

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19407

研究課題名（和文）炎症を背景とした腫瘍形成における線維芽細胞リモデリングの解析

研究課題名（英文）Fibroblast remodeling in tumorigenesis based on inflammation

研究代表者

菊池 章（Akira, Kikuchi）

大阪大学・感染症総合教育研究拠点・特任教授（常勤）

研究者番号：10204827

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：正常大腸、炎症大腸、大腸がん由来の線維芽細胞の経時的変化を、1細胞RNAシーケンスの結果を用いて統合解析した。マウス大腸がんの病態形成過程において誘導されるがん関連線維芽細胞（CAF, cancer-associated fibroblast）のうち、Wnt5a依存的に維持されるものとしてtumor-promoting CAF（tCAF）を同定した。Wnt5aがTGF β /PPARシグナルの制御を介して、tCAFの性状維持に寄与していることが示唆され、Wnt5aノックアウトにより腫瘍形成が抑制されたことと合わせて、CAFにおけるWnt5a発現の意義が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Wnt5a発現線維芽細胞は正常組織では大腸陰窩の頂部に限局しているが、がん化の過程で腫瘍全層に広がりtCAFと近接しており、空間的な相互作用の強さも示唆された。一方、がんに至る過程で大腸組織は炎症病態を介するが、Wnt5a発現線維芽細胞の一部は炎症誘導性の線維芽細胞サブタイプinflammatory fibroblast（Inf2）に移行し、TGF β 1を強く発現したことから、tCAF活性化のトリガーはInf2に由来すると考えられた。以上より、炎症から腫瘍に至る病態において、Wnt5a発現線維芽細胞を中心とした線維芽細胞集団の時空間的リモデリングの制御機構を明らかにできた。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the temporal changes in fibroblasts involved in the pathogenesis of diseases, single-cell RNA sequencing results of normal colon fibroblasts, inflammation-induced colon fibroblasts, and colon cancer-derived fibroblasts were integrated and analyzed. Among the subsets of cancer-associated fibroblasts (CAFs) induced during the pathogenesis of mouse colon cancer, tumor-promoting CAFs (tCAFs) were identified as those that are maintained dependent on Wnt5a. It was suggested that Wnt5a contributes to the maintenance of CAF identity through the control of the TGF β /PPAR signaling axis in tCAFs. Taken together with the findings of the inhibition of tumor formation by Wnt5a knockout in mouse model, significance of Wnt5a expression in CAFs was revealed.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Wnt5a 線維芽細胞 炎症 大腸がん 1細胞シーケンス

1. 研究開始当初の背景

線維芽細胞は間充織に広く存在する主要な細胞成分であり、細胞外マトリックスを豊富に産生する特徴から生体や臓器を支持する結合組織細胞としての役割が長年にわたって解析されてきた。一方、最近の解析結果では、線維芽細胞は定常状態では組織幹細胞の恒常性を維持し、その適切な増殖や分化に必要なが、病的状態では線維化や炎症、腫瘍形成時における病態の増悪に寄与することが明らかになっている¹⁾。加えて、「1細胞 RNA シーケンス(scRNA-seq)」解析により、これまで均質な細胞集団と考えられてきた線維芽細胞が、多様な機能を有する異なるサブタイプに細分化されることが、急速に明らかになりつつある²⁾。しかし、scRNA-seq 解析には細胞の空間情報が含まれないことから、線維芽細胞のサブタイプごとの組織内での空間的位置関係は明らかになっていない。線維芽細胞は病態形成の各過程に密接に関与することから、線維芽細胞サブタイプの構成や局在の時間的な変化を理解することが必要であると考えられる。したがって、今後は scRNA-seq 解析により明らかになった新規の細胞サブタイプの個別の機能を、位置情報ならびに時間情報とあわせて、統合的に理解することが求められている。

私共はこれまで 20 年以上にわたって、Wnt シグナルによる細胞機能制御とその異常による病態解明に関する研究を行ってきた。19 種類存在する Wnt リガンドの中で Wnt5a に着目して、Wnt5a によるがん細胞の増殖、浸潤、転移の制御³⁾⁻⁶⁾や、腸管炎症における Wnt5a によるインターフェロンの作用増強⁷⁾を明らかにしてきた。その過程で、Wnt5a は正常腸管では間質のわずかな線維芽細胞にのみ発現しているが、炎症状態では潰瘍部直下で Wnt5a 陽性細胞が増加することを見出した。しかし、この Wnt5a 発現線維芽細胞集団の炎症病態形成や、炎症に起因する発がんにおける機能的役割は明らかになっていない⁸⁾。さらに、炎症や腫瘍化が進行する過程で、線維芽細胞サブタイプの時空間的なリモデリングが生じるが、このリモデリングが病態形成にいかに関与するのかが解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、私共が同定している Wnt5a 発現線維芽細胞をモデルとして、炎症を背景とした腫瘍形成における線維芽細胞のリモデリングの経時的ならびに空間的な変化をバイオインフォマティクスとイメージング、シミュレーションの 3 つの手法で統合的に解析する方法論を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

上記目的を遂行するために、以下の 3 点の方法を用いた。

(1) 線維芽細胞リモデリングの 1 細胞 RNA シーケンス(scRNA-seq)解析

成獣マウスに対して発がん物質であるアゾキシメタン(AOM)投与後、腸炎誘発剤デキストラン硫酸ナトリウム(DSS)を自由飲水させると、4-6 週間後には大腸腺腫、20 週間後には大腸腺がんが生じる(AOM/DSS 誘導性発がんモデル)。20 週間後後の AOM/DSS モデルマウスより腫瘍部を採材し、フローサイトメトリー(Epcam 陰性、Cd45 陰性、Cd31 陰性、Gp38 陽性)により線維芽細胞を単離し、scRNA-seq データを取得する系をすでに確立していた。その中で Wnt5a は特定のサブタイプに高発現することが判明していた。さらに Wnt5a をノックアウト(KO)したマウスでは、腫瘍形成が阻害されたことから、Wnt5a 発現線維芽細胞の発がんへの関与が示唆された。しかし、腫瘍環境に存在する各線維芽細胞サブタイプが大腸がん発生の過程において、どのように出現または消失し、空間的局在を変化させていくのかが不明であった。そこで、正常大腸、炎症誘導された腸管、大腸がん組織由来の線維芽細胞の scRNA-seq データを取得し、これらを統合解析する。さらに Wnt5a KO マウスに形成された大腸がん組織から単離した線維芽細胞の scRNA-seq を行い、Wnt5a が線維芽細胞リモデリングに与える影響を評価する。

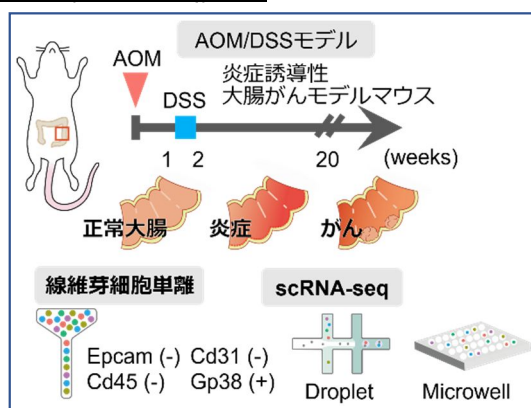


図 1: 本研究の実験方法の概略図

そこで、正常大腸、炎症誘導された腸管、大腸がん組織由来の線維芽細胞の scRNA-seq データを取得し、これらを統合解析する。さらに Wnt5a KO マウスに形成された大腸がん組織から単離した線維芽細胞の scRNA-seq を行い、Wnt5a が線維芽細胞リモデリングに与える影響を評価する。

(2) 線維芽細胞リモデリングの細胞動態解析

大腸がんモデルマウスより採取した腫瘍組織において、(1)の解析にて同定した線維芽細胞集団のマーカー遺伝子をもとにマルチカラーで免疫染色もしくは fluorescence in situ hybridization (FISH) を行い、各サブタイプの空間的配置を評価する。

