

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16617

研究課題名(和文)腫瘍形成に関わる間質細胞由来メタロプロテアーゼ分子の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of metalloproteinase molecules derived from cancer stromal cells involved in tumorigenesis

研究代表者

志満 敏行 (Shima, Toshiyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：70738781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：癌組織(癌細胞ならびに癌間質細胞)においてメタロプロテアーゼ(MMPs)が大量に分泌されており、その主な産生源として癌間質細胞が注目されている。主要な癌間質細胞である癌関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast: CAF)は、癌細胞との相互作用により癌進展に大きく寄与することが示されているが、これまでに申請者の研究グループではMMPs活性がCAFの腫瘍促進性形質維持に重要であることを明らかにしてきた。本研究では、マウスおよびヒト肺癌間質細胞(主にCAF)で高発現するMMP分子を同定し、腫瘍形成・進展に関わる間質細胞由来MMPsの機能について解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昨今のヒト肺癌の腫瘍形成・進展に関わる因子の同定や機能解析に伴い、薬物療法(免疫チェックポイント阻害薬や分子標的薬)において目覚ましい進歩を遂げています。同時に未だ解明されていない治療対象となる因子の候補も多数存在しています。今回、肺癌間質細胞より分泌されているメタロプロテアーゼ分子に着目しました。メタロプロテアーゼ分子には多数の種類が存在するので、それらから特にヒト肺癌に関わる分子を同定しました。これらがどのようにヒト肺癌の腫瘍形成・進展に関わるの機能の解析を行うことにより、将来の薬物療法への応用の可能性を示しました。

研究成果の概要(英文)：Metalloproteinases (MMPs) are secreted in large amounts in cancer tissues (cancer cells and cancer stromal cells), and interstitial cells have been attracting attention as a significant source of their production. Cancer-associated fibroblasts (CAFs), a considerable cancer stromal cell, have been shown to contribute significantly to cancer progression by interacting with cancer cells. The applicant's research group has previously demonstrated that MMPs activity is essential in maintaining the pro-tumor trait of CAFs. In this study, we identified MMP molecules that are highly expressed in mouse and human lung cancer stromal cells (mainly CAFs) and analyzed the functions of stromal cell-derived MMPs involved in tumorigenesis and progression.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：MMPs ADAM CAF 肺癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌の進展のメカニズムに関して、宿主-腫瘍間の相互作用、特に癌細胞を取り巻く腫瘍微小環境の重要性が認識されている。腫瘍微小環境を構成する間質細胞には線維芽細胞などの間葉系細胞、マクロファージやT細胞をはじめとして免疫細胞、血管やリンパ管を構成している細胞、主に細胞間に局在する細胞外マトリックス

(extracellular matrix: ECM) および、それに結合する生理活性物質が含まれる。腫瘍微小環境を構成する腫瘍間質細胞の中でも線維芽細胞とマクロファージは、それぞれ癌関連線維芽細胞

(cancer-associated fibroblast: CAF)、腫瘍随伴マクロファージ(Tumor-associated

macrophage: TAM)と呼ばれる。これまでの病理学的な検討から、種々の癌組織において、CAFやTAMの存在が癌の悪性度と相関することが報告されるとともに、癌細胞との共培養やマウスモデルを用いた研究により、実験的にも癌幹細胞の維持や転移促進に関与することが実証されつつある(図1)。腫瘍間質においては、CAFやTAMといった腫瘍促進性間質細胞の侵入により、ECM成分などのダイナミックな変化を伴う病的組織破壊を来し、癌細胞生存に有利な環境が形成される。特に腫瘍組織内で異常に蓄積あるいは分解されたECMは、癌幹細胞維持やいわゆる”前転移ニッチ”形成において重要な役割を果たすことが提唱されている。メタロプロテアーゼであるMMP(matrix metalloproteinase)とADAM(a disintegrin and metalloproteinase)遺伝子ファミリーは、腫瘍組織内のこれらECMや生理活性物質分解において中心的な役割を果たしており、癌の進展に大きく関与することが知られている。これまでの報告から、癌細胞とともに様々な間質細胞がメタロプロテアーゼを産生するが、その中でもCAFとTAMは主要な産生源と考えられている(表1)。したがって、腫瘍進展におけるCAFやTAM由来メタロプロテアーゼの機能を明らかにすることは今後の重要な課題の一つと考えられる。申請者らのグループは、これまでに悪性腫瘍や炎症性疾患で代表される病的状態におけるメタロプロテアーゼ分子の発現・機能解析を行い、ヒト肺癌と乳癌組織においてADAM28の癌細胞選択的発現と癌細胞の増殖・転移との相関を見出してきた。本研究では、これまで蓄積された我々独自の研究データをもとに、microarray databaseとヒト肺癌組織から採取した線維芽細胞を用いてCAFで高発現するメタロプロテアーゼに同定ならびに腫瘍形成に関わる機能解析を行う。

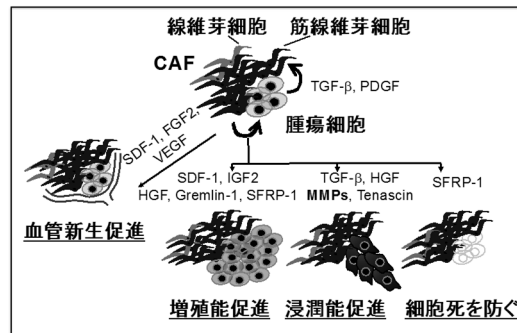


図1 CAFによる腫瘍促進作用

2. 研究の目的

上記のように、これまでに申請者の研究グループではメタロプロテアーゼ活性が癌関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast: CAF)の腫瘍促進性形質維持に重要であることを明らかにしてきた。本研究では、マウスおよびヒト肺癌間質細胞(主にCAF)で高発現するメタロプロテアーゼ分子を同定し、腫瘍形成・進展に関わる間質細胞由来メタロプロテアーゼの役割について明らかにする。

表1. 腫瘍間質細胞におけるメタロプロテアーゼの発現

間質細胞	メタロプロテアーゼ	インヒビター
好中球	MMP-8, -9	TIMP-1
	ADAM8, 17	
	ADAMTS1	
マクロファージ	MMP-1, -2, -7, -9, -12, -14	TIMP-1, -2, -3
	ADAM9, 15, 17	
	ADAMTS4	
リンパ球	MMP-3, -9	TIMP-1
	ADAM17, 28	
血管内皮細胞	MMP-2, -3, -7, -14, -19	TIMP-1, -2
	ADAM15, 17	
線維芽細胞	MMP-1, -2, -3, -9, -11, -13, -14, -19	TIMP-1, -2, -3
	ADAM17	
	ADAMTS5	

3. 研究の方法

本研究課題では、マウス、ヒトCAFで高発現するメタロプロテアーゼ分子の同定を行い、特に予備実験で同定したMMP-13に着目し、ヒト肺癌由来CAFとMmp13 KOマウスを用いて、腫瘍促進作用に関わる間質細胞由来MMP-13の機能解析を行った。

(1)マウス、ヒトCAFで高発現するメタロプロテアーゼ分子の発現解析

本項目では、ヒト肺癌組織よりCAFを単離・初代培養し、ヒト肺癌由来CAFにおけるMMP-13を含む発現解析を行った。肺癌手術材料の癌部・非癌部組織より、CAFおよび正常線維芽細胞(normal tissue-associated fibroblast: NAF)を単離する。採取部の形態学的な組織型と比較しながら、全てのADAMとMMPをスクリーニングできるPCRアレイ(Invitrogen社; 作製済)を用いて、培養CAFにおけるADAMとMMPの発現レベルを網羅的に解析し、培養ヒト由来CAFで高発現するADAMとMMPを解析する。PCRアレイにおいてCAFで有意に発現が上昇しているメタロプロテアーゼとMMP-13に関しては、さらに、定量PCR、イムノブロット法を用いて発現解析をする。また、蛍光ペプチドを用いて、CAFおよびNAFにおけるメタロプロテアーゼ活性を定量するとともに、メタロプロテアーゼのインヒビター(BB94など)を用いてCAFおよび

NAFにおけるメタロプロテアーゼ活性を調べる。

#### (2) 同所性肺癌移植モデルの確立

マウス肺癌細胞株を wild-type (WT)あるいは *Mmp13* KO マウスの麻酔をかけて人工呼吸器管理下に左開胸して胸膜直下に移植し、経時的に腫瘍の発育やリンパ節転移を観察する。RNA in situ hybridization 法を用いて、腫瘍内での MMP-13 発現細胞を同定するとともに、腫瘍細胞や間質細胞の組織学的変化を解析し、腫瘍形成における間質細胞由来 MMP-13 の役割を明らかにする。

#### (3) *Mmp13* KO マウスを用いた間質細胞由来メタロプロテアーゼの腫瘍促進作用解析

異所性(皮下)癌移植モデルを用いた間質細胞由来 MMP-13 の役割解析: マウス肺癌細胞株を wild-type (WT)あるいは *Mmp13* KO マウスの皮下に移植し、経時的に腫瘍の発育や肺転移を観察する。また、RNA in situ hybridization 法を用いて、腫瘍内での MMP-13 発現細胞を同定するとともに、腫瘍細胞や間質細胞の組織学的変化を解析し、腫瘍形成における間質細胞由来 MMP-13 の役割を明らかにする。

*Mmp13* 欠損間質細胞の形質解析および基質の探索: WT あるいは *Mmp13* KO マウスより初代皮膚線維芽細胞あるいは骨髄由来マクロファージを単離し、real-time PCR 法あるいはイムノブロット法を用いて種々のサイトカインや増殖因子の発現レベルを解析するとともに、MMP-13 の基質を探索する

同所性癌移植モデルを用いた間質細胞由来 MMP-13 の役割解析: 前年度確立した同所性癌移植モデルを用いて解析する。標識したマウス肺癌細胞株を WT あるいは *Mmp13* KO マウスの肺内に直接移植し、IVIS in vivo イメージングを用いて腫瘍の発育や気管支リンパ節への転移の有無をリアルタイムで観察する。また、腫瘍細胞や間質細胞の組織学的変化を解析し、肺内腫瘍形成における間質細胞由来 MMP-13 の役割を明らかにする。

骨髄由来細胞の関与の検討: 腫瘍間質中に動員される CAF の約 20%あるいはマクロファージは骨髄由来であることが示されている。WT マウスの骨髄細胞を *Mmp13* KO マウスへ、あるいは WT あるいは *Mmp13* KO マウスの骨髄細胞を WT マウスへ移植後、異所性(皮下)あるいは同所性癌移植モデルを行うことにより、骨髄細胞由来間質細胞の腫瘍形成への関与を検討する。

(4) ヒト肺癌手術検体のパラフィン切片を用いて、腫瘍内における MMP-13 発現細胞の同定を行う(MMP-13 の染色条件については既に検討済み)。具体的には、免疫染色法により上皮細胞、活性化線維芽細胞、マクロファージなどに対する特異的マーカーとの二重染色を行い、MMP-13 高発現細胞を特定するとともに、年齢・ドライバー遺伝子変異の有無、肺癌の腫瘍径・分化度・静脈侵襲の有無、予後等の臨床病理学的因子臨床情報との関連を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) マウス、ヒト CAF で高発現するメタロプロテアーゼ分子の発現解析

取得したヒト肺癌組織より CAF を単離・初代培養し、ヒト肺癌由来 CAF における MMP-13 を含む発現解析を行った。肺癌手術材料の癌部・非癌部組織より、CAF および正常線維芽細胞(normal tissue-associated fibroblast: NAF)を単離する。採取部の形態学的な組織型と比較しながら、全ての ADAM と MMP をスクリーニングできる PCR アレイ (Invitrogen 社; 作製済)を用いて、培養 CAF における ADAM と MMP の発現レベルを網羅的に解析し、培養ヒト由来 CAF で高発現する ADAM と MMP を解析した。

現時点で候補分子はいくつか挙げられるが、更に検体数を増やして検討を予定している。

### (2) 同所性肺癌移植モデルの確立

マウス肺癌細胞株を wild-type (WT)ならびに *Mmp13* KO マウスの麻酔をかけて人工呼吸器管理下に左開胸して胸膜直下に移植し、経時的に腫瘍の発育やリンパ節転移を観察した。現在、RNA in situ hybridization 法を用いて、腫瘍内での MMP-13 発現細胞を同定するとともに、腫瘍細胞や間質細胞の組織学的変化を解析中である。今後更に検体数を増やして検討を予定している。



● 同所性肺移植モデル

(左)丸印:同所性移植され、生着したマウス肺癌

(右)丸印:同所性移植され、腫大した肺門部リンパ節

### (3) *Mmp13* KO マウスを用いた間質細胞由来メタロプロテアーゼの腫瘍促進作用解析

異所性(皮下)癌移植モデルを用いた間質細胞由来 MMP-13 の役割解析: すでにいくつかの検体でマウス肺癌細胞株を wild-type (WT)あるいは *Mmp13* KO マウスの皮下に移植し、経時的に腫瘍の発育や肺転移を観察し、検体の採取を終えている。RNA in situ hybridization 法を用いて、腫瘍内での MMP-13 発現細胞を同定するとともに、腫瘍細胞や間質細胞の組織学的変化を解析し、傾向が掴めている。今後更に検体数を増やして解析を予定している。

*Mmp13* 欠損間質細胞の形質解析および基質の探索: 現在、解析中である。

同所性癌移植モデルを用いた間質細胞由来 MMP-13 の役割解析: 検体数を増やして解析中である。

骨髄由来細胞の関与の検討: まだ実験中であり、現段階での成果の報告が不能である。

### (4) ヒト肺癌組織における MMP-13 の発現解析

ヒト肺癌手術検体のパラフィン切片を用いて、腫瘍内における MMP-13 発現細胞の同定を行っ

た。また、年齢・ドライバー遺伝子変異の有無、肺癌の腫瘍径・分化度・静脈侵襲の有無、予後等の臨床病理学的因子・臨床情報との関連を検討中であり、いくつかの傾向は掴めている。特に、臨床病理学的因子・臨床情報との関連についての検討は他施設のものについても解析を行っており、その解析結果については現在投稿中である。

本研究で提案したプロジェクトは、CAF で高発現するメタロプロテアーゼを同定するだけでなく、ノックアウトマウスを用いた癌移植モデルやヒト肺癌パラフィン標本を用いた発現解析を行い、分子生物学、生化学、遺伝子工学、病理組織学的手法を駆使して、包括的に間質細胞由来メタロプロテアーゼの解析を行う点に特色がある。また、これまでに報告の少ない同所性肺癌移植モデルから得られる解析結果により、生体内に近いモデルでメタロプロテアーゼを介した腫瘍内微小環境の解明をする点に独創性がある。本研究で得られる情報は、腫瘍進展に関わる新たな間質細胞由来メタロプロテアーゼの役割を解明するとともに、従来癌細胞自身に対する診断・治療が主流であった癌研究領域に大きな展開をもたらす可能性があると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----