

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19404

研究課題名（和文）癌関連線維芽細胞に特異的に発現する細胞膜マーカータンパク質の探索とその治療応用

研究課題名（英文）Search for cell membrane marker protein specifically expressed in cancer-associated fibroblasts and its therapeutic application

研究代表者

仲矢 道雄（Michio, Nakaya）

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：80464387

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：癌細胞の周囲に存在する癌関連線維芽細胞は、癌の増殖、浸潤の土壌を形成し、癌の病態を悪化させる。最近では、この癌関連線維芽細胞を標的とした癌治療法の開発が注目されつつある。その一方でこれまで、厳密な意味での癌関連線維芽細胞に特異的なマーカー受容体は見つかっていない。そこで我々は、癌関連線維芽細胞特異的なマーカー受容体を探索しその候補分子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

すい臓がんなどの難知性がんにおいては、線維化は治療における大きな問題となっている。その線維化を実行する細胞ががん関連線維芽細胞である。従って、がん関連線維芽細胞はこれら難知性がんの治療の標的となる。私たちは、これまで同定されていなかった、がん関連線維芽細胞特異的なマーカー受容体候補を見出した。従って学術的な意味を持つと考える。また、この受容体を標的としてがん関連線維芽細胞特異的な薬剤送達が可能になるなど新たな難知性がん治療法開発への展開が見込まれ、社会的意義を持つと考える。

研究成果の概要（英文）：Cancer-associated fibroblasts, which are found around cancer cells, form the soil for cancer growth and invasion and worsen the disease. Recently, the development of cancer therapies targeting these cancer-associated fibroblasts has been attracting attention. On the other hand, no marker receptor that is strictly specific for cancer-associated fibroblasts has been found. We therefore searched for marker receptors specific for cancer-associated fibroblasts and identified candidate molecules.

研究分野：薬理学、分子生物学

キーワード：線維化

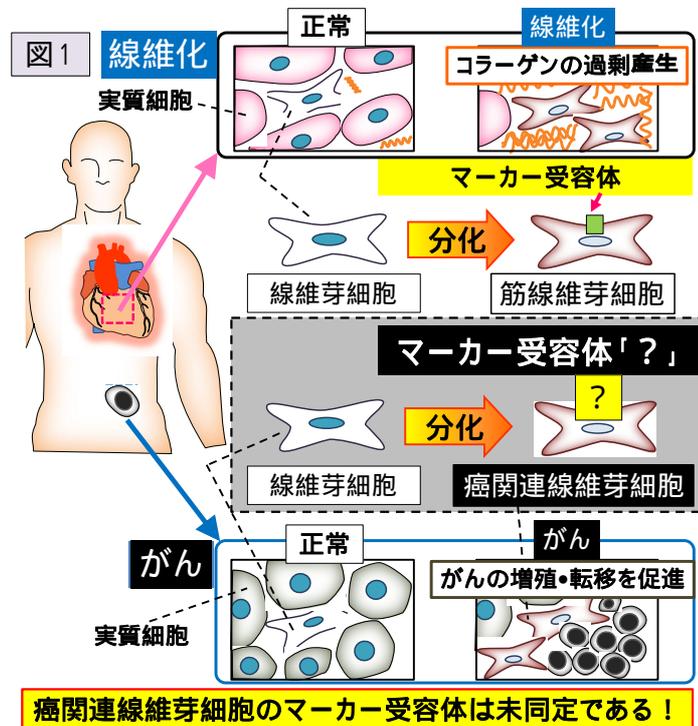
1. 研究開始当初の背景

我々の臓器は、各臓器に特徴的な機能を与える実質細胞（心臓の場合は、拍動能を持つ心筋細胞、肝臓の場合は、代謝機能を持つ肝細胞）と、その隙間に存在するコラーゲン線維を作る線維芽細胞から構成される（**図1**）。これまで、様々な病気においては、実質細胞の異常に焦点が当てられ、線維芽細胞の病気への寄与についてはあまり着目されていなかった。

しかしながら、近年、癌や線維化が関連する様々な疾患において、線維芽細胞が病態の悪化に極めて重要な役割を担うことが明らかとなってきた（Madar S et al., *Trends Mol. Med.*, 2013）。癌は周知の通り、日本の死亡原因の第一位である。一方で、線維化も、先進国の全死亡原因の約45%に關与するため（Pellicoro A et al., *Nat. Rev. Immunol.*, 2014）、革新的な治療法、診断技術の確立が求められている。線維化とは、コラーゲンが過剰に産生された状態（**図1**）であり、線維化した組織では、組織が硬くなる等して、その機能が著しく低下する。

癌細胞の周囲では、線維芽細胞が、**癌関連線維芽細胞**と呼ばれる細胞に分化し、癌の増殖や浸潤を助ける（**図1**）。一方で、線維化した臓器（例えば、心筋梗塞後の心臓や、喫煙者の肺、脂肪肝）においては、線維芽細胞は、過剰なコラーゲン産生能を持った、**筋線維芽細胞**という細胞に分化する（**図1**）。

