

令和元年6月18日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11373

研究課題名(和文)皮膚線維芽細胞と悪性黒色腫細胞との相互作用の検討

研究課題名(英文)The relationship between cancer-associated fibroblasts and malignant melanoma cells.

研究代表者

元村 尚嗣 (Motomura, Hisashi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30382188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、癌細胞の進展に深く関与するとされている癌微小環境、とりわけ微小環境中に存在する癌関連線維芽細胞に着目したものである。本研究の結果、癌関連線維芽細胞は、悪性黒色腫の進展、とりわけ細胞増殖能に対して促進的に作用していると考えられた。また、その作用は癌関連線維芽細胞から放出されるmacrophage inflammatory protein-3 beta (MIP3-)を介した機序である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行期の悪性黒色腫に対する治療は、今日でも最も困難な挑戦の一つである。従来は有効性を示す抗がん剤もほとんど無かったが、近年は免疫チェックポイント阻害薬を初めとしたいくつかの分子標的薬が開発され、その予後も少しずつ改善されているが、まだその有効性は高いとは言えないのが現状である。今回の結果は、これまでとは異なった観点から悪性黒色腫の増殖機序の解明を行っており、新たな分子標的薬の開発につながる可能性がある我々は考えている。

研究成果の概要(英文)：Our research focuses on the tumor's microenvironment especially cancer-associated fibroblasts (CAF), which exists in the tumor's microenvironment. This result suggested that CAF affect on melanoma progression, especially the ability of proliferation. Furthermore, it suggested that CAF affect on melanoma through the release of macrophage inflammatory protein-3 beta (MIP-3).

研究分野：形成外科学

キーワード：悪性黒色腫 癌微小環境 癌関連線維芽細胞

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

1. 研究開始当初の背景

皮膚悪性黒色腫は、急速な増殖や遠隔転移のため悪性度が非常に高い癌腫の一つとされる。その発生頻度は人種間で差異が見られ、かつて本法では 10 万人に 1 人という比較的稀な腫瘍であったが、近年では増加傾向にある。皮膚悪性黒色腫に対する薬物療法は近年では分子標的薬がその中心を担っており、とりわけ免疫チェックポイント阻害薬は従来の抗がん剤とは一線を画する効果を上げている。しかしその治療効果はまだ満足できるものとは言い難いのが現状であり、より有効性の高い治療薬の開発が望まれている。

他方、分子標的薬の開発には癌細胞の発現蛋白やその伸展に関わる物質の解明が不可欠である。以前より悪性黒色腫の発現する蛋白についての網羅的研究は行われているが、癌細胞を取り巻く周囲の微小環境に着目した報告は少ない。胃癌や大腸癌、膵癌など多くの癌腫において癌細胞周囲の微小環境、とりわけ線維芽細胞が癌細胞の伸展に影響することが報告されている。悪性黒色腫についても同様に癌周囲微小環境がその伸展に影響を与えている可能性が考えられるが、その関連性について検討した報告はほとんど認めない。

2. 研究の目的

本研究は、上記の視点から悪性黒色腫の増殖機序の解明を図ることを目的としている。すなわち癌周囲微小環境、その中でも癌関連線維芽細胞と呼ばれる癌微小環境中の線維芽細胞に着目し、悪性黒色腫細胞へ与える影響及びその機序についての検討を通じて、悪性黒色腫の進展に影響する物質を解明することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 癌関連線維芽細胞株の樹立

大阪市立大学医学部附属病院形成外科において悪性黒色腫を含む皮膚悪性腫瘍に対する加療目的に受診した患者のうち、インフォームドコンセントを行い本研究に対する同意を得た症例より、皮膚悪性腫瘍由来の癌関連線維芽細胞株の樹立を行った。切除した腫瘍標本のうち、腫瘍組織辺縁より組織を一部採取してここから線維芽細胞株を樹立した。樹立した細胞株は凍結保存した。線維芽細胞はシャーレで培養を行い、semi-confluent となった時点で培地を無血清培地へ変更し 3 日間培養を行った後に培地を回収して線維芽細胞培養上清として続く実験に使用した。またこれとは別に癌と離れた正常組織からも線維芽細胞株を樹立、同様に培養上清を正常線維芽細胞培養上清として回収・使用した。

(2) 癌関連線維芽細胞による、悪性黒色腫への影響

悪性黒色腫細胞については、当教室保有のヒト皮膚悪性黒色腫細胞株 (MMAc、A375、COLO679) を使用した。癌関連線維芽細胞培養上清を添加した条件下で、悪性黒色腫細胞が受ける影響を細胞増殖能・細胞遊走能・細胞浸潤能の 3 点から検討した。

細胞増殖能については、悪性黒色腫細胞を癌関連線維芽細胞培養上清添加群と対照群を 3 日間培養し、24 時間毎に細胞数を Coulter Counter Z2 (Beckman Coulter, Inc.) で計測し、その変化を比較した。細胞遊走能は、Wound healing assay を増殖能と同様に上清添加群・対照群のそれぞれで行い、上清添加による変化を検討した。また細胞浸潤能は invasion assay を行った。すなわち、8 μ m の孔を持つフィルターを用いて double chamber culture モデルを構築、上層に癌細胞を、下層に癌関連線維芽細胞培養上清を添加して培養を行い、24 時間後にフィルターを回収して下面に浸潤した癌細胞数を計測した。

(3) 癌関連線維芽細胞培養上清に含まれる物質の検索

癌関連線維芽細胞培養上清及び正常線維芽細胞培養上清に対して Proteome Profiler™ (R&D SYSTEM®) を用いて cytokine array を行い、上清に含まれる物質について網羅的に検索した。各物質の濃度は正常線維芽細胞培養上清に対する濃度比として算出し、(2) の実験結果と照らし合わせることで悪性黒色腫細胞の進展に関与している可能性がある物質を選定した。

(4) 選定物質が悪性黒色腫細胞に与える影響についての検討

(3) で同定した物質を添加した条件下で悪性黒色腫細胞の培養を行い、その進展能の変化を MTT assay で検討した。併せて癌関連線維芽細胞培養上清の選定物質を中和抗体で中和した条件下でも悪性黒色腫細胞の培養を行い、その効果が打ち消されることを確認した。

4. 研究成果

癌関連線維芽細胞培養上清を加えることで、悪性黒色腫細胞の増殖能及び浸潤能に変化を認めた。増殖能については 3 系統中 2 系統の癌細胞 (A375、MMAc) で促進作用を認めた (図 1)。浸潤能は 3 系統中 1 系統 (MMAc) で有意な促進効果を認めたが 1 系統 (A375) では有意な抑制効果を認め、系統毎に異なる結果となった (図 2)。なお遊走能については実験結果が安定せず、有意差を持った結果の証明には至らなかった。

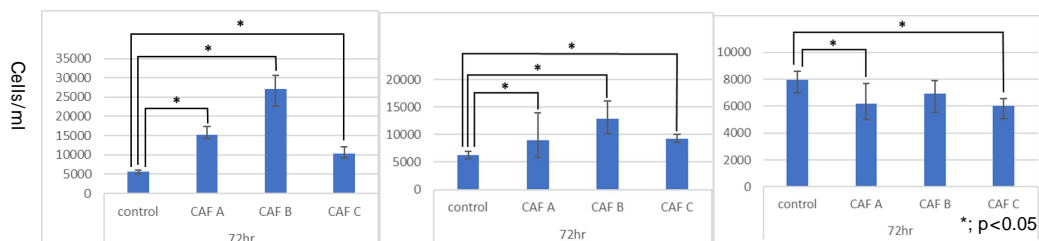


図 1. 細胞増殖能の変化

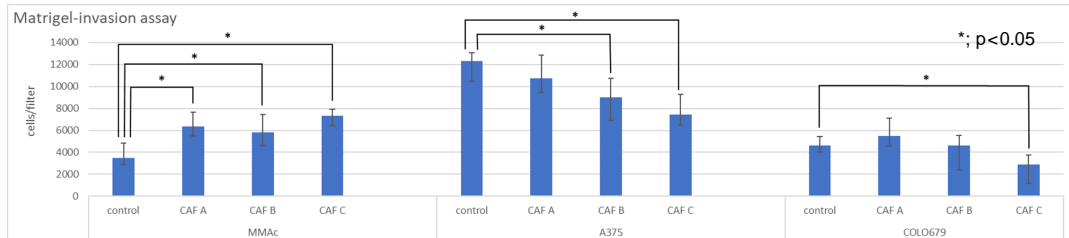


図 2. 細胞浸潤能の変化

次に cytokine array の結果を物質毎に検討し、先に行った実験結果と照らし合わせて作用物質の選定を行った。この際、増殖能は2つの系統で共通した結果 (CAF B で最も強く反応する) であったため、増殖能を中心して検討を進めた。最終的に、macrophage inflammatory protein-3 beta (MIP-3)を本実験の候補物質として選出した (図 3)