(3) 線維芽細胞リモデリングの数理解析

Wnt5a は正常腸管では間質のごく一部の線維芽細胞に発現しているが、炎症状態では潰瘍部直下に集積した線維芽細胞に局限して強く発現するようになる。さらに、AOM/DSS モデルマウスの腫瘍組織では、Wnt5a 陽性細胞が発がん細胞周辺に多数集簇している。すなわち、正常時には Wnt5a

陽性細胞の細胞数は限定されているが、炎症や腫瘍化に伴い、Wnt5a 発現細胞数と存在様式が変化する。これが数理モデルの枠組みでどのように理解されるかを検討する。

4. 研究成果

(1) 線維芽細胞リモデリングの 1 細胞 RNA シーケンス(scRNA-seq)解析

病期ごとの scRNA-seq の統合解析の結果、正常大腸では大きく分けて 4 タイプの線維芽細胞サブタイプ (Wnt5a 発現線維芽細胞、筋線維芽細胞、正常線維芽細胞 1(Norm1)、正常線維芽細胞 2(Norm2)) が存在することが判明した(図 2)。炎症が惹起されると、2 タイプの正常線維芽細胞 (Norm1、Norm2)それぞれから炎症病態特有の線維芽細胞(Inf1、Inf2)が誘導された。さらにその炎症を背景として発がんに至ると、同様に 2 タイプのサブタイプ (inflammatory CAF (iCAF)と tumor-promoting CAF (tCAF)) が認められた。Wnt5a 発現線維芽細胞と筋線維芽細胞については各病態に共通して存在していた。これまでも炎症性腸疾患や大腸がんにおける線維芽細胞のサブタイプを定義する試みが行われてきたが^{9),10)}、病態ごとに存在しうるサブタイプのプロファイリングに重点が置かれていた。本研究では線維芽細胞の活性化の系譜に注目し、経時的な変化を考慮した分類を示すことができた。

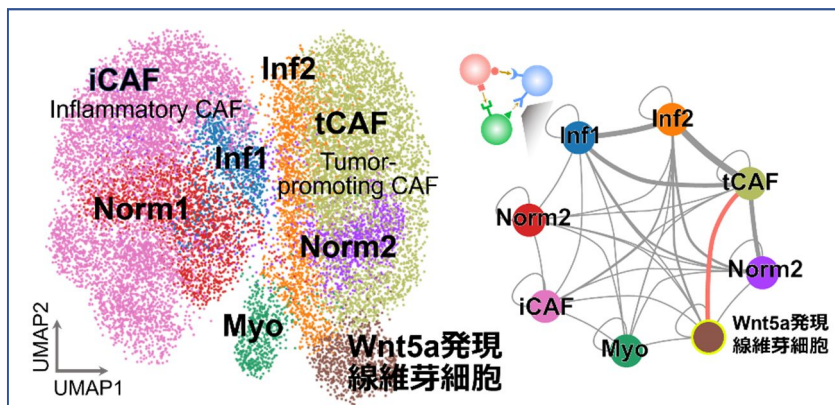


図 2: 各病態における線維芽細胞の scRNA-seq の統合解析の結果(左)と、各サブタイプ間の相互作用の解析(右)

次に Wnt5a KO マウスにおける変化を解析したところ、腫瘍環境において tCAF が減少した。リガンド 受容体の発現プロファイルから細胞間相互作用を定量評価したところ、Wnt5a 発現線維芽細胞は tCAF と最も強く相互作用していた(図 2)。すなわち、腫瘍環境内において Wnt5a 依存的に tCAF が維持されていることが示唆された。続いて

軌道解析の結果、tCAF は正常線維芽細胞サブタイプの一つである Norm2 に由来することが示唆された。また、Norm2 から tCAF へと遷移する過程で、Norm2 を規定する要素の一つとして同定した PPAR シグナルが减弱した。一方、tCAF では TGF シグナルの活性化が認められたが、TGF シグナルは PPAR シグナルを抑制することから¹¹⁾、TGF シグナルは tCAF における正常線維芽細胞の要素を抑えることで、tCAFらしさを維持している可能性が示された。さらに Wnt5a をノックアウトすると、tCAF において TGF シグナルは减弱し、PPAR シグナルが活性化したことから、Wnt5a が TGF /PPAR シグナル軸の制御を介して、腫瘍環境内の線維芽細胞のアイデンティティ維持に寄与していることが判明した(図 3)。

(2) 線維芽細胞リモデリングの細胞動態解析

各細胞群のマーカー遺伝子を同定し、モデルマウスがん組織において RNA in situ hybridization 法を用いて、線維芽細胞集団の空間的变化を解析したところ、Wnt5a KO マウスでは腫瘍近傍に存在する tCAF 集団が減少することが判明した。また、Wnt5a 発現線維芽細胞は正常組織では大腸陰窩の頂部に限局していたが、がん化の過程で腫瘍全層に広がり tCAF と近接して存在した。すなわち、空間的配置からも両線維芽細胞集団の相互作用の強さが示された。

(3) 線維芽細胞リモデリングの数理解析

正常組織より存在する Wnt5a 発現線維芽細胞は腫瘍組織でも維持されていたが、1 細胞当たりの Wnt5a の発現量が上昇した。また、マウス大腸がん組織より単離した線維芽細胞を用いた初代培養系において、Wnt5a が TGF シグナル依存的に発現誘導された。そこで Wnt5a 発現線維芽細胞のリモデリングを、刺激時間依存的な Wnt5a 発現量のモニタリング結果をもとに、数理モデルへ展開し評価しようと考えた。ところが scRNA-seq 解析の結果、Wnt5a 発現線維芽細胞の一部は、がんに至るまでの炎症病態において炎症誘導性のサブタイプ Inf2 に移行することが判明した。Wnt5a 発現線維芽細胞のリモデリングは、同細胞内の遺伝子発現変化にとどまらず、異なるサブタイプへの変化も考慮する必要が生じ、初代培養系での評価が難しく数理モデル構築に必要なデータの取得ができなかった。一方、Wnt5a 発現線維芽細胞由来の Inf2 では、TGF シグナルのリガンドである Tgfb1 を強く発現していた。リガンド 受容体の発現プロファイルに基づく細胞間相互作用を検討したところ、tCAF と Inf2 の相互作用は非常に強いことから、tCAF 活性化に必要な TGF シグナルのトリガーは Inf2 に由来すると考えられた(図 3)。

以上(1)-(3)の成果により、炎症から腫瘍に至る病態において、Wnt5a 発現線維芽細胞を中心とした線維芽細胞集団の時空間的リモデリングの制御機構を明らかにして、Wnt5a がリモデリングの制御因子の一つである可能性を示すことができたと考えられる。

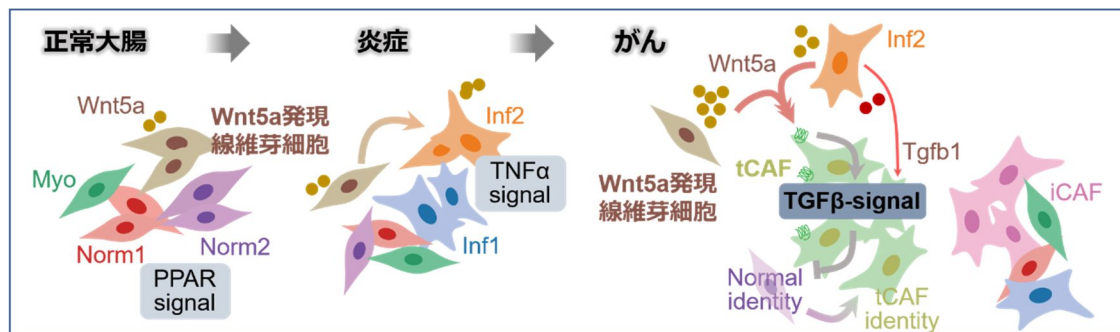


図 3 : 本研究の成果の概要図

< 引用文献 >

- 1) Simon T, Salhia B. Cancer-Associated Fibroblast Subpopulations With Diverse and Dynamic Roles in the Tumor Microenvironment. *Mol Cancer Res.* 2022 Feb;20(2):183-192. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-21-0282. Epub 2021 Oct 20. PMID: 34670861; PMCID: PMC9306405.
- 2) Lavie D, Ben-Shmuel A, Erez N, Scherz-Shouval R. Cancer-associated fibroblasts in the single-cell era. *Nat Cancer.* 2022; 3(7): 793-807. doi: 10.1038/s43018-022-00411-z. Epub 2022 Jul 26. PMID: 35883004; PMCID: PMC7613625.
- 3) Kurayoshi M, Oue N, Yamamoto H, Kishida M, Inoue A, Asahara T, Yasui W, Kikuchi A. Expression of Wnt-5a is correlated with aggressiveness of gastric cancer by stimulating cell migration and invasion. *Cancer Res.* 2006; 66(21): 10439-10448. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2359; PMID: 17079465.
- 4) Yamamoto H, Kitadai Y, Yamamoto H, Oue N, Ohdan H, Yasui W, Kikuchi A. Laminin g2 mediates Wnt5a-induced invasion of gastric cancer cells. *Gastroenterology* 2009; 137(1): 242-252. PMID: 19582886.
- 5) Matsumoto S, Fumoto K, Okamoto T, Kaibuchi K, Kikuchi A. Binding of APC and dishevelled mediates Wnt5a-regulated focal adhesion dynamics in migrating cells. *EMBO J.* 2010; 29(7):1192-1204. doi: emboj201026 [pii]10.1038/emboj.2010.26; PMID: 20224554.
- 6) Sato A, Yamamoto H, Sakane H, Koyama H, Kikuchi A. Wnt5a regulates distinct signalling pathways by binding to Frizzled2. *EMBO J.* 2010; 29(1) 41-54. doi:emboj2009322 [pii]10.1038/emboj.2009.322; PMID: 19910923.
- 7) Shojima K, Sato A, Hanaki H, Tsujimoto I, Nakamura M, Hattori K, Sato Y, Dohi K, Hirata M, Yamamoto H, Kikuchi A. Wnt5a promotes cancer cell invasion and proliferation by receptor-mediated endocytosis-dependent and -independent mechanisms, respectively. *Sci. Rep.* 2015; 5; 8042. doi: 10.1038/srep08042; PMID: 25622531; PMCID: 4306915.
- 8) Plikus MV, Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, Driskell RR, Rosenthal N, Biernaskie J, Horsley V. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell.* 2021; 184(15): 3852-3872. doi: 10.1016/j.cell.2021.06.024. PMID: 34297930; PMCID: PMC8566693.
- 9) Korsunsky I, Wei K, Pohin M, Kim EY, Barone F, Major T, Taylor E, Ravindran R, Kemble S, Watts GFM, Jonsson AH, Jeong Y, Athar H, Windell D, Kang JB, Friedrich M, Turner J, Nayar S, Fisher BA, Raza K, Marshall JL, Croft AP, Tamura T, Sholl LM, Vivero M, Rosas IO, Bowman SJ, Coles M, Frei AP, Lassen K, Filer A, Powrie F, Buckley CD, Brenner MB, Raychaudhuri S. Cross-tissue, single-cell stromal atlas identifies shared pathological fibroblast phenotypes in four chronic inflammatory diseases. *Med.* 2022; 3(7): 481-518.e14. doi: 10.1016/j.medj.2022.05.002; PMID: 35649411; PMCID: PMC9271637.
- 10) Lee HO, Hong Y, Etlioglu HE, Cho YB, Pomella V, Van den Bosch B, Vanhecke J, Verbandt S, Hong H, Min JW, Kim N, Eum HH, Qian J, Boeckx B, Lambrechts D, Tsantoulis P, De Hertogh G, Chung W, Lee T, An M, Shin HT, Joung JG, Jung MH, Ko G, Wirapati P, Kim SH, Kim HC, Yun SH, Tan IBH, Ranjan B, Lee WY, Kim TY, Choi JK, Kim YJ, Prabhakar S, Tejpar S, Park WY. Lineage-dependent gene expression programs influence the immune landscape of colorectal cancer. *Nat Genet.* 202; 52(6): 594-603. doi: 10.1038/s41588-020-0636-z; PMID: 32451460.
- 11) Wei J, Ghosh AK, Sargent JL, Komura K, Wu M, Huang QQ, Jain M, Whitfield ML, Feghali-Bostwick C, Varga J. PPAR γ downregulation by TGF β in fibroblast and impaired

