

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659185

研究課題名(和文)がん間質細胞の特異な生物像を標的とした、新たな制がん法の開発

研究課題名(英文)Development of target therapy for stromal cells

研究代表者

石井 源一郎(Ishii, Genichiro)

独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・ユニット長

研究者番号：00270869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1) がん間質内線維芽細胞が、がん細胞との相互作用を介して獲得する特異な生物像の同定、2) 獲得した特異な生物像を規定するシグナルの解明、3) 特定したシグナルが活性化された線維芽細胞が、がんの進展を促進する機構の解明、あるいは薬剤感受性に与える分子機構の解明を試み、がん間質線維芽細胞の特異シグナルを制御する“がん間質細胞の分子標的治療法”の実現に向けた学術基盤の確立を目指したものである。研究期間内に、Podoplanin 分子を発現している CAFs は、EGFR 変異陽性肺腺癌の Gefitinib 初期耐性に関わる機構を解明した。

研究成果の概要(英文)：Cancer associated fibroblasts (CAFs) reportedly influence tumor progression via the secretion of extracellular matrix proteins, proteases, cytokines, and growth factors. Recently, the significance of CAFs was reported to be associated with resistance to molecular-targeted therapy. This study shows lung adenocarcinoma cell lines harboring EGFR activating mutation became more resistant to EGFR TKI when cocultured with PDPN expressing CAFs, compared with control CAFs in vitro. Furthermore, 105 postoperative recurrent patients with PDPN positive CAFs had a significantly lower EGFR TKIs response, compared with those with PDPN negative CAFs. Our studies show PDPN positive CAFs plays an important role in primary resistance to EGFR TKIs and may be an ideal therapeutic target for use in combination therapy with EGFR TKIs.

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：がん関連線維芽細胞 分子標的 がん微小環境

### 1. 研究開始当初の背景

がん組織内には、がん細胞のみならず、がん細胞周囲を取り巻く線維芽細胞、血管構成細胞、免疫担当細胞などの間質細胞も多数含まれる。1889年、Paget が “seed and soil” theory を提唱して以来、がんの生体内における増殖には、“seed (がん細胞)” および “soil (間質細胞により構成されるがん組織微小環境)” 双方の生物学的性質が重要であることが示唆されてきた。本研究の目的は、がん間質細胞、特に線維芽細胞の生物学的特性を形成する特異シグナルに関わる標的分子を同定し、新たな制がん法、すなわち “がん間質細胞の分子標的治療法” を確立することである。

### 2. 研究の目的

がん細胞の生存・増殖に関わる様々なシグナル伝達が明らかになり、それら分子を特異的に阻害する分子標的薬は、現在のがん薬物療法の主役を担っている。その一方で、分子標的薬に対して治療抵抗性を示す症例も少なからず認められ、臨床的に重要な問題となる。がん細胞を取り囲む線維芽細胞は、がん細胞の生存・増殖に関わるシグナルに重要な影響を与えており、治療抵抗性の一要因と考えた。本研究の目的は 1) がん細胞の分子標的薬感受性に決定的な影響を与える線維芽細胞の同定、生物像の解析を行い、2) 病理標本を用いて、上記線維芽細胞の存在と分子標的薬感受性との相関を検証し、3) 線維芽細胞由来の機能分子の同定を試みることにより、“効果的な分子標的治療法” の実現に向けた学術基盤を確立し、創薬応用を目指すことである。

### 3. 研究の方法

1) ヒトがん組織より cancer associated fibroblasts (CAFs) を分離培養し、hTERT 遺伝子を導入することにより不死化する。2) CAFs のクローン株を作製する。3)

Podoplanin (PDPN) 陽性 CAFs および肺腺癌細胞株 (PC-9) を共培養し、EGFR-TKI を加えることにより、PC-9 細胞の生存率を計測する。コントロールとしては PDPN 陰性 CAFs を用いる。

4) PDPN-CAFs との共培養において、PC-9 細胞の pERK, pAkt の発現を検討する。5) 手術時に得られた病理組織標本を用いて免疫組織染色を行い、CAFs における podoplanin 蛋白の発現を評価する。その患者の診療情報の匿名化をした上で、患者背景、治療詳細等の診療情報をレトロスペクティブに収集し、組織検体を用いた線維芽細胞における podoplanin の発現の有無による EGFR-TKI の奏功を検討する。

6) CAFs を標的とした “間質細胞の分子標的治療法” の妥当性を評価する。

### 4. 研究成果

1-2) ヒト肺がん組織より cancer associated fibroblasts (CAFs) を分離培養した。その後 hTERT 遺伝子を lentiviral vector (蛍光タンパク発現) を用いて遺伝子導入することにより寿命延長することを確認した。蛍光タンパクを指標に single cell sorting を行い、CAFs のクローン株を作製することを試みた。現在までに、4 症例の CAFs より 31 クローンを得ることに成功した。

