

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791423

研究課題名(和文) がん微小環境における癌関連線維芽細胞を標的とした新たな癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel cancer therapy of targeting cancer-associated fibroblasts

研究代表者

野間 和広 (Noma, Kazuhiro)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：10534761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：癌の増殖や転移において線維芽細胞が大きく関与しているとされる。癌細胞に影響され線維芽細胞は癌関連線維芽細胞(CAF細胞)すなわち活性化線維芽細胞となり癌の進展に大きく作用する。我々は癌の治療においてそのCAF細胞を標的とした新たな治療戦略を開発した。CAF細胞マーカーのFAPという特異的蛋白を標的抗原とし、蛍光色素抱合の抗FAP抗体を開発した。近赤外線光を当てることにより蛍光色素が振動し細胞膜を破壊し細胞死に至らしめる。CAF細胞は実際に食道癌と共培養において癌の増殖促進していたが、その近赤外線光を用いて線維芽細胞を標的とした光線免疫療法を加えることで癌の増殖を抑制することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Cancer progression is closely related to fibroblasts. Normal fibroblasts change their phenotype to active form, cancer-associated fibroblasts (CAF) when they face on cancer cell and are affected. We have developed the new strategy, targeting of the CAF in cancer therapy. We focused on fibroblast activation protein and developed photoimmunotherapy (PIT) targeting FAP protein to kill activated fibroblasts, which is expressed in the cytoplasm and cell surface only when they are activated. The developed antibody was anti-FAP-IR700dye. Once the antibody attaches to targeted protein with IR700 and is irradiated by near-infrared light, the targeted cell was induced apoptosis by destroyed cell wall. In vitro and vivo assay, CAF cell promoted esophageal cancer progression. When we irradiated on those co-culture models with anti-FAP-IR700dye, in success cancer progression was suppressed dramatically.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：がん微小環境 癌関連線維芽細胞 食道癌 光線免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

近年の分子細胞生化学の発展により、分子標的治療薬によって飛躍的に予後改善を認める癌腫も出てきている。またその一方で、旧来からの腫瘍細胞増殖抑制という抗癌剤のあり方から、がん微小環境を制御することでより抗腫瘍効果をあげる例も出て来ており新しい可能性を示唆している。

また我々は以前より食道癌進展におけるがん微小環境、特に CAF 細胞に注目し分子標的となり得る Signal transduction の解析を行って来た。癌細胞由来の TGF $\beta$  シグナルを制御するため TGF $\beta$  受容体阻害剤を用い、癌関連線維芽細胞 (CAF 細胞) が不活性化し、VEGF の過剰産生を抑制し癌微小血管新生を阻害出来ることを報告した。以上の事は CAF 細胞を標的とした新規抗癌治療の可能性を示唆する結果であった (Noma K et al. Gastroenterology 2008)。

食道癌のがん微小環境においては癌関連線維芽細胞 (CAF) のマーカーである  $\alpha$ SMA を有する線維芽細胞の癌腫における発現頻度を検討したところ、CAF は腫瘍の深達度によってその発現頻度に違いを認め、特に腫瘍の先進部および増大傾向の強い辺縁部に多く存在することが判明した。また in vivo においても、食道癌細胞株と CAF を用いた Xenograft にて共培養の腫瘍が癌単独の腫瘍よりもより増大傾向にあることが解った。以上の実験より食道癌において、CAF はその組織浸潤に関係し、その存在は腫瘍増殖を促進していることが示唆された。

以上より我々は CAF 細胞自体を制御することで、CAF 細胞の癌に対する総合的な支援作用 (血管新生、浸潤促進および免疫抑制、至適細胞外マトリックスの制御に至るまで) も同時に制御出来るのではないかと考えた。また上記の如く CAF 細胞制御することで旧来の抗癌剤の投与にさらに上乘せ効果が得られるのではないかと仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究は、“がん微小環境”において中心的な役割を担う癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblast: 以下 CAF) を標的とした癌治療を開発することを目的とする。腫瘍細胞の増殖を標的とした従来の抗癌剤や分子標的治療ではなく、癌細胞を支持する線維芽細胞を制御する治療法を開発することで、その単剤での抗腫瘍効果はもとより、既存の抗癌剤や他モダリティーと併用することにより、さらに高い制癌・抗癌作用が得られる可能性があると考えている。さらに本研究は線維芽細胞を標的とするため、組織の線維化という病態が問題となる様々な疾患、肝硬変や肺線維症そして心筋梗塞など

