

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14385

研究課題名(和文) 癌微小環境の正常化による新規癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy normalizing tumor-associated stroma

研究代表者

折茂 彰 (Akira, Orimo)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70275866

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)：癌塊中に多数存在する癌内線維芽細胞(Carcinoma-associated fibroblasts: CAFs)は活性化した筋線維芽細胞集団より形成され、癌進展を促進することが知られている。それ故、CAFsは癌治療の標的として考慮されるが、具体的な標的分子は知られていない。本研究ではヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 HDAC inhibitorがCAFsを不活性化することにより癌進展を抑制する可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：CAFs (Carcinoma-associated fibroblasts) are often present in various human carcinomas. These fibroblasts are also composed of myofibroblasts, a hallmark of activated fibroblasts and known to promote tumor progression. However, molecular targets on CAFs have not been elucidated yet. In this study, we claim that HDAC inhibitors are a promising to inactivate tumor-promoting CAFs to prevent tumor progression.

研究分野：癌生物学

キーワード：癌微小環境 CAFs エピゲノム変異 乳癌

### 1. 研究開始当初の背景

癌塊は癌細胞に加えて、癌微小環境中に存在する線維芽細胞、炎症細胞や血管内皮細胞などの多数の非癌細胞により構成されている。これらの間質細胞が、癌細胞の増殖、細胞死抑制、血管新生、浸潤や転移に強く影響していることが最近の研究により明らかにされている。申請者は、患者乳癌塊より癌微小環境の主な構成細胞である筋線維芽細胞を豊富に含んだ CAFs を抽出し、この細胞が stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) と TGF- $\beta$  の autocrine signaling を獲得し、癌血管新生や癌細胞の増殖を顕著に促進することを明らかにした<sup>1-3</sup>。これらの背景のもとに、申請研究は、CAFs を不活性化することにより、この細胞の血管新生や炎症促進作用などを抑制し、結果として癌微小環境を正常化することにより癌化・進展を制御するという着想に至った。

癌促進性の癌微小環境を正常化し癌退縮を誘導する治療法の前例として、vascular endothelial growth factor (VEGF) 拮抗剤投与による血管新生抑制が知られている。しかしながら、癌転移促進などの予期せぬ副作用に加え、期待された癌抑制効果が得られていないのが現状である。癌微小環境の正常化をより効率的に行うためには、新規の標的細胞や標的分子の同定が不可欠である。申請者は、癌塊に多数存在する CAFs を標的にすることを計画している。上述したように、CAFs は癌内で活性化筋線維芽細胞として存在し、様々な癌促進性のサイトカインや増殖因子を産生する。この病態は線維症と酷似し、CAFs と線維症内に存在する活性化筋線維芽細胞は極めて類似した細胞であることが認識されている。線

維症発症動物モデルにおいて、HDAC inhibitor の投与が線維症を有意に軽減させることが報告されているが、HDAC inhibitor が CAFs の活性化を抑制し、癌進展を抑制するか否かについてはまだ報告がない。

### 2. 研究の目的

癌塊中に多数存在する癌内線維芽細胞 (Carcinoma-associated fibroblasts: CAFs) は活性化した筋線維芽細胞集団より形成され、多種多様なサイトカインや増殖因子を産生し、血管新生や炎症を促し癌進展を促進することが知られている。それ故、CAFs は癌治療の標的として考慮されるが、具体的な標的分子を絞り込むことは容易ではない。申請者は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 histone deacetylase (HDAC) inhibitor が CAFs を不活性化することを見出した。CAFs を不活性化することにより、多数の血管新生および炎症促進性のサイトカインや増殖因子の産生を抑制することにより、癌微小環境を正常化し、CAFs の癌促進能を抑制することが予期される。申請研究では、HDAC inhibitor による CAFs の不活性化機構および癌促進能の抑制機構を分子レベルで解明して、CAFs を標的にした癌微小環境の正常化による新規癌治療法の基礎を築きたい。

### 3. 研究の方法

癌治療抵抗性や再発などの問題点を克服できる社会実現の達成に向けて、申請研究では CAFs を不活性化することにより癌微小環境を正常化し、飛躍的に治療効果を向上させるレジメを動物実験レベルで開発する。このゴールに向けて、次の目標 ~ を設定して戦略的にアプローチする。申請研究では、HDAC

inhibitor による CAFs の不活性化の分子機構を解明する。不活性化された CAFs の癌増殖・悪性化能抑制の分子機構を調査する。CAFs を標的にした癌微小環境の正常化および癌進展抑制を動物モデルを使用して検証する。

以上より癌微小環境の正常化を促すことによる、より効果的な癌治療法の開発を目指した架け橋的基礎研究を3ヵ年計画で試行する。

#### 4. 研究成果

1) HDAC inhibitor による CAFs の不活性化の分子機構を解明した。HDAC inhibitor の添加により a-SMA, TGFβ1, SDF-1 などの活性化線維芽細胞のマーカーの発現が低下した。

2) 次に HDAC が不活性化された CAFs の癌増殖・悪性化能抑制の分子機構を調査した。HDAC1-shRNA および HDAC 抑制剤の TSA 処理により、SDF-1 や TGF-β のオートクラインシグナルが抑制された。

3) HDAC1-11 までが知られており、クラス I-IV までの4つのクラスに分類される。各サブタイプ特異的な HDAC 抑制剤の投与により、少なくとも HDAC1 が CAFs の活性化に寄与していることが示唆された。

4) 次に、CAFs を標的にした癌微小環境の正常化および癌進展抑制を動物モデルにて検証するために、CAFs における shRNA による HDAC1 蛋白の発現抑制は、乳癌細胞と免疫不全マウスに共移植された場合、乳癌細胞の増殖を抑制した。

#### (考察)

CAFs の活性化能や癌促進能は、ゲノム遺伝子変異でなく、エピゲノムの変異により媒介されている可能性が強い。CAFs で TGFβ, SDF-1, YAP, NF-κB, p62, PI3K-AKT, Notch シグナルなどの多くの

シグナルの亢進や低下が報告されているが、これらの変異がどのように CAFs の癌促進能の恒常的な維持に寄与しているのかは明らかでない。

本研究の結果より、CAFs における HDAC が活性化していることに加えて、HDAC の抑制が CAFs の活性化や癌促進能を抑制することが分かった。このことは、CAFs が恒常的にその癌促進性の表現型を維持する上で、HDAC の活性化およびヒストンの脱アセチル化が重要である可能性を示唆している。

しかしながら、この作用が、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤による global なヒストンのアセチル化の亢進に依存するのがあるいは、転写因子などの non-ヒストン蛋白のアセチル化亢進に依存するのかが検討する必要がある。

今後は、CAFs におけるアセチル化の低下がどのように関連シグナルを調整し、CAFs の機能に関与しているのかをより詳細に研究する必要がある。また、CAFs におけるエピゲノム異常の臨床的意義に関しての研究も必要である。

#### 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)

[雑誌論文](計7件)

1. Pernilla Roswall, Matteo Bocci, Michael Bartoschek, Hong Li, Glen Kristiansen, Sara Jansson, Sophie Lehn, Jonas Sjölund, Steven Reid, Christer Larsson, Pontus Eriksson, Charlotte Anderberg, Eliane Cortez, Lao H Saal, Christina Orsmark-Pietras, Eugenia Cordero, B Kristian Haller, Jari Häkkinen, Ingrid JG Burvenich, Elgene Lim, Akira Orimo, Mattias Höglund, Lisa Rydén, Holger Moch, Andrew M Scott, Ulf Eriksson, Kristian Pietras, Microenvironmental control of breast cancer subtype elicited by paracrine platelet derived growth factor-CC signaling., Nat. Med. 2018

- Mar 12. doi: 10.1038/nm.4494 査読あり
2. Tomokatsu Omoto, Joo-ri Kim-Kaneyama, Xiao-Feng Lei, **Akira Orimo**, Koji Ohnishi, Kosuke Yoshihara, Aya Miyuchi, Shuo Li, Lin Gao, Takahiro Umemoto, Junichi Tanaka, Kenta Nakahara, Motohiro Takeya, Fumio Ishida, Shin-ei Kudo, Shogo Haraguchi, Takuro Miyazaki and Akira Miyazaki., The impact of stromal Hic-5 on the tumorigenesis of colorectal cancer through lysyl oxidase induction and stromal remodeling. *Oncogene*, 2017, Dec 15. doi: 10.1038/s41388-017-0033-y 査読あり
  3. Escudero-Esparza A., Bartoschek M., Gialeli C., Okroj M., Owen S., Jirström K., **Orimo A.**, Jiang WG, Pietras K., Blom AM., (2016) Complement inhibitor CSMD1 acts as tumor suppressor in human breast cancer. *Oncotarget*, 2016, 7, 76920-76933 査読あり
  4. Mezawa, Y. and **Orimo A.\***, The roles of tumor- and metastasis-promoting carcinoma-associated fibroblasts in human carcinomas. *Cell and tissue research*, (2016), *Cell Tissue Res*, 365, 675-89. doi:10.1007/s00441-016-2471-1. 査読あり
  5. Englund E, Bartoschek M, Reitsma B, Jacobsson L, Escudero-Esparza A, **Orimo A**, Leandersson K, Hagerling C, Aspberg A, Storm P, Okroj M, Mulder H, Jirström K, Pietras K, Blom AM. (2016) Cartilage oligomeric matrix protein contributes to the development and metastasis of breast cancer. *Oncogene*. 235, 5585-5596 doi: 10.1038/onc.2016.98 査読あり
  6. Holmquist E., Reitsma B., King B., Escudero-Esparza Sioned Owen A., **Orimo A.**, Okroj M., Anagnostaki L., Jiang W., Jirström K., Blom A., The human complement inhibitor Sushi Domain-Containing Protein 4 (SUSD4) expression in tumor cells and CD8+ T cells is associated with better prognosis of breast cancer patients. *BMC Cancer*, (2015) 19, 737. 査読あり
  7. Polanska, Y. \* and **Orimo A.\*** (2013) Carcinoma Associated Fibroblasts. *Journal of Cellular Physiology*, 228, 1651-7. \*Corresponding author 査読あり

〔学会発表〕(計9件)

1. 招待講演：ワークショップ講演 乳癌内線維芽細胞と癌浸潤・転移 折茂 彰、伊藤 恭彦、目澤 義弘、

- Kaidiliavi Sulidan、Nadila Wali、竹田省、奥村 康、竹田 和由、樋野興夫、浜田 道昭、松村 優子 第27回日本癌病態治療研究会 6月1日2018年 千葉
2. English oral presentation : CAFs boost mammary cancer invasion and metastasis via formation of the epithelial and mesenchymal tumor cell cluster. **Akira Orimo**, Yasuhiko Ito, Yoshihiro Mezawa, Kaidiliavi Sulidan, Nadila Wali1, Okio Hino, Kazuyoshi Takeda, Michiaki Hamada, Yuko Matsumura 第76回日本癌学会学術総会 9月28-30日2017年横浜
  3. 招待講演；**折茂 彰** [2PS13-5] 癌内線維芽細胞による癌悪性化機構 [2PS13] シンポジウム：生体現象における上皮-間葉細胞間相互作用 2016年12月1日(木) 13:00 ~ 15:15 オーガナイザー：斉藤 正夫(山梨大学)、Guojun Sheng(熊本大学・IRCMS) 第39回日本分子生物学会年会 横浜
  4. English oral presentation, **Akira Orimo**, Nadila Wali, Yasuhiko Ito, Okio Hino, Kazuyoshi Takeda, Michiaki Hamada, Yuko Matsumura, CAFs boost mammary cancer metastasis via increasing the cell-cell adhesion 第75回日本癌学会学術総会 10月8日2016年横浜
  5. 招待講演；Carcinoma-associated fibroblasts confer adherent epithelial cell traits in breast cancer cells to promote metastasis **Akira Orimo**. シンポジウム がんの浸潤・転移メカニズムの解明と治療標的 第75回日本癌学会学術総会 名古屋、10月8日2015年
  6. 招待講演；**Orimo A.**癌細胞と癌内線維芽細胞の共進化および癌悪性化 第30回発癌病理研究会 8月27日2015年
  7. 招待講演 **折茂 彰** 癌悪性化における癌内線維芽細胞の関与 平成26年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ 滋賀県大津市 2月5-6日2015年
  8. 招待講演 折茂彰 癌内線維芽細胞による癌悪性化分子機構 日本癌学会シンポジウム・共同利用共同

研究拠点シンポジウム「がん幹細胞・微小環境・分子標的～がん進展制御への挑戦」 金沢、1月21-22日、2015年

9. 招待講演 **折茂彰** Evolution of human breast carcinoma cells with stromal myofibroblasts to propagate tumor metastasisシンポジウム：がんを知る：「がん細胞の浸潤の新たなメカニズム」第73回日本癌学会学術総会 横浜、9月27日2014年

〔図書〕(計7件)

1. 折茂彰 私のメンター～受け継がれる研究の心～ Robert A. Weinberg-我ががん研究者の親父 Bob- vol. 34 984頁 4月号2016年3月号 実験医学 羊土社
2. 折茂彰 がん転移予防を考える～がん微小環境の立場より～ 日本がん予防学会 News Letter No.87, 2016年3月号
3. 伊藤匠、松村優子、伊藤恭彦、**折茂彰** 癌内線維芽細胞と癌進展・悪性化 34巻8号758-766頁 呼吸 2015
4. **折茂彰**, 松村優子, 本多一貴, Nadila Wali, がん内線維芽細胞とがんの悪性化 Vol.33 No.5 73-80癌小環境と標的治療 実験医学 羊土社 2015年
5. **折茂彰**, 松村優子, 伊藤恭彦, 十合晋作 線維化病態と癌悪性化 呼吸器内科 科学評論社 2月号第27巻第2号142-148, 2015年
6. 谷口源太郎、**折茂彰** 肺の損傷と発癌機序「Annual Review 呼吸器 2015」(株)中外医学社 99-106, 2015年
7. 松村優子, 伊藤恭彦, **折茂彰** がん細胞の浸潤・転移を促進するがん微小環境:がん内線維芽細胞を例に 細胞工学 Vol.33 No.6 609-12 2014年

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称：患者原発性大腸癌の個別化転移モデルマウスの作製方  
発明者：**折茂彰** 他6名(7人中1番目)

権利者：**折茂彰** 他6名(7人中1番目)  
種類：  
番号：2013-193525  
出願年月日：平成25年9月18日  
国内外の別：国内

名称：早期癌転移検出法および新規癌転移抑制薬のスクリーニング法  
発明者：**折茂彰** 他3名(4人中1番目)  
権利者：**折茂彰** 他3名(4人中1番目)  
種類：  
番号：2013-189538  
出願年月日：平成25年9月12日  
国内外の別：国内

名称：強転移性ヒト癌細胞株  
発明者：**折茂彰**  
権利者：**折茂彰**  
種類：  
番号：2013-178842,  
出願年月日：平成25年8月30日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://ganshien.umin.jp/research/main/orimo/index.html>

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
折茂彰 (ORIMO AKIRA)  
順天堂大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：70275866  
(2)研究分担者