

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19456

研究課題名(和文) 骨髄由来線維細胞(fibrocyte)の肺癌進展における役割の検討

研究課題名(英文) Investigation of a role of bone marrow-derived fibrocytes in lung cancer progression

研究代表者

西條 敦郎(SAIJO, Atsuro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・特任助教

研究者番号：00467812

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、線維細胞のがん幹細胞制御における役割について検討した。線維細胞はosteopontin、CC-chemokine ligand 18、plasminogen activator inhibitor-1などの液性因子を介し、肺がん細胞のPI3K/AKT経路を活性化することで、がん幹細胞化を増強することを明らかにした。術後組織切片を用いた検討を行い、実験的に証明した線維細胞とがん幹細胞化の関連をヒトの臨床検体で確認した。線維細胞は液性因子を介した、PI3K/AKT経路の活性化により肺がん細胞のがん幹細胞化を増強し、AKT阻害薬ががん幹細胞を標的とした治療薬となりうる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify a role of fibrocytes in lung cancer progression. Human fibrocytes enhanced the CSC-like properties of lung cancer cells through secreted factors, including osteopontin, CC-chemokine ligand 18, and plasminogen activator inhibitor-1. The PI3K/AKT pathway was critical for fibrocytes to mediate the CSC-like functions of lung cancer cells. In human lung cancer specimens, the number of tumor-infiltrated fibrocytes was correlated with high expression of CSC-associated protein in cancer cells. These results suggest that fibrocytes may be a novel cell population that regulates the CSC-like properties of lung cancer cells in the CSC niches.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：がん幹細胞 肺がん 線維細胞

1. 研究開始当初の背景

Fibrocyte は、1994 年に Bucala らによって同定された末梢血単球由来の骨髄細胞で、コラーゲン産生能を有する細胞である。循環白血球中に占める割合は非常に少ない細胞であるが、その生物学的特徴(コラーゲン産生能)から、主に創傷治癒や間質性肺炎、気管支喘息など、線維化を主体とする疾患についてその重要性が検討、報告されてきた。一方、がん領域においても fibrocyte は何らかの役割を果たすことが予想されるが、その報告は少なく、未だ不明な点が多い。

このような状況の中、我々は肺がんおよび悪性胸膜中皮腫において、fibrocyte が FGF2 の産生を介して血管新生阻害剤の耐性化に寄与することを明らかにした。

そこで今回、fibrocyte は肺がん進展そのものにも影響を与えるという仮説のもと、そのメカニズムを解析することとした。

2. 研究の目的

本研究では、fibrocyte とがん幹細胞様特性の増強との関係に着目し、それに関わるメカニズムを明らかにすることで、肺がん進展における fibrocyte の役割を解明し、がん微小環境を標的とした新たな分子標的治療法の開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 切除可能肺がん 58 症例の切除組織を用いて、がん間質の fibrocyte-like cell を CD45 および fibroblast specific protein-1 陽性の細胞として同定し、肺がん間質の fibrocyte 数と肺がんの予後との関連を検討した。

(2) 健常人末梢血から Ficoll 比重遠心法により末梢血単核球を分離し、フィブロネクチンコートディッシュ上で培養し、ヒト fibrocyte を単離した。

(3) ヒト fibrocyte を肺がん細胞株と SCID マウスの皮下に共移植し、肺がん細胞株の増殖能や皮下腫瘍形成能に対する fibrocyte の影響を評価した。

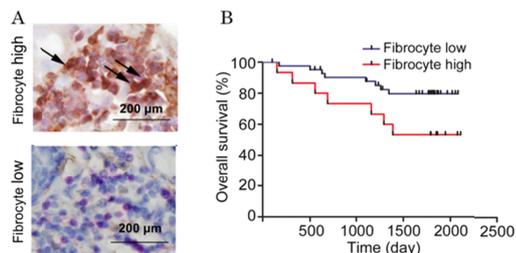
(4) Fibrocyte の培養上清を用いて肺がん細胞株の sphere 形成能や細胞内シグナル伝達経路に及ぼす影響を評価した。

(5) 肺がんの術後組織と組織アレイを用いてがん細胞におけるがん幹細胞マーカー発現とがん間質 fibrocyte 数の相関を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト肺がん切除標本を用いた検討では、がん間質の fibrocyte 数の多い症例は少ない症例に比べ、有意に術後の生存期間が短かつ

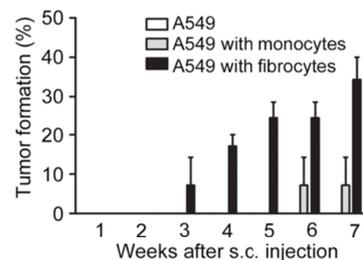
た(図 1; HR, 3.36; 95% CI, 1.03–10.91; $P = 0.044$)。さらに肺がんの一般的な予後因子である年齢、性別、臨床病期、喫煙歴を含め多変量解析を行ったところ、がん間質の fibrocyte 数は切除可能肺がんの独立した予



(図1) (A) 肺がん術後組織を用いてがん間質の fibrocyte を CD 45 (赤色) および fibroblast specific protein-1 (茶色) 陽性の細胞として同定した。(B) がん間質の fibrocyte 数の多い症例は少ない症例に比べ、有意に術後の生存期間が短かった (HR, 3.36; 95% CI, 1.03–10.91; $P = 0.044$)。

後不良因子であった。この結果からがん間質の fibrocyte が肺がんの再発や転移に寄与している可能性が示唆された。

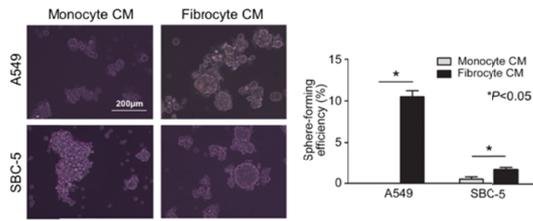
(2) 次に健常人末梢血由来の fibrocyte と肺がん細胞株 (A549、SBC-5) を SCID マウスの皮下に共接種し、皮下腫瘍形成に対する直接的な影響を検討した。Fibrocyte との共接種で肺がん細胞の皮下腫瘍増殖能には変化を認めなかったが、がん細胞のみでは皮下腫瘍を形成できない程度までがん細胞数を減じて fibrocyte と共接種したところ、fibrocyte 共移植により有意に皮下腫瘍形成能が促進



(図2) Fibrocyte と A549 細胞 (1×10^4 cells) を SCID マウスの皮下に共移植し腫瘍形成能を評価した。Fibrocyte との共移植により肺がん細胞の腫瘍形成能は有意に促進された。

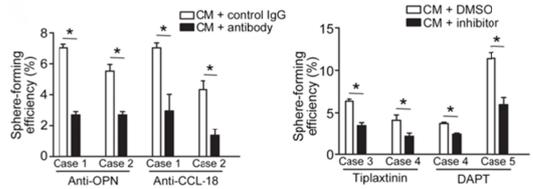
された(図 2)。この結果から、fibrocyte ががん幹細胞の特徴の一つとされる腫瘍形成能を増強する可能性が示唆された。

(3) *In vitro* において、がん幹細胞の指標の一つである sphere 形成能を評価したところ、fibrocyte の培養上清を用いることで肺がん細胞は sphere を形成した(図 3)。また、sphere 形成細胞ではがん幹細胞に関連した転写因子の遺伝子発現の亢進や、シスプラチンに対する耐性および高い腫瘍形成能を有することを確認した。これらの結果から、fibrocyte 由来の液性因子ががん幹細胞化に重要な役割を果たしていることが示唆された。



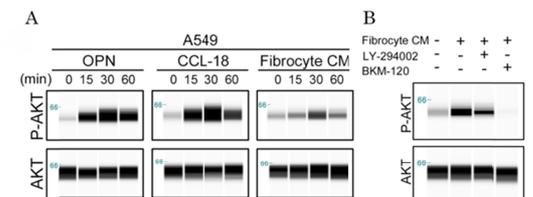
(図3) Monocyteまたはfibrocyteの培養上清を用いて肺がん細胞株(A549またはSBC-5)を低接着条件下で培養した。Fibrocyteの培養上清を用いることで肺がん細胞のsphere形成能は有意に増強された(* $p < 0.05$)。

(4) 次にメンブレンベース抗体アレイとマイクロアレイ法を用いた網羅的解析、および中和抗体と受容体阻害剤を用いた sphere 形成阻害実験により、fibrocyte が産生する osteopontin (OPN)、CC-chemokine ligand 18 (CCL-18)、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)が肺がん細胞の sphere 形成に関わっていることを明らかにした(図 4)。



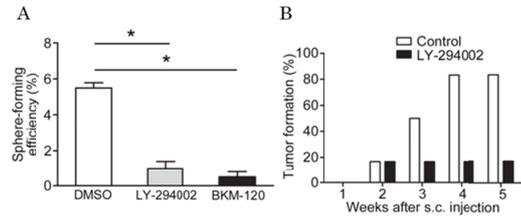
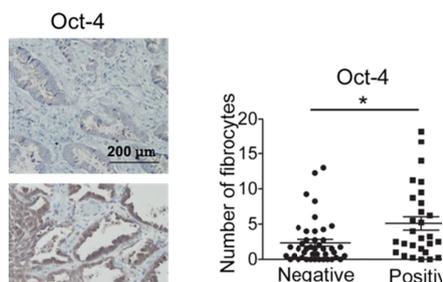
(図4) OPN、CCL-18に対する中和抗体およびPAI-1阻害剤である Tiplaxtininにより fibrocyte培養上清で増強されるA549の sphere形成能は有意に抑制された(* $p < 0.05$)。

