

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09108

研究課題名（和文）癌関連線維芽細胞をターゲットとした大腸癌微小環境制御を目指した基礎的研究

研究課題名（英文）Basic research targeting cancer-associated fibroblasts for regulation of colorectal cancer microenvironment

研究代表者

田村 耕一（Tamura, Koichi）

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：70468289

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）：消化器癌検体としてまず大腸癌、そして胃癌の手術検体で解析を開始した。癌種や検体の病期、分化度はもとより、評価する部位や用いる基準・試薬・機器によって検査結果に大きくばらつきがでることが判明したため、評価基準の再検討を行っている。
また癌微小環境に關与するシグナル伝達路としてWntシグナル経路に着目し、胃がん検体を用いてWntシグナル関連タンパクの免疫染色を行ったところ、スキルス胃がんにおいて、 β -catenin高発現が予後不良因子であることが判明した。このことからWntシグナル関連タンパクの異常ががん間質を形成する線維芽細胞の増加を介してがんの悪性度に影響している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Wntシグナル関連タンパクの異常ががん間質を形成する線維芽細胞の増加を介してがんの悪性度に影響している可能性が示唆されたことから、この結果を踏まえて大腸癌検体でもWntシグナル関連タンパクの免疫染色を行ったところ発現程度に違いがあることを認めている。今後CAFとの関連を評価することでがん間質に関連した新規病態が解明され、間質をターゲットとした薬剤と既存抗癌剤との新規ハイブリッド癌治療開発へと繋がるのが期待される。

研究成果の概要（英文）：We began analyzing digestive organ cancer specimens, first colon cancer specimens and then gastric cancer surgical specimens. Since it was found that the test results varied greatly depending on the site of evaluation, the criteria, reagents, and instruments used, as well as the cancer type, stage, and degree of differentiation of the specimens, the evaluation criteria are being reexamined.
In addition, focusing on the Wnt signaling pathway as a signaling pathway involved in the cancer microenvironment, immunostaining of Wnt signaling-related proteins using gastric cancer specimens revealed that high β -catenin expression is a poor prognostic factor in Scirrhou gastric cancer. This suggests that abnormalities in Wnt signaling-related proteins may affect the malignant potential of cancer via an increase in the number of fibroblasts forming cancer stroma.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 癌関連線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

われわれはこれまでに、大腸癌腫瘍先進部における分化あるいは脱分化した癌細胞巢が存在していることに着目し、浸潤・転移や予後と相関していることを明らかにした。近年、癌先進部の微小環境では癌細胞のみならず、線維芽細胞、血管内皮細胞、免疫細胞など多数の間質細胞が存在し、癌の進展に関与することが注目されている。消化器癌においても、癌先進部の間質に癌関連線維芽細胞(CAFs)が存在し、予後との関連などは報告されているが、不明な点が多い。癌微小環境内の主要素である線維芽細胞に関しては、間質由来のみならず、骨髄由来または血管外膜由来の割合の把握することで、浸潤・転移や血管新生を調節し得る可能性を秘めている。本研究によって基礎的臨床的検討を完遂することで、癌関連線維芽細胞をターゲットとした消化器癌腫瘍先進部の微小環境における浸潤や転移の更なるメカニズムの解明をこれまでの研究成果である癌細胞巢との相互作用をふまえて検討することを目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、当教室で手術を行った大腸癌手術標本検体より抽出した線維芽細胞(腫瘍部及び非腫瘍部)をマウス xenograft model に皮下移植し、腫瘍の増殖能や血管新生能の検討を行う。さらに GFP でラベリングしたマウス骨髄細胞を NOD/SCID マウスに移植し、腫瘍内の線維芽細胞における間質由来/骨髄細胞由来の割合と悪性度の検討を行う。大腸癌に関して CAFs の癌細胞と間質の interaction の解明を目的として、様々な由来から誘導された CAFs を臨床検体とマウスモデルを用いて抽出・検討することは初めての試みである。CAFs の癌細胞転移の初期にみられる誘導・活性化と癌微小環境の再構築時にみられる変化には違いがあると考え、間質変化のメカニズムを解明し、間質をターゲットとした薬剤と既存抗癌剤との新規ハイブリッド癌治療開発へと繋がることを期待される。

3. 研究の方法

(1)大腸癌組織、正常組織における CAFs の活性度の評価

本研究の目的および内容を説明し、同意を得た大腸癌手術患者 200 例を対象とする。薄切標本から HE 染色により大腸癌浸潤先進部における HS と budding の評価とともに CAFs の活性を示す desmoplastic reaction の評価(図 1)を行い、臨床病理学的因子を確認する(8)。線維芽細胞マーカーである α -SMA, Collagen type I, Vimentin について免疫組織化学染色を施行し、CAFs での発現強度を確認する。全て臨床病理学的因子との相関の検討を行う。

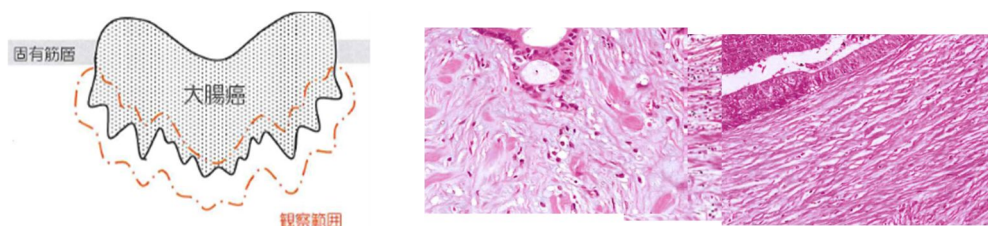


図 1 癌浸潤先進部での desmoplastic reaction の評価

(2)大腸癌組織、正常組織から線維芽細胞の抽出

大腸癌摘出直後に腫瘍組織先進部と、対照として正常組織を採取する。採取した組織は 10% fetal calf serum (FCS) を追加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 内で Collagenase type I と hyaluronidase 含有下, 37℃, 18 時間分離, 培養する。分離した組織を 5 分間攪拌させ、線維芽細胞を含む上清を遠心分離後に沈殿物を再培養し、5 回以上細胞の population doubling を繰り返して安定化させた線維芽細胞を実験に供することとする。

(3)in vitro における CAFs と正常組織線維芽細胞の違いに関する検討

大腸癌培養細胞株 HT29 (ATCC HTB-38), LS174T (ATCC CL188), HCT116 (ATCC CCL247) を使用する。各培養細胞と上記で単離した CAFs または正常組織内線維芽細胞を 1:3 の割合で 10% FCS 含有 DMEM 内で培養する。続いて(1) MTT assay を施行し、増殖能の検討、(2) 24 well plate 内で Wound healing assay を施行し、浸潤能の検討、(3) 培養上清にて TGF- β , α 2-integrin, VEGF について ELISA を施行し、増殖や血管新生関連サイトカインの検討を行う。

(4)骨髄細胞由来 CAFs のヒト大腸癌組織での存在に関する検討

大腸癌摘出標本内の腫瘍責任血管内血液を採取し、比重遠心法にて単核球を採取、20% FCS 下で培養し、CAFs の増殖の有無を確認する。対照として健康人末梢血と同様に培養する。

(5) マウス xenograft model を用いた in vivo での検討

マウス xenograft model の作成：CAFs として摘出腫瘍先進部由来線維芽細胞と対照として正常組織由来線維芽細胞を用いる。各培養細胞 1×10^6 個と各線維芽細胞 3×10^6 個を混ぜ、NOD/SCID マウスに皮下移植し、マウス xenograft model を作製する。皮下移植から 4 週間後の腫瘍径と重量を計測し、desmoplastic reaction については病理組織学的に評価する。

骨髄細胞由来 CAFs の増殖・浸潤能への影響に関する検討：Green Fluorescent Protein (GFP) トランスジェニックマウスの骨髄細胞を上記で作製した xenograft model へ移植し、腫瘍皮下移植を行った 2 週間および 4 週間後に増殖した腫瘍を摘出し、腫瘍径と重量を測定し、さらに免疫組織化学染色を含め、病理組織学的に検討する(図 2)。

線維芽細胞による腫瘍増殖能、浸潤能に関する検討：採取した腫瘍組織をパラフィン包埋後に薄切切片を作製し、大腸癌手術摘出標本と同様に免疫組織化学染色を施行した後、腫瘍間質の病理組織学的評価を行う。

ヒト骨髄細胞由来 CAFs の担癌 NOD/SCID マウス腫瘍間質への影響に関する検討：ヒト大腸癌腫瘍責任血管内採血より培養した単核球を Carboxyfluorescein succinyl ester (CFSE) でラベリングし、上記 xenograft model 内に心注し、CFSE ラベリングされた CAFs の存在を評価する。

CAFs におけるその起源と悪性度に関する総合検討：活性化した線維芽細胞とされる筋線維芽細胞のみならず、骨髄細胞由来の線維芽細胞が大腸癌 CAFs においても重要な役割を果たすとの仮定のもと、 α -SMA, Collagen type I, Vimentin, CD31, CD34 について免疫組織化学染色または flow cytometry にて評価し、その誘導能と浸潤・転移との相関を検討する。

CAFs と血管新生に関する検討：切除不能進行大腸癌の化学療法において抗 EGFR 阻害剤はキードラッグであり、CAFs と活性化された IL-6 または腫瘍内血管増殖には末梢血中の Endothelial progenitor cell (EPC) が関与することから、摘出腫瘍から flow cytometry にて CD31+ EPC, IL-6 の割合を評価し、CAFs と EPC の相互作用について検討を行う。

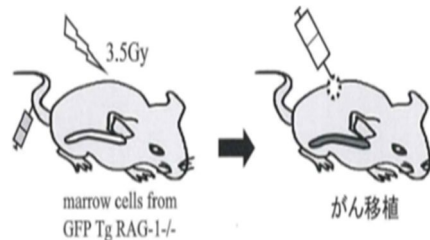


図 2 GFP tag マウスの骨髄細胞を SCID マウスに移植

4. 研究成果

消化器癌検体としてまず大腸癌、そして胃癌の手術検体で解析を開始した。癌種や検体の病期、分化度はもとより、評価する部位や用いる基準・試薬・機器によって検査結果に大きくばらつきがでることが判明した。評価基準の再検討を行っており、現在はスキルス胃癌の検討を先行して研究継続中である。

癌微小環境に関与するシグナル伝達経路として Wnt シグナル経路があり、多くの癌腫において Wnt シグナル経路の異常が報告されている。特に胃がんの中でもスキルス胃がんは著明な線維性組織の増生を伴って急速広範に増殖する特徴を持ち、がん細胞を取り巻く間質の影響の関与が大きいと考えられている。このスキルス胃がんにおいて CAFs の異常増殖による高度な線維化が生じると報告されており CAFs の関与がより高いものと考えられたが、Wnt シグナル経路の異常については不明な点も多く、このメカニズム解明のため胃がんにおける Wnt シグナル関連タンパクの発現について検討を行った。胃がん手術検体を用いて Wnt シグナル関連タンパクである APC, β -catenin, Axin2, GSK-3 の免疫染色を行い、その発現程度と臨床病理学的因子の関連を評価したところ、スキルス胃がんにおいて β -catenin 高発現群は予後不良であったが(5 年全生存率: β -catenin high 群 12.0%, β -catenin low 群 46.9%; $p=0.0001$)、一方で非スキルス胃がんでは予後に関与しない(5 年全生存率: β -catenin high 群 77.7%, β -catenin low 群 77.4%; $p=0.9253$)ことが判明し(図 3)、このことから Wnt シグナル関連タンパクの異常ががん間質を形成する線維芽細胞の増加を介してがんの悪性度に影響している可能性が示唆された。

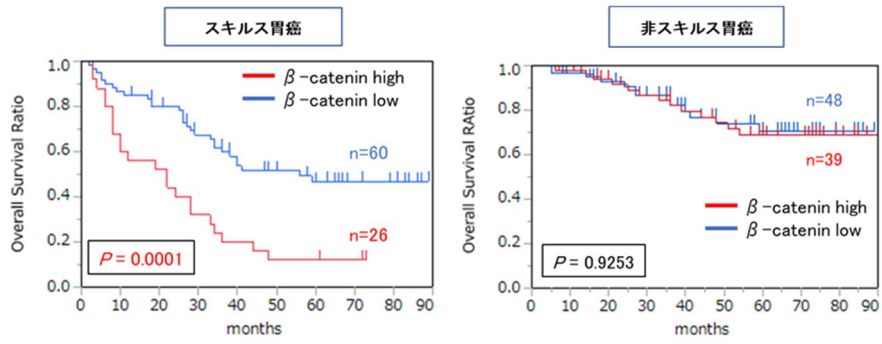


図3 スキルス胃癌および非スキルス胃癌における Kaplan-Meier 曲線

この結果をふまえて、大腸癌検体でも Wnt シグナル関連タンパクの免疫染色を行ったところ発現程度に違いがあることを認めており、CAF との関連を評価することで、新規の病態解明を模索している。

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
研究分担者	田宮 雅人 (Tamiya Masato) (10816698)	和歌山県立医科大学・医学部・学内助教 (24701)	
研究分担者	山上 裕機 (Yamaue Hiroki) (20191190)	和歌山県立医科大学・医学部・学長特命教員(特別顧問) (24701)	

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