

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09528

研究課題名（和文）卵巣癌オルガノイドを用いた脂肪細胞によるがん浸潤・転移機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of cancer invasion and metastasis by adipocytes using ovarian cancer organoids

研究代表者

佐々木 浩（HIROSHI, SASAKI）

大阪医科薬科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80432491

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）：肥満はがんの発症だけでなく再発や予後に関連することが知られている。特に内臓型肥満はがんの再発への影響は大きく、そのメカニズムの一つとして脂肪細胞が繊維芽細胞成長因子を大量に産生し、がん周囲環境を変化させ血管新生やがん増殖に作用が近年わかってきた。今回の検討により内臓肥満の患者は非肥満患者に比べて再発が多いことがわかり、そのメカニズムとしての脂肪細胞から分泌される繊維芽細胞成長因子（Fibroblast Growth Factor: FGF）により癌組織の3次元構造や微小環境の変化し、再発転移が増加す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

肥満とがん発症リスクにおける研究は従来から多く行われているが、がんの増殖、浸潤、再発と肥満や内臓脂肪、皮下脂肪との関連に着目した研究は未だ少ない。今回の我々の検討により肥満および脂肪とがんとの関連性の理解を深めたことにより、新たながん進展メカニズム解析および治療戦略が開発できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Obesity is known to be related not only to the onset of cancer but also to recurrence and prognosis. Visceral obesity in particular has a large impact on cancer recurrence, and in recent years it has been discovered that one of the mechanisms is that fat cells produce large amounts of fibroblast growth factor, which changes the environment around the cancer and has an effect on angiogenesis and cancer growth. This study showed that patients with visceral obesity have a higher recurrence rate than non-obese patients, and it was suggested that the mechanism behind this may be that fibroblast growth factor (FGF) secreted from fat cells changes the three-dimensional structure and microenvironment of cancer tissue, increasing recurrence and metastasis.

研究分野：婦人科癌

キーワード：卵巣癌 肥満 オルガノイド

## 1. 研究開始当初の背景

近年、増加傾向である肥満は乳がんや肝臓癌、大腸癌などの発症リスク因子であるだけでなく、がんの増殖、再発にも関連していることがわかってきた。例えば、乳癌におけるメタアナリシスでは BMI が 30 以上の患者は 25 未満の患者に比して再発リスクは 18% 上昇し、死亡リスクも 26% 上昇すると報告されている。さらに肥満の中でも内蔵型肥満はがんのリスクが高く、閉経女性を対象とした 12 年間の前向きコホート研究において、皮下脂肪に対して内臓脂肪が多いと肺癌で 1.68 倍、消化器癌で 1.34 倍はリスクが上昇することがわかった。我々は卵巢癌患者を対象とし内臓型肥満と再発予後の関連を検討したところ皮下脂肪に比して内臓肥満が多い卵巢癌患者では有意に再発率が高く、卵巢癌においても内蔵型肥満は予後関連因子になる可能性が示唆された。肥満におけるがん増殖・浸潤メカニズムとして肥満患者における過剰な脂肪細胞が繊維芽細胞成長因子 (Fibroblast Growth Factor: FGF) を大量に産生し、がん周囲環境を変化させ血管新生やがん増殖に作用することがわかってきた。FGF はその受容体である FGFR に結合すると 2 量体を形成し、さらに FGFR の重要な基質である FGFR substrate 2 (FRS2) がリン酸化されるとその下流にある PI3K 並びに MAPK 経路が活性化され、その結果として細胞増殖・浸潤が誘導される。このような FGF を介した増殖・浸潤メカニズムは白血病や胆嚢癌では報告されているが卵巢癌ではあきらかではない。さらに我々は以前に細胞表面マーカーである CD24 が卵巢癌において独立した予後因子となり、卵巢癌細胞株に CD24 を強制発現させることにより上皮間葉転換 (EMT) 関連蛋白である Snail、Twist が発現し、がんの浸潤・転移が促進されることを報告した。最近、この CD24 陽性卵巢癌が FGF により EMT の誘導が促進されることが報告されたことから、CD24 陽性卵巢癌患者は脂肪細胞から分泌される FGF を介して増殖・転移に関与する可能性がある。一方で、これまで卵巢癌の研究においては、卵巢癌細胞株あるいは患者由来癌組織をマウスに移植して作製した PDX (Patient-Derived Xenograft) がモデルとして使用されてきた。しかしながら、細胞株の培養では 2 次元培養での環境に限られることや樹立された臨床腫瘍の多様性を有していないこと、PDX では 3 次元での培養で癌微小環境は臨床腫瘍と類似しているが、様々な患者検体からの癌組織を探索するには膨大な実験動物が必要となる等の問題があった。そこで本研究ではこれらの諸問題を克服すべく、癌患者組織由来の細胞を *in vitro* で 3 次元培養して様々な肥満患者ごとに作製した卵巢癌オルガノイドを用い、網羅的でスループットの高い研究を行うこととした。

## 2. 研究の目的

卵巢癌は婦人科悪性腫瘍の中でも浸潤・転移を伴うことが多く生存率の最も低い婦人科癌であり進行期症例や再発症例では完治が困難である。我々の臨床研究において内臓肥満患者では卵巢癌の予後が悪いことから、そのメカニズムを解明することにより予後改善に寄与できる可能性がある。そこで、まず脂肪細胞より分泌している FGF が卵巢癌患者の予後と関連しているかを検討する。次に卵巢癌患者の脂肪細胞を分離し、分泌する FGF が卵巢癌細胞株の増殖・浸潤に関与するか *in vitro* にて検討する。さらにこれまでの *in vitro* 研究では困難であった 3 次元構造での検討を行うため卵巢癌オルガノイドを作製し FGF による 3 次元的な組織学的変化について検討する。最後に FGF の受容体阻害薬であるエルダフィチニブを用いて卵巢癌における抗腫瘍効果について検討する。卵巢癌と肥満に関する研究はほとんどなく、またそのメカニズムを検討したものはない。今回の我々の検討により卵巢癌患者における新たな治療戦略が見いだされる可能性がある。

