

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16992

研究課題名（和文）悪性黒色腫における癌関連線維芽細胞のリンパ管内皮細胞への遊走および増殖作用の検討

研究課題名（英文）Migration and proliferative effects of cancer-associated fibroblasts on lymphatic endothelial cells in malignant melanoma

研究代表者

藤川 平四郎（Fujikawa, Heishiro）

大阪公立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：80740373

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）：本研究は癌細胞の進展に深く関与するとされている腫瘍微小環境における癌関連線維芽細胞に着目した。癌組織内でリンパ管新生が誘導されることにより組織内のリンパ管が増加しリンパ節転移を起こすことが知られている。悪性黒色腫はリンパ節転移を起こしやすいため、癌関連線維芽細胞のリンパ節転移に対する影響について評価を行った。癌細胞の影響を受けた癌関連線維芽細胞はリンパ管内皮細胞の増殖を促進することが示唆された。その作用に関連しているサイトカインの検索を試みたが、実際にリンパ管内皮細胞の増殖に対して促進的に働く物質は同定できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、悪性黒色腫の腫瘍微小環境における癌関連線維芽細胞によってリンパ管内皮細胞の増殖が促進される可能性が考えられた。すなわちリンパ管新生、ひいてはリンパ節転移に影響を与えることが示唆される。しかし、それに影響を与えるサイトカインの同定には至らなかった。引き続きリンパ管新生に関与する物質を検索し、その阻害剤の開発が望まれる。

研究成果の概要（英文）：Our research focused on cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment, which are deeply involved in cancer cell progression. Lymphangiogenesis is induced in cancer tissues, resulting in increase of lymphatic vessels in the tissues and causes lymph node metastasis. Malignant melanoma is prone to lymph node metastasis. Therefore, we evaluated the effect of cancer-associated fibroblasts on lymph node metastasis. The results suggest that cancer-associated fibroblasts affected by cancer cells promote proliferation of lymphatic endothelial cells. We attempted to find cytokines associated with this effect, but were unable to identify any substances that actually promote lymphatic endothelial cell proliferation.

研究分野：形成外科学

キーワード：悪性黒色腫 癌関連線維芽細胞 リンパ管新生 リンパ管内皮細胞

## 1. 研究開始の背景

皮膚悪性黒色腫はメラノサイトが悪性化した皮膚癌である。発生頻度については人種差があり、欧米と比較して本邦では 10 万人に 1 - 2 人と比較的稀であるが、悪性度が高くリンパ節転移、遠隔転移を来しやすい。近年、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬の発展により生存率の改善が見られるが、より有効性の高い新規治療薬の開発が望まれる。

分子標的薬の開発には癌細胞の発現蛋白やそれに関わる物質の解明が不可欠である。以前より悪性黒色腫において発現する蛋白についての網羅的研究が行われているが、癌細胞を取り巻く腫瘍微小環境に着目した報告は少ない。胃癌や大腸癌など多くの癌腫において腫瘍微小環境、特に線維芽細胞が癌細胞の浸潤、転移に影響を与えることが報告されている。悪性黒色腫についても同様に腫瘍微小環境が進展に影響を与えている可能性が考えられるが、その関連性について検討した報告はほとんど認められない。

微小環境内の線維芽細胞、いわゆる癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblasts: CAF) について、癌周囲のリンパ管密度を増加させることが報告されている。リンパ節転移においてリンパ管密度の増加が進展に関与しており、その機序の解明がリンパ節転移の抑制につながる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究は悪性黒色腫の増殖において、リンパ節転移に関連する機序の解明を目的としている。前述のごとく、腫瘍微小環境によるリンパ節転移の影響について検討すべく、CAF について着目した。CAF によってリンパ管新生が誘導されリンパ管密度が増加することの評価として、リンパ管内皮細胞への影響について検討した。CAF がリンパ管内皮細胞を増殖させる物質を同定することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) 癌関連線維芽細胞の樹立

大阪公立大学医学部附属病院形成外科において悪性黒色腫を含む皮膚悪性腫瘍に対する治療目的に受診した患者のうち、本研究へのインフォームドコンセントを得て、切除した病変より癌関連線維芽細胞株の樹立を行った。切除標本から組織を一部採取して細かく粉碎し、DMEM 内で培養を行うことで樹立可能であった。樹立した CAF は凍結保存した。CAF はシャーレで培養を行い、semi-confluent となった時点で培地を無血清培地へ変更し 72 時間培養を行った後に培地を回収して CAF 培養上清として続く実験に使用した。

