

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08335

研究課題名(和文) 大腸癌浸潤における癌関連線維芽細胞の機能解明と診断・治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of cancer-associated fibroblasts and its application to cancer diagnosis and treatment

研究代表者

久保 俊之 (Toshiyuki, Kubo)

札幌医科大学・医学部・訪問研究員

研究者番号：80784313

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)：消化器内視鏡技術の進歩により、早期大腸がんの多くは大きさや部位に関わらず内視鏡治療で切除が可能となったが、一部の症例は早期から浸潤・リンパ節転移が認められることから、分子メカニズムのさらなる解明が求められる。我々は、臨床検体を対象としたトランスクリプトーム解析から、大腸がん間質で高発現する一連の遺伝子を同定し、その中でもAEBP1/ACLPに着目した。AEBP1/ACLPはがん線維芽細胞に高発現し、がん線維芽細胞の活性化を促進することが示された。さらにがん線維芽細胞由来のAEBP1/ACLPは、がん細胞の遊走・浸潤・腫瘍形成能を促進することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん間質は、がんの進展に重要な役割を担っており、重要な診断・治療標的である。本研究では、新たな大腸がん間質マーカーとしてAEBP1/ACLPを同定した。AEBP1/ACLPは、がん間質の主要な成分であるがん線維芽細胞に高発現し、これを活性化する。さらにがん線維芽細胞由来のAEBP1/ACLPはがん細胞を活性化することを見出した。これらの結果から、AEBP1/ACLPは新たながん診断マーカーおよび治療標的たりうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Advancements in gastrointestinal endoscopy technology have made it possible to surgically remove early-stage colorectal cancer using endoscopic treatment, regardless of the size or location of the tumor. However, in some cases, early infiltration and lymph node metastasis have been observed, highlighting the need for further understanding of the molecular mechanisms involved. In our study, we conducted transcriptome analysis on clinical samples and identified a series of genes highly expressed in the stroma of colorectal cancer, with a particular focus on AEBP1/ACLP. AEBP1/ACLP was found to be highly expressed in cancer-associated fibroblasts and shown to promote their activation. Furthermore, we revealed that AEBP1/ACLP derived from cancer-associated fibroblasts enhances the migratory, invasive, and tumor-forming abilities of cancer cells.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸がん 浸潤 がん線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

消化器内視鏡技術の進歩により、早期大腸がんの多くは大きさや部位に関わらず外科手術よりも低侵襲な内視鏡治療で一括切除が可能となった。早期がんの中でも粘膜内に留まるがんは内視鏡治療による局所切除で根治できるが、粘膜下層浸潤 (SM) がんの約 10% はリンパ節転移を伴う。そこで、内視鏡切除後の病理診断により転移リスクを層別化して追加外科手術が行われるが、その約 90% が過剰な治療となっている。そのためより正確な転移リスクの層別化を可能とする診断マーカーの開発が求められている。これまでに浸潤がんの分子解析が多く研究者により行われているが、早期がんの浸潤・転移メカニズムにはいまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は大腸腫瘍臨床検体からがん線維芽細胞を分離・培養し、解析することでがん浸潤に関わる分子を同定し、診断・治療に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

組織検体

外科切除された早期大腸がんから上皮成分と間質成分をレーザーキャプチャーマイクロダイゼクションで分離し、RNA を抽出した。また 49 例の早期大腸がん症例を免疫染色解析した。

RNA-seq 解析

抽出した RNA の品質をバイオアナライザで検証した後、HiSeq2500 による RNA-seq 解析を行った。データを Strand NGS (Agilent Technologies) により解析した。

免疫染色

ACL P の発現を免疫染色により解析した。画像データを ImageJ ソフトにより解析し、発現量を定量化した。

細胞培養

大腸がん細胞株 (CaCO2, HCT116, RKO, SW48, SW480, SW620, T84) を発現解析、機能解析に用いた。内視鏡的に切除された大腸腫瘍から線維芽細胞を分離、培養した。

ノックダウンと機能解析

siRNA を用いて、ACL P のノックダウンを行った。Cell Counting Kit-9 を用いて Cell viability アッセイを行った。Boyden チャンバーを用いて、遊走アッセイ、浸潤アッセイを行った。また三次元コラーゲンゲル培養を用いて、浸潤能を解析した。

4. 研究成果

大腸がん間質における AEBP1/ACL P 発現上昇の同定

RNA-seq 解析の結果、大腸がん間質において発現上昇する遺伝子候補 18 個を同定した。定量 RT-PCR 解析および免疫染色の結果、がん間質における AEBP1 の発現上昇を確認し、以後主な解析対象とした。AEBP1 には 2 つの転写バリエーションがあるが、がん線維芽細胞を用いた定量 RT-PCR 解析の結果、バリエーション 1 (別名 ACL P) が優位に高発現していることを見出した。一方、大腸がん細胞株はバリエーション 1 を発現しておらず、代わりにバリエーション 2 の発現が認められた。The Cancer Genome Atlas (TCGA) のデータを用いた解析から、大腸がんにおける AEBP1 発現は、ACTA2、FAP、PDGFRB など既知のがん線維芽細胞マーカーと非常に高い正の相関を示した。