各分野の治療に応用可能な研究と考えている。

## 3. 研究の方法

本研究において

(1)当教室の豊富な消化器癌 (食道癌) 治療症例を生かし癌組織中 CAF 細胞の発現と臨床病理学的な検討

(2)分子細胞生物学的手法を用いて食道癌細胞と CAF 細胞の相互作用についての解析

(3)CAF 細胞特異的マーカーに対する抗体を用いた選択的に CAF 細胞を標的とした“薬剤抱合型抗 CAF 抗体”の開発

(4)新規抱合型抗 CAF 抗体による CAF 細胞の制御効果およびその抗腫瘍効果の検討

以上を研究項目とした。

下記項目を具体的研究方法とした。

①食道癌の切除標本における CAF 細胞の臨床病理学的検討と CAF 細胞マーカーの検討

② CAF 細胞の腫瘍における相互作用の検討 (in vitro, in vivo)

③CAF 細胞の特異的マーカーに対する抗体を用いた選択的線維芽細胞の細胞死の誘導試験

④選択的に CAF 細胞を標的とした抗腫瘍効果の検討 (in vitro, in vivo)

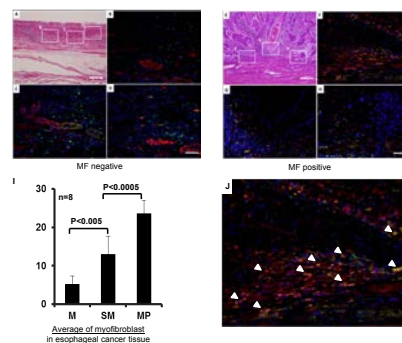
⑤抗癌剤 (5FU、シスプラチン) との併用療法による抗腫瘍効果の検討 (in vitro, in vivo)

## 4. 研究成果

①食道癌の切除標本における CAF 細胞の臨床病理学的検討と CAF 細胞マーカーの検討においては、食道癌の各深達度別に特に癌の先進部における CAF の分布を検討し、m 癌、sm 癌、mp 癌とそれぞれ深達度が深部になるほど CAF が多く確認され、強い関与が示唆された。(図 1) また、CAF のマーカーとしては Fibroblast Activation Protein (FAP) に着目し、通常の線

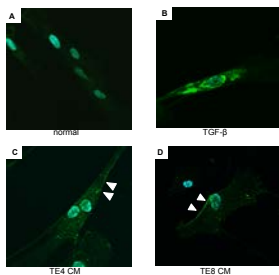
維芽細胞が癌細胞に刺激されることで FAP を高発現することがわかった。(図 2)

図1 CAFs expression in esophageal cancer tissue increased by invasion depth



② CAF 細胞の腫瘍における相互作用の検討 (in vitro, in vivo) においては、食道癌細胞と線維芽細胞を共培養することで線維芽細胞は活性型の CAF に形質転化し FAP を発現した。また in vitro にて共培養の xenograft の方が大きく増大した。以上より CAF は相乗的な作用があると示唆された。(図 3)

図2 Activated fibroblasts over-expressed FAP in cytoplasm and cell surface



FAP expression of FEF3 stimulated by TGF-β and activated with TE4 and 8 CM was increased more than normal status. FAP was strongly expressed in the cytoplasm of FEF3 stimulated with TGFβ. It was also strongly expressed on the cell surface in FEF3 activated with CM of TE cells.

図3 Activated fibroblast accelerated tumor growth of esophageal cancer cells

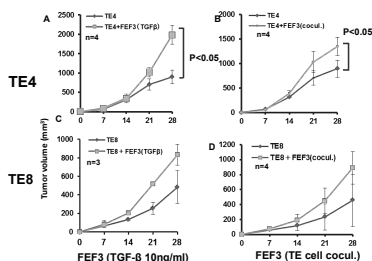
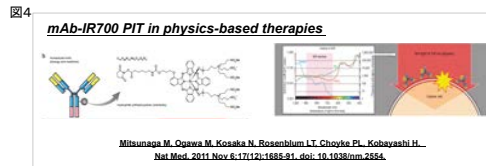


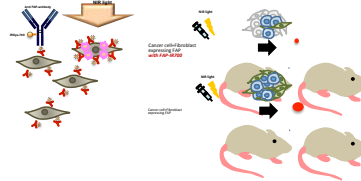
Figure 2. In vivo study, it was found that tumors co-injected TE cells and CAFs tended to grow more than TE cells alone. The same trend was observed in TE8 and TE4 cell lines. These pictures shows that tumors co-injected TE cells and CAFs grow larger than TE cells alone.

