

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22796

研究課題名(和文)大腸腫瘍の発育進展過程における周囲間質の線維芽細胞の役割

研究課題名(英文)The role of fibroblasts in the progression of colorectal tumor

研究代表者

下山 雄丞(Shimoyama, Yusuke)

東北大学・大学病院・非常勤講師

研究者番号：50888518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸の良性ポリープである腺腫が大腸癌に進行する中で、腺腫の周りに存在する線維芽細胞と呼ばれる細胞とどのように影響しあって進行していくのかを検討した。細胞と細胞の間を埋めて分子の一種が腫瘍とお互いに作用し合い、良性の病変が進展していく可能性が考えられた。この過程には他にも免疫細胞なども関与している可能性が考えられ、今後そのような要因を含めた検討を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

良性の大腸ポリープがどのように大腸癌に進行していくのかについて、ポリープ周囲に存在する間質と呼ばれる構造とどのように作用し合っているのかを検討し、その過程において何らかの役割を果たしている可能性のある分子を見出した。

大腸癌の内視鏡治療は進歩しているが、早期癌で内視鏡治療を受けるも、癌がやや深く進展している場合には追加で手術することもあり、体にとって負担になり得る。その判断にあたっては、様々な要素を勘案してになるが、今回の分子がその判断ツールの一助となり、不要な追加外科手術を回避することに有用な要素となる可能性があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In general, benign colorectal tumor(adenoma) progresses to malignant colorectal tumor(carcinoma). Nevertheless, how colorectal tumor interacts between fibroblasts around it. Therefore, we studied the interaction of tumor and fibroblasts and revealed that a molecule in the interstitium affects the tumor progression.

研究分野：下部消化管

キーワード：大腸腺腫 線維芽細胞 癌関連線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍周囲の間質には線維芽細胞、炎症細胞、内皮細胞などが含まれており、腫瘍の微小環境を形成している。その中で、cancer associated fibroblast(CAF)は腫瘍周囲間質における主要な構成成分と考えられ、腫瘍の増殖・浸潤・転移などに関与しているとされている。多くの報告においてCAFは腫瘍の発育・進展過程において促進的な役割を演じていることが示されているが、その一方でCAFが腫瘍に対して抑制的に機能するという事も少なからず報告されている。無論、それぞれの癌種による差異もあると思われるが、CAFの役割について一定の見解は未だにない。

そこで、我々は腫瘍の発生初期の「良性腫瘍」という段階では、腫瘍周囲の微小環境は生体の恒常性を維持するため抗腫瘍的に機能するが、腫瘍が「悪性」に進展する中で自らの生存に有利になるように周囲の微小環境を改変していくのではないかと考えた。

すなわち、大腸癌に着目すると「良性腺腫の段階において周囲間質の線維芽細胞は抗腫瘍的に機能するが、腫瘍が進展していく中で線維芽細胞がCAFsとして機能するようになり、腫瘍の進展を促進させるのではないか」という仮説をたてた。

2. 研究の目的

膀胱癌においては腫瘍から由来するエクソソーム(内部にタンパク質や核酸などを含んだ小胞顆粒で、細胞間伝達機構として注目されている)に含まれるTGF β が線維芽細胞からCAFへの分化・活性化に関わっていると報告されている(Mol Cancer Res.2018 Jul;16(7))が、大腸癌についての報告は未だみられない。そこで、大腸腫瘍において線維芽細胞がCAFとして機能するメカニズムの解明を本研究の目的とする。それにより新たな大腸癌の治療ターゲットが生まれる可能性が期待できると考えられる。

3. 研究の方法

1)大腸腺腫・大腸癌オルガノイドと線維芽細胞・CAFsとの共培養

所属する研究グループにおいて、内視鏡的もしくは外科的に切除された早期大腸癌(T1,N0,M0まで)・進行大腸癌オルガノイドの長期培養株が既に樹立されている。それに加え、今後CAFsおよび正常大腸上皮からの線維芽細胞を樹立する予定である。まずはCAFで既知のマーカーとされる α -SMA、FAP、PDGFRなどの発現をRT-PCR法により確認する。大腸腺腫・早期大腸癌・進行大腸癌それぞれのオルガノイドを線維芽細胞およびCAFsと共培養し増殖能の変化を調べる。

生体内における腫瘍の増殖の差異を確認すべく、免疫不全マウス(NOGマウス)を用いた異種移植を行う。樹立した大腸癌オルガノイドをGFPで標識し、線維芽細胞またはCAFsと共にNOGマウスの皮下に移植、また、脾臓からオルガノイド+線維芽細胞またはCAFsを注入し、肝転移モデルを作成する。皮下移植モデルでは腫瘍径の評価ならびに α -SMAの免疫染色を行ってCAFsがどのように分布しているのかを確認し、肝転移モデルでは形成された転移巣数・それぞれの径を評価する。

2)線維芽細胞・CAFsの遺伝子発現の変動、エクソソーム回収

線維芽細胞および CAFs から RNA を抽出し、マイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現プロファイルと比較する。また、それぞれの培養液の上清からエクソソームを回収し、超遠心法で抽出する。エクソソームの形態を電子顕微鏡で観察し、含まれる RNA・タンパクの精製を行いマイクロアレイ、プロテオソーム解析を行う。以上の結果より CAF で発現している遺伝子の絞込みを行う。

3)患者予後との相関性の検証

2)で絞り込みを行った遺伝子において、その受容体が大腸腫瘍に発現しているか確認する。大腸腫瘍でもその受容体が発現していれば、各オルガノイドでの発現量と、そのオルガノイドを作成した患者との予後に差がないか Kaplan-Meier 法で解析する。

4 . 研究成果

大腸腺腫または大腸癌のオルガノイドと、CAFs または線維芽細胞との共培養系の確立を行った。腺腫オルガノイド+線維芽細胞と大腸癌オルガノイド+線維芽細胞の共培養系を比較すると、腺腫+線維芽細胞で共培養を行った場合に腺腫オルガノイドの増大傾向を認めた。何らかの液性因子が関与していると考え、腺腫オルガノイド+線維芽細胞と大腸癌オルガノイド+線維芽細胞の2群の共培養間でマイクロアレイによる遺伝子発現の変動を検討したところ、腺腫オルガノイド+線維芽細胞の共培養系で Wnt シグナル系の発現亢進が確認された。また、細胞外マトリックス分子であるペリオスチンの発現亢進も認められ、腺腫から大腸癌へ発育進展するにあたり細胞外マトリックスとの相互作用が重要な役割を果たしている可能性が示唆され、患者検体での免疫染色を行うも、ペリオスチンの発現にはばらつきがあり、予後や病期との相関性は確認されなかった。腫瘍微小環境を構成する要素としては、線維芽細胞の他に免疫細胞も重要な役割を果たすものと考えられる。本検討のモデルはあくまで部分的な要素での生体内モデルの再現にとどまるものであり、他に免疫細胞の関与についての検討も組み合わせるのが重要であると考えた。CAFs 以外にも、腫瘍関連マクロファージが腫瘍の発育進展に関与しているとの報告もあり、現在大腸腫瘍オルガノイド+線維芽細胞+マクロファージの共培養系の確立について検討を進めている。

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

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