ACL P はがん線維芽細胞を活性化させる

臨床検体より樹立したがん線維芽細胞を用いて、siRNA による AEBP1/ACL P のノックダウン実験を行った。定量 RT-PCR およびウエスタンブロットによりノックダウン効果が確認された。AEBP1/ACL P のノックダウンは、がん線維芽細胞の増殖および遊走を抑制することが、cell viability アッセイ、wound healing アッセイから示された。また AEBP1/ACL P のノックダウンは、がん線維芽細胞による細胞外マトリクス再構成能を抑制することが、コラーゲンゲル収縮アッセイから示された。AEBP1/ACL P ノックダウンが、がん線維芽細胞の遺伝子発現プロファイルに与える影響を、マイクロアレイで解析した。マイクロアレイデータを Gene Set Enrichment Analysis で解析した結果、細胞周期関連遺伝子の発現が AEBP1/ACL P ノックダウンにより有意に低下することが示された。これらの結果から、AEBP1/ACL P はがん線維芽細胞の活性化を促すと考えられた。

ACL P はがん細胞の遊走・浸潤・腫瘍形成能を促進する

がん線維芽細胞由来の AEBP1/ACL P が、がん細胞に与える影響を解析するため、Boyden チャ

ンバーを用いた間接共培養実験を行った。がん線維芽細胞の AEBP1/ACLP をノックダウンすることで、がん細胞の遊走能・浸潤能が抑制された。さらに 3 次元コラーゲンゲル浸潤アッセイからも同様の結果が得られた。さらにがん線維芽細胞とがん細胞株をヌードマウスに共移植する xenograft モデルを用いた解析の結果、がん線維芽細胞の AEBP1/ACLP のノックダウンは腫瘍形成能を抑制することが示された。これらの結果から、がん線維芽細胞由来の AEBP1/ACLP は、がん細胞の遊走・浸潤を促進すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shibata Yasuhiro, Ishigami Keisuke, Kazama Tomoe, Kubo Toshiyuki, Yamano Hiro-o, Sugita Shintaro, Murata Masaki, Nakase Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Mediterranean fever gene-associated enterocolitis in an elderly Japanese woman	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1661 ~ 1666
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-021-01497-1	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 Kubo Toshiyuki, Adachi Yasushi, Ishii Yoshifumi, Endo Takao	4. 巻 53
2. 論文標題 Esophageal large cell neuroendocrine carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestive and Liver Disease	6. 最初と最後の頁 502 ~ 503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dld.2020.05.026	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 Adachi Yasushi, Nojima Masanori, Mori Mitsuru, Himori Ryogo, Kubo Toshiyuki, Akutsu Noriyuki, Lin Yingsong, Kurozawa Youichi, Wakai Kenji, Tamakoshi Akiko	4. 巻 30
2. 論文標題 Insulin-Like Growth Factor 2 and Incidence of Liver Cancer in a Nested Case?Control Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention	6. 最初と最後の頁 2130 ~ 2135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1055-9965.EPI-21-0481	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 Sudo Gota, Aoki Hironori, Yamamoto Eiichiro, Takasawa Akira, Niinuma Takeshi, Yoshido Ayano, Kitajima Hiroshi, Yorozu Akira, Kubo Toshiyuki, Harada Taku, Ishiguro Kazuya, Kai Masahiro, Katanuma Akio, Yamano Hiro o, Osanai Makoto, Nakase Hiroshi, Suzuki Hiromu	4. 巻 112
2. 論文標題 Activated macrophages promote invasion by early colorectal cancer via an interleukin 1 serum amyloid A1 axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4151 ~ 4165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15080	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 -

1. 著者名 Yorozu Akira, Yamamoto Eiichiro, Niinuma Takeshi, Tsuyada Akihiro, Maruyama Reo, Kitajima Hiroshi, Numata Yuto, Kai Masahiro, Sudo Gota, Kubo Toshiyuki, Nishidate Toshihiko, Okita Kenji, Takemasa Ichiro, Nakase Hiroshi, Sugai Tamotsu, Takano Kenichi, Suzuki Hiromu	4. 巻 111
2. 論文標題 Upregulation of adipocyte enhancer binding protein 1 in endothelial cells promotes tumor angiogenesis in colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1631 ~ 1644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14360	査読の有無 無
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3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 須藤豪太, 山本英一郎, 青木敬則, 高澤啓, 新沼猛, 久保俊之, 萬頭, 吉戸文乃, 北嶋洋志, 甲斐正広, 小山内誠, 仲瀬裕志, 鈴木拓.
2. 発表標題 活性化マクロファージはIL-1 -SAA1 axisを介して早期大腸がんの浸潤を促進する.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本英一郎, 吉戸文乃, 須藤豪太, 三橋慧, 北嶋洋志, 新沼猛, 甲斐正広, 原田拓, 佐々木基, 久保俊之, 山野泰穂, 仲瀬裕志, 菅井有, 鈴木拓.
2. 発表標題 Helicobacter pylori除菌後胃がんと背景胃粘膜におけるDNAメチローム解析.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新沼猛, 北嶋洋志, 畠中袖衣, 関口翔平, 萬頭, 久保俊之, 佐々木基, 原田拓, 甲斐正広, 仲瀬裕志, 鈴木拓.
2. 発表標題 新規頭頸部癌関連long non-coding RNAの同定と機能解析.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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
研究 分担 者	山本 英一郎 (Yamamoto Eiichiro) (60567915)	札幌医科大学・医学部・訪問研究員 (20101)	

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