

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592090

研究課題名(和文) 癌微小環境を標的とした肺癌治療の開発

研究課題名(英文) Therapeutic Perspective of Tumor Microenvironment in Non-Small Cell Lung Cancer

研究代表者

新谷 康 (shintani, yasushi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90572983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌を取り巻く間質や細胞は、腫瘍の微小環境に寄与し、腫瘍の進展に深く影響している。我々は、癌細胞とその微小環境との関わりを標的とした癌治療の開発を目的とした研究を進めてきた。上皮細胞が極性を失って運動性が亢進し間葉系の形質を獲得する上皮間葉転換EMTに注目し、肺癌細胞は、腫瘍間質や成長因子によってEMTが誘導され、浸潤・転移能を獲得し、さらに抗癌剤や分子標的薬への耐性を獲得することを発見した。中でも、TGF-betaおよびIL-6のシグナル系が癌間質におけるEMTに重要な役割を担っていることを明らかにし、肺癌に対する新たな分子標的に成りえることを示した。

研究成果の概要(英文)：Our recent focus has been signaling pathways that promote Epithelial to mesenchymal transition (EMT) in response to tumor microenvironment such as growth factors as well as extracellular matrix. Tumor stroma in non-small cell lung cancer (NSCLC) is of interest in the entity as both biomarkers and therapy targets. We can assume that anticancer therapeutics targeting EMT pathways and signaling elements will bring additional ways for the treatment of NSCLC. IL-6 from tumor stroma enhanced epithelial cell EMT and acquisition of cancer stemness by enhancing TGF-beta signaling. IL-6 and TGF-beta may play contributing roles in maintenance of the paracrine loop between these two cytokines as part of the communication between tumor stroma and NSCLC cells, resulting in chemoresistance.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 癌周囲微小環境 癌幹細胞 治療抵抗性 上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

我々は、癌微小環境の機能調節に重要な役割を果たしている上皮間葉転換 EMT (Epithelial Mesenchymal Transition) に注目し、肺癌周囲間質 tumor stroma に含まれる EGF、FGF、KGF や TGF- β などの増殖因子や collagen から誘導される EMT シグナル伝達経路について報告してきた。EMT とは、上皮細胞が上皮としての形質を失い、線維芽細胞などの間葉系の形質を獲得する現象であり、細胞極性の消失、細胞間接着の減少、細胞遊走能の亢進、アクチン系細胞骨格の改築を特徴とする。間葉系の形質を得た癌細胞は、より遊走能を獲得し、浸潤、転移を起こす。我々は、TGF- β や I 型 Collagen による EMT シグナルを明らかにし、EMT を抑制することで EMT を制御し、癌細胞の浸潤能、転移能が低下することを報告してきた。

2. 研究の目的

EMT シグナルを制御することで肺癌を dormant な状態に維持することができれば、外科治療や放射線治療といった局所制御、全身治療である抗癌剤に加える有用な癌治療法になると考えられる。本研究の目的は、癌微小環境を調節する EMT の関連シグナル分子を明らかにし、癌細胞の EMT を制御することである。

3. 研究の方法

肺癌周囲の間質 tumor stroma を形成する微小環境に注目し、癌細胞と周囲の間質細胞や細胞外基質のクロストークを解析する。中でも、癌細胞の EMT 誘導・癌幹細胞様形質転換における線維芽細胞 (Cancer associated fibroblast: CAF) の役割を明らかにし、そのシグナル伝達経路を制御することで癌細胞の悪性化を抑制できるか検討する。

細胞株を用いた肺癌微小環境の再現：肺癌細胞株、肺癌関連線維芽細胞株 CAF を用いて、共培養を行い、EMT 関連分子の変化を解析した。

肺切除標本を用いた肺癌微小環境の再現：術前に Informed Consent を得られた症例の肺癌切除標本から肺癌細胞、間質細胞を採取し、実験材料を得た。

癌微小環境による肺癌細胞変化の解析：肺癌細胞と CAF 間のシグナル伝達経路を明らかにするために、強力な EMT 誘導因子である TGF- β に注目し、その inhibitor を用いて TGF- β シグナルを抑制することで生じる現象を調べた。

癌細胞による間質細胞変化の解析：癌細胞と接触させた癌間質細胞の変化を解析した。間質細胞が産生する TGF- β 、IL-6 といったサイトカインを測定し、癌浸潤の場をいかに提供するのかを明らかにした。

