

令和元年6月20日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16559

研究課題名(和文)肝線維芽細胞による免疫細胞との相互作用と肝発癌のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Interaction between cancer associated fibroblasts and immune cells in tumor microenvironment of HCC

研究代表者

間野 洋平 (MANO, yohei)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10792244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌患者の切除標本から癌部の線維芽細胞(CAF)と非癌部の線維芽細胞(NF)を分離することに成功し、発現タンパクや遺伝子の比較を行いました。CAFはNFに比べて線維芽細胞の活性タンパクやサイトカインの産生が多いことがわかりました。また、遺伝子の網羅的解析により、BMP4がそれらの発現を制御する因子の一つであり、CAFの活性化にかかわっていることをBMP4の発現制御により明らかにしました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、肝細胞癌の癌関連線維芽細胞において、BMP4がその活性化や癌の悪性化に関与していることが明らかになり、新たな治療ターゲットとして意義のある発見であったと考えられます。新たな治療法として、癌細胞だけでなく線維芽細胞を制御することにより、既存の治療に加えてより高い治療効果が得られると期待されます。

研究成果の概要(英文)：We established primary cancer-associated fibroblasts (CAFs) and non-cancerous liver fibroblasts (NFs) from 15 patients who underwent HCC resection. The CAFs expressed more ACTA2 and COL1A1 than the NFs, suggesting that CAFs are more activated phenotype. The CAFs produced larger amounts of IL-6, IL-8 and CCL2 than the NFs, which led to invasiveness of HuH7 in vitro. We found that Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP4) is up-regulated in CAFs compared to NFs. The CAF phenotype and function were gained by BMP4 over-expression or recombinant BMP4 given to fibroblasts, all of which decreased with BMP4 knockdown. In tissues obtained from the patients, BMP4-positive cells are mainly observed in encapsulated fibrous lesions and HCC. Positive expression of BMP4 in HCC in resected tissues, not in fibroblasts, was associated with poorer postoperative overall survival in patients with HCC.

研究分野：肝癌

キーワード：肝癌 肝線維化 癌微小環境

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、慢性炎症に起因する肝線維化進展は、肝星細胞と肝線維芽細胞が重要な役割を果たしていると考えられている。肝星細胞や線維芽細胞を活性化する分子として、肝細胞障害により分泌される Apoptotic body、DAMPs (Damage-associated molecular patterns)、PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) や、炎症細胞から分泌される炎症性サイトカインなどの関与が報告されており、その結果肝線維化の進展や発癌につながると考えられる。また一方では、活性化した肝星細胞、線維芽細胞が分泌するサイトカイン・ケモカインにより、肝臓内のマクロファージ、T細胞などの免疫活性が抑制、あるいは癌に有利な Phenotype への分化誘導が惹起される。肝臓内の慢性炎症においては、これらのような線維芽細胞や免疫細胞の相互作用によって、肝発癌や癌の進展に有利な微小環境が形成されていくと考えられている。

癌の微小環境に重要な細胞として、腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated Macrophage, TAM) の研究は、これまで様々な癌腫において報告されてきた。肝癌においても、発癌によって癌組織への多数の TAM が浸潤する。TAM は、免疫抑制性のサイトカインを分泌することで抗腫瘍免疫を抑制したり、あるいは、癌の進展を助長するような分泌タンパクを産生したりすることで、癌の進展を増強する。

申請者らは、TAM が産生する IL-6 によって、肝癌細胞の STAT3 シグナルが刺激され、増殖や浸潤が促進されること、また肝癌組織における STAT3 の活性化が肝癌切除の患者において独立した予後因子となることを報告してきた。我々の報告も含めて、肝癌細胞による TAM の誘導や TAM による肝癌細胞への影響はいくつか報告されているが、肝線維芽細胞との相互作用についての報告は未だない。

申請者らの予備実験によると、癌部の線維芽細胞 (Cancer-associated Fibroblast, CAF) と非癌部線維芽細胞 (Non-cancerous Tissue Fibroblast, NF) を分離して培養することに成功した。CAF と NF の培養上清によってヒト末梢血単球から分化させたマクロファージを刺激すると、TAM のマーカーである CD163 の発現が CAF の刺激でより増強することも確認された。そこで、本研究では、ヒトの肝組織から分離培養した細胞を用いた *in vitro* 実験モデル (線維芽細胞、マクロファージ、T細胞、樹状細胞、NK細胞) を構築し、それぞれの相互作用を様々な角度から分析、それぞれの責任分子を明らかにすることが可能ではないかという着想に至った。

2. 研究の目的

肝炎ウイルスやアルコール、脂肪肝炎などによる慢性的な炎症により、肝臓の線維化が進展することが知られている。また、炎症の原因に関わらず、肝線維化は発癌の重要なリスク因子である。その一方で、肝線維化の主体である活性化した線維芽細胞がどのように肝癌を引き起こすのかは未だ不明な部分が多い。癌の微小環境は、多くの癌でその進展に大きく関わっていることが明らかになってきており、癌微小環境の中心的役割を果たしていると考えられる線維芽細胞が近年注目されてきている。

本研究では、線維芽細胞と肝細胞、免疫細胞とがどのような相互作用をしているか明らかにし、肝癌治療あるいは肝発癌予防の新たなアプローチ法を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

複数の症例のヒト組織から分離した細胞を、癌部と非癌部で phenotype を比較することで、肝癌微小環境の形成・制御に重要な分子を同定し、*in vitro* と *in vivo* でその分子の機能を明らかにする。

線維芽細胞の分離・培養、CAF と NF の液性因子・発現遺伝子の比較 癌部と非癌部における免疫細胞の phenotype 比較 CAF/NF と免疫細胞との共培養 免疫細胞分化・活性化への影響 CAF/NF が発現する免疫細胞制御分子 (ターゲット分子) に対する中和

ターゲット分子の患者検体での発現比較・局在の確認 (血清・組織) ターゲット分子強制発現・発現抑制モデルの作成とその活性化・機能の比較

4. 研究成果

肝癌に対して肝切除を行った症例について、9例から癌部と非癌部の線維芽細胞の抽出に成功した。それぞれ抽出した細胞については、分離培養を行った。分離した細胞については、線維芽細胞マーカーである ACTA2 等の発現を確認し、肝細胞マーカーである CK や Hepper-1 が発現していないことを確認した。

癌関連線維芽細胞 (CAF) と非癌部線維芽細胞 (NF) の培養上清を抽出し、HCC 細胞株に添加したところ、CAF による刺激のほうが有意に浸潤能を上昇させた。また、健康人の単球に上清を添加したところ、CAF による刺激のほうが有意に遊走能を上昇させた。

CAF と NF の発現する遺伝子の比較をアレイで行ったところ、CAF では BMP4 の発現が上昇していることが明らかとなった。実際に、肝癌切除症例の標本において、BMP4 の免疫染色を行ったところ、非癌部の線維芽細胞に比べて、癌周囲の線維芽細胞に多く染色された。

BMP4 の刺激を線維芽細胞に加えたところ、IL-6 や IL-8 などの炎症性サイトカインの発現が上昇し、p16 や p21 などの老化マーカーの発現も増えた。BMP4 強制発現株でも同様の所見がえられ、CAF に対して BMP4 を発現抑制した場合は逆の変化が確認された。また、NF に対して、BMP4

強制発現株を作成し、発現遺伝子や発現タンパクを比較したところ、BMP4 強制発現によりサイトカインの発現が上昇し、老化マーカーの発現や線維化マーカーの発現が増強した。逆に、CAF に BMP4 の shRNA を導入し、BMP4 発現抑制株を作成し比較したところ、BMP4 の発現を抑制することによって、サイトカインの発現、線維化マーカーの発現、老化マーカーの発現はいずれも低下した。

以上のことから、肝臓の線維芽細胞において、BMP4 はサイトカインの発現、線維化マーカーの発現、老化マーカーの発現を制御する因子の一つであり、肝臓においては CAF 化するために重要な因子であることが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

J Gastroenterol. 2019 Apr 2. doi: 10.1007/s00535-019-01579-5.

Bone morphogenetic protein 4 provides cancer-supportive phenotypes to liver fibroblasts in patients with hepatocellular carcinoma.

Mano Y, Yoshio S, Shoji H, Tomonari S, Aoki Y, Aoyanagi N, Okamoto T, Matsuura Y, Osawa Y, Kimura K, Yugawa K, Wang H, Oda Y, Yoshizumi T, Maehara Y, Kanto T.

〔学会発表〕(計 1 件)

第 26 回日本消化器関連学会週間 (JDDW2018KOBE)

会期:平成 30 年 11 月 1 日(木)~4 日(日)

会場:神戸コンベンションセンター

タイトル:肝臓関連線維芽細胞における BMP4 の機能と意義

発表者:間野洋平、吉住朋晴、考藤達哉

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔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:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。