3) PC-9+ PDPN-CAFs 群では、EGFR-TKI 投与後に 59.9% の細胞が生存していた。一方 PC-9+control CAFs 群では 48.2% の細胞が生存した ( $p < 0.05$ )。一方、CAFs の PDPN 分子をノックダウンすることにより、PC-9 細胞の生存率増加はキャンセルされた。以上から、CAFs に発現している PDPN 分子は、PC-9 細胞の EGFR-TKI 耐性に寄与していることが確認された。

4) EGFR-TKI 投与後の PC-9 細胞の pERK1/2, pAkt 発現レベルは、PDPN-CAFs との共培養群において、有意に上昇していた。

5) 術後再発肺腺癌症例を用いたレトロスペクティブな解析を行った。再発時 EGFR-TKI に対する奏効率は、原発巣において

PDPN-CAFs 陽性症例において有意に低かった。以上の結果から、PDPN-CAFs は、EGFR-TKI に対して機能的に抵抗性に働いている可能性が示唆された。

#### 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 5 件 )

1) Takahashi A, Ishii G\*, Kinoshita T, Yoshida T, Umemura S, Hishida T, Yoh K, Niho S, Goto K, Ohmatsu H, Ohe Y, Nagai K, Ochiai A.

Identification of prognostic immunophenotypic features in cancer stromal cells of high-grade neuroendocrine carcinomas of the lung.

J Cancer Res Clin Oncol. 2013;139(11):1869-78.

査読あり

2) Podoplanin-positive cancer associated fibroblast could have prognostic value independent of cancer cell phenotype in stage I lung squamous cell carcinoma: Utility of combining analysis of both cancer cell phenotype and cancer associated fibroblast phenotype.

Ono S, Ishii G\*, Nagai K, Takuwa T, Yoshida J, Nishimura M, Hishida T, Aokage K, Fujii S, Ikeda N, Ochiai A.

Chest 2013;143(4):963-70.

査読あり

3) Tumor promoting effect of podoplanin-positive fibroblasts is mediated by enhanced RhoA activity.

Ito S, Ishii G\*, Hoshino A, Hashimoto H, Neri S, Kuwata T, Higashi M, Nagai K, Ochiai A.

Biochem Biophys Res Commun, 2012;422(1):194-9

査読あり

4) Recruitment of podoplanin positive cancer-associated fibroblasts in metastatic lymph nodes predicts poor prognosis in pathological N2 Stage III lung adenocarcinoma.

Neri S, Ishii G\*, Taira T, Hishida T, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K, Ochiai A.

Ann. Surg. Oncol. 2012;19(12):3953-62.

査読あり

5) Prognostic significance of cancer associated stromal cells in stage I lung adenocarcinoma patients.

Itoh M, Ishii G\*, Nagai K, Maeda R, Nakano Y, Ochiai A.

Chest 2012;142(1):151-8

査読あり

[ 学会発表 ] ( 計 5 件 )

1) 石井 源一郎, 祢里 真也, 吉田 達哉, 落合 淳志. 免疫・がん・微小環境のクロストーク がん進展に寄与する Cancer associated fibroblasts(CAFs)の病理生物像の解析

日本病理学会、2013年、札幌

2) 腫瘍微小環境の病理病態 がん関連線維芽細胞が、がん進展に及ぼす病態病理機構

石井 源一郎, 祢里 真也, 落合 淳志

日本癌学会総会、2012年、札幌

3) 肺腺癌における間質へ浸潤する制御性 T 細胞の意義

木下 智成, 石井 源一郎, 平岡 伸介, 青景 圭樹, 菱田 智之, 吉田 純司, 永井 完治,

落合 淳志

日本癌学会総会、2012年、札幌

4) 神経内分泌腫瘍で過剰発現する PTPRZ1 の肺小細胞がん進展における機能解析

牧野嶋 秀樹, 石井 源一郎, 小嶋 基寛, 藤井 誠志, 桑田 健, 落合 淳志

日本癌学会総会、2012年、札幌

5) 大腸がんの転移を促進する漿膜直下微小環境の特徴

小嶋 基寛, 石井 源一郎, 牧野嶋 秀樹, 樋口 洋一, 斎藤 典男, 落合 淳志

日本癌学会総会、2012年、札幌

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 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 0 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

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

石井 源一郎 (Ishii, Genichiro)

独立行政法人国立がん研究センター・臨床

開発センター・ユニット長

研究者番号：00270869

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし