

令和元年6月25日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15625

研究課題名(和文) Metastatic dormancy活性化ニッチ分子機構解明と癌転移治療の応用

研究課題名(英文) Dissection of molecular mechanisms of the metastatic niche dormancy and application to the anti-metastatic therapy

研究代表者

小島 豊 (kojima, yutaka)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00327800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は癌微小環境の主な構成細胞である線維芽細胞(carcinoma-associated fibroblasts: CAFs)がmetastatic dormancy活性化nicheとして作用する可能性を推測している。対照の乳腺由来の線維芽細胞と比較してCAFは、tumor organoidと免疫不全マウスに移植された時に、優位に肝臓や肺への自発転移を促進した。この結果は、CAFがmetastatic dormancy活性化nicheとして作用する可能性を示唆するものであるが、今後はよりmetastatic dormancyに特化したモデルを使用した解析が必要である。。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌死亡の90%は転移再発に起因している。癌診断時に臨床的に転移が認められないが、原発巣治療後数年以内に転移再発で命を落とす患者数は少なくない。転移再発は、遠隔臓器の新しい環境に適応できず細胞増殖を停止している(dormant)癌細胞の再増殖に依存している。もし癌細胞のdormancyを制御機構を解明し臨床に応用することができれば、転移癌細胞との共存が可能になるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Our previous findings demonstrated that CAFs promote tumor malignancy of nearby carcinoma cells. We here aimed to determine whether CAFs also regulate the niche for metastatic dormancy to boost metastasis. To do so, we checked roles of CAFs on metastatic ability of tumor organoids generated from human colon carcinomas. We found that CAFs boost tumor metastasis of colon tumor organoids in the liver and lungs significantly more than did control fibroblasts did, when orthotopically injected into immunodeficient mice. These findings indicate that CAFs may play roles for niches to activate metastatic dormancy, however, more clear evidences await future study.

研究分野：癌生物学

キーワード：metastatic dormancy CAFs tumor microenvironment

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

## 1. 研究開始当初の背景

癌診断時に臨床的に転移が認められないが、治療後数年以内に転移再発する例が少ない。転移した癌細胞のほとんどは遠隔臓器の新しい環境に適応できず死滅するか増殖を停止している (dormancy)。そして dormancy が活性化され癌細胞が目覚めると、再び増殖を開始する。もし癌細胞の dormancy の活性化を制御することができれば、強い副作用のある抗癌剤を使用し癌細胞を死滅させることなく、転移癌細胞との共存が可能になるかもしれない。

申請者の研究グループでは、癌微小環境に多数存在する癌内線維芽細胞(CAFs)が近傍の癌細胞に浸潤・転移能を教授することを見出している。対照正常線維芽細胞で教育されたヒト乳癌細胞(DCIS<sup>cnt</sup>)と比較して、CAFsで教育されたDCIS<sup>CAF</sup>は癌進展過程で、細胞-細胞接着・凝集能を亢進することにより、癌細胞クラスター(集合体)を形成して、細胞死抑制能を増し、血液循環中に侵入し遠隔臓器に著明な転移を形成することが明らかになっている。

## 2. 研究の目的

癌死亡の90%は転移再発に起因している。癌診断時に臨床的に転移が認められないが、原発巣治療後数年以内に転移再発で命を落とす患者数は少なくない。転移再発は、遠隔臓器の新しい環境に適応できず細胞増殖を停止している(dormant)癌細胞の再増殖に依存している。もし癌細胞の dormancy を制御することができれば、転移癌細胞との共存が可能になるかもしれない。申請者は癌微小環境の主な構成細胞である線維芽細胞(carcinoma-associated fibroblast: CAFs)が近傍の癌細胞に作用して転移を顕著に促進することを見出している。この先行研究を基に、CAFs が metastatic dormancy 活性化 niche として作用する可能性を推測している。申請研究では、CAFによる metastatic dormancy 活性化の分子機構を解明し新規癌転移治療法の開発に役立てたい。

## 3. 研究の方法

癌転移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 の metastatic dormancy 活性化機構を解明し、新規癌転移治療の開発の基礎を築くことを目指す。申請研究では、CAFs の metastatic dormancy 活性化 niche として作用を調査する。さらに② metastatic dormancy 活性化に必須な遺伝子シグナルを同定し、その抑制剤や中和抗体の効果を動物モデルで検証する。

以上より、metastatic dormancy 活性化 niche の分子機構の解明と治療への応用を目指した、架け橋の基礎研究を3ヵ年計画で試行した。

## 4. 研究成果

metastatic dormancy の研究は癌細胞内のシグナル伝達に関するものが多く、癌微小環境が播種した癌細胞の dormancy にどのように影響を及ぼしているか否かは不明な点が多い。細胞外基質 extracellular matrix がインテグリンを介して、dormant な癌細胞を活性化する概念が従来より定着しているが、癌微小環境中に存在する間質細胞がどのような癌細胞の dormancy に寄与しているかに関しては明らかな知見は現在まで

得られていない。

CAFs は癌微小環境に多く存在し、癌細胞の増殖、浸潤・転移、部分的上皮間葉移行、炎症、免疫抑制や治療抵抗性など多くの癌の特性を制御していることが知られている。申請者は、原発巣内において CAFs が癌細胞と interaction すると、癌細胞に部分的上皮間葉移行が誘導され浸潤・転移能が亢進することを見出している（未発表）。この作用は CAFs より高分泌される増殖因子やサイトカインにより誘導されるが、加えて癌塊内で誘導される細胞外基質のリモデリング、低酸素や低栄養による epi/genomic な変化により助長されると推測される。

申請者はヒト乳癌細胞や患者大腸癌 patient-derived tumor xenograft (PDX) を dissociate して、CAFs や対照正常線維芽細胞との共移植あるいは癌細胞のみが免疫不全マウスの皮下や直腸に移植後 2 か月半後に各臓器を採取した。重要なことに、CAFs が共移植された乳癌や患者大腸癌は、対照の線維芽細胞や癌細胞のみの移植と比較して、顕著に肝臓および肺に転移を形成した。CAFs は原発巣増殖も促進することより、CAFs による転移促進率は転移体積を原発巣の重量で割った metastatic index として評価された。加えて、癌細胞における E-cadherin や上皮間葉移行関連転写因子の発現抑制により、CAFs で誘導された部分的上皮間葉移行の抑制や転移能が抑制された。以上の結果より CAFs で誘導された部分的上皮間葉移行により癌細胞の浸潤能や転移能が媒介されていることが示唆された。

さらに申請者の予備実験では、CAFs で癌細胞に誘導された部分的上皮間葉移行が、癌塊より抽出され *in vitro* で培養された癌細胞においても安定的に維持されていることを示唆した。このことは、癌塊内における CAFs との相互作用により癌細胞に安定的に高浸潤能や転移能がリプログラムされたことを意味しているのかもしれない。今後は CAFs で癌細胞にリプログラムされた部分的上皮間葉移行がどのように dormancy を活性化しているかを調査する必要がある。

また、興味深いことに、癌転移を伴った肺において、alpha-smooth muscle actin, テネシン-C, ファイブロネクチンやペリオスチンの発現陽性の宿主由来のマウス CAFs の集積が観察された。皮下に癌細胞と共移植されたヒト CAFs が、移植された癌細胞と共に遠隔臓器に播種するという知見が他のグループより提唱されている。しかしながら、我々の系では移植されたヒト CAFs が遠隔臓器に播種することはなかった。恐らく播種した癌細胞が宿主マウス CAFs の集積を誘導していると想像される。重要なことに、この宿主由来 CAFs は播種した癌細胞が dormancy より活性化する過程に積極的に寄与している可能性が推測される。

以上より、CAFs は原発巣においては、部分間葉移行を誘導し、癌細胞の浸潤・転移能を促進する。この過程は metastatic dormancy に寄与しているかもしれない。

さらに転移巣においては、播種した癌細胞より誘導された CAFs は、癌細胞の metastatic dormancy の活性化や増殖に関与しているかもしれない。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1 . High-sensitivity Detection of Micrometastases Generated by GFP Lentivirus-transduced Organoids Cultured from a Patient-derived Colon Tumor. Okazawa Y, Mizukoshi K, Koyama Y, Okubo S, Komiyama H, Kojima Y, Goto M, Habu S, Hino O, Sakamoto K, Orimo A., Journal of visualized experiments: JoVE (136) 2018年6月

〔学会発表〕(計5件)

1. 講演：中間型上皮間葉移行による患者大腸癌細胞クラスターの転移への寄与  
岡澤 裕、水越 幸輔、小山 侑、大久保 捷奇、Kaidiliavi Sulidan、伊藤 恭彦、小見山 博光、小島 豊、五藤 倫敏、垣生 園子、樋野 興夫、折茂 彰、坂本 一博  
第29回 日本消化器癌発生学会総会 東京 2018年11月16~17日

2. 講演：患者大腸癌由来 PDX およびオルガノイドを使用した転移モデルの樹立  
水越 幸輔、岡澤 裕、小山 侑、大久保 捷奇、Kaidiliavi Sulidan、伊藤 恭彦、小見山 博光、小島 豊、五藤 倫敏、垣生 園子、樋野 興夫、折茂 彰、坂本一博  
第28回 日本消化器癌発生学会総会 熊本 2017年11月17日(金) ~ 18日(土)

3. 講演：中間型上皮間葉移行による患者大腸癌細胞クラスターの転移への寄与  
岡澤 裕、水越 幸輔、大久保 捷奇、Kaidiliavi Sulidan、小山 侑、小島 豊、五藤 倫敏、折茂 彰、坂本 一博 第72回日本消化器外科学会総会 金沢 2017年7月20日~22日

4. Poster presentation : Multicellular tumor clusters seed metastases in colon patient-derived tumor xenografts. Shoki Okubo, Kosuke Mizukoshi, Yu Okazawa, Hiroshi Haeno, Hiromitsu Komiyama, Harumi Saeki, Yasuhiko Ito, Yutaka Kojima, Michitoshi Goto, Sonoko Habu, Sumio Watanabe, Okio Hino, Kazuhiro Sakamoto and Akira Orimo  
第75回日本癌学会学術総会 横浜 2016年10月7日

5. Oral presentation : Metastatic seeding of patient-derived colon cancer cells maintaining epithelial or mesenchymal trait. Kosuke Mizukoshi, Yu Okazawa, Naomi Kadowaki Hiromitsu Komiyama, Yutaka Kojima, Michitoshi Goto Sonoko Habu, Okio Hino Akira Orimo and Kazuhiro Sakamoto 第70回日本消化器外科学会総会 浜松 2015年7月17日

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：折茂彰

ローマ字氏名：ORIMO, Akira

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：病理・腫瘍学

職名：准教授

研究者番号（8桁）：70275866

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。