expression and function in systemic sclerosis: a novel mechanism for progressive fibrogenesis. PLoS One. 2010; 5(11): e13778. doi: 10.1371/journal.pone.0013778; PMID: 21072170; PMCID: PMC2970611.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hirokazu Kimura, Ryota Sada, Naoki Takada, Akikazu Harada, Yuichiro Doki, Hidetoshi Eguchi, Hideki Yamamoto, Akira Kikuchi.	4. 巻 40
2. 論文標題 The Dickkopf1 and FOXM1 positive feedback loop promotes tumor growth in pancreatic and esophageal cancers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4486 ~ 4502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-021-01860-z	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 -

1. 著者名 Akikazu Harada, Shinji Matsumoto, Yoshiaki Yasumizu, Kensaku Shojima, Toshiyuki Akama, Hidetoshi Eguchi, Akira Kikuchi.	4. 巻 10
2. 論文標題 Localization of KRAS downstream target ARL4C to invasive pseudopods accelerates pancreatic cancer cell invasion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 10:e66721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.66721	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 -

1. 著者名 Kosuke Iguchi, Ryota Sada, Shinji Matsumoto, Hirokazu Kimura, Yoh Zen, Masayuki Akita, Hidetoshi Gon, Takumi Fukumoto, Akira Kikuchi.	4. 巻 114
2. 論文標題 DKK1 CKAP4 signal axis promotes hepatocellular carcinoma aggressiveness	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2063 ~ 2077
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15743	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 -

1. 著者名 Akihiro Nagoya, Ryota Sada, Hirokazu Kimura, Hideki Yamamoto, Koichi Morishita, Eiji Miyoshi, Eiichi Morii, Yasushi Shintani, Akira Kikuchi.	4. 巻 12
2. 論文標題 CKAP4 is a potential exosomal biomarker and therapeutic target for lung cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Translational Lung Cancer Research	6. 最初と最後の頁 408 ~ 426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tlcr-22-571	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 原田昭和、松本真司、菊池章
2. 発表標題 RAS下流のエフェクター分子ARL4Cを標的とした膀胱癌の浸潤転移の制御
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田武志、原田昭和、香山尚子、佐藤朗、菊池章
2. 発表標題 AOM/DSS大腸がんマウスモデルにおけるWnt5a発現線維芽細胞サブセットの同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池 章, 松本 真司, 新澤 康英, 佐田 遼太, 原田 昭和
2. 発表標題 GREB1を介する新規がんシグナル経路は分子標的となる
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田 昭和, 菊池 章
2. 発表標題 Wnt5aはがん微小環境において線維芽細胞のサブタイプを制御することで腫瘍増殖を促進する
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田 昭和, 松本 真司, 菊池 章
2. 発表標題 GREB1を軸とした小児固形がん発症シグナルの解明
3. 学会等名 第95回 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊池 章, 松本 真司, 新澤 康英, 原田 昭和
2. 発表標題 ホルモン非依存性悪性腫瘍におけるGREB1の発現制御機構
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinji Matsumoto, Akikazu Harada, Akira Kikuchi
2. 発表標題 GREB1 drives HNF4 ⁻ dependent oncogenic transcription and tumor growth in Wnt signal-activated hepatocellular carcinoma.
3. 学会等名 Wnt Meeting2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akikazu Harada, Takeshi Harada, Yoshiaki Yasumizu, Akira Kikuchi
2. 発表標題 Wnt5a regulates cellular state of specific subtype of fibroblast and accelerates tumor progression.
3. 学会等名 Wnt Meeting2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学医学系研究科分子病態生化学
<https://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/molbiobc/index.html>

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	松本 真司 (Matsumoto Shinji) (20572324)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授 (14401)	

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