

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790815

研究課題名(和文) 癌関連線維芽細胞(CAF)を標的とした胸膜中皮腫の新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Development of pleural mesothelioma treatment targeting for cancer-associated fibroblasts

研究代表者

金地 伸拓(Kanaji, Nobuhiro)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60403789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：悪性胸膜中皮腫は、切除不能で発見されることが多く、化学療法に抵抗性となった場合の予後は不良である。近年、癌の周囲に存在する線維芽細胞が、癌の進行に関与していることが報告され、癌関連線維芽細胞(CAF)と呼ばれている。悪性胸膜中皮腫と線維芽細胞との相互作用は、ほとんどわかっていないため、本研究ではその関連を調べた。

本研究により、肺線維芽細胞由来の培養液により悪性胸膜中皮腫細胞の悪性度(遊走能や浸潤能)は増強した。また、肺線維芽細胞から分泌されるフィブロネクチンや肝細胞増殖因子(HGF)が、遊走能や浸潤能の増強に関与することが判明した。悪性胸膜中皮腫の治療に、これらが標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Most cases of malignant pleural mesothelioma are inoperable, and have poor prognosis when they are chemotherapy-resistance. Recently, cancer-associated fibroblasts (CAF) had been reported, that are observed around cancer cells and have a role on cancer progression. In this study, association between malignant pleural mesothelioma cells and fibroblasts were investigated.

Cell migration was assessed by chemotaxis, and cell invasion was assessed by Matrigel invasion assay. The culture media derived from lung fibroblasts augmented migratory and invasive abilities of malignant pleural mesothelioma cells. Exogenous fibronectin and hepatocyte growth factor (HGF) augmented mesothelioma cell migration and invasion, respectively. It was found that fibronectin and HGF were released from lung fibroblasts.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：悪性胸膜中皮腫 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫は胸膜表面の中皮細胞の腫瘍化により生じる疾患であり、切除不能の状態と診断されることが多い。切除不能の悪性胸膜中皮腫の治療にはペメトレキセドやシスプラチンなどの抗癌剤が用いられるが、抗癌剤に耐性となった場合の予後は不良であり、新たな治療法の開発が望まれる。

上皮間葉転換(EMT)は、生理的にみられるのみならず、肺癌や乳癌などの悪性腫瘍の悪性度亢進をもたらすことが報告されている。また、癌関連線維芽細胞(CAF)は、癌細胞塊の周囲にみられる線維芽細胞であり、肺癌や乳癌で悪性度を亢進させ、患者の予後を不良にすることが報告されている。

悪性胸膜中皮腫と線維芽細胞との相互作用はほとんど報告がなく、不明な部分が多い。しかし、他の癌と同様に、線維芽細胞は悪性胸膜中皮腫の悪性度を亢進させる可能性が考えられる。そうであれば、線維芽細胞を標的とすることが、悪性胸膜中皮腫の新たな治療となりうる可能性がある。

2. 研究の目的

上皮型悪性胸膜中皮腫細胞株と肺線維芽細胞を用いて、その相互作用を調べることを目的とした。具体的には、(1)胸膜中皮腫細胞が線維芽細胞の性質をCAF様に変化させるかどうかを確認すること、(2)線維芽細胞が、胸膜中皮腫細胞に対してEMT様の変化を誘導するかどうかを確認すること、および(3)これらの変化に関わる因子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

3種類の悪性胸膜中皮腫細胞株(H28, H226, H2052)および3種類の肺線維芽細胞(HFL1, MRC5, IMR90)を用いる。

(1)悪性胸膜中皮腫細胞株の培養液を採取し、線維芽細胞のコラーゲンゲル収縮能に与える影響を確認する。

(2)悪性胸膜中皮腫細胞株の培養液中のTGF- β やPDGFの濃度を測定し、それらの因子が、線維芽細胞のコラーゲンゲル収縮能に与える影響を確認する。

(3)悪性胸膜中皮腫細胞株にTGF- β 1を加え、EMTが生じるかどうかを確認する。

(4)肺線維芽細胞の培養液を採取し、悪性胸膜中皮腫細胞株の遊走能に与える影響をchemotaxisで確認する。

(5)肺線維芽細胞の培養液が悪性胸膜中皮腫細胞株の浸潤与える影響をMatrigel invasion assayで評価する。

(6)細胞培養液中のfibronectin, hepatocyte growth factor (HGF), およびepidermal growth factor (EGF)の濃度をELISAで測定する。