マウス共接種モデルを用いた癌微小環境の解析：肺癌細胞と間質細胞を同時にマウ

スに接種する共接種モデルを用いて、癌微小環境を生体内で再現した。形成する腫瘍のサイズ、マウスの生存、また腫瘍を形態や免疫組織学的に解析した。

肺切除標本を用いて、EMT マーカー、CAF マーカー、TGF- β 、IL-6 の免疫組織染色を行い、臨床病理学的因子との関連を検討した。

4. 研究成果

肺癌細胞は、肺癌関連線維芽細胞株 CAF との共培養によって、上皮様形態から Spindle な細胞に変化し、E-cadherin などの上皮系マーカーは減少し N-cadherin や Vimentin などの間葉系マーカーが上昇した。浸潤・転移能は上昇し、さらに抗癌剤や分子標的薬への耐性を獲得した。また足場非依存的培養により、sphere 形成能が高くなっていることがわかった。以上より、CAF から分泌された液性因子によって癌細胞で EMT が誘導されることが明らかになった。また EMT 誘導によって癌幹細胞形質を獲得する可能性が示唆された。実際、EMT を誘導することで、癌細胞における CD44、Bmi1 などの幹細胞マーカー発現が上昇した。

手術標本から腫瘍周囲の癌関連線維芽細胞 CAF を初代培養し、癌細胞株と共培養したところ、と同様に EMT が誘導された。この現象は、同時期に初代培養で得られた正常肺線維芽細胞 NF の共培養よりも EMT 誘導が迅速であり、CAF から分泌される液性因子の方が、NF に比して EMT 誘導効果が強いことが示された。

TGF- β R inhibitor によって、や で誘導された EMT が抑制されることから、CAF-癌細胞の相互作用には TGF- β シグナルが関与することが判明した。さらに、TGFR inhibitor によって、抗癌剤や分子標的薬に対する感受性が上昇し、sphere 形成能も浴せされることから、TGF- β シグナルは癌幹細胞形質獲得にも関与していると考えられた。

肺癌細胞は CAF と相互作用することで、肺癌細胞だけでなく線維芽細胞から IL-6 産生が上昇することが判明した。実際に、TGF- β に IL-6 を加えると、EMT 関連分子の発現変化を増強し、癌細胞の抗癌剤や分子標的薬への耐性獲得が増強した。以上より IL-6 は EMT や癌幹細胞形質獲得効果を増強する可能性が示唆された。さらに、線維芽細胞における TGF- β 、EGF、FGF、VEGF、コラーゲンなどの EMT 誘導因子や IL-10、CSF-1、Chemokine ligand (CCL) などのサイトカイン発現も、TGF- β 単独に比して TGF- β に IL-6 を加えることで産生増加を認め、線維芽細胞においても IL-6 は TGF- β シグナルを増強する可能性が示唆された。

肺癌細胞株と CAF を動物皮下に接種する共移植モデルでは、CAF の存在により、

腫瘍増大速度の上昇、血管新生促進、抗癌剤耐性化、幹細胞マーカー高発現を認めた。また、これらの変化は TGF- β シグナル阻害薬の腹腔内投与によって、癌細胞単独接種群と同程度の腫瘍形成能へ抑制されることが明らかになった。以上より、生体内でも TGF- β シグナルを介して、CAF が腫瘍形成能を増加すると考えられた。さらに、肺癌細胞株と CAF を共接種することによって、肺癌細胞株のみの接種群よりも、Cisplatin による抗癌剤治療に抵抗性をもつことを示し、この効果も TGF- β シグナル阻害薬を抗癌剤と同時に接種することによって、獲得した治療抵抗性が減弱した。以上より、生体内においても、TGF- β シグナルを介して、抗癌剤耐性獲得が誘導されると考えられた。

EMT によって、間葉系マーカーの獲得だけではなく CD44、Bmi1 の上昇、癌形成能を獲得することが判明し、治療抵抗性には癌幹細胞様形質の獲得が関与していると考えられた。抗癌剤、放射線に対する耐性癌細胞株を作成したところ、EMT が誘導されており、また幹細胞マーカーが上昇していた。実際、放射線化学療法後に肺切除を施行した症例の検討では、残存腫瘍内で EMT マーカーが増加している症例の予後が不良であった。癌細胞の EMT マーカー発現と癌細胞の TGF- β 発現および癌周囲 CAF の IL-6 発現は有意に相関しており、生体内でも治療によって EMT が誘導され、治療抵抗性を獲得し残存する可能性が示唆された。術前治療によって EMT が誘導され治療抵抗性を獲得した組織が残存する可能性が示唆された。

従来の癌治療によって癌幹細胞様形質を維持または誘導する niche が誘導され、治療抵抗性を示す癌幹細胞が残存する可能性が示唆された。癌細胞が癌幹細胞様形質を獲得する過程で癌間質細胞が重要な役割を担っているため、癌細胞と癌間質 niche の相互作用を対象とした癌治療は治療耐性化を抑制し、新しい癌治療につながる可能性がある。

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4件)

Abulaiti A, Shintani Y, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Okumura M. Interaction between non-small-cell lung cancer cells and fibroblasts via enhancement of TGF- β signaling by IL-6. *Lung Cancer*. 82,204-213: 2013

Shintani Y, Abulaiti A, Kimura T, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Morii E,

Okumura M. Pulmonary fibroblasts induce epithelial mesenchymal transition and some characteristics of stem cells in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 96:425-33,2013

Lee J, Nakagiri T, Kamimura D, Harada M, Oto T, Susaki Y, Shintani Y, Inoue M, Miyoshi S, Morii E, Hirano T, Murakami M, Okumura M. IL-6 amplifier activation in epithelial regions of bronchi after allogeneic lung transplantation. *Int Immunol*. 25:319-32,2013.

Shintani Y, Funakoshi Y, Inoue M, Takeuchi Y, Okumura M, Maeda H, Ohta M. Pathological status of mediastinal lymph nodes after preoperative concurrent chemoradiotherapy determines prognosis in patients with non-small cell Lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 18:530-5,2012.

[学会発表](計8件)

新谷康 癌微小環境を標的とした肺癌治療の開発。第31回日本呼吸器外科総会、学会賞受賞講演、5/30/2014 東京

新谷康、井上匡美、木村亨、川村知裕、中桐伴行、澤端章好、南正人、奥村明之進 外科切除標本を用いた個別化治療実現のための予後・治療効果予測因子の解析と展望。第114回日本外科学会総会、4/4/2014 京都

Shintani Y, Abulaiti A, Kimura T, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Morii E, Okumura M. IL-6 enhances EMT signaling and decreases sensitivity to chemotherapy in non-small cell lung cancer cells. 第72回日本癌学会、10/3/2013 横浜

新谷康、井上匡美、木村亨、川村知裕、中桐伴行、澤端章好、南正人、奥村明之進 癌幹細胞の微小環境(niche)を標的とした肺癌治療の開発。第113回日本外科学会総会、4/11/2013 福岡

Shintani Y, Abulaiti A, Kimura T, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Morii E, Okumura M. Pulmonary fibroblasts increase EMT signaling and decrease sensitivity to chemotherapy in non-small cell lung cancer cells via TGF-beta and IL-6 signaling. *IASLC(15)*, 10/30/2013 Sydney

Shintani Y, Abulaiti A, Kimura T, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M, Okumura M. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal-transition and stemness in non-small-cell lung cancer. *AACR(103)*, 4/2/2012 Chicago

Shintani Y, Abulaiti A, Kimura T, Funaki S, Nakagiri T, Inoue M, Sawabata N, Minami M,

Okumura M Fibroblasts induce epithelial-mesenchymal-transition and stemness in non-small-cell lung cancer. The 8th International Symposium on Cancer Research and Therapy, 11/10/2012, Tokyo

新谷康、木村 亨、Abulaiti A、中桐伴行、井上匡美、澤端章好、南正人、奥村明之進 癌幹細胞の微小環境 (niche) を標的とした肺癌治療の開発。第 112 回日本外科学会定期学術集会、4/13/2012 千葉

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新谷 康 (Yasushi Shintani)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：90572983

(2) 研究分担者

奥村 明之進 (Meinoshin Okumura)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：40252647

南 正人 (Masato Minami)
大阪大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10240847

澤端 章好 (Noriyoshi Sawabata)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：50403184
(平成 25 年度まで分担者として参画)

井上 匡美 (Masayoshi Inoue)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：10379232

中桐 伴行 (Tomoyuki Nakagiri)
大阪大学・医学系研究科・招へい教員
研究者番号：70528710

川村 知裕 (Tomohiro Kawamura)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：30528675
(平成 26 年度より分担者として参画)

(3) 連携研究者
()

研究者番号：