

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860276

研究課題名(和文) がん関連線維芽細胞におけるメタロプロテアーゼの機能解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of metalloproteinases in cancer-associated fibroblasts

研究代表者

下田 将之 (Shimoda, Masayuki)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70383734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：がん関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast: CAF)とがん細胞の相互作用は腫瘍進展に大きく寄与することが知られている。本研究では、がん間質やCAFで発現するメタロプロテアーゼを網羅的に解析した。これまでのデータベースを用いて、がん間質で種々のメタロプロテアーゼが高発現していることを明らかにするとともに、CAFで高発現するメタロプロテアーゼ候補分子を同定した。また、CAF由来エクソソームでは一部のメタロプロテアーゼが特異的に高発現していることも明らかとなった。以上の結果から、CAFにおけるメタロプロテアーゼ発現異常が腫瘍進展に関与している可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Carcinoma-associated fibroblasts (CAFs), frequently observed in tumor stroma, are more capable of maintaining cancer stem cells and promoting tumor growth and angiogenesis through their interactions with carcinoma cells. In this study, we performed comprehensive analysis of metalloproteinases in tumor stroma and CAFs. We found that, in stroma associated with human cancer, several metalloproteinases were significantly upregulated, whereas there was a trend towards decreased expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs). By analyzing CAF microarray datasets, we identified several candidates for CAF-specific metalloproteinases. CAFs also secreted exosomes containing more metalloproteinases including ADAM10 compared to normal adjacent fibroblasts. These data suggest that dysregulation of metalloproteinases in CAFs may contribute to their tumor-propagating ability in patients.

研究分野：実験病理学

キーワード：がん 線維芽細胞 メタロプロテアーゼ

## 1. 研究開始当初の背景

がん組織は、がん細胞と間質成分から構成され、間質成分としては線維芽細胞、血管内皮細胞、炎症細胞などの多種の細胞、細胞膜表面や細胞間に局在する細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) および、それに結合する生理活性物質 (増殖因子、サイトカイン、ケモカインなど) が含まれる。その中でも、がん関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast: CAF) は腫瘍間質の主要な構成成分であり、これまでの病理学的な検討から、種々のがん組織において、CAF の存在ががんの悪性度と相関することが報告されるとともに、がん細胞と CAF との共培養やマウスへの移植モデルを用いた研究により、実験的にも CAF ががん細胞の増殖・浸潤や血管新生を促進し、さらにはがん幹細胞の維持や転移促進にも関与することが実証されつつある Kalluri et al: Nature Rev Cancer, 2006; Shimoda et al: Semin Cell Dev Biol, 2010。

腫瘍間質においては、線維芽細胞やマクロファージといった間質細胞の参画により、ECM 成分や生理活性物質の劇的な変化を伴う病的組織構築を来し、がん細胞生存に有利な環境が形成される。特に ECM 成分に関しては、腫瘍組織内で異常に蓄積あるいは分解された tenascin C や periostin などががん幹細胞維持やいわゆる”前転移ニッチ”形成において重要な役割を果たすことが提唱されている Oskarsson et al: EMBO J, 2011。 メタロプロテアーゼである MMP(matrix metalloproteinase) と ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 遺伝子ファミリーは、腫瘍組織内の ECM や生理活性物質代謝において中心的な役割を果たしており、がんの進展に大きく関与することが知られている。これらの中でも、近年 ADAM 分子は細胞膜上の増殖因子・レセプター・細胞接着分子のシェディング、ECM 分解、インテグリンへの結合、細胞内シグナル伝達などを介して細胞の接着・運動・増殖に関わる多機能分子であり、がん細胞の増殖・浸潤・転移への関与が注目されている Blobel: Nat Rev Mol Cell Biol, 2007; Mochizuki et al: Cancer Sci, 2007; Blobel: Nature Rev Cancer, 2008。

## 2. 研究の目的

これまでにがん間質中の線維芽細胞 (CAF) とがん細胞の相互作用はがん幹細胞の維持、血管新生、転移などに大きく寄与することが示されている。本研究では、ヒト CAF で高発現するメタロプロテアーゼを網羅的に検索し、CAF の形質維持・腫瘍促進作用におけるこれらメタロプロテアーゼの役割を解析するとともに、CAF 由来エクソソーム中のメタロプロテアーゼによる転移促進作用の可能性を病理形態学、分子生物学、生化学の各手段を駆使して研究し、CAF による新規がん転移メカニズムを解明する。これらの研究を通して、ヒトがんの機能的分子病理診断への貢献を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) CAF で高発現するメタロプロテアーゼ分子の同定・解析