(7)fibronectinやHGFが悪性胸膜中皮腫細胞株の遊走能や浸潤能に与える影響を評価する。

(8)悪性胸膜中皮腫細胞株をマウスの皮下に接種し、腫瘍マウスモデルを作成する。線維芽細胞を同時に接種した場合に、腫瘍形成に影響があるかどうかを確認する。

4. 研究成果

多くの実験において、3種類の悪性胸膜中皮腫細胞株(H28, H226, H2052)および3種類の肺線維芽細胞(HFL1, MRC5, IMR90)を用いた。

(1)悪性胸膜中皮腫細胞株の培養液により、線維芽細胞のコラーゲンゲル収縮能は増強した。

(2)悪性胸膜中皮腫細胞株の培養液中にTGF- β 1が認められ、TGF- β 1により、線維芽細胞のコラーゲンゲル収縮能は増強した。PDGF-BBも悪性胸膜中皮腫細胞株の培養液中に認められたが、低濃度であり、その濃度においては、線維芽細胞のコラーゲンゲル収縮能に影響を及ぼさなかった。

(3)悪性胸膜中皮腫細胞株にTGF- β 1を加え、EMTマーカー(紡錘形の細胞形態変化、E-cadherinの発現やN-cadherinの増加など)を評価したが、EMTマーカーの変化は認めなかった。

(4)肺線維芽細胞の培養液により悪性胸膜中皮腫細胞株の遊走能は亢進した。

(5)肺線維芽細胞の培養液により悪性胸膜中皮腫細胞株の浸潤能は亢進した。

(6)線維芽細胞培養液中にfibronectinおよびHGFを認めた。EGFは検出されなかった。

(7)fibronectinは悪性胸膜中皮腫細胞株の遊走能を亢進した。HGFは、浸潤能を亢進した。H28細胞に限れば、HGFにより遊走能も亢進した。

(8)H226細胞をマウスの皮下に接種し、腫瘍マウスモデルを作成した。線維芽細胞(HFL1あるいはMRC5)を同時に接種した場合に、腫瘍形成に明らかな違いは認められなかった。

これらの結果から、肺線維芽細胞から分泌されるfibronectinやHGFが悪性胸膜中皮腫細胞の悪性度を増強している可能性があり、それらを標的とすることで、悪性胸膜中皮腫の新たな治療となりうる可能性があることが考えられた。

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10件)

1. Kanaji N, Tadokoro A, Watanabe N, Inoue T, Ishii T, Dobashi H, Bando H. S. Increases in serum CYFRA21-1 concentration during successful treatment with crizotinib. Am J Case Rep. 2014 Nov 3;15:480-4 査読有り

2. Kanaji N, Tadokoro A, Susaki K, Yokokura S, Ohmichi K, Haba R, Watanabe N, Bandoh S, Ishii T, Dobashi H, Matsunaga T. Higher susceptibility of NOD/LtSz-scid Il2rg (-/-) NSG mice to xenotransplanted lung cancer cell lines. *Cancer Manag Res*. 2014 Oct 21;6:431-6 査読有り
 3. Kanaji N, Watanabe N, Kita N, Bandoh S, Tadokoro A, Ishii T, Dobashi H, Matsunaga T. Paraneoplastic syndromes associated with lung cancer. *World J Clin Oncol*. 2014 Aug 10;5(3):197-223 査読有り
 4. Kanaji N, Basma H, Nelson A, Farid M, Sato T, Nakanishi M, Wang X, Michalski J, Li Y, Gunji Y, Feghali-Bostwick C, Liu X, Rennard SI. Fibroblasts that resist cigarette smoke-induced senescence acquire profibrotic phenotypes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014 Sep 1;307(5):L364-73 査読有り
 5. Kanaji N. Prognosis of patients with paraneoplastic syndromes associated with lung cancer. *Austin J Pulm Respir Med* 2014; 1: 3 査読有り
 6. Kanaji N, Kushida Y, Bandoh S, Ishii T, Haba R, Tadokoro A, Watanabe N, Takahama T, Kita N, Dobashi H, Matsunaga T. Membranous glomerulonephritis associated with mycobacterium shimoidei pulmonary infection. *Am J Case Rep* 2013; 14: 543-547 査読有り
 7. Kanaji N, Bandoh S, Hayashi T, Haba R, Watanabe N, Ishii T, Kunitomo A, Takahama T, Tadokoro A, Imataki O, Dobashi H, Matsunaga T. *EGFR* mutation identifies distant squamous cell carcinoma as metastasis from lung adenocarcinoma. *World J Respirol* 2013;3(2):38-43 査読有り
 8. Kanaji N, Nelson A, Wang X, Sato T, Nakanishi M, Gunji Y, Basma H, Michalski J, Farid M, Rennard SI, Liu X. Differential roles of JNK, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinases on endothelial cell tissue repair functions in response to tumor necrosis factor- α . *J Vasc Res*. 2013;50(2):145-56 査読有り
 9. Kanaji N, Bandoh S, Ishii T, Tadokoro A, Watanabe N, Takahama T, Haba R, Imataki O, Dobashi H, Matsunaga T. Detection of EML4-ALK fusion genes in a few cancer cells from transbronchial cytological specimens utilizing immediate cytology during bronchoscopy. *Lung Cancer*. 2012 Aug;77(2):293-8 査読有り
 10. Kanaji N, Nelson A, Allen-Gipson DS, Sato T, Nakanishi M, Wang X, Li Y, Basma H, Michalski J, Farid M, Rennard SI, Liu X. The p38 Mitogen-activated Protein Kinases Modulate Endothelial Cell Survival and Tissue Repair. *Inflamm Res*. 2012;61:233-44 査読有り
- 〔学会発表〕(計 6 件)
1. 金地伸拓 渡邊直樹 石井知也 坂東修二. 肺癌モデルとしての NSG マウスの有用性の検討. 第 55 回日本肺癌学会学術講演会 2014 年 11 月 国立京都国際会館 (京都府)
 2. 金地伸拓 渡邊直樹 喜多信之 田所明 石井知也 坂東修二 松永卓也. 線維芽細胞が悪性胸膜中皮腫細胞の遊走能を亢進させる因子の検討. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会 2014 年 4 月 大阪国際会議場 (大阪府)
 3. 金地伸拓 坂東修二 石井知也 渡邊直樹 田所明 高濱隆幸 松永卓也. Crizotinib により食道海洋を来した肺腺癌の 1 例. 第 11 回日本臨床腫瘍学会学術講演会 2013 年 8 月 仙台国際センター・東北大学百周年記念会館 川内萩ホール (宮城県)
 4. 金地伸拓 田所明 渡邊直樹 高濱隆幸 石井知也 坂東修二 松永卓也. 肺癌細胞検体からの RET 融合遺伝子、ROS1 融合遺伝子及び BRAF 遺伝子変異の検出. 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会 2013 年 4 月 東京国際フォーラム (東京都)
 5. 金地伸拓 石井知也 渡邊直樹 高濱隆幸 田所明 坂東修二 波平浩吉. 多剤併用化学療法が奏効した Mycobacterium shimoidei 感染症の 1 例. 第 47 回日本呼吸器学会中国・四国地方会 2012 年 7 月 海峽メッセ下関 (山口県)
 6. 金地伸拓 田所明 石井知也 坂東修二. 肺癌関連線維芽細胞 (CAF) を誘導する因子の検討. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会 2012 年 4 月 神戸国際会議場・展示場・ポートピアホール (兵庫県)

〔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

金地 伸拓 (Kanaji Nobuhiro)
香川大学医学部 血液・免疫・呼吸器内科
助教
研究者番号：60403789

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：