

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08693

研究課題名（和文）癌微小環境由来の食道癌転移抑制シグナル制御機構の解明による治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of signaling regulation in the cancer microenvironment that suppresses esophageal cancer metastasis and its application to treatment

研究代表者

橋本 貴史（takashi, hashimoto）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：20407307

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）：手術により摘出された食道癌より線維芽細胞の樹立を試みた。51例中43例において、癌部よりCAFs、非癌部より対照線維芽細胞の樹立に成功した。上皮細胞、間葉系細胞や血球系細胞に特異的な抗体を使用した免疫組織染色を施行し純度の高い線維芽細胞が樹立が確認された。また、RNA-sequencingにより非癌部由来の対照線維芽細胞と比較して、CAFsにおいて有意に発現が亢進している遺伝子が複数同定された。さらに食道癌癌部よりオルガノイドの樹立を試み10例で成功した。2、3例のオルガノイドを高度免疫不全マウスに移植し癌の形成能を検討したが、癌増殖が非常に遅く、移植後2カ月以内に癌を形成することはなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌死亡の90%は転移に起因し、食道癌の転移・再発は原発巣の外科的な切除後2年以内に多発する。その理由として申請者は、原発巣が未知の転移抑制シグナルで転移巣増殖を制御しており、原発巣切除の結果、抑制シグナル消失・転移発症を促進するという仮説を立てた。このとき、その証明の鍵要素として、高転移性癌で癌間質を主に構成している線維芽細胞「CAF: carcinoma-associated fibroblasts」に申請者は着目し研究を進めている。本研究が成功した場合は、癌発巣由来の転移形成抑制シグナルが同定され、転移抑制剤の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We attempted to establish fibroblasts from esophageal cancers removed by surgery. In 43 of 51 cases, we succeeded in establishing CAFs from cancerous areas and control fibroblasts from non-cancerous areas. Immunohistochemical staining using antibodies specific to epithelial cells, mesenchymal cells, and blood cells confirmed the establishment of highly pure fibroblasts. In addition, RNA-sequencing identified multiple genes whose expression was significantly increased in CAFs compared to control fibroblasts derived from non-cancerous areas. We also attempted to establish organoids from esophageal cancer areas and succeeded in 10 cases. Two or three organoids were transplanted into highly immunodeficient mice to examine their ability to form cancer, but the cancer growth was very slow and no cancer was formed within two months after transplantation.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：食道癌 転移・再発 CAFs 原発巣 転移抑制シグナル

1. 研究開始当初の背景

癌は全身に影響を及ぼす疾患として考えられている。近年、原発巣が産生する増殖因子、サイトカインやエクソゾームが遠隔臓器に作用し、転移した癌細胞が生着し増殖し易い環境(niche)を形成することが複数の動物モデルを使用した実験により示唆されている(McAllister SS, et al., Nat. Cell Biol.,16, 717-27, 2014)。これらの知見は、原発巣由来の癌細胞が転移促進 niche を形成し、癌細胞の遠隔転移を促進する作用があることを示唆している。

一方、従来より乳癌や大腸癌などの原発巣切除後に、遠隔転移の増悪がみられることが臨床的に観察されてきた (Sugarbaker E., et al., New York: Raven Press, pp. 227-240, 1977)。また、Judah Folkman のグループは、ヒト肺癌細胞株をマウスに皮下移植し、その3日後に原発巣を切除し、13-21 日後に肺転移の大きさを観察した。結果として、原発巣を切除しなかった群と比較して、原発巣が切除された群において肺転移が10倍程度増大していた (O'Reilly M., et al., Cell, 79, 315-328, 1994)。さらに原発巣由来転移抑制因子として、血管新生抑制因子である angiostatin が肺実質の血管新生を抑制し、肺転移を抑制していることが明らかにされた。

現在まで上記のように原発巣が転移巣の増殖を促進あるいは抑制する両方の可能性を示唆する論文が混在している。このことから、申請者は転移抑制シグナルが産生されるか否かは、原発巣の性質に依存している可能性に着目した。研究分担者らの先行研究より、癌微小環境に多数存在する CAFs が癌浸潤・転移能をさずけることを見出している。以上のことから、申請者は原発巣由来食道癌細胞は、転移巣増殖抑制シグナルを産生し遠隔臓器での転移増殖を抑制しているが、CAFs が豊富に存在する原発巣では、転移増殖抑制シグナルの産生が抑制され、転移が促進すると推測している。

2. 研究の目的

癌死亡の90%は転移に起因しているが、転移のメカニズムは未だ明らかでない。食道癌の転移・再発は、原発巣の外科的な切除後2年以内に生じることが多い。このことから申請者は、原発巣は何らかの転移抑制シグナルを産生し転移巣の増殖を制御しているが、原発巣の切除によりその抑制シグナルが消失することで転移の発症が促進される可能性を想像している。また、高転移性癌では、癌間質の主な構成細胞である線維芽細胞(carcinoma-associated fibroblasts: CAFs) がこの原発巣由来の転移抑制シグナルを阻害することにより、結果として転移を促進していることが予測される。研究分担者らは、患者大腸癌を模倣した patient-derived xenograft (PDX)モデルを樹立し、単一癌細胞よりも上皮系/間葉系の性質を有した癌細胞集団がより顕著に転移を形成することを明らかにした実績がある (Mizukoshi K., Orimo A., et al., International Journal of Cancer, 2020, 146, 2547-2562.)。申請研究では、食道癌におけるPDXモデルを樹立し、このモデルを使用して原発巣由来の転移抑制シグナルを同定し、CAFsによる転移抑制シグナルの阻害機構を解明しさらに前臨床マウスモデルを使用した新規転移抑制治療の基礎を確立することを目標とする。さらに低酸素・低栄養の環境下においてもCAFsと食道癌細胞の相互作用を媒介する遺伝子やシグナルを同定、比較することによりこれらが癌微小環境に及ぼす影響を検討することを目標とする。

3. 研究の方法

本研究では転移性食道癌を抑制する為、(1)食道癌 PDX モデルを樹立し、(2)食道癌原発巣由来の転移抑制シグナルを同定し、(3)CAFsによる転移抑制シグナルの制御機構を解明し、(4)新規の抗転移治療法の基礎を前臨床マウスモデルを用いて確立する。

課題(1) 食道癌原発巣由来の PDX モデルマウスの樹立

研究分担者らは40例の患者大腸癌組織を高度免疫不全マウスに皮下・同所移植し、13症例の継代可能な大腸癌 PDX モデルマウスの樹立に成功している(特許出願:患者原発性大腸癌の個別化転移モデルマウスの作製方法、発明者:小島、折茂他6名、出願番号:2013-193525, 出願日:平成25年9月18日; Mizukoshi K., Orimo A., et al., 2019, International Journal Cancer, 2020, 146, 2547-2562.)。今回、食道癌においても同様に継代可能な食道癌 PDX モデルマウスの樹立を目標とする。

課題(2) 食道癌原発巣由来の転移抑制シグナルの同定

また研究分担者らは既に大腸癌において高感度に微小転移を検出するための新規の実験系を樹立している (Okazawa Y., Orimo A., et al., J. Vis. Exp. 2018, 14;136)。患者由来大腸癌オルガノイドを GFP ウイルスで感染後、免疫不全マウスに同所および門脈より注入し 1 か月後に肝臓や肺に GFP 陽性大腸癌細胞の微小転移が検出された。

申請研究では、患者由来食道癌オルガノイドの培養上清を抽出する。レンチウイルス由来 GFP で食道癌オルガノイド (最も高転移能を有した) をラベルし、免疫不全マウスに同所移植あるいは経門脈的に移植する。抽出されたオルガノイドの培養上清を で作製されたマウスに細胞移植後に経時的に経腹膜的に投与し、30 日後に GFP 陽性転移巣のシグナルを定量する。最初はパイロット実験として、各群 2 匹のマウスを用いる。転移巣の抑制効果がみられた場合は、再現性を確認するために各群 6-8 匹のマウスを使用する。また転移巣の抑制能を評価し、その能力別にグループ分けをする。次に転移抑制作用を示した群、示さなかった群のオルガノイド培養上清を用いてサイトカイン定量抗体アレイを施行し、転移抑制性オルガノイドで高発現している因子を同定する。また、各群のオルガノイドより mRNA および蛋白を抽出し、上記の転移抑制因子の遺伝子発現を検証する。申請者は、高転移能を有した食道癌 PDX 由来オルガノイドと比較して、弱転移能を有したオルガノイドでは、転移抑制因子の発現が亢進していると推測している。

引き続き、有望な上位 3 種類の転移抑制候補因子を高転移能を有したオルガノイドに過剰発現する。また、転移能を持たないオルガノイドにこれらの因子の発現を shRNA を用いて抑制する。これらの遺伝子操作されたオルガノイドをマウスに同所および経門脈的に移植して、転移巣を測定する。

課題(3) CAFs による転移抑制シグナルの制御機構の解明

研究分担者らは、先行研究で患者由来大腸癌オルガノイドと乳癌由来 CAFs の共移植を施行した。非癌部由来線維芽細胞が移植された場合と比較し、CAFs は有意に肝臓や肺への転移を促進した。CAFs 依存性の癌転移メカニズムの解析において、CAFs と癌細胞の癌腫を統一することが重要なため、本研究では、患者食道癌由来 CAFs を樹立して、食道癌オルガノイドと免疫不全マウスに共移植する。申請者は、食道癌オルガノイドのみが移植された場合と比較し、食道癌由来 CAFs と共移植された場合は転移が促進されることを予測している。そして CAFs が課題 2) で同定された転移抑制因子の発現を抑制するか否かを調査するために、CAFs + 食道癌オルガノイド、対照正常線維芽細胞 + 食道癌オルガノイドおよび食道癌オルガノイドのみの同所移植で形成された癌塊より作製した切片を使用し、上記の候補因子の特異的抗体を用いた免疫組織染色を施行する。申請者は、CAFs が食道癌オルガノイドにおける上記の転移抑制因子の発現を抑制することにより転移形成を促進していると推測している。

課題(4) 前臨床マウスモデルを用いた新規食道癌転移抑制療法の確立

原発巣由来転移抑制因子の治療効果を in vivo で検討するために、GFP 陽性食道癌オルガノイドをマウスに同所移植する。その後、課題 2) で転移抑制因子として同定された 3 種類の因子のリコンビナント蛋白を細胞移植後に経時的に経腹膜的に投与し、30 日後に GFP 陽性転移巣のシグナルを定量する。加えて、GFP 陽性食道癌オルガノイドをマウスに経門脈的に注入して作製された実験的肝臓転移モデルにおいても、転移抑制因子のリコンビナント蛋白投与群および非投与群で、GFP シグナルを評価する。リコンビナント蛋白の投与が転移形成を抑制することが予期される。

更にこれらの転移抑制因子が、癌細胞自身に作用し細胞増殖や細胞死を制御するのか、あるいは周囲の血管細胞、炎症免疫細胞や線維芽細胞に作用して、転移促進性ニッチの形成を抑制するのか否かを検討する。各転移抑制因子のリコンビナントタンパク投与群および非投与群において、転移巣の免疫組織染色を、細胞増殖や細胞死のマーカーで染色する。また、血管細胞、炎症免疫細胞や線維芽細胞に対する抗体を用いた染色も施行する。

4. 研究成果

手術により摘出された食道癌より線維芽細胞の樹立を試みた。5 1 例中 4 3 例において、癌部より CAFs、非癌部より対照線維芽細胞の樹立に成功した。上皮細胞、間葉系細胞や血球系細胞に特異的な抗体を使用した免疫組織染色を施行し純度の高い線維芽細胞が樹立が確認された。また、RNA-sequencing により非癌部由来の対照線維芽細胞と比較して、CAFs において有意に発現が亢進している遺伝子が複数同定された。これらの遺伝子の中には癌悪性化や治療抵抗性に関与しているものが含まれていた。

さらに食道癌癌部よりオルガノイドの樹立を試み10例で成功した。2,3例のオルガノイドを高度免疫不全 NOD/Shi-scid, IL-2R KO (NOG) マウスに移植し癌の形成能を検討したが、癌増殖が非常に遅く、移植後2カ月以内に癌を形成することはなかった。

2,3例のオルガノイドは高度免疫不全マウスに癌の形成を確認することはできなかったが、原発巣由来の転移抑制シグナルを同定する為に、研究室で長期培養後に株化された悪性度の高い細胞株は使用せずに、患者由来のオルガノイドを使用した食道癌 PDX モデルを樹立することが重要であると考えている。今後は、移植時のマトリゲル量を50%から100%にすると共に移植する癌細胞数を増やす予定である。加えて移植の為に癌細胞オルガノイドをトリプシン処理するが、なるべく細胞にダメージがないように、トリプシン処理を弱くする。さらに、他のオルガノイドも検討し、6-12か月後に癌の形成が見られた場合は、PDX より癌オルガノイドを樹立し実験に用いることも検討したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ueyama H, Yao T, Hashimoto T (32番目/41人中)	4. 巻 56
2. 論文標題 Gastric epithelial neoplasm of fundic-gland mucosa lineage: proposal for a new classification in association with gastric adenocarcinoma of fundic-gland type	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Gastroenterol	6. 最初と最後の頁 814-828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-021-01813-z.	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野村美咲, 山下和成, 那須元美, 阿部雅明, 佐々木和教, 橋本貴史, 峯 真司, 折茂 彰
2. 発表標題 CAFsは食道癌における術前化学療法抵抗性の獲得に関する
3. 学会等名 第33回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2022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	折茂 彰 (akira orimo) (70275866)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授 (32620)	

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