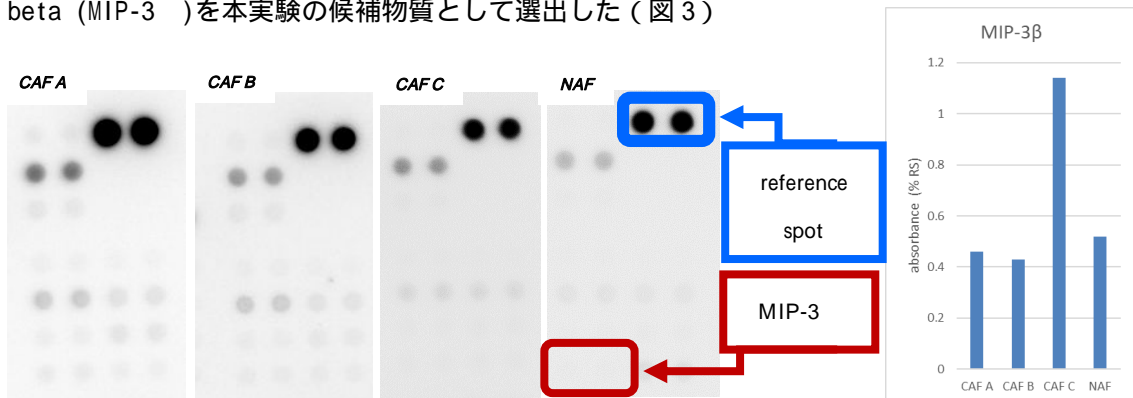


図 3 cytokine array

グラフはそれぞれの癌関連線維芽細胞培養上清中の MIP-3 濃度を、正常線維芽細胞培養上清中の濃度に対する比率として算出している

最後に MIP-3 を添加した条件下で悪性黒色腫細胞の増殖能の変化を検討した。この結果、3系統中2系統 (MMac, COLO679) において、培養 48 時間以降に有意な増殖能の亢進を認めた。なお、抗体による MIP-3 中和条件下での培養は現在継続中であり、有効なデータはまだ得られていない。

上記の一連の実験から、癌関連線維芽細胞は MIP-3 を介して悪性黒色腫の進展、とりわけ増殖能に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Heishiro Fujikawa. Macrophage Inflammatory Protein-3 beta (MIP-3) from Cancer-Associated Fibroblasts Promote the Proliferation of Melanoma Cells. AACR Annual Meeting 2019 (2019.3.29-4.3, Atlanta, Georgia, USA)
2. Heishiro Fujikawa. Effect on Cancer-Associated Fibroblasts on the progression on Malignant Melanoma Cells. AACR Annual Meeting 2018 (2018.4.14-18, Chicago, Illinois, USA)
3. 藤川平四朗. 皮膚悪性腫瘍関連線維芽細胞が皮膚悪性黒色腫に与える影響についての検討. 第 26 回日本形成外科学会基礎学術集会 (2017 年 10 月 19-20 日,大阪)
4. 羽多野隆治. 悪性黒色腫における原発巣と転移巣の癌細胞間相互作用. 第 25 回日本形成外科学会基礎学術集会 (2016 年 9 月 16 日,大阪)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔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：八代 正和

ローマ字氏名：(YASHIRO, Masakazu)

所属研究機関名：大阪市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁): 60305638

研究分担者氏名：羽多野 隆治

ローマ字氏名：(HATANO, Takaharu)

所属研究機関名：大阪市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：助教

研究者番号(8桁): 10382144

研究協分担者氏名：藤川 平四朗

ローマ字氏名：(FUJIKAWA, Heishiro)

所属研究機関名：大阪市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：病院講師

研究者番号(8桁): 80740373

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。