マウス・ヒト由来 CAF で高発現するメタロプロテアーゼ分子の同定: マウス由来 CAF microarray database (マウス皮膚がん由来 CAF、マウス乳がん由来 CAF とこれらの control fibroblasts) を解析し、マウス由来 CAF で高発現するメタロプロテアーゼ分子の同定を行った。また、ヒト浸潤性乳癌あるいは非癌乳癌間質から microdissection 法により採取した癌および非癌間質組織を用いた database を用いて、乳癌間質において発現変動するメタロプロテアーゼ関連分子を解析した。さらに、ヒト肺癌組織より単離した CAF におけるメタロプロテアーゼ関連分子の発現を解析した。

同定メタロプロテアーゼ分子による CAF の形質維持および腫瘍促進作用の解析: において同定した CAF で高発現するメタロプロテアーゼを欠損したマウスより dermal fibroblast を単離・培養し、CAF マーカーなどの発現解析を行うとともに、現在同定メタロプロテアーゼ欠損マウスを用いてがん移植モデルを作製し、腫瘍増殖・浸潤促進作用における CAF 高発現メタロプロテアーゼの関与を解析している。

ヒト肺がん間質における同定メタロプロテアーゼ分子の発現解析: ヒト肺がん手術材料パラフィン切片を用いて腫瘍間質内線維芽細胞における同定メタロプロテアーゼの発現を免疫染色法にて検討した。

### (2) CAF 由来エクソソーム中メタロプロテアーゼ分子のプロテオーム解析

CAF あるいは NAF の培養上清から精製したエクソソーム中メタロプロテアーゼの発現レベルをイムノプロット法あるいは質量分析法を用いて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果:

#### CAF で高発現するメタロプロテアーゼ分子の同定・解析

はじめに、ヒト癌組織より採取した癌間質あるいは CAF において発現変動するメタロプロテアーゼ分子およびその阻害分子の同定を行った。ヒト浸潤性乳癌あるいは非癌乳癌間質から microdissection 法により採取した癌および非癌間質組織を用いた database の解析では、乳癌間質において種々のメタロプロテアーゼ分子の発現が有意に上昇しているとともに、メタロプロテアーゼ阻害分子である TIMP3 (tissue inhibitor of metalloproteinases-3) の発現が有意に低下していることを見出した。また、ヒト肺癌組織より採取した CAF では、同一患者の非腫瘍部より採取したコントロール線維芽細胞と比べて、種々の TIMP 分子の発現が有意に低下していることが明らかとな

った。以上の結果から癌間質におけるメタロプロテアーゼ発現・活性のバランスが腫瘍間質の維持に關与している可能性が示唆された。一方、マウス由来 CAF microarray database の解析から、CAF で特異的に高発現するメタロプロテアーゼ候補分子としてコラゲナーゼ分子を同定した。ヒト肺癌組織においても、標的コラゲナーゼはがん細胞とともに一部の間質細胞で発現することを見出し、現在標的コラゲナーゼノックアウトマウスを用いたがんモデルの作製・解析を進めている。

CAF 由来エクソソーム中メタロプロテアーゼ分子の解析

ヒト CAF 由来エクソソームのプロテオーム解析では、ヒト CAF 由来エクソソームにおいて ADAM10 の発現上昇が見られる一方で、メタロプロテアーゼの内因性インヒビターである TIMP の一部の発現が低下しており、CAF 由来エクソソームではメタロプロテアーゼ活性が相対的に上昇している可能性が示唆される。

(2) 得られた成果の国内外の位置づけとインパクト

近年、臨床医学に貢献する病理診断として、がん細胞の有無や組織型を判定する質的診断とともに、最適な分子標的治療法選択の判定、あるいはがんの悪性度や転移能を予測する機能的診断の重要性が増している。本研究の成果は、CAF で発現するメタロプロテアーゼ活性の意義を明らかにするだけでなく、CAF 由来エクソソームの役割を解明することにより、腫瘍内微小環境に焦点を当てた機能的分子病理診断に貢献し、新たな診断・治療の開発に大きな展開をもたらす可能性があると期待される。

(3) 今後の展望

今後、ノックアウトマウスおよびヒト検体を用いて、CAF 特異的に高発現するメタロプロテアーゼの生物学的機能解析を進めるとともに、ヒト CAF 由来エクソソーム中メタロプロテアーゼの意義についても解析を進める。これらの解析をもとに、CAF 特異的に高発現するメタロプロテアーゼ関連分子について、分子病理診断の候補分子としての可能性をさらに検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

(1) **Shimoda M**, Jackson HW and Khokha R: Tumor suppression by stromal TIMPs. *Mol Cell Oncol*, in press. (DOI: 10.4161/23723556.2014.975082)(査読：有)

(2) **Shimoda M**, Horiuchi K, Sasaki A, Tsukamoto T, Okabayashi K, Hasegawa H, Kitagawa Y and Okada Y: Epithelial cell-derived a disintegrin and metalloproteinase-17 confers resistance to colonic inflammation through EGFR activation. *EBioMedicine*, 5:114-24, 2016. (DOI:

10.1016/j.ebiom.2016.02.007) (査読：有)

(3) Miyamae Y, Mochizuki S, **Shimoda M**, Ohara K, Abe H, Yamashita S, Kazuno S, Ohtsuka T, Ochiai H, Kitagawa Y and Okada Y: ADAM28 is expressed by epithelial cells in human normal tissues and protects from C1q-induced cell death. *FEBS J*, 283:1574-94, 2016. (DOI: 10.1111/febs.13693) (査読：有)

(4) Ota M, Mochizuki S, **Shimoda M**, Abe H, Miyamae Y, Ishii K, Kimura H, Okada Y: ADAM23 is downregulated in side population and suppresses lung metastasis of lung carcinoma cells. *Cancer Sci*, 107:433-43, 2016. (DOI: 10.1111/cas.12895) (査読：有)

(5) Mizuno S, Yoda M, **Shimoda M**, Tohmonda T, Okada Y, Toyama Y, Takeda S, Nakamura M, Matsumoto M and Horiuchi K: A disintegrin and metalloprotease 10 is indispensable for maintenance of the muscle satellite cell pool. *J Biol Chem*, 290:28456-28464, 2015. (DOI: 10.1074/jbc.M115.653477) (査読：有)

(6) Anzai A, **Shimoda M**, Endo J, Kohno T, Katsumata Y, Matsushashi T, Yamamoto T, Ito K, Yan X, Shirakawa K, Shimizu-Hirota R, Yamada Y, Ueha S, Shinmura K, Okada Y, Fukuda K and Sano M: Adventitial CXCL1/G-CSF expression in response to acute aortic dissection triggers local neutrophil recruitment and activation leading to aortic rupture. *Circ Res*, 116:612-623, 2015. (DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304918) (査読：有)

(7) **Shimoda M**, Principe S, Jackson HW, Luga V, Fang H, Molyneux SD, Shao YW, Aiken A, Waterhouse PD, Karamboulas C, Hess FM, Ohtsuka T, Okada Y, Ailles L, Ludwig A, Wrana JL, Kislinger T and Khokha R: Loss of the Timp gene family is sufficient for the acquisition of the CAF-like cell state. *Nat Cell Biol* 16:889-901, 2014. (DOI: 10.1038/ncb3021) (査読：有)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) **下田将之**: 病的組織におけるメタロプロテアーゼの機能解析研究、第104回日本病理学会総会、2015年5月1日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

(2) **下田将之**、Rama Khokha: 癌間質線維芽細胞形質獲得におけるTIMP分子の機能解析、第103回日本病理学会総会、2014年4月24日、広島国際会議場(広島県広島市)

〔図書〕(計 7 件)

(1) **下田将之**、岡田保典: 「メタロプロテアーゼと炎症性疾患」、『実験医学』、羊土社、32巻17号、pp.2829-37、2014.

(2) **下田将之**、岡田保典: 「メタロプロテアーゼによる組織内微小環境因子代謝」、『病理と臨床』、文光堂、32巻1号、pp.24-30、2014.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

下田 将之（Shimoda Masayuki）  
慶應義塾大学・医学部・専任講師  
研究者番号：70383734

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし