

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23790455  
 研究課題名（和文）上皮由来の線維芽細胞様細胞の癌間質における新規作用メカニズムの解明  
 研究課題名（英文）Researching the mechanism of cancer-associated epithelial cells  
 研究代表者 白木原 琢哉（SHIRAKIHARA TAKUYA）  
 独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員  
 研究者番号：30548756

## 研究成果の概要（和文）：

研究代表者らが以前に発見し報告した癌浸潤に関与する正常上皮由来 EMT(上皮-間葉移行)獲得細胞の詳細な解析を行った。マイクロアレイ解析を用いて特異的な発現をする遺伝子群を同定し、その中の一つである ITGA3 の発現機構や機能解析を行った。ITGA3 は FGF 下流の Erk シグナルによって発現が誘導され、中和抗体によって機能阻害を行うことで細胞浸潤能が抑制された。また、ITGA3 の発現を 20 種類の乳癌細胞株で比較したところ、分化度が低く悪性度が高いとされる basal 型の乳癌において Erk の高リン酸化と ITGA3 の高い発現が認められた。

## 研究成果の概要（英文）：

We have previously reported that EMT-acquired normal epithelial cells facilitated invasion of cancer cells, when they mixed and cultured together. A number of specific genes expressed in these cells were identified by using microarray analysis. ITGA3 was highly expressed in poorly-differentiated breast cancer tissues and the neutralizing antibody of ITGA3 suppressed invasion of EMT-acquired cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：細胞

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは EMT（上皮-間葉転換）を介して線維芽細胞様に形態的及び機能的に変化した正常上皮由来の細胞が癌細胞の浸潤を促進することを発見した。この活性型の線維芽細胞様細胞は TGF-beta と FGF-2 の双方からの

シグナルクロストークによって分化誘導され、極めて高い運動能・浸潤能・細胞外基質分解能を有する。そして興味深いことに、この活性型線維芽細胞様細胞を癌細胞と共に *in vitro* において培養すると癌細胞の浸潤を強く促進することが観察された。癌細胞と共培

養した正常上皮細胞は癌細胞から分泌されたサイトカインらによって活性型線維芽細胞様細胞へと分化する様子も認められことから、癌細胞と正常上皮細胞との間には癌悪性度増大へと向かわせる未知の相互作用の存在が推測された。

近年、癌を取りまく特徴的な微小環境は浸潤・転移などの癌生物像を規定する重要な要素であることが多方面から指摘されている。癌組織の大部分を構成する癌間質は線維芽細胞をはじめ、炎症細胞、免疫担当細胞、血管及びリンパ管内皮細胞、そして細胞外基質などの結合組織から構成されている。特に癌間質線維芽細胞は CAF (cancer associated fibroblast) と呼ばれ、癌悪性度を左右する重要な働きを持つとされている。CAF 細胞は一般的には癌が発生または転移増殖した臓器固有の線維芽細胞が、癌細胞の増殖・進展にあわせて変化したものが起源だと考えられている。ところが CAF 細胞と非癌部線維芽細胞とは遺伝子発現や増殖因子に対する反応性が異なることが近年明らかとなっている。そこで、腫瘍組織に豊富に存在する TGF-beta や FGF-2 によって EMT を獲得した上皮由来の線維芽細胞様細胞が CAF 細胞の一部として動員されているという仮説の検証を試みた。

## 2. 研究の目的

TGF-beta と FGF-2 によって誘導される正常上皮由来の活性型線維芽細胞様細胞のマーカとなる遺伝子を同定し、腫瘍組織内での細胞の存在の確認と癌浸潤に対する作用機序の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) がん微小環境において活性型線維芽細胞様細胞を観察する。

① マイクロアレイを用いて活性型線維芽細胞様細胞のマーカとなり得るような特異的遺伝子を探索する。

② 同定した複数の候補遺伝子の抗体で細胞免疫染色を行い、上皮細胞への TGF-beta と FGF-2 の共刺激によってタンパク質発現が誘導されている様子を観察する。

③ 染色可能な抗体を用いて乳癌等の組織染色を行い、活性型線維芽細胞様細胞と類似したマーカを発現する細胞が癌もしくは癌間質に存在するかどうかを検証する。

(2) 癌標的治療へつなげるため、活性型線維芽細胞様細胞の分化機構や癌細胞との相互作用の機構を解明する。

① TGF-beta の FGF-2 の共刺激がどのようなシグナル経路を活性化して重要な遺伝子制御を行っているのかを上記マイクロアレイの結果を解析して明らかにし、リン酸化の阻害等による分子生物学的な検証を行う。

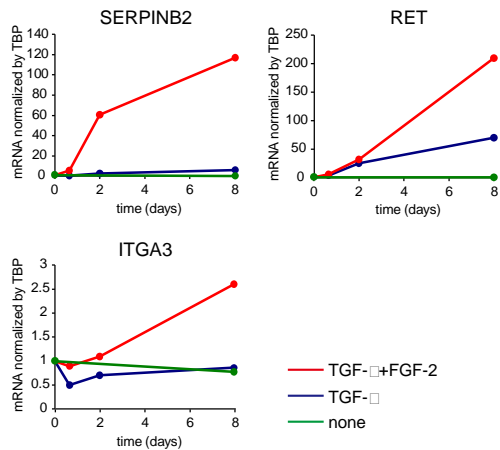
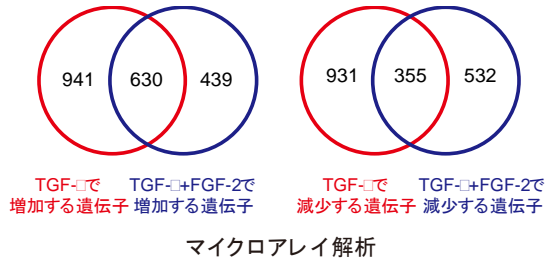
② 活性型線維芽細胞様細胞と癌細胞を共培養した時の癌細胞側におけるシグナル変化を調べて両細胞間での相互作用を明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) 特異的分子の同定と組織染色

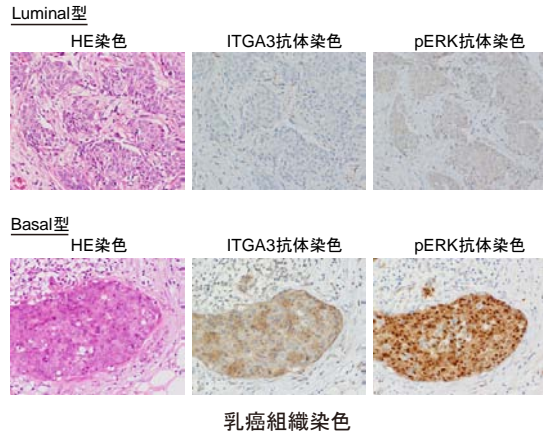
① 正常乳腺上皮細胞株に TGF-beta と FGF-2 の共刺激を行うことで活性型線維芽細胞様細胞を誘導し、この EMT 様の変化に伴って特異的な発現変化が認められた分子をマイクロアレイで統合的に解析した。発現量が上昇した遺伝子群の中から細胞骨格、運動、分化に関与する特に重要と推測される約 10 種類の遺伝子を同定した。さらに EMT 誘導に伴う遺伝子発現の経時変化や、ウェスタンブロットと細胞免疫染色によるタンパク質発現を確認して絞り込みを行い、最終的に ITGA3、

RET、SERPINB2 の3 遺伝子に着目した。



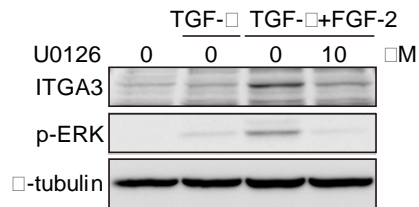
同定した3遺伝子の発現変化

②乳がんの組織染色を行うと ITGA3 は間質よりもむしろ癌細胞で強い発現が認められ、EMT を獲得した上皮由来の正常細胞と見られる細胞を認めることができなかった。そこで当初の計画とは異なるが、乳癌における ITGA3 の発現量を 20 種類の乳癌細胞株で比較した。すると、低分化で悪性度が高いとされる basal 型において高発現が見られた。興味深いことにこの ITGA3 が高発現の細胞株では Erk のリン酸化の亢進も認められた。乳癌組織染色においても ITGA3 と Erk のリン酸化は分化度の高い luminal 型よりも basal 型で強い発現が認められた。一方、RET と SERPINB2 は抗体の品質により組織染色での観察を行うことができなかった。

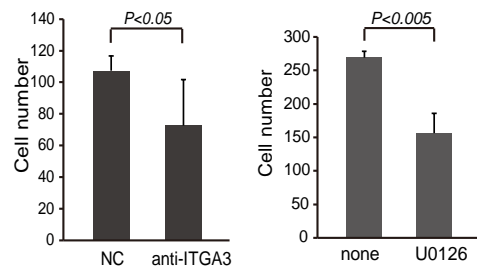


(2) ITGA3 の発現機能解析

①ITGA3 について TGF-beta と FGF-2 の共刺激による EMT 誘導時での機能解析を行ったところ、siRNA や阻害剤では強い線維芽細胞様の形態変化が阻害されることはなかったが、浸潤能は ITGA3 の中和抗体によって約 4 割程度抑制された。また、乳癌細胞株や組織染色では ITGA3 の発現量が Erk のリン酸化と関連していたことから ITGA3 発現量の高い細胞株に MEK 阻害剤(U0126)を用いたところ、ITGA3 の発現は抑制され、ITGA3 中和抗体と同様に浸潤能も阻害された。



共刺激による ITGA3 誘導と MEK 阻害剤による抑制



ITGA3 中和抗体と MEK 阻害剤による細胞浸潤の抑制

②組織染色において癌間質における活性型線維芽細胞様細胞の存在を証明することはできなかったため、今回は癌細胞との共培養実験は中止した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Takuya Shirakihara, Tomonori Kawasaki, Akihito Fukagawa, Kentaro Semba, Ryuichi Sakai, Kohei Miyazono, Keiji Miyazawa, Masao Saitoh, Identification of integrin alpha3, as a molecular marker of cells undergoing EMT and cancer cells with aggressive phenotypes, Cancer Science, 査読有、未掲載

[学会発表] (計 4 件)

1. 白木原 琢哉、堺 隆一、齋藤 正夫、FGF-2 accelerates TGF-beta-induced EMT and promotes invasion of cancer, 第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日、横浜
2. Takuya Shirakihara, Ryuichi Sakai, Masao Saitoh, FGF-2 accelerates TGF-beta-induced EMT and promotes invasion of cancer, The 3<sup>rd</sup> Symposium Mechanisms and Models of Cancer, 2013 年 8 月 7 日、San Diego (USA)
3. 白木原 琢哉、堺 隆一、齋藤 正夫、FGF-2 による TGF-beta 誘導性 EMT の亢進とがん浸潤への関与、第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会、2013 年 7 月 11 日、松本
4. Takuya Shirakihara, Kohei Miyazono, Masao Saitoh, TGF-beta switches isoform of FGF receptors and regulates EMT of

cancer-associated epithelial cells, 5<sup>th</sup> International EMT Meeting, 2011 年 10 月 11 日、Biopolis (Singapore)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

白木原 琢哉 (SHIRAKIHARA TAKUYA)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号 : 30548756