

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24300332

研究課題名(和文) ヒト乳癌転移の分子機構の解明

研究課題名(英文) Dissecting molecular mechanisms mediating human breast cancer metastasis

研究代表者

折茂 彰 (orimo, akira)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70275866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：CAF s を含めた癌微小環境が、近傍の癌細胞にEMTを誘導し癌細胞の浸潤能を亢進させることにより転移形成を誘導し、遠隔臓器に到達した癌細胞は、METを介してその増殖能を高めることが推測される。しかしながら、申請研究の結果では、CAF s によるEMTの誘導は顕著ではなく、対照的に細胞と細胞の接着促進が転移能の獲得に重要であることを示唆するものであった。今後は数種類の癌細胞を用いて、単一癌細胞がより浸潤しやすく転移しやすいのか、あるいは接着しクラスターを形成している癌細胞が、転移しやすいのか、明らかにする必要がある。また今後のより詳細な分子レベルの解析が必要である。

研究成果の概要(英文)：CAF s predominantly present within the tumor-associated stroma. However, roles of CAF s on tumor malignancy haven't fully understood yet at molecular levels. The invasion-metastatic cascade is composed of a series of multi-step processes and epi/genetic alterations are believed to be largely responsible for ability of cancer cells to metastasize. Recent emerging evidence also supports the notion that cancer metastasis depends on non-cell autonomous effect of nearby stromal cells. Here we show that CAF s induce highly metastatic ability into barely metastatic breast cancer cells via conferring self-stimulating autocrine signaling mediated by some cell adhesion molecules. These factors importantly promote cell-cell adhesions in carcinoma cells that can facilitate their metastatic dissemination and associated with poorer outcome in breast cancer patients. Taken together, these findings strongly suggest crucial roles of CAF s on promotion of tumor malignancy.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌微小環境 癌転移 CAF s 細胞接着

## 1. 研究開始当初の背景

過去30年間の癌研究は、原発癌細胞における遺伝子変異や、シグナル伝達の異常のメカニズムの解析を中心に行われてきた。一方、原発巣に存在する癌細胞が遠隔臓器に転移するメカニズムに関しては不明な点が多い。

癌細胞は原発巣より周辺組織へ浸潤 (invasion) し、血管内に侵入 (intravasation) し生存 (survival) し、血管外に出て (extravasation) 遠隔臓器に到達する。転移した癌細胞は、生存し、コロニーを形成 (colonisation) して、微小な転移巣を形成し、顕著な転移巣に発展する。このように癌細胞にとって、非常に困難と予測される複数のステップを毎回克服することにより、癌細胞が転移形成を成し遂げることができる。

従来より癌細胞の転移能力の獲得には、癌細胞内に蓄積された genetic あるいは epigenetic な変異の蓄積や、変異が入る細胞の起源が重要と考えられてきた。例えば、癌幹細胞などの特定の細胞に変異が入った場合は、より転移が生じ易いと予測されている。加えて、最近の数々の報告は、癌微小環境が癌細胞の転移促進に寄与していることを提案している。

申請研究では、ヒト癌の微小環境中に多数存在する活性化筋繊維芽細胞 (CAFs: carcinoma-associated fibroblasts) が、どのように癌細胞にとって困難な転移のプロセスを助けているのか、分子レベルで明らかにする。最近我々は、ヒト DCIS (ductal in situ carcinoma) 由来の培養乳癌細胞株に CAFs が上皮間葉移行 (EMT: epithelial-mesenchymal transition) を顕著に誘導することを確認

している (未発表データ)。上皮間葉移行は癌細胞の浸潤や転移に必須のプログラムとして知られている。CAFs は癌上皮細胞に上皮間葉移行を誘導して、より浸潤能の高い、apoptosis 抵抗性な癌細胞に変化させているのかもしれない。申請者らは、このような癌細胞の悪性を促す CAFs と癌細胞の相互作用を、分子レベルで明らかにすることを計画している。

## 2. 研究の目的

癌の遠隔臓器への転移は癌患者の死亡率の90%に起因する。しかしながら、乳癌が遠隔臓器に転移するメカニズムは明らかでなく、転移を有効に治療することは非常に困難であるのが現状である。近年、癌内微小環境が癌転移を促進していることが示唆されている。申請研究では、癌内微小環境の主要な構成細胞である癌内繊維芽細胞 (carcinoma-associated fibroblasts; CAFs) が乳癌の転移を促進するメカニズムを解明し、将来の癌転移治療に役立てたい。

## 3. 研究の方法

1) CAFs が原発癌内でヒト乳癌細胞に上皮間葉移行を誘導し、血中循環癌細胞数や遠隔転移を促進するか否を検討する。

2) CAFs により癌細胞に誘導される上皮間葉移行や遠隔転移を媒介する遺伝子の同定を試みる。

3) 原発癌内で CAFs によって癌細胞に誘導された上皮間葉移行が、遠隔臓器で間葉上皮移行を起こしているかどうか調べる。

4) 同定された特定の遺伝子やシグナル経路の抑制が、CAFs により誘導された癌細胞の上皮間葉移行や転移を抑制するかどうか評価する。

## 4. 研究成果

癌微小環境が乳癌転移に関して重要な役割

を演じていることは多くの研究により示唆されている。申請研究では癌微小環境中に多数存在する癌内線維芽細胞に焦点を絞り研究をすすめた。癌内線維芽細胞が癌細胞の浸潤・転移を促進することを示唆した論文は複数あるが、適切なコントロールベースで *in vivo* で癌内線維芽細胞の転移促進能を各転移段階で注意深く示した論文はない。

今回我々は、高度免疫不全 NOD/SCID/ Cnull (NOG) マウスを使用した tumour xenograft の系を用い、CAFs が弱転移性ヒト乳癌細胞と移植された場合、非癌部より抽出された対照線維芽細胞と共移植された場合に比較して、転移が顕著に増加することを観察している。

癌内線維芽細胞を有した原発巣に存在する癌細胞は、対照線維芽細胞と共移植された癌細胞と比較して、より浸潤性が高いことが、組織上観察された。以下研究の objective に対しての結果を列挙する。

1) CAFs が原発癌内でヒト乳癌細胞に上皮間葉移行を誘導し、血中循環癌細胞数や遠隔転移を促進するか否を検討した。

(結果) CAFs が上皮系のヒト乳癌細胞と免疫不全マウスに共移植後に抽出された癌細胞を調査したところ、対象の正常繊維芽細胞と比較して、間葉系のマーカーの発現が誘導されることはなかった。この事実は、多くのペーパーで示唆されている CAFs が癌細胞に EMT を誘導するという結果と相反するものであった。過去の報告では、CAFs より採取された培養上清と数日間培養後に癌細胞に EMT マーカーである間葉系遺伝子やたんぱく質の発現が上昇することが示されている。申請者も CAFs 培養上清がヒト培養乳癌上皮細胞に上皮間葉移行 (EMT) を顕

著に誘導することを確認している。CAFs よりの培養上清が DCIS (ductal carcinoma in situ) 由来のヒト乳癌細胞に 4-6 日間添加された時、上皮細胞のマーカーの細胞膜の E-cadherin が細胞質へ移行し、間葉系細胞のマーカーの vimentin の発現が上昇した。しかしながら今回の申請研究において、申請者が用いた系は、癌細胞と CAFs を *in vivo* で調査するために、両細胞を免疫不全マウスに共移植することにより、癌塊内の CAFs と癌細胞の相互作用の調査を有すものである。

2) CAFs により癌細胞に誘導される上皮間葉移行や遠隔転移を媒介する遺伝子の同定を試みる。

(結果) CAFs と共移植された癌塊より移植された癌細胞は、正常の繊維芽細胞と移植された癌塊より抽出された癌細胞より、浸潤・凝集・転移形成能が亢進していた。この作用は EMT 非依存性のものであり、今後の解析が必要である。この *in vivo* の系においては、CAFs が癌細胞に EMT を誘導することは観察されなかった。

3) 原発癌内で CAFs によって癌細胞に誘導された上皮間葉移行が、遠隔臓器で間葉上皮移行を起こしているかどうか調べる。

(結果) CAFs と共移植された癌塊を持つマウスは対照の正常の繊維芽細胞と移植された癌塊を持つマウスと比較して、より高頻度に顕著な転移を示した。そしてこれらの転移巣は上皮系の表現型を示した。今後はこれらのマウスの血中循環癌細胞を検査する必要がある。Preliminary data では、上皮系の形態を維持した血中循環癌細胞が確認されている。

4) 同定された特定の遺伝子やシグナル経路の抑制が、CAFsにより誘導された癌細胞の上皮間葉移行や転移を抑制するかどうか評価する。

(結果) CAFsで誘導された高転移性癌細胞が、細胞接着因子群の発現を亢進していることが示唆された。この過程は従来より認識されている EMT-MET 仮説と対照的なメカニズムである。

(考察) CAFs を含めた癌微小環境が、近傍の癌細胞に EMT を誘導し癌細胞の浸潤能を亢進させることにより転移形成をトリガーし、遠隔臓器に到達した癌細胞は、MET を介してその増殖能を高めることが推測される。申請研究の結果では、CAFs による EMT の誘導は顕著ではなく、対照的に細胞と細胞の接着の促進が転移能の獲得に重要であることを示唆するものであった。今後は数種類の癌細胞を用いて、単一癌細胞がより浸潤しやすく転移しやすいのか、あるいは接着シクラーを形成している癌細胞が、転移しやすいのか、明らかにする必要がある。また今後のより詳細な分子レベルの解析が必要である。

