuki S, Miyamae Y, Abe H, Chijiwa M, Yoshida H, Shiozawa J, Ishijima M, Kaneko K, Kanaji A, Nakamura M, Toyama Y, Okada Y. Hyaluronan-binding protein involved in hyaluronan depolymerization is up-regulated and involved in hyaluronan degradation in human osteoarthritic cartilage. *Am J Pathol* 188:2109-2119, 2018. (#, equally contribution) (DOI: 10.1016/j.ajpath.2018.05.012) (査読：有)
4. **Shimoda M**, Ota M, Okada Y. Isolation of cancer stem cells from human lung carcinoma cell lines by Hoechst side population method. *Methods Molec Biol* (Springer) 1692: 49-59, 2018. (DOI: 10.1007/978-1-4939-7401-6_5) (査読：無)
5. **Shimoda M**^{*}, Yoshida H, Mizuno S, Hirozane T, Horiuchi K, Yoshino Y, Hara H, Kanai Y, Inoue S, Ishijima M, Okada Y^{*}. Hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization controls endochondral ossification through hyaluronan metabolism. *Am J Pathol* 187:1162-1176, 2017. (*, corresponding author) (DOI: 10.1016/j.ajpath.2017.01.005) (査読：有)
6. Yoshino Y, Ishisaka M, Tsuruma K, Shimazawa M, Yoshida H, Inoue S, **Shimoda M**, Okada Y, Hara H. Distribution and function of hyaluronan binding protein involved in hyaluronan depolymerization (HYBID, KIAA1199) in the mouse central nervous system. *Neuroscience* 347:1-10, 2017. (DOI: 10.1016/j.neuroscience.2017.01.049) (査読：有)
7. **Shimoda M**^{*}, Khokha R. Metalloproteinases in extracellular vesicles. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864:1989-2000, 2017. (*, corresponding author) (DOI: 10.1016/j.bbamcr.2017.05.027) (査読：有)

[学会発表] (計 10 件)

1. **下田将之**、望月早月、Rama Khokha、岡田保典：腫瘍進展における ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) の役割。第 23 回日本病態プロテアーゼ学会。シンポジウム「膜結合型プロテアーゼ/プロテアーゼインヒビターの最先端」。2018 年。

2. 清水英徳、下田将之、望月早月、宮前結加、阿部仁、千々岩みゆき、吉田浩之、塩澤淳、石島旨章、金子和夫、金治有彦、中村雅也、戸山芳昭、岡田保典：HYBIDの変形性関節症関節軟骨での発現とヒアルロン酸分解における役割解析。第31回日本軟骨代謝学会。2018年。
3. 下田将之：組織内微小環境因子代謝を介した腫瘍進展機構に関する研究。第63回日本病理学会秋期特別総会。A演説。2017年。
4. 下田将之、依田昌樹、大塚崇、岡田保典：線維芽細胞によるECM代謝を介した腫瘍形成・がん幹細胞維持機構の解明。金沢大学がん進展制御研究所拠点シンポジウム・成果発表会。2017年。
5. 下田将之、吉田浩之、水野早希子、弘實透、堀内圭輔、吉野雄太、原英彰、金井弥栄、井上紳太郎、石島旨章、岡田保典：Hyaluronan-binding protein involved in hyaluronan depolymerization controls endochondral ossification through hyaluronan metabolism. 第49回日本結合組織学会学術大会。大高賞受賞講演。2017年。
6. 下田将之、吉田浩之、水野早希子、堀内圭輔、吉野雄太、原英彰、金井弥栄、井上紳太郎、石島旨章、岡田保典：長管骨形成に関わるHYBIDの役割解析。第106回病理学会総会。2017年。
7. 下田将之、吉田浩之、水野早希子、弘實透、堀内圭輔、吉野雄太、原英彰、石島旨章、井上紳太郎、金井弥栄、岡田保典：内軟骨性骨形成におけるHYBID(hyaluronan-binding protein involved in hyaluronan depolymerization)の機能解析。第30回日本軟骨代謝学会。2017年。
8. 下田将之、吉田浩之、水野早希子、弘實透、堀内圭輔、吉野雄太、原英彰、石島旨章、井上紳太郎、金井弥栄、岡田保典：発育におけるHYBID(HYaluronan-Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization)の機能解析。一般口演。第46回日本創傷治癒学会。2016年。
9. 下田将之、吉田浩之、水野早希子、弘實透、堀内圭輔、吉野雄太、原英彰、石島旨章、井上紳太郎、金井弥栄、岡田保典：HYBID(HYaluronan-Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization)遺伝子欠損マウスの作製と表現型解析。ポスター発表。第13回日本病理学会カンファレンス。2016年。
10. 下田将之、吉田浩之、水野早希子、弘實透、堀内圭輔、井上紳太郎、岡田保典：HYBID(HYaluronan-Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization)遺伝子欠損マウスの作製と表現型解析。一般口演。第48回日本結合組織学会学術大会。2016年。

〔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：
 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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：大塚 崇
ローマ字氏名：OTSUKA, Takashi
所属研究機関名：東京慈恵会医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：40306717

(2)研究協力者

研究協力者氏名：金井 弥栄
ローマ字氏名：KANAI, Yae

研究協力者氏名：岡田 保典
ローマ字氏名：OKADA, Yasunori

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。