

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08420

研究課題名(和文) 大腸癌微小環境における細胞死機構の解明と治療開発

研究課題名(英文) Elucidation of cell death mechanisms in the colorectal cancer microenvironment and therapeutic development

研究代表者

林 義人 (Hayashi, Yoshito)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80647123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、癌微小環境を構成する線維芽細胞の活性化機構を明らかにし、大腸癌進展抑制のため癌関連線維芽細胞を標的とした新規治療法を開発することを目的とした。細胞株を用いて、p53機能欠損癌細胞由来エクソソームが線維芽細胞のオートファジーを抑制し、その結果活性化させる機構を明らかにした。また、癌細胞由来エクソソーム中に含まれるマイクロRNA発現を解析し、線維芽細胞のオートファジーを抑制する機能をもつマイクロRNAを同定した。大腸癌進展機構において、線維芽細胞におけるオートファジーが重要な役割を果たしている可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、癌微小環境を構成する癌細胞と線維芽細胞の細胞間相互作用において、癌細胞由来エクソソームがオートファジーの抑制を介して線維芽細胞を活性化することを示す学術的成果を得ることができた。本邦において大腸癌患者の増加傾向が続いているが、癌細胞由来エクソソームや線維芽細胞のオートファジーが新規治療標的となりうることを示せたことは社会的意義が高いと考える。

研究成果の概要(英文)：The aim of the present study was to elucidate the activation mechanism of fibroblasts, which constitute the cancer microenvironment, and to develop novel therapeutic strategies targeting cancer-associated fibroblasts to inhibit colorectal cancer progression. Using cell lines, we have elucidated the mechanism by which exosomes derived from p53-deficient cancer cells inhibit fibroblast autophagy and consequently activate fibroblasts. We also examined the expression of microRNAs in exosomes derived from cancer cells, and identified the microRNA which suppress autophagy of fibroblasts. We showed that autophagy in fibroblasts may play an important role in the mechanism of colorectal cancer progression.

研究分野：消化器癌

キーワード：癌微小環境 癌関連線維芽細胞 オートファジー 大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

様々な悪性腫瘍の進展において重要な役割を果たしている癌微小環境が注目されているが、中でも線維芽細胞は癌関連線維芽細胞と呼称され、癌細胞との細胞間相互作用により、腫瘍進展に寄与している。申請者は、本研究課題開始前に、大腸癌において、p53 機能欠損した癌細胞は線維芽細胞を活性化させ癌関連線維芽細胞の形質を獲得することを報告した。また、活性化した線維芽細胞は、血管内皮増殖因子の産生を亢進し、結果的に血管新生が誘導され腫瘍進展につながることを明らかにしていた。一方で、癌微小環境における線維芽細胞の詳細な活性化機構は不明であった。

また、細胞間伝達機構のひとつとしてエクソソームがあり、申請者は、p53 機能欠損大腸癌細胞由来エクソソームが線維芽細胞において癌関連線維芽細胞形質を惹起することを見出していた。しかし、p53 機能欠損大腸癌細胞由来エクソソームがどのように線維芽細胞を活性化させるかについては不明であった。本研究課題では、オートファジーに注目した。癌においてオートファジーが発癌や腫瘍進展に促進的に作用するのか抑制的に作用するのか以前より議論の対象となっていた。線維芽細胞活性化機構におけるオートファジーの役割を明らかにすることで、癌関連線維芽細胞を標的とした治療方法の開発を試みることは新規性・独創性があり、本邦において大腸癌罹患者・死亡者は近年増加傾向が続く中で社会的意義が高い研究と考えた。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、p53 機能欠損大腸癌細胞から分泌されるエクソソームが線維芽細胞の活性化を誘導する機構において、オートファジーの役割を明らかにし、エクソソームや線維芽細胞が大腸癌進展における治療標的となりうるか検討することとした。さらに、p53 機能欠損大腸癌細胞由来エクソソーム中に含まれるマイクロ RNA を解析し、線維芽細胞活性化機構において重要なマイクロ RNA を同定することも目的とした。癌細胞と線維芽細胞間相互作用に関して、本研究では癌細胞が線維芽細胞に与える影響を詳細に検討した。

3 . 研究の方法

p53 野生型大腸癌細胞株である HCT116 を用い、shRNA により p53 発現を抑制した HCT116 を樹立した。線維芽細胞として CCD-18Co 株、p53 変異大腸癌細胞株として HT29 を用いた。癌細胞由来エクソソームを超遠心法により抽出し、CCD-18Co に添加し、CCD-18Co のオートファジーをフラックスアッセイにより検討した。また、CCD-18Co におけるオートファジーの意義を明らかにするために、オートファジー関連遺伝子の発現を siRNA により抑制し、HCT116 と共培養して HCT116 の増殖能を検討した。また、p53 野生型および欠損型 HCT116 由来エクソソーム中に含まれるマイクロ RNA をマイクロアレイによって網羅的に解析し、オートファジー関連遺伝子を標的とするマイクロ RNA を *in silico* 解析により同定した。

4 . 研究成果

p53 機能欠損大腸癌細胞と共培養した線維芽細胞においては、p53 野生型大腸癌細胞と共培養した線維芽細胞に比較して、癌関連線維芽細胞形質を表す線維芽細胞活性化マーカーとなる遺伝子発現が増加し、オートファジーが抑制されることを見出した。また、p53 機能欠損大腸癌細胞由来エクソソームを線維芽細胞に添加すると、線維芽細胞のオートファジーは抑制された。p53 変異細胞株である HT29 を用いた実験でも同様の結果が得られた。その際、線維芽細胞のオートファジー関連タンパク発現を検討したところ、ATG2B の抑制を認め、線維芽細胞の ATG2B 発現を抑制するとオートファジーの抑制や活性化線維芽細胞の形質と考えられる各種遺伝子の発現上昇を認めた。また、ATG2B 発現を抑制した線維芽細胞と共培養した癌細胞では、増殖能の亢進を認めた。ATG2B を抑制するマイクロ RNA として miR-4534 を同定し、線維芽細胞で強制発現させるとオートファジーは抑制され、活性化線維芽細胞の形質と考えられる各種遺伝子発現の上昇を認めた。以上より、p53 機能欠損大腸癌細胞より分泌されたエクソソーム中の miR-4543 が線維芽細胞の ATG2B を抑制することでオートファジーを抑制させ、癌関連線維芽細胞形質として報告されている遺伝子発現上昇を誘導し、その結果腫瘍進展につながる可能性を示した。今後は、大腸癌患者の保存血清と用いて、miR-4543 発現を評価し、大腸癌組織における線維芽細胞の集簇や癌細胞の p53 発現を評価することで、本研究課題で明らかにした線維芽細胞活性化機構が実際の

ヒト大腸癌において治療標的となりうるか検討していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inoue Takanori, Hayashi Yoshito, Tsujii Yoshiki, Yoshii Shunsuke, Sakatani Akihiko, Kimura Keiichi, Uema Ryotaro, Kato Minoru, Saiki Hirotsugu, Shinzaki Shinichiro, Iijima Hideki, Takehara Tetsuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Suppression of autophagy promotes fibroblast activation in p53-deficient colorectal cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98865-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takanori Inoue, Yoshito Hayashi, Minoru Shigekawa, Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Deficiency of p53 function in colon cancer cells activate fibroblast through suppression of autophagy.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	新崎 信一郎 (Shinzaki Shinichiro) (60546860)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	
研究分担者	辻井 芳樹 (Tsujii Yoshiki) (80795170)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	飯島 英樹 (Iijima Hideki) (90444520)	大阪大学・医学系研究科・特任准教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関