#### 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5件)

1. Mezawa, Y. and Orimo A\*, The roles of tumor- and metastasis-promoting carcinoma-associated fibroblasts in human carcinomas. Cell tissue research, (2016), *In press* (査読あり)

\* Corresponding author

2. Cartilage oligomeric matrix protein contributes to the development and metastasis of breast cancer. Englund E, Bartoschek M, Reitsma B, Jacobsson L, Escudero-Esparza A, Orimo A, Leandersson K, Hagerling C, Aspberg A, Storm P, Okroj M, Mulder H, Jirstrom K, Pietras K, Blom AM. Oncogene. Apr 11. 2016 (査読あり)

3. Holmquist E., Reitsma B., King B., Escudero-Esparza Sioned Owen A., Orimo A., Okroj M., Anagnostaki L., Jiang W., Jirstrom K., Blom A., The human complement inhibitor Sushi Domain-Containing Protein 4 (SUSD4) expression in tumor cells and CD8+ T cells is associated with better prognosis of breast cancer patients. BMC Cancer, (2015) 19, 737. (査読あり)

4. Polanska, Y. \* and Orimo A.\* (2013) Carcinoma Associated Fibroblasts. Journal of Cellular Physiology, 228, 1651-7. (査読あり) \*Corresponding author

5. Togo, S.\*, Polanska, Y., Horimoto, Y and Orimo, A.\* (2013) Carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) are a promising therapeutic target. Cancers, 5, 149-169. (査読あり)

[学会発表](計5件)

1. 招待講演; Carcinoma-associated fibroblasts confer adherent epithelial cell traits in breast

cancer cells to promote metastasis  
**Orimo A.** シンポジウム **がんの浸潤・転移メカニズムの解明と治療標的** 第 75 回日本癌学会学術総会 名古屋、10月8日 2015年

2. 招待講演 **折茂彰** 癌内線維芽細胞による癌悪性化分子機構 日本癌学会シンポジウム・共同利用共同研究拠点シンポジウム 「がん幹細胞・微小環境・分子標的～がん進展制御への挑戦」 金沢、1月21-22日、2015年 *Invited*
3. 招待講演 **折茂彰** Evolution of human breast carcinoma cells with stromal myofibroblasts to propagate tumor metastasis シンポジウム：がんを知る：「がん細胞の浸潤の新たなメカニズム」第 73 回日本癌学会学術総会 横浜、9月27日 2014年
4. 招待講演 **折茂彰** シンポジウム、間質性肺炎に合併した肺癌の現状と治療戦略- 炎症や線維化が及ぼす癌化や癌進展促進機構 -Carcinoma-associated fibroblasts (CAFs)の視点から 第 54 回日本呼吸器学会 大坂 4月25日 2014年
5. 招待講演 **折茂彰** Evolution of metastasis-promoting stromal myofibroblasts. 第58回幹細胞治療研究センターフォーラム 東京大学医科学研究所 4月19日2013年

〔図書〕(計5件)

1. 伊藤匠、松村優子、伊藤恭彦、**折茂彰** 癌内線維芽細胞と癌進展・悪性化 34巻8号758-766頁 呼吸 2015

2. **折茂彰**, 松村優子, 本多一貴, Nadila Wali, がん内線維芽細胞とがんの悪性化 Vol.33 No.5 73-80 癌小環境と標的治療 実験医学 羊土社 2015年
3. **折茂彰**, 松村優子, 伊藤恭彦, 十合晋作 線維化病態と癌悪性化 呼吸器内科 科学評論社 2月号第 27 巻第 2号 142-148, 2015年
4. 谷口源太郎、**折茂彰** 肺の損傷と発癌機序「Annual Review 呼吸器 2015」(株) 中外医学社 99-106, 2015年
5. 松村優子, 伊藤恭彦, **折茂彰** がん細胞の浸潤・転移を促進するがん微小環境：がん内線維芽細胞を例に 細胞工学 Vol.33 No.6 609-12 2014年

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称：強転移性ヒト癌細胞株

発明者：**折茂彰**

権利者：同上

種類：特許

番号：2013-178842

出願年月日：平成 25 年 8 月 30 日

国内外の別：国内

名称：早期癌転移検出法および新規癌転移抑制薬のスクリーニング法

発明者：**折茂彰** 他 3 名(4人中1番目)

権利者：同上

種類：特許

番号：2013-189538

出願年月日：平成 25 年 9 月 12 日

国内外の別：国内

名称：ヒト癌上皮細胞の遠隔転移のモデルマウス

作出方法

発明者：折茂彰

権利者：同上

種類：特許

番号：2012-175544,

出願年月日：平成 24 年 8 月 8 日

国内外の別：国内

取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

研究紹介 site:

<http://ganshien.umin.jp/research/main/orimo/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

折茂 彰 (ORIMO, Akira)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70275866

### (2) 研究分担者

斎藤 光江 (SAITO, Mitsue)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：30205679

堀本 義哉 (HORIMOTO, Yoshiya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：40424246

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：