③CAF 細胞の特異的マーカーに対する抗体を用いた選択的線維芽細胞の細胞死の誘導試験

においては、CAF が特異的に発現するタンパク分解酵素の Fibroblast Activation Protein (FAP) を標的とした治療法を開発した。方法は、IR700 とよばれる蛍光蛋白で抗体と抱合し近赤外線光を当てると赤色発色し、また抗原が細胞膜に存在する細胞であれば膜破壊が起こり細胞死を誘導することが出来る Photoimmunotherapy を応用した。原方では HER2 陽性細胞に対して Herceptin-IR700 を用いて実験で細胞死や in vitro での腫瘍縮小を認めた。我々は Herceptin 抗体の変わりに抗 FAP 抗体を用いて応用した。(図 4) 活性化された線維芽細胞を選択的に近赤外線光で死滅させる方法で、世界で初めて選択的に CAF を標的とした治療法である。

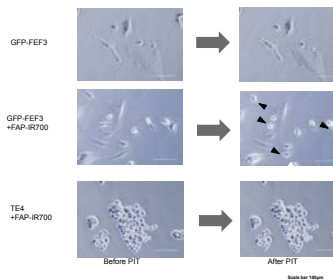


Concept of therapeutic strategy



実際に in vitro にて癌細胞により活性化された線維芽細胞を近赤外線光で選択的に殺傷することに成功した。(図 5)

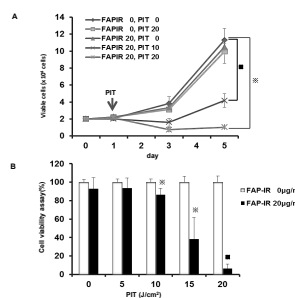
図5 Morphological change was confirmed in activated FEF3 by FAP-IR700-mediated PIT.



It was observed a cell shrinkage after irradiation with NIR light in GFP-FEF3 expressing FAP with FAP-IR700. (Arrow head) On the other hand, GFP-FEF3 without FAP-IR700 was not seen shrinkage. A morphological change was not seen even if we irradiated TE4 with NIR light. The same trend was observed in TE8 cells.

細胞増殖実験においても、また近赤外線光の力価依存的にも活性化された線維芽細胞即ち CAF を殺傷することに成功した。(図 6)

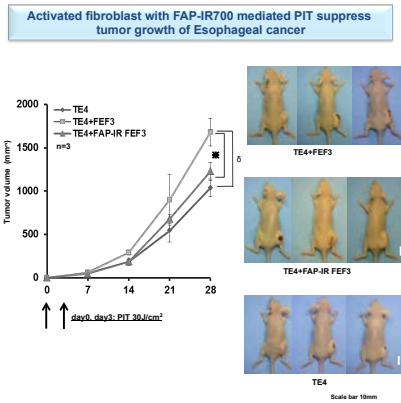
図6 Long-term growth inhibition in response to FAP-IR700-mediated PIT



A) Cell growth curve: A proliferation assay revealed that long-term growth inhibition was achieved only when cells were treated with FAP-IR700 and were also exposed to light.  
B) XTT assay: Cell viability was controlled in the group which conjugated with FAP-IR700 by strength dependence of the light significantly.

④選択的に CAF 細胞を標的とした抗腫瘍効果の検討 (in vitro, in vivo) においては in vivo の実験として食道癌細胞と線維芽細胞 (癌細胞による活性化された線維芽細胞=CAF) を共培養した Xenograft に近赤外線光を照射する群と照射しない群で

図7



比べると照射しCAFをコントロールした群で有意に腫瘍増大を抑制することが確認された。(図7)

以上の結果は、がん微小環境における線維芽細胞を標的としたのみならず癌の治療における癌細胞外の細胞、即ち正常細胞をコントロールした新たな治療法として画期的な方法である。

さらに癌の進展におけるCAFの役割の重要性は多くの論文にて発表されているが実際にCAFを制御する方法や制御した制癌治療を開発した報告はなく世界初の線維芽細胞を標的とした治療法開発と言える。

今後は、上記研究計画にあげられるものし得なかった⑤抗癌剤(5FU、シスプラチン)との併用療法による抗腫瘍効果の検討(in vitro, in vivo)の検討を引き続き行う予定である。

#### 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)

① [雑誌論文] (計 0 件)

② [学会発表] (計 3 件)

(1) 渡邊 伸一郎 ( 野間 和広 他 )、Cancer-associated fibroblasts contribute to progression of esophageal cancer、日本癌学会、平成 24 年 9 月 19 日、札幌

(2) 渡邊 伸一郎 ( 野間 和広 他 )、Novel photoimmunotherapy (PIT) targeting cancer-associated fibroblast (CAFs) for esophageal cancer、AACR、平成 25 年 4 月 10 日、ワシントン DC

(3) 野間 和広、Potential of targeting cancer-associated fibroblasts (CAFs) in cancer therapy、日本外科学会、平成 26 年 4 月 3 日、京都

③ [図書] (計 0 件)

#### ④ [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

がんの間質細胞を標的とする治療開発

<http://www.ges-okayama-u.com/research.html#1>

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科消化器外科内のホームページ、研究の項目にて発表されている。

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

野間 和広 (NOMA KAZUHIRO)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号: 10534761

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: