

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14856

研究課題名(和文) 癌組織様オルガノイドの樹立による筋線維芽細胞の癌ニッチとしての役割の解明

研究課題名(英文) Clarification of the role of myofibroblasts in cancer niche by development of cancer-tissue like organoid

研究代表者

大浜 剛 (Ohama, Takashi)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：50579018

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)：近年、癌の成長・悪性化には、癌組織中の微小環境(癌ニッチ)が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。特に、筋線維芽細胞は癌ニッチの主役として注目されている。しかし、筋線維芽細胞がどのように癌細胞の成長や悪性化を制御しているのか、反対に癌細胞が筋線維芽細胞の挙動にどのような影響を与えるかなど、癌細胞と筋線維芽細胞の相互作用についての分子機構はほとんど明らかになっていない。本研究では、がん細胞が産生したHB-EGFが筋線維芽細胞のErb1/4受容体を介してERK1/2およびJNK1/2を活性化することで筋線維芽細胞の遊走を促進し、癌ニッチへ呼び寄せることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cancer microenvironment (cancer-niche) has been shown to contribute to the growth and malignant transformation of cancer. Accumulating evidences revealed that myofibroblasts plays the central role in cancer-niche. However, it remains largely unknown how myofibroblasts and cancer cells regulate each other. In this project, we found that HB-EGF secreted by cancer cells promotes myofibroblasts migration through ERK1/2 and JNK1/2 activation, which, in turn, could support cancer progression.

研究分野：薬理学

キーワード：がん 筋線維芽細胞 大腸癌 HB-EGF

1. 研究開始当初の背景

近年、癌の成長・悪性化には、癌組織中の微小環境（癌ニッチ）が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。特に、筋線維芽細胞は癌ニッチの主演として注目されている。しかし、筋線維芽細胞がどのように癌細胞の成長や悪性化を制御しているのか、反対に癌細胞が筋線維芽細胞の挙動にどのような影響を与えるかなど、癌細胞と筋線維芽細胞の相互作用についての分子機構はほとんど明らかになっていない。

消化管の筋線維芽細胞は上皮細胞の足場として存在し、その組織学的局在から上皮ニッチとしての重要性が古くから指摘されてきた（図1）。生理的な重要性に加え、癌ニッチとしての病態生理的な重要性が明らかになったことでさらに注目が高まっているが、これまで適切な細胞株が存在しなかったことがこの分野の研究の進展を妨げてきた。申請者はこの問題を解決するため、世界で初めてマウス腸筋線維芽細胞株を樹立した。

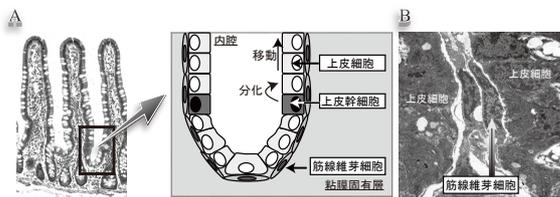


図1 消化管の筋線維芽細胞

- A. 消化管の陰窩の底には上皮幹細胞が存在する。筋線維芽細胞は上皮細胞の足場として存在し、分化や遊走などを制御する。
- B. マウス結腸陰窩部の電子顕微鏡像。筋線維芽細胞と上皮細胞の接着の様子が観察できる。

2. 研究の目的

本研究は、従来の細胞間相互作用解析法を用いた検討に加え、癌組織様オルガノイドを用いた検討を行うことで、消化管癌における筋線維芽細胞と癌細胞の相互作用の分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

マウス腸上皮細胞株 aMoC1 に、がん促進因子 RasV12 を安定的に発現させることで細胞を癌化させた。この細胞と初代培養マウス腸筋線維芽細胞および我々が樹立したマウス腸筋線維芽細胞株 LmcMF を用いて、正常腸上皮細胞と癌細胞が筋線維芽細胞に与える影響を比較検討した。また、ヒト大腸癌患者臨床サンプルの癌組織および周辺の正常組織からオルガノイドを形成させ、筋線維芽細胞を単離培養した。

4. 研究成果

本研究は、消化管癌における筋線維芽細胞と癌細胞の相互作用の分子機構を解明する

ことを目的とし、(項目 A) 従来の細胞間相互作用解析法を用いた検討、(項目 B) 癌組織様オルガノイドを用いた検討、の2つの視点から解析を行った。

項目 A では、マウス正常上皮細胞株 aMoC1 に、がん促進因子である RasV12 を安定発現させた細胞株 aMoC1-RasV12 の培養上清が、筋線維芽細胞の表現型に与える影響を解析し、培養上清中の HB-EGF が Erb1/4 受容体を介して ERK1/2 および JNK1/2 を活性化することで筋線維芽細胞の遊走を促進していることを明らかにした（図2）。具体的には、aMoC1 細胞の培養上清（MCM）と aMoC1-RasV12 の培養上清（KCM）で初代培養マウス腸筋線維芽細胞および LmcMF を処置したところ、MCM 処置により筋線維芽細胞の遊走は促進されたが、KCM にはそれを有意に上回る遊走促進効果が観察された。aMoC1 に比べて aMoC1-RasV12 で発現が高いサイトカイン類の腸筋線維芽細胞の遊走に対する効果を解析したところ、HB-EGF 処置で顕著に増加することが明らかになった。培養上清および HB-EGF が腸筋線維芽細胞のシグナル伝達に与える影響を解析したところ、KCM 中の HB-EGF は ERK1/2 および JNK1/2 シグナルを活性化していることが明らかになった。ErbB1/4 受容体拮抗薬である daconitinib は、HB-EGF 処置による ERK1/2、JNK1/2 シグナルの活性化、および筋線維芽細胞の遊走促進をほぼ完全に解除した。当該研究は、「Regulation of intestinal myofibroblasts by KRas-mutated colorectal cancer cells through heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor」として Oncology Reports に掲載された。

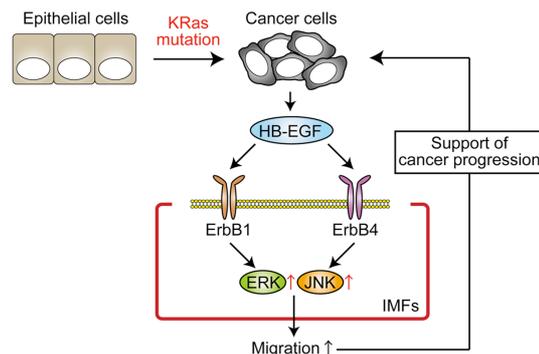


図2 細胞の癌化が腸筋線維芽細胞の遊走を制御する分子機構

比較的悪性度の高い大腸癌では sphingosine kinase (SphK) の発現上昇が観察される。SphK は sphingosine をリン酸化することで sphingosine-1-phosphatase (S1P) を産生する。我々は以前、S1P が腸筋線維芽細胞に作用すると、cyclooxygenase-2 (COX-2) 発現を上昇させることでがん悪性化因子である prostaglandin E₂ (PGE₂) 産生

を誘導することを報告している (Ohama T et al. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2008, 295(4):G766-75)。そこで、S1P が腸筋線維芽細胞の遊走に与える影響を解析したところ、腸上皮細胞での SphK 発現上昇による S1P 産生が、S1PR2/Rock/Rac1 シグナルを介して、腸筋線維芽細胞の遊走を抑制することが明らかになった。この結果は、悪性度の高い大腸癌では、がん細胞が産生する S1P によって腸筋線維芽細胞が、癌ニッチ中に維持され、がんの悪性化に利用されている可能性を示唆する。本研究結果は、現在論文投稿準備中である。

項目 B については、ヒト大腸癌組織と周辺部の正常部組織からエアリーキッド法によるオルガノイドの作製を行った。エアリーキッド法は、従来のクリプト上皮や上皮幹細胞単独で作製するオルガノイドと異なり、筋線維芽細胞を含む様々な細胞を含有する。簡便であることがこの手法の利点の 1 つであるが、ヒトの臨床サンプルの場合、オルガノイド形成の成功率に個体差が大きく結果が安定しないことが明らかになった。また、外科手術時に摘出される新鮮標本が必要なため、思うように研究が進まないという欠点も存在したことから、代替法として aMoC1-RasV12 細胞をソフトアガー内で足場非依存的に培養するコロニー形成試験や免疫不全体内で腫瘍を形成させる担がんマウスモデルを用いて、筋線維芽細胞の癌ニッチとしての役割の解析を行った。ソフトアガーアッセイでは aMoC1 がほとんどコロニーを形成しないのに対して、aMoC1-RasV12 細胞では顕著にコロニー数の増加が観察されたことから、RasV12 の発現で細胞が癌化していることが確認できた。また、予備的検討の段階であるが、aMoC1-RasV12 と腸筋線維芽細胞を混合して免疫不全動物に移植させ「癌細胞-腸筋線維芽細胞混合型腫瘍」を形成させたところ、腸筋線維芽細胞の存在により癌の成長が促進される結果が得られている。今後は、HB-EGF をはじめとした癌細胞-腸筋線維芽細胞相互作用に関わる因子が、癌の成長に与える影響を検討して行く予定である。

オルガノイド形成に用いたヒト大腸癌臨床サンプルから筋線維芽細胞を単離培養し、患者間でのその性状の違いの比較を行った。 α -SMA や vimentin 等の筋線維芽細胞マーカーの発現を確認したところ、患者間で発現パターンにかなりの違いが存在することが明らかになった。また、これらのヒト大腸癌由来筋線維芽細胞を、マウス腸筋線維芽細胞に対して遊走抑制作用の認められた S1P で処置したところ、顕著に遊走が抑制される細胞と、全く影響のない細胞が存在し、反応性においても患者間で大きな違いが存在することが明らかになった。現在、筋線維芽細胞の表現型の違いが生まれる分子機構を解析中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- (1) Kawasaki H, Saotome T, Usui T, Ohama T, Sato K (2017) Regulation of intestinal myofibroblasts by KRas-mutated colorectal cancer cells through heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor *Oncol Rep.* 37(5): 3128-3136 (doi:10.3892/or.2017.5520) 査読あり
- (2) Kake S, Usui T, Ohama T, Yamawaki H, Sato K (2017) Death-associated protein kinase 3 controls tumor progression of A549 cells through ERK MAPK/c-Myc signaling *Oncology Report*, 37(2): 1100-1106 (doi:10.3892/or.2017.5359) 査読あり
- (3) Usui T, Sakurai M, Enjoji S, Kawasaki H, Umata K, Ohama T, Fujiwara N, Yabe R, Tsuji S, Yamawaki H, Hazama S, Takenouchi H, Nakajima M, Tsunedomi R, Suzuki N, Nagano H, Sato K (2016) Establishment of a novel model for anti-cancer drug resistance in three-dimensional primary culture of tumor microenvironment. *Stem Cells International*, 2016, 7053872 (doi:10.1155/2016/7053872) 査読あり
- (4) Tsuji S, Yabe R, Usui T, Mizuno T, Ohama T*, Sato K (2016) Anti-Tumor Effects of Perphenazine on Canine Lymphoma *Journal of Veterinary Medical Science*, 78(8):1293-1298 (doi:10.1292/jvms.15-0707) 査読あり
- (5) Fujiwara N, Usui T, Ohama T*, Sato K (2016) Regulation of Beclin 1 Protein Phosphorylation and Autophagy by Protein Phosphatase 2A (PP2A) and Death-Associated Protein Kinase 3 (DAPK3). *Journal of Biological Chemistry*, 291(20): 10858-10866 (doi:10.1074/jbc.M115.704908) 査読あり
- (6) Hosoyama T, Samura M, Kudo T, Nishimoto A, Ueno K, Murata T, Ohama T, Sato K, Mikamo A, Yoshimura K, Li TS, Hamano K (2015) Cardiosphere-derived cell sheet primed with hypoxia improves left ventricular function of chronically infarcted heart *American Journal of Translational Research*, 7(12): 2738-2751. 査読あり

- (7) Yabe R, Miura A, Usui T, Mudrak I, Ogris E, Ohama T*, Sato K (2015) Protein Phosphatase Methyl-Esterase PME-1 Protects Protein Phosphatase 2A from Ubiquitin/Proteasome Degradation *PLoS ONE*, 10(12): e0145226 (doi:10.1371/journal.pone.0145226) 査読あり
- (8) Enjoji S, Yabe R, Fujiwara N, Tsuji S, Vitek MP, Mizuno T, Nakagawa T, Usui T, Ohama T*, Sato K (2015) The Therapeutic Effects of SET/I2PP2A Inhibitors on Canine Melanoma. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(11): 1451-1456. (doi:10.1292/jvms.15-0193) 査読あり

〔学会発表〕(計 7件)

- (1) 川崎秀吉, 馬田康司, 碓彰一, 鈴木伸明, 永野浩昭, 臼井達哉, 大浜剛, 佐藤晃一 Sphingosine-1-Phosphate は結腸癌微小環境において筋線維芽細胞の遊走を制御する
第39回日本分子生物学会 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
2016年12月2日 (ポスター発表)
- (2) 臼井達哉、櫻井優、川崎秀吉、大浜剛、佐藤晃一
エアリーキッドインターフェイス培養法を用いた三次元マウス肺がんモデルの樹立
第159回日本獣医学会 日本大学 (神奈川県・藤沢市)
2016年9月6日 (口頭発表)
- (3) 大浜剛
消化管の炎症・癌におけるタンパク質脱リン酸化酵素の役割
第89回日本薬理学会 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
2016年3月9日 (シンポジウム)
- (4) Kawasaki H, Usui T, Ohama T, Sato K Interaction of epithelial cells with intestinal myofibroblasts through S1P in colorectal cancer. The Joint Symposium of the 7th Veterinary Research among Universities of Veterinary Medicine in East Asia, Hanoi, Vietnam
2016年2月22日 (口頭発表)
- (5) 大浜剛
胃がんにおける PP2A 阻害タンパク質 SET の役割
第7回日本プロテインホスファターゼ研究会 基礎生物学研究所 (愛知県・岡崎市)
2016年1月30日 (口頭発表)
- (6) Kawasaki H, Usui T, Ohama T, Sato K Interaction of epithelial cells with intestinal myofibroblasts through S1P in colorectal cancer. The 3rd Sapporo Summer Seminar for One Health 北海道大学 (北海道・札幌市)
2015年9月16日 (口頭発表)
- (7) 川崎秀吉、臼井達哉、大浜剛、佐藤晃一 結腸癌における Sphingosine-1-Phosphate を介した上皮細胞と筋線維芽細胞の相互作用
第158回日本獣医学会 北里大学 (青森県・十和田市)
2015年9月7日 (口頭発表)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~vetpharm/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大浜剛 (OHAMA, Takashi)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：50579018