線維芽細胞の分化は、癌や線維化関連疾患の病態を悪化させることから、癌関連線維芽細胞あるいは筋線維芽細胞を正常な線維芽細胞に戻すことができれば、それぞれ、癌、線維化関連疾患の病態の進行を抑制できると予想される。そのためには、まず、癌関連線維芽細胞、あるいは筋線維芽細胞を特異的に認識することを可能にする、それぞれの細胞にのみ発現する、細胞膜表面の目印蛋白質（**マーカー受容体**）が必要となる。近年、そのようなマーカー受容体が世界中で探索されてきた。



2. 研究の目的

一方で、申請者は、癌関連線維芽細胞の分化状態を自在に制御できる方法を見出した。そこで本研究では、この独自に確立した分化制御法を用いて、癌関連線維芽細胞のマーカー受容体を同定することを目指した。

3. 研究の方法

大腸がんモデルマウスの作製

アゾキシメタン投与後にデキストラン硫酸ナトリウムを投与することにより大腸がんモデルマウスを作製した。

大腸がんモデルマウスからの癌関連線維芽細胞、上皮細胞、白血球の単離

コラゲナーゼ等により消化した大腸癌周囲部の細胞のうち、プレートに接着した細胞を回収し、その後、同様に強い接着力を持つマクロファージを MACS 磁気細胞分離法により除去し、癌関連線維芽細胞を単離した。

線維化した大腸がんにおける mRNA の検出

In situ hybridization 法を用いて、大腸がんを呈するマウス大腸切片上の mRNA を検出した。また、同時にがん関連線維芽細胞のマーカー分子である α -SMA 抗体による免疫染色も行った。

4. 研究成果

1. 分化状態によって発現量が大きく変化する受容体の探索

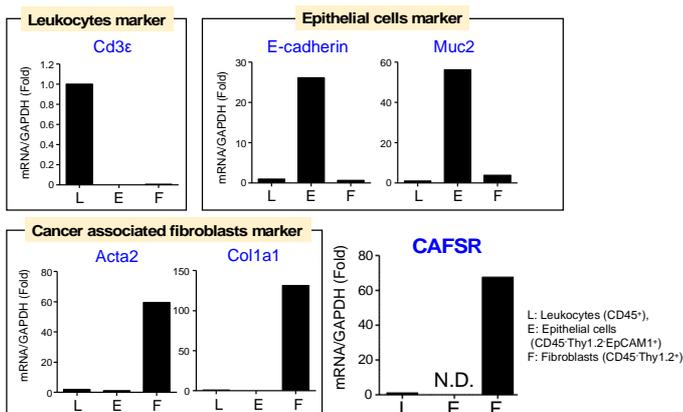
大腸がんから単離した癌関連線維芽細胞を独自の分化制御法を用いて、分化、脱分化、再分化させた。その後、これら3種の癌関連線維芽細胞に発現する遺伝子を DNA microarray によって比較し、分化、再分化した癌関連線維芽細胞にのみ多く発現し、脱分化した癌関連線維芽細胞にほぼ発現しない受容体群を選別した。その結果、いくつかの受容体が候補分子として選別された。

2. 選別した受容体群が CAF に特異的に発現するかの解析

選別した受容体群が CAF に特異的に発現するかを検討するために、大腸がんモデルマウスから癌関連線維芽細胞分画、上皮細胞分画、白血球分画をセルソーターを用いて回収し、その発現をリアルタイム RT-PCR により検討した。

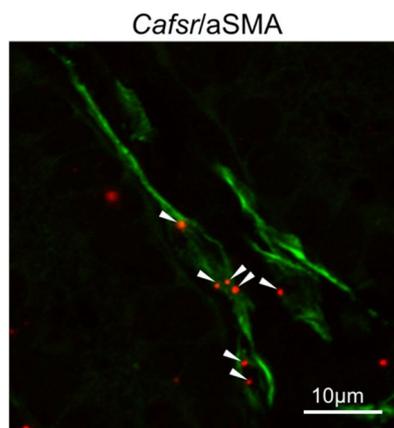
まず、それぞれの分画が純度よく回収できているかについてそれぞれの分画のマーカ分子である Cd3e, E-cadherin, Muc2, Acta2, Col1a1 を用いて検討した所、純度よく回収できていることが確かめられた。そこで、選別した受容体群

のそれぞれの細胞分画における発現を検討した所、ある受容体 (Cancer associated fibroblast specific receptor: CAFSR) が癌関連線維芽細胞分画に特異的に発現することを見出した (図 2)。



3. CAFSR は大腸がんの癌関連線維芽細胞に発現する

そこで次に CAFSR が実際に癌関連線維芽細胞に発現するかをマウス大腸がん切片を用いた in situ hybridization により検討した。その結果、Cafsr は α SMA (癌関連線維芽細胞の代表的なマーカ分子の一つ) 陽性の細胞に認められた。従って、Cafsr が癌関連線維芽細胞に発現することが明らかとなった (図 3)。