### 3. 研究の方法

倫理委員会の承認のもと患者の同意を得た上で卵巣癌患者血清を採取し ELISA 法にて FGF の発現量を測定する。FGF の発現量と BMI・皮下脂肪・内臓脂肪量について比較検討する。次に FGF の発現と無病生存期間および全生存期間との相関を検討する。さらに卵巣癌組織を CD24 抗体にて免疫染色を行い CD24 陽性卵巣癌患者および陰性患者における FGF 発現量と予後との相関について検討を行った。

次に卵巣癌患者の皮下脂肪および内臓脂肪組織から採取した脂肪細胞を前述方法にて分離培養し上清を回収の上、FGF の発現を ELISA 法にて確認する。recombinant FGF を卵巣癌細胞株に添加しそれぞれの細胞を回収したうえで cell viability を MTS assay および cell count 法にて確認し、つづいてそれぞれの蛋白を抽出し EMT 関連蛋白 (Snail、Slug、E-cadherin) 抗体を用いて Western blotting 法にて解析した。

同意を得た卵巣癌患者より卵巣癌組織の一部を採取し細切し、オルガノイド処理を行い、安定的な 3 次元オルガノイド培養が確認した上で、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片を作製し、手術検体の FFPE 切片とオルガノイド培養組織から採取した FFPE 切片の両者を H&E 染色し、性質が維持・再現されていることを組織学的に確認した。このオルガノイド作製の手法を用いて CD24 陽性および陰性卵巣癌オルガノイドを作製し、control 群、recombinant FGF 添加群におけるがん組織およびがん周囲環境における組織学的変化および EMT 関連蛋白の発現の違いについて免疫組織化学的検索を行った。

2~3 カ月齢のメスヌードマウスに通常食を摂取させた通常マウスと 1~2 カ月間高脂肪食を摂取させその後通常食に変更させた肥満マウスを用いて以下の実験を行った。

通常および肥満マウス血清を採取し ELISA 法にて FGF の発現量を測定 それぞれのヌードマウスに卵巣癌細胞株を移植し腫瘍を形成させ約 4 週間後に腫瘍の重量測定および転移部位の検索、さらに腫瘍パラフィン切片を作製する。EMT 関連蛋白にて免疫染色し、がんの浸潤能の違いの検討をおこなった。

### 4. 研究成果

我々は卵巣癌患者を対象とした肥満と再発の関連を検討した臨床研究において、内臓肥満の患者は非肥満患者に比べて再発が多いことを明らかにした。次に卵巣癌患者血清を採取し ELISA 法にて FGF の発現量を測定する目的で倫理委員会に申請を行い、検体採取を行ったところ FGF の発現量と BMI・皮下脂肪・内臓脂肪量についての関連について示唆された。また卵巣癌患者より皮下脂肪および内臓脂肪 (大網) 組織をコラゲナーゼ処理し遠心分離し、脂肪前駆細胞を単離した上で卵巣がん細胞株と共培養し、増殖能や細胞接着因子などの検討を行っており、現在最終解析中である。次に 2~3 カ月齢のメスヌードマウスに通常食を摂取させた通常マウスと 2 カ月間高脂肪食を摂取させその後通常食に変更させた肥満マウスの作製した上で、通常および肥満マウス血清を採取し ELISA 法による FGF の発現量の測定したところ、肥満マウスによる FGF の発現量増加を認めた。さらにヌードマウスに卵巣癌細胞株を移植し腫瘍を形成させ約 4 週間後に腫瘍の重量測定および転移部位の検索、腫瘍パラフィン切片の作製をおこない、EMT 関連蛋白にて免疫染色したところ、肥満と癌浸潤関連タンパクとの関連することが示唆された。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shunsuke Miyamoto, Tomohito Tanaka, Kensuke Hirotsuna, Ruri Nishie, Shoko Ueda, Sousuke Hashida, Shinichi Terada, Hiromi Konishi, Yuhei Kogata, Kohei Taniguchi, Kazumasa Komura, Masahide Ohmichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Validation of a Patient-Derived Xenograft Model for Cervical Cancer Based on Genomic and Phenotypic Characterization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 2969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14122969.	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 該当する

〔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	林 正美 (Hayashi Masami)  (00551748)	大阪医科薬科大学・医学部・准教授  (34401)	
研究分担者	劉 昌恵 (Yu Masae)  (00849581)	大阪医科薬科大学・医学部・講師  (34401)	
研究分担者	大道 正英 (Ohmichi Masahide)  (10283764)	大阪医科薬科大学・医学部・教授  (34401)	
研究分担者	田中 良道 (Tanaka Yoshimichi)  (10625502)	大阪医科薬科大学・医学部・講師  (34401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	恒遠 啓示  (Tsunetoh Satoshi)  (70388255)	大阪医科薬科大学・医学部・講師    (34401)	
研究分担者	藤原 聡枝  (Fujiwara Satoe)  (90707960)	大阪医科薬科大学・医学部・講師    (34401)	

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