(5) OPN、CCL-18 および PAI-1 に共通する細胞内シグナル伝達経路である PI3K/AKT 経路に着目、OPN、CCL-18 および fibrocyte 培養上清の刺激により肺がん細胞内のリン酸化 AKT の発現が増強されることを capillary western assay 法にて確認した(図 5A)。さらに AKT 阻害剤である LY-294002 および BKM-120 により fibrocyte 培養上清刺激による肺がん細胞内のリン酸化 AKT の発現が抑制された(図 5B)。



(図5) A549細胞内のリン酸化AKTの発現をcapillary western assay法を用いて検出した。(A) OPN、CCL-18およびfibrocyte培養上清によりA549細胞のリン酸化AKTの発現が増強された。(B) AKT阻害剤であるLY-294002およびBKM-120によりfibrocyte培養上清刺激によるA549細胞内のリン酸化AKTの発現は抑制された。

(6) LY-294002 および BKM-120 により fibrocyte 培養上清で増強される肺がん細胞の sphere 形成能は有意に抑制された (図 6A)。さらに LY-294002 の前治療により fibrocyte 共移植により増強される A549 細胞の皮下腫瘍形成能は抑制された(図 6B)。



(図6) (A) AKT阻害剤であるLY-294002およびBKM-120によりfibrocyte培養上清により増強されるA549細胞のsphere形成能は有意に抑制された。(B) A549細胞をLY-294002で前治療した後、SCIDマウスの皮下にfibrocyteと共移植した。Fibrocyteとの共移植で増強されるA549細胞の腫瘍形成能は、LY-294002の前治療により有意に抑制された(* $p < 0.05$)。

瘍形成能は抑制された(図 6B)。

(7) さらに肺がん術後組織切片および肺がん組織アレイを用いた検討を行い、がん幹細胞に関連する転写因子である Oct-4、Sox-2、Nanog 陽性症例は陰性症例と比較しがん間質の fibrocyte 数が有意に多いことを示し、実験的に証明した fibrocyte とがん幹細胞化の関連をヒトの臨床検体で確認した(図 7)。

以上の結果から、fibrocyte は OPN、CCL-18、PAI-1 などの液性因子を介し、肺がん細胞の PI3K/AKT 経路を活性化することで、肺がん細胞のがん幹細胞化を増強し、AKT 阻害薬ががん幹細胞を標的とした治療薬となりうる可能性が示唆された。

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1件)

① Saijo A, Goto H, Nakano M, Mitsuhashi A, Aono Y, Hanibuchi M, Ogawa H, Uehara H, Kondo K, Nishioka Y.

Bone marrow-derived fibrocytes promote stem cell-like properties of lung cancer cells. *Cancer Lett.* 2018 May 1;421:17-27. doi:

10.1016/j.canlet.2018.02.016. (査読あり)

〔学会発表〕(計5件)

① 西條敦郎. 骨髄由来線維細胞(fibrocyte)は肺癌のがん幹細胞様特性を促進する. 第76回日本癌学会学術総会. 横浜. 2017年9月28日.

② Saijo A. Bone Marrow-Derived Fibrocytes Promote Stem Cell-Like Properties of Lung Cancer Cells. *ATS 2017 International Conference*. Washington, DC, USA. 2017年5月24日.

③ Saijo A. Bone marrow-derived fibrocytes promote stem cell-like properties of lung cancer cells. 第57回日本呼吸器学会学術講演会. 東京. 2017年4月22日.

④西條敦郎．骨髄由来線維細胞(fibrocyte)は肺癌のがん幹細胞様特性を促進する．第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会．米子．2016 年 7 月 21 日．

⑤Saijo A. Bone marrow-derived fibrocytes maintain stem cell-like properties of lung cancer. ATS 2016 International Conference. San Francisco, CA, USA. 2016 年 5 月 15 日.

〔図書〕(計 1 件)

後東久嗣, 西條敦郎, 西岡安彦．がんの進展における線維細胞の機能と役割～血管新生阻害薬耐性とがん幹細胞様細胞の誘導～．分子呼吸器病 22(1):49-51, 2018.

〔その他〕

ホームページ等

<http://repo.lib.tokushima-u.ac.jp/en>

<http://www.sannai.umin.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

西條 敦郎 (SAIJO, Atsuro)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・

特任助教

研究者番号：00467812