

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15797

研究課題名（和文）食道癌悪性化における癌内線維芽細胞の役割の解明

研究課題名（英文）The roles of CAFs for malignant progression of human esophagus tumors

研究代表者

鈴木 真由（suzuki, mayu）

順天堂大学・医学部・非常勤助手

研究者番号：90815341

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：食道癌間質に多く存在する癌内線維芽細胞（CAFs）は癌細胞の浸潤、転移の促進や治療抵抗性獲得に関与しているが、その分子機構はまだ不明な点が多い。申請研究では、33例の手術により摘出された食道癌部および非癌部の検体を採取しprimary cultureし27例でCAFsおよびコントロールの線維芽細胞の樹立に成功した。また、5症例の食道癌オルガノイドも樹立した。今後はこれらの患者由来線維芽細胞と食道癌オルガノイドの共培養や共移植マウスモデルを使用し、癌悪性化に寄与する遺伝子やシグナル伝達を分子レベルで検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らはCAFsとの相互作用により近傍の食道癌細胞にpartial EMT (epithelial-mesenchymal transition) が誘導される可能性に注目している。partial EMTが細胞-細胞接着を維持した癌細胞クラスターの形成および間葉系の表現型を誘導し、癌細胞の浸潤・転移能や治療抵抗性能を促進させる可能性を提案した。本研究が成功した場合は、CAFsによる新規の浸潤・転移能や治療抵抗性能促進メカニズムを解明できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：CAFs, which are abundant in esophageal cancer stroma, are involved in cancer cell infiltration, promotion of metastasis, and acquisition of treatment resistance, but the molecular mechanism remains unclear. In the submitted study, specimens of esophageal cancer and non-cancerous areas removed by surgery were collected from 33 cases and primary culture was performed, and CAFs and control fibroblasts were successfully established in 27 cases. In addition, 5 cases of esophageal cancer organoids were also established. In the future, we plan to use co-culture and co-transplanted mouse models of these patient-derived fibroblasts and esophageal cancer organoids to investigate genes and signaling that contribute to cancer malignancy at the molecular level.

研究分野：消化器内科

キーワード：食道癌 浸潤・転移 癌悪性化 CAFs 癌微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食道癌における、stage IV の 5 年生存率は 10% 台と低値であり、かつ、食道癌では転移率 T1b (stage I) でも 30 ~ 50% にリンパ節転移を認めるなども転移率も高い。根治術後においても再発率は 28 ~ 47% に認めるとされ、再発した場合の生存期間中央値は 5 ~ 10 ヶ月であり予後はかなり不良と言わざるを得ない。

また分子標的薬が胃癌、大腸癌などの消化管癌で適応となってきたにもかかわらず、食道癌においては、有効な分子標的薬の臨床治験の結果が得られていないのが現状である (Dutton S., et al., *Lancet Oncol* 2014;15:894-904)。転移を認めた食道癌において、更なる有効な薬剤を検討するにあたっては、分子生物学的に腫瘍の病態を解明することが急務であると考えられる。

α -smooth muscle actin (α -SMA) 陽性の活性化筋線維芽細胞である CAFs は患者食道癌の間質で多く検出される。CAFs は、腫瘍の増殖、浸潤や転移さらには癌細胞の治療抵抗性に寄与することが知られている。申請者は、乳癌内に存在する線維芽細胞が癌化の過程で癌細胞の影響下でより悪性度の増した CAFs に分化し、正常組織に存在する線維芽細胞とは異なった性質を獲得していることをこれまでに明らかにした。またヒト乳癌より抽出された CAFs は血管新生促進性サイトカイン stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) を高発現し乳癌の血管新生や増殖を促進することを示した。さらに、CAFs が癌の進展過程で SDF-1 と TGF- β シグナルを亢進し、癌促進能の表現型を安定に維持し、癌細胞と独立した癌化を促進する細胞であることを明らかにした (Kojima, Y., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20009-20014, 2011)。しかしながら、CAFs が癌細胞に高転移性や治療抵抗性を教授するメカニズムはまだ不明な点が多い。

以前より癌浸潤・転移を促進するプログラムとして上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) が広く知られている。EMT が誘導された単一間葉系癌細胞は浸潤能を亢進し、遠隔臓器に転移し、間葉上皮移行 (mesenchymal-epithelial transition: MET) を介して上皮系癌細胞になり、macroscopic な転移巣を形成する。しかしながら、近年、EMT 非依存的に間葉系の表現型を介することなく上皮系癌細胞集団 (クラスター) が転移する説や partial EMT を介して上皮系癌細胞が E-cadherin の弱発現を維持したまま、間葉化 (epithelial-mesenchymal type: E/M type) し、細胞細胞接着能を有した癌細胞集団が浸潤・転移に寄与することも提唱されている。

患者癌を模倣したマウスモデル作製のため、申請者は T, B, NK 免疫細胞を欠損した高度免疫不全 NOG マウス (NOD/Shiscid, IL-2R γ KO) を使用し、ヒト大腸癌組織を使用した PDX モデルマウスの樹立に成功している。

2. 研究の目的

申請研究では、この PDX 作製技術を利用し、患者食道癌の PDX モデルを樹立し、CAFs との共移植モデルを使用し、CAFs が癌細胞の浸潤、転移や治療抵抗性にどの様に寄与しているか分子レベルで調査する。申請者の仮説は、CAFs が partial EMT を近傍の癌細胞に誘導し、細胞死抵抗性の癌細胞クラスター形成を誘導し、転移や治療抵抗性を促進する可能性を推測している。申請研究ではこの仮説を検証し、その分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