また、癌細胞から影響を受けた CAF を作成した。CAF の継代培養開始時に、癌細胞の培養上清 (採取方法は前述の CAF 培養上清と同様) を 50% の濃度で添加して培養を開始し、semi-confluent となった時点で癌細胞の培養上清を含んだ上清は破棄し、無血清培地で 72 時間培養した上清を educated CAF (eCAF) の上清として採取した。

### (2) CAF によるリンパ管内皮細胞への影響について

悪性黒色腫細胞については、当教室保有のヒト皮膚悪性黒色腫細胞株(MMAc、COLO679)を使用した。CAF 培養上清を添加した条件下で、リンパ管内皮細胞が受ける影響を細胞増殖能、リンパ管新生により評価した。リンパ管内皮細胞は Promocell®よりヒト皮膚リンパ管内皮細胞(成人)を購入して用いた。

細胞増殖能については、リンパ管内皮細胞を CAF 培養上清添加群と対照群を 72 時間培養し、MTT assay を行った。リンパ管内皮細胞に 50%の CAF および eCAF 培養上清を添加してインキュベーターで培養し、24 時間毎に CellTiter 96® AQueous One Solution Reagent (Promega) を添加して処理した後、モデル 550 マイクロプレートリーダー (Bio-rad) により 570nm の吸光度を測定した。

リンパ管新生については、tube formation assay により評価を行った。*In Vitro* Angiogenesis Assay Kit (Trevigen)を用いた。リンパ管内皮細胞を Calcein AM で蛍光染色し、培養開始 12 時間後に BZ-X710 (Keyence)を用いてリンパ管内皮細胞の管腔形成を観察、撮影した。Image J で画像解析を行い、形成された管腔および節の数、管の全長を計測した。

### (3) リンパ管内皮細胞増殖に関連するサイトカインの検索

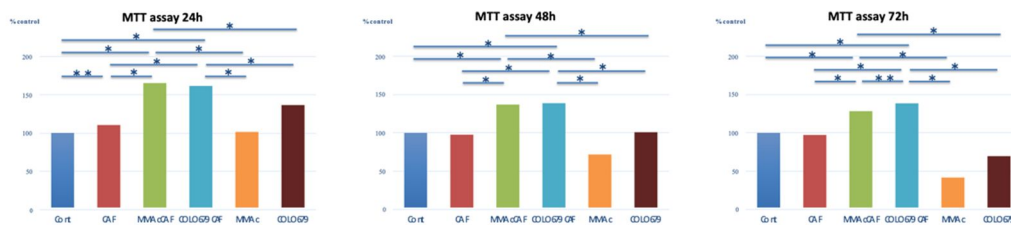
リンパ管内皮細胞に関連するサイトカインについては、Proteome Profiler™ (R&D SYSTEM®)を用いて cytokine array を行い、CAF 上清中に含まれる物質について網羅的に検索した。候補と考えられる物質において、その物質をリンパ管内皮細胞に添加して培養し実際に増殖効果が認められるかどうかを確認した。

## 4. 研究成果

CAF に対して MMAc および COLO679 から採取した上清を加えて培養した eCAF (MMAcCAF および COLO679CAF) からそれぞれ培養上清を採取した。リンパ管内皮細胞に対して CAF 培養上清および eCAF 培養上清 2 種を添加して培養すると、MTT assay において、対照群と比較してリンパ管内皮細胞が有意に増殖することが確認された。また、CAF と比較して eCAF で有意に増殖が促進されていた (Fig.1)。同様の傾向が tube formation assay においても認められた (Fig.2)。

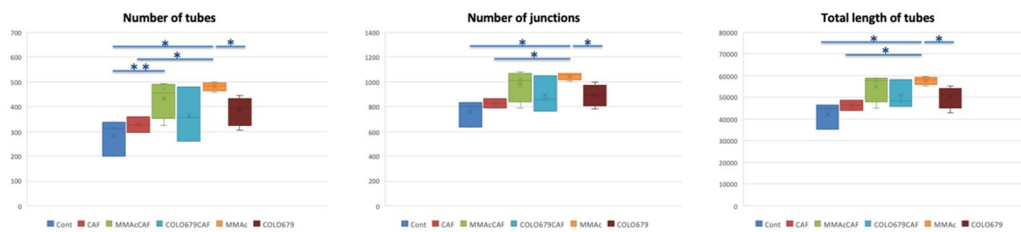
引き続き、異なる CAF 2 種 (CAF1、CAF2) およびそれぞれの CAF に対して MMAc の上清を添加して作成した eCAF 2 種 (eCAF1m、eCAF2m)、計 4 種の CAF の上清を用いて cytokine array を行った。CAF1 と eCAF1m、CAF2 と eCAF2m においてサイトカインの発現を比較した (Fig.3)。cytokine array 1 および 2 において、共通して有意差がみられた物質を 4 種に絞り込んだ。CCL2 (MIP-1)、CXCL10 (GRO- $\alpha$ )、IL-8、IL-6 がリンパ管内皮細胞増殖に関連する因子と考え、各物質をリンパ管内皮細胞に種々の濃度で添加することにより増殖効果が実際に発現するかどうかを確認したが、いずれの物質においてもリンパ管内皮細胞の増殖を促進する結果が得られなかった。