Red; Cafsr (arrowheads)
Green; α SMA
Cyan; DAPI

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 1. Yuma Horii#, Michio Nakaya*#, Hiroki Ohara#, Hiroaki Nishihara#, Kenji Watari, Akiomi Nagasaka, Takeo Nakaya, Yuki Sugiura, Toshiaki Okuno, Tomoaki Koga, Akira Tanaka, Takehiko Yokomizo and Hitoshi Kurose	4. 巻 in press
2. 論文標題 Leukotriene B4 receptor 1 exacerbates inflammation following myocardial infarction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 2. Takeo Nakaya, Masaya Sogabe, Shin-ichi Yamamoto, Kentaro Tsuji, Michio Nakaya, Toshiro Niki, Shunsuke Endo, and Akira Tanaka	4. 巻 e15888
2. 論文標題 Pancreatic carcinoma metastasis to a lung carcinoma lesion and pulmonary fibrotic regions, overtaking the stromal microenvironment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e15888
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1097/MD.00000000000015888.	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 Chikashi Yoshimura, Akiomi Nagasaka, Hitoshi Kurose, & Michio Nakaya	4. 巻 in press
2. 論文標題 Efferocytosis during myocardial infarction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J.Biochem.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Takashi Iezaki, Kazuya Fukasawa, Tetsuhiro Horie, Gyujin Park, Samuel Robinson, Michio Nakaya, Hiroyuki Fujita, Yuki Onishi, Kakeru Ozaki, Takashi Kanayama, Manami Hiraiwa, Yuka Kitaguchi, Katsuyuki Kaneda, Yukio Yoneda, Takashi Takarada, X. Edward Guo, Hitoshi Kurose, and Eiichi Hinoi	4. 巻 145(14)
2. 論文標題 The MAPK Erk5 is necessary for proper 1 skeletogenesis through a molecular axis that involves Smurfs-Smads-Sox9	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev164004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1242/dev.164004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Taka-aki Koshimizu, Kenji Honda, Sachi Nagaoka-Uozumi, Atsuhiko Ichimura, Ikuo Kimura, Michio Nakaya, Nobuya Sakai, Katsushi Shibata, Kentarou Ushijima, Akio Fujimura, Akira Hirasawa, Hitoshi Kurose, Gozoh Tsujimoto, Akito Tanoue & Yukio Takano	4. 巻 21(6)
2. 論文標題 Complex formation between the vasopressin 1b receptor, -arrestin-2, and the μ -opioid receptor underlies morphine tolerance	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 820-833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41593-018-0144-y	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12件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 仲矢道雄, 黒瀬等
2. 発表標題 筋線維芽細胞に焦点を当てた線維化治療戦略
3. 学会等名 日本薬学会第140年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 仲矢道雄
2. 発表標題 機械的刺激を感知し、組織の線維化を促進する転写共役因子の機能解析とそれを基盤とした新規線維化治療法の開発
3. 学会等名 第1回日本メカノバイオロジー 研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲矢道雄,
2. 発表標題 心疾患時の死細胞貪食における筋線維芽細胞の役割
3. 学会等名 第61回日本結合組織学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻野瑠星、伊藤峻太、渡健治、長坂明臣、仲矢道雄、黒瀬等
2. 発表標題 プロトン感知性GPCR (GPR4) に着目した心筋梗塞時におけるpH低下の生理的影響の解析
3. 学会等名 生体機能と創薬シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣中貴則、大場悠生、長坂明臣、仲矢道雄、黒瀬等
2. 発表標題 Smad6を安定化させ、BMPシグナルを抑制するユビキチンリガーゼの同定
3. 学会等名 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣中貴則、大場悠生、長坂明臣、仲矢道雄、黒瀬等
2. 発表標題 Smad6を安定化し、BMPシグナルを抑制するユビキチンリガーゼの同定
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 仲矢道雄
2. 発表標題 筋線維芽細胞の機能を制御する新たな分子の探索と同定
3. 学会等名 第3回 Fibrosis (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Michio Nakaya
2. 発表標題 Phagocytosis of dead cells by myofibroblasts during myocardial infarction
3. 学会等名 The 4th Japan-Taiwan Joint Symposium for Pharmaceutical Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲矢道雄
2. 発表標題 心疾患と死細胞貪食
3. 学会等名 第16回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲矢道雄、黒瀬等
2. 発表標題 心筋梗塞時の筋線維芽細胞による死細胞貪食
3. 学会等名 第50回 日本結合組織学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Michio Nakaya, Yuki Ohba, Takanori Hironaka, Hidetaka Kosako, Hitoshi Kurose
2. 発表標題 Identification of an E3 ubiquitin ligase that stabilizes Smad6 and inhibits BMP signaling
3. 学会等名 12th International BMP Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Michio Nakaya
2. 発表標題 Cardiac myofibroblasts contribute to removal of dead cells from hypertrophic heart
3. 学会等名 Japan Australia Meeting on Cell Death (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 仲矢道雄	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本生化学会	5. 総ページ数 4
3. 書名 生化学 「心筋梗塞時における死細胞貪食」	

1. 著者名 仲矢道雄	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 2
3. 書名 医学のあゆみ 「心筋梗塞時の筋線維芽細胞による死細胞の貪食」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学大学院 薬学研究院 薬効安全性学分野 http://chudoku.phar.kyushu-u.ac.jp

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
--	---------------------------	-----------------------	----