申請研究では、CAFs による食道癌の浸潤・転移や治療抵抗性メカニズムならびに抑制法を解明することを目的として、3 つの課題と目標を設定する。

課題 1) 食道癌 PDX モデルおよび CAFs の樹立

同所移植を容易にするためにまず患者癌塊を NOG マウスの皮下に移植することを試みる。患者食道癌切除検体 (直径 7 mm 程度) をマトリゲル® (Falcon) とともに NOG マウスの皮下に移植する。同検体より同時に CAFs を primary culture する。対照の正常線維芽細胞は食道の非癌部より抽出する。数か月後、皮下で増殖した癌塊を collagenase で消化し single cell suspension を作製し、新たな NOG マウスの食道に同所移植する。移植が困難な場合は、数種類の注入針のサイズ (23

~30 G)を検討し、細胞に与えるダメージを最小化しかつ最も細い注射針を用いる。あるいは皮下移植に変更する。NOG マウスに同所移植後 6 か月間経過を観察し、原発巣の増殖や転移の有無を評価する。8~10 例の食道癌の移植を予定している。

課題 2) 食道癌組織由来 CAFs および食道癌 PDX との共移植系の確立

申請研究では、食道癌由来 CAFs あるいは対照の非癌部由来線維芽細胞と NOG マウスに同所あるいは皮下移植された食道癌塊の増殖能、partial EMT および遠隔臓器への転移能に関して、各グループ間で比較する。CAFs の癌転移促進作用や治療抵抗性獲得の分子機構を解明する為に、食道癌由来 CAFs あるいは対照の非癌部由来線維芽細胞と移植された食道癌塊より癌 organoids を培養する。申請者らは癌 organoids 培養に精通している。これらの organoids より RNA を抽出し DNA マイクロアレイ解析を施行し、各グループ間で遺伝子発現を比較する。

課題 3) CAFs による食道癌浸潤・転移促進や治療抵抗性に関するメカニズムの調査

上記の DNA マイクロアレイ解析にて同定された上位 5 つの遺伝子の発現を shRNA を用いて抑制し癌悪性能への寄与を調査する。

4. 研究成果

食道癌間質に多く存在する癌内線維芽細胞 (CAFs) は癌細胞の浸潤、転移の促進や治療抵抗性獲得に関与しているが、その分子機構はまだ不明な点が多い。本研究では、CAFs が食道癌細胞にもたらす影響を明らかにするため、33 例の手術により摘出された食道癌部および非癌部の検体を採取した。採取した検体をミンス酵処理により単細胞化して 10%FCS-dMEM の培養液を添加して培養皿上にて線維芽細胞の培養を施行した。線維芽細胞の増殖は全般的に良好で primary culture により 27 例の CAFs およびコントロールの線維芽細胞の樹立に成功した。線維芽細胞は術前化学療法が施行された症例および施行されなかった症例より樹立された。またほとんどの食道癌は術前化学療法に無反応性・抵抗性であり、このような化学療法に抵抗性な癌より線維芽細胞が樹立された。現在 RNA-sequencing を施行中であり得られたトランスクリプトームのバイオインフォマティクス解析を施行予定である。化学療法未治療癌由来 CAFs vs コントロールの線維芽細胞におけるトランスクリプトーム解析に加えて化学療法未治療癌由来 CAFs vs 治療抵抗性癌由来 CAFs の解析を計画している。

また手術で採取された 15 症例の胆管癌の小癌塊 (5 mm x 5 mm) をマトリゲル溶液に浸した後高度免疫不全 NOG マウスの皮下に移植した。1 年間経過を観察し 2 例で癌の増殖が観察された。また、ヒト検体を酵素処理にて単細胞化しマトリゲルドーム内で培養することにより 5 症例の食道癌オルガノイドも樹立した。今後はこれらの患者由来線維芽細胞と食道癌オルガノイドの共培養や共移植マウスモデルを使用し、癌悪性化に寄与する遺伝子やシグナル伝達を分子レベルで検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeda T, Asaoka D, Nojiri S, Nishiyama M, Ikeda A, Yatagai N, Ishizuka K, Hiromoto T, Okubo S, Suzuki M, Nakajima A, Nakatsu Y, Komori H, Akazawa Y, Nakagawa Y, Izumi K, Matsumoto K, Ueyama H, Sasaki H, Shimada Y, Matsumoto K, Osada T, Hojo M, Kato M, Nagahara A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Linked Color Imaging and the Kyoto Classification of Gastritis: Evaluation of Visibility and Inter-Rater Reliability.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Digestion.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000501534	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeda T, Nagahara A, Ishizuka K, Okubo S, Haga K, Suzuki M, Nakajima A, Komori H, Akazawa Y, Izumi K, Matsumoto K, Ueyama H, Shimada Y, Matsumoto K, Asaoka D, Shibuya T, Sakamoto N, Osada T, Hojo M, Nojiri S, Watanabe S.	4. 巻 97
2. 論文標題 Improved Visibility of Barrett's Esophagus with Linked Color Imaging: Inter- and Intra-Rater Reliability and Quantitative Analysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 183-194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000504091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------