

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02931

研究課題名（和文）薬物療法後のがん細胞再増殖を規定するがん微小環境の研究

研究課題名（英文）Study of cancer-associated fibroblasts in tumor re-progression after chemotherapy

研究代表者

石井 源一郎（Genichiro, Ishii）

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・科長

研究者番号：00270869

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は薬物療法後の微小環境に着目し、がん細胞の再増殖・再進展を規定する分子機構の解明を目的としている。シスプラチン耐性A549、CAFsを独自に作製し、RNAseqを実施した。その結果、Ligand XはナイーブCAFsと比較してシスプラチン耐性CAFsでは9.9倍発現が上昇していた。すなわち、抗がん剤未投与状態では存在しないがん細胞とCAFsの相互作用が新たに生じている可能性が考えられた。今後は、シスプラチン耐性がん細胞の増殖、浸潤、足場非依存性生存、増殖に、シスプラチン耐性CAFsが関与しているかを各種バイオアッセイを用いて検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤投与により変化するがん微小環境の生物学的特性に関する報告は、世界的に皆無である。また、1) 薬剤耐性CAFsの概念、2) 再増殖に関わるがん細胞とCAFsの相互作用、に関わる研究は、治療法の開発、バイオマーカーの探索にも繋がり発展性が高い。さらには、本研究の成果により、難治がんの治療標的とされるのは、がん細胞のみならず CAFsあるいはCAFsが産生する細胞外マトリックスである可能性が生じる。すなわち、難治がんの薬物治療に対するパラダイムシフトも起こる。

研究成果の概要（英文）：This study aims to elucidate the molecular mechanisms that govern cancer cell re-progression within drug-resistant tumor microenvironment. Cisplatin-resistant A549 and CAFs were independently generated and RNAseq was performed. The results showed that Ligand X was upregulated 9.9-fold in cisplatin-resistant CAFs compared to cisplatin-sensitive CAFs. In other words, it is possible that there is a new interaction between cancer cells and CAFs, which does not exist in the untreated state of anticancer drugs.

In the future, we will investigate whether cisplatin-resistant CAFs are involved in the proliferation, invasion, and anchorage-independent survival and growth of cisplatin-resistant cancer cells using various bioassays.

研究分野：病理学

キーワード：がん微小環境 がん関連線維芽細胞 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺がんに対する殺細胞性抗がん剤の効果は限定的である。大半の症例では投与後もがん細胞の一部は残存し、再増殖（再発）をきたす。申請者は、非がん細胞が形成する微小環境は、薬物感受性を規定することを示してきた。抗がん剤は、がん細胞のみならず非がん細胞にも細胞死を誘導するが、一部の細胞は残存・再増殖する。従って、抗がん剤投与後のがん組織は、再増殖する非がん細胞とがん細胞から構成されており、投与前の微小環境とは全く異なっている。そして“がんの再増殖”を規定するのは、“薬物投与後”の微小環境である。申請者の病理学的検討より、抗がん剤投与後に手術された症例では、多数の CAFs が“残存がん細胞”周囲に存在していることが判明している。すなわち、抗がん剤未投与状態（naïve な微小環境）では存在しない“がん細胞と CAFs”の相互作用が新たに生じ、がん細胞の再増殖に寄与している可能性を考えた。

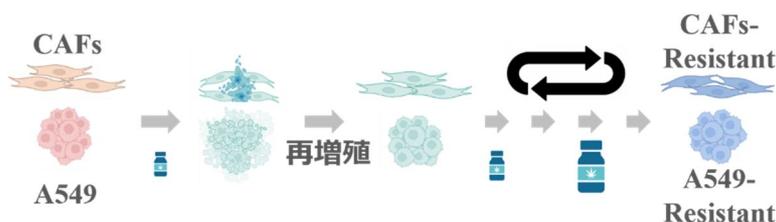
2. 研究の目的

以上を踏まえて本研究では、殺細胞性抗がん剤投与後の非がん細胞が形成する特殊な微小環境を解析し、革新的な肺がん薬物療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究は“薬物療法後の微小環境”に着目し、がん細胞の再増殖・再進展を規定する分子機構の解明を目的としている。期間内に行った研究の方法について列挙する。

- (1) がん細胞株と CAFs を含んだハイブリッドオルガノイドを (Nomura K et al. Cancer Sci. 2021)用いて、シスプラチン耐性ハイブリッドオルガノイド作製を試みた。
- (2) がん細胞、CAFs 別々にシスプラチン耐性株の作製を試みた。低濃度暴露から始め、最終的には 5uM のシスプラチン下にて生存するがん細胞株 (A549 肺腺癌細胞株) および CAFs 細胞株 (肺腺癌組織より培養) の樹立を試みた (下図)。



- (3) A549、CAFs、それぞれでシスプラチン耐性株・シスプラチン非耐性株の RNAseq を実施し、発現遺伝子の比較解析を行った。
- (4) A549、CAFs のシスプラチン耐性株・シスプラチン非耐性株を用いて、我々のラボで独自に開発した collagen invasion assay により、薬剤非耐性微小環境・薬剤耐性微小環境での浸潤能の比較を行った。

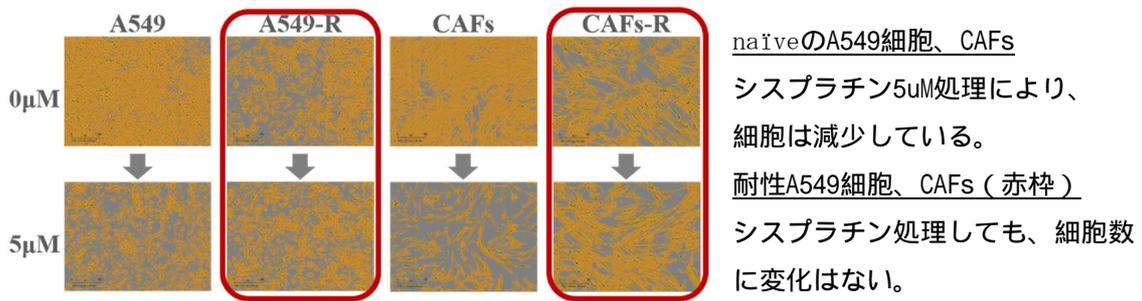
4. 研究成果

(1) ハイブリッドオルガノイドを用いた検討

ハイブリッドオルガノイドの作製には成功したが、シスプラチン free の状態にても、がん細胞の viability を保ったままでの長期培養が困難であった。(ハイブリッドオルガノイドの HE 標本を作製して確認した結果、中心部では大半の腫瘍細胞が壊死に陥っていた。)

(2) シスプラチン耐性株の作製

シスプラチン耐性株の写真を下図に示す。



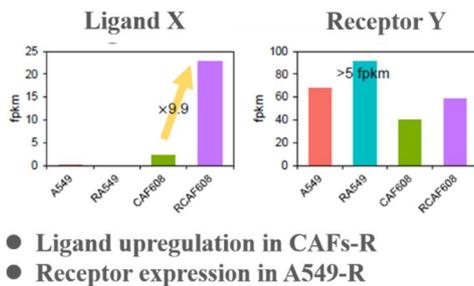
以上から、シスプラチン耐性の癌細胞およびCAFsの作製に成功した(同一の手法)。

(3) RNAseqの結果

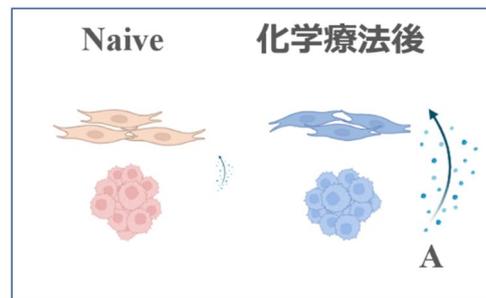
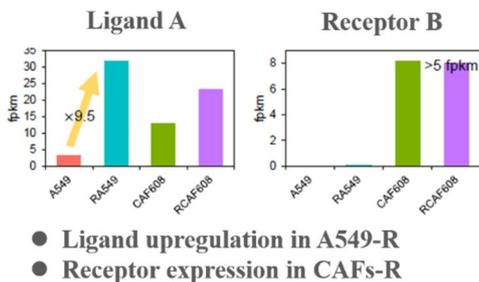
A549に関しては、耐性株でTNF応答遺伝子、炎症応答遺伝子の発現が増加していた。CAFsに関しては、耐性株で形態形成や細胞増殖の負の制御に関する遺伝子の発現の増加していた。

薬剤耐性CAFsは、naiveの細胞と比較して増殖が遅いことが判明していたため、上記の結果は reasonableであった。

次に、RNAseqの結果を基に、シスプラチン耐性A549とシスプラチン耐性CAFsの予想される相互作用を解析した。その結果、Ligand X (公表ができないため "X" と記す) は、naive CAFsと比較してシスプラチン耐性CAFsでは9.9倍発現が上昇していた。一方ligand Xの受容体Yは、naive A549、シスプラチン耐性A549共に一定量発現していた(下図参照)。



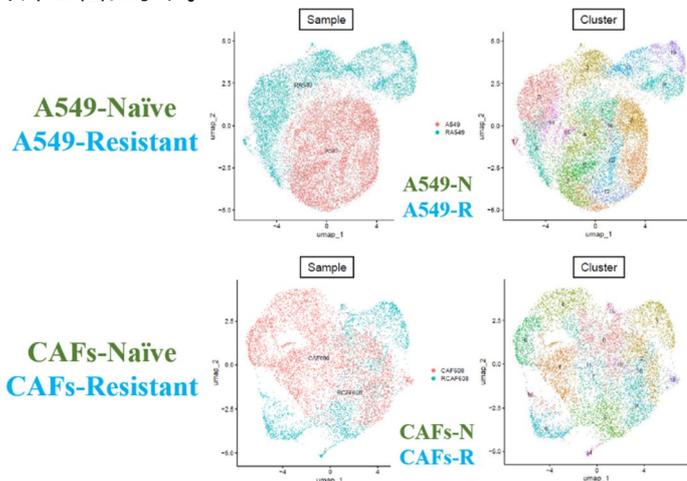
一方、Ligand A (公表ができないため "A" と記す) は、naive A549と比較してシスプラチン耐性A549では9.5倍発現が上昇していた。ligand Aの受容体Bは、naive CAFs、シスプラチン耐性CAFs共に一定量発現していた(下図参照)。



以上の結果からは、抗がん剤未投与状態では存在しない“がん細胞とCAFs”の相互作用が新たに生じ、がん細胞の再増殖に寄与している可能性が考えられた。

(4) Single cell RNAseqの結果

各細胞株のクラスター分類、クラスターにenrichされている遺伝子群の同定を行った。結果を以下の図に示す。



左上は、NaïveなA549とシスプラチン耐性A549の各単細胞の分布を示したものである。

左下は、NaïveなCAFsとシスプラチン耐性CAFsの各単細胞の分布を示したものである。

右上、右下は、それぞれの細胞株のクラスター分類を行ったものである。詳細は現在解析中である。

(5) naïveな微小環境・薬剤耐性微小環境での浸潤能の比較

A549とCAFsをシスプラチン耐性株同士、シスプラチン非耐性株同士で共培養し、我々が独自に開発したcollagen invasion assay (Int J Cancer, 2015) により、薬剤非耐性微小環境・薬剤耐性微小環境での浸潤能の比較を行った。結果、CAFs に関しては、耐性株の方が非耐性株よりwound 内への浸潤速度が遅かった。また、wound 内に浸潤した薬剤耐性がん細胞数は、非耐性のがん細胞数より有意に少数であった。以上の結果より、naïveな微小環境内と比較して、薬剤耐性微小環境内では、シスプラチン耐性CAFsは耐性A549の浸潤亢進には寄与しない可能性が示唆された。

癌細胞の転移は、増殖、局所浸潤、血流（またはリンパ流）内における足場非依存性の生存・増殖、血管外への遊走、局所臓器における生着の過程を経る。今後の検討課題としては、

- 1) 薬剤耐性微小環境内では、シスプラチン耐性CAFsは耐性A549の増殖能亢進に寄与するか？
- 2) 薬剤耐性微小環境内では、シスプラチン耐性CAFsは耐性A549の足場非依存性の生存・増殖に寄与するか？である。

また、これらの過程に、上述した新たな分子間相互作用が関連しているかどうかを検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki Jun、Tsuboi Masahiro、Ishii Genichiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Cancer-associated fibroblasts and the tumor microenvironment in non-small cell lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Expert Review of Anticancer Therapy	6. 最初と最後の頁 169 ~ 182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14737140.2022.2019018	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 Nomura Kotaro, Nakai Tokiko, Nishina Yukino, Sakamoto Naoya, Miyoshi Tomohiro, Tane Kenta, Samejima Joji, Aokage Keiju, Kojima Motohiro, Sakashita Shingo, Taki Tetsuro, Miyazaki Saori, Watanabe Reiko, Suzuki Kenji, Tsuboi Masahiro, Ishii Genichiro	4. 巻 113
2. 論文標題 18F fluorodeoxyglucose uptake in PET is associated with the tumor microenvironment in metastatic lymph nodes and prognosis in N2 lung adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1488 ~ 1496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15266	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 Eguchi Yuki, Nakai Tokiko, Kojima Motohiro, Wakabayashi Masashi, Sakamoto Naoya, Sakashita Shingo, Miyazaki Saori, Taki Tetsuro, Watanabe Reiko, Watanuki Rurina, Yamauchi Chisako, Iwatani Tsuguo, Mukohara Toru, Onishi Tatsuya, Ishii Genichiro	4. 巻 113
2. 論文標題 Pathologic method for extracting good prognosis group in triple negative breast cancer after neoadjuvant chemotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1507 ~ 1518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15273	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 Masahiro, Aoyama Naoki, Kojima Motohiro, Sakamoto Naoya, Miyazaki Saori, Taki Tetsuro, Watanabe Reiko, Matsuura Kazuto, Kotani Daisuke, Kojima Takashi, Fujita Takeo, Tabuchi Keiji, Ishii Genichiro, Sakashita Shingo	4. 巻 -
2. 論文標題 The area of residual tumor predicts esophageal squamous cell carcinoma prognosis following neoadjuvant chemotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00432-022-04366-7	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 Kondo Ryotaro, Sakamoto Naoya, Harada Kenji, Hashimoto Hiroko, Morisue Ryo, Yanagihara Kazuyoshi, Kinoshita Takahiro, Kojima Motohiro, Ishii Genichiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Cancer-associated fibroblast-dependent and -independent invasion of gastric cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-022-04484-2	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 Hoshino H, Aokage K, Miyoshi T, Tane K, Kojima M, Sugano M, Kuwata T, Ochiai A, Suzuki K, Tsuboi M, Ishii G.	4. 巻 8
2. 論文標題 Correlation between the number of viable tumor cells and immune cells in the tumor microenvironment in non-small cell lung cancer after induction therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathol Int .	6. 最初と最後の頁 512-520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13110	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	中井 登紀子 (Nakai Tokiko) (00619538)	国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・医員 (82606)	

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