本研究において CAF によりリンパ管新生を促進する可能性は示唆されたものの、サイトカインの同定には至らなかった。



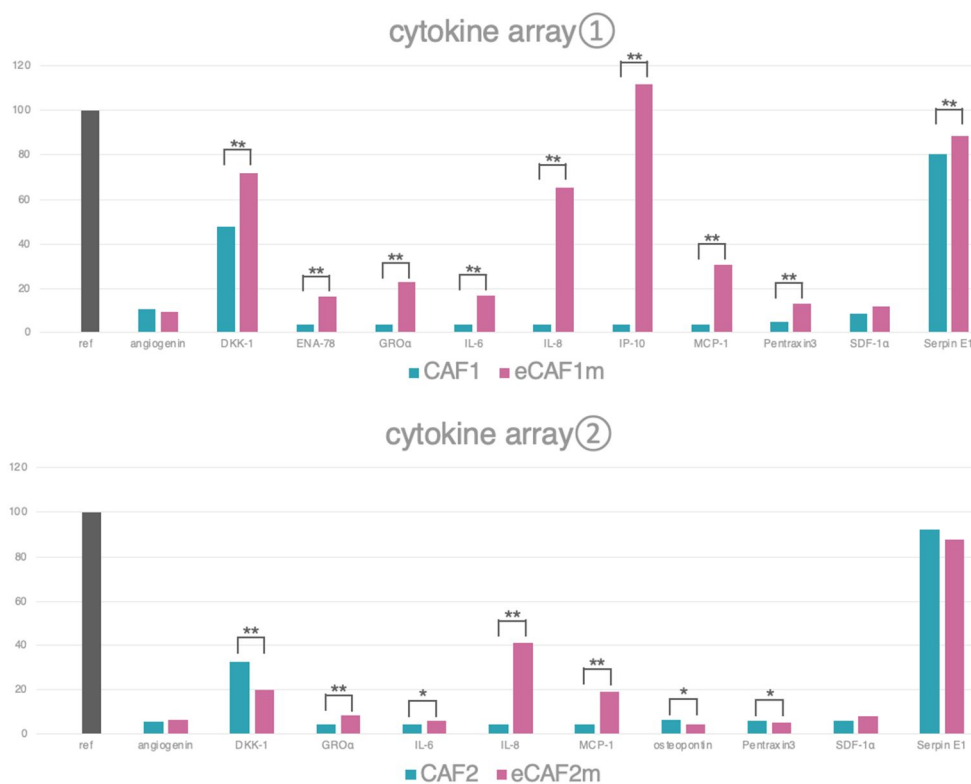
**Fig. 1 Effect on proliferation of HLECs by CAFs or tumor cells**

MTT assay showed that conditioned medium from CAFs with supernatant of tumor cells had proliferative effect on HLECs significantly. \*:P<0.01, \*\*:P<0.05



**Fig. 2 Lymphangiogenesis assessed by tube formation assay**

In MMACCAF-CM and MMAC-CM group, there was significant difference between control group in each factors reflecting lymphangiogenesis. It was suggested that Especially MMAC had strong effect on progression of lymphangiogenesis.



**Fig. 3 cytokine array 1 and 2**

\*:P<0.01, \*\*:P<0.05

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shusaku Maeda, Masakazu Yashiro, Hisashi Motomura, Takaharu Hatano, Heishiro Fujikawa
2. 発表標題 Effect of Cancer-Associated Fibroblasts on Lymphatic Vessel Formation in Malignant Melanoma
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shusaku Maeda, Masakazu Yashiro, Hisashi Motomura, Takaharu Hatano, Heishiro Fujikawa
2. 発表標題 Effect of Cancer-Associated Fibroblasts on Lymphatic Vessel Formation in Malignant Melanoma
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shusaku Maeda, Masakazu Yashiro, Hisashi Motomura, Takaharu Hatano, Heishiro Fujikawa
2. 発表標題 Cancer-associated fibroblasts under the influence of melanoma cells might stimulate the lymphatic vessel formation
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔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
---------	---------