

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460997

研究課題名(和文) 肝癌前駆・幹細胞と癌微小環境構成細胞の解明：肝癌撲滅を目指して

研究課題名(英文) Analysis of hepatic stem and progenitor cells in the tumor microenvironment of liver metastasis: For cancer metastasis suppression

研究代表者

末次 淳 (Suetsugu, Atsushi)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30340079

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)：癌は、原発巣及び転移巣において癌微小環境を形成し、癌組織内は癌細胞周囲の癌構成細胞が重要な役割を果たしている。原発巣及び肝転移巣において、癌関連線維芽細胞や腫瘍関連マクロファージの重要性が明らかとなった。癌細胞内のエクソソームが転移前に線維芽細胞に入り込み、転移する環境を形成することを証明した。また、血液中にも分泌され、エクソソームを介した癌細胞・周囲細胞間の存在を確認した。腫瘍細胞内のエクソソームが、癌形成時・転移時においての重要な役割を果たしていると証明された。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells form microenvironment in primary and metastatic tumor. The cancer-associated cells play an important role. Cancer-associated fibroblast cells and tumor-associated macrophages are important in the liver metastasis. Cancer cells shed exosomes and transfer exosomal molecules to fibroblast cells during tumor progression. We confirmed that cancer cells release exomes into the circulation of mice with liver metastasis. We collected blood of mice and detected exosomes. Imaging of exosomes can contribute to understanding the role of intercellular communication in tumor progression. Tumor-driven exosomes have been viewed as a mediator to condition tissues and prepare niches for metastasis.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝癌 幹細胞 癌微小環境

1. 研究開始当初の背景

癌は原発巣及び転移巣において微小環境を形成し、その癌組織内は癌細胞のみでなく、周囲の癌関連細胞が重要な役割を果たしていることが報告されている。人由来大腸癌細胞株の肝転移や、ヒトの膀胱癌組織をマウスに移植し、蛍光タンパク技術を用いてそれら癌微小環境を形成する細胞をシングルレベルで画像化し、癌細胞周囲の癌関連細胞特に癌関連線維芽細胞 (cancer associated fibroblasts) や腫瘍関連マクロファージ (tumor associated macrophages) の重要性を報告してきた。このような事実により、癌形成及び転移時において、癌細胞と周囲の細胞間のコミュニケーションは必要である。また近年、細胞が分泌するエンドソーム由来のエクソソームの中に、遺伝物質である non-coding RNA が発見され、細胞及び個体間においてメッセンジャーとしての役割を果たしていることが明らかになってきている。最近になり、癌細胞が自らの microRNA をエクソソームに封入して分泌していることが明らかになってきた。癌細胞は自らの増殖及び転移において、細胞内外の輸送システムを利用していると思われる。

2. 研究の目的

本研究の目標は、癌発生時における癌細胞と癌微小環境構成細胞の役割について明らかにすること、また、癌転移時における癌細胞および癌構成にて中心的役割を担う癌関連線維芽細胞の性質を解明することであり、最終的には、背景肝の違いによる癌形成時および転移性癌の癌細胞および癌形成周囲細胞の相互作用を解明することにある。

3. 研究の方法

蛍光タンパク (GFP、RFP) を導入した癌細胞や細胞周期を判別できる細胞株を NUDE マウスの脾臓や同所移植により、様々な担癌・転移マウスを作成する。癌結節は、蛍光タンパクで標識してあるため癌細胞および癌構成周囲細胞内の間質系細胞の区別は明らかになる。転移モデル作成後、蛍光顕微鏡 FV1000 を用いて、原発巣および転移巣の癌細胞と癌関連線維芽細胞の相互作用について画像的に解析する。一部の癌結節を *in vitro* にて数日培養し、癌細胞と癌関連周囲細胞の解明を行う。さらにはエクソソームを標識した細胞株を用いて同様のモデル作成により癌細胞内のエクソソームの関わりや miRNA を解析する。さらに脂肪肝モデルマウスを作成し、背景肝の違いによる癌形成時および転移性癌の癌細胞および癌形成周囲細胞の相互作用を解明する。

4. 研究成果

癌構成における癌細胞と癌微小環境構成細胞の役割について明らかにすることが本

研究の目標の一つであった。転移性肝癌において癌細胞と癌関連線維芽細胞の相互作用を癌細胞・線維芽細胞をシングルレベルで画像化し、特に癌細胞が間質細胞に近接存在する状態下で癌細胞分裂像が認められることを視覚的に証明し、さらに転移性肝癌において非癌部よりも癌部および癌部辺縁にコラーゲン・線維性タンパクが多いことも証明し報告した。微小環境の細胞の中でも特に癌関連線維芽細胞が癌形成・転移時に重要であることが証明され、癌形成時に重要な細胞であることが解明された。さまざまな癌種の癌転移時の微小環境を検討したところ、転移部位によって癌微小環境の細胞構成が異なること、また癌腫により微小環境を構成する細胞が異なることが明らかになり、すべての癌において癌関連線維芽細胞が重要であるとは限らないことが解明され論文報告した。癌構成にて中心的役割を担う癌関連線維芽細胞の性質を解明することであった。肝臓転移の際に癌エクソソームが転移巣を形成するときに、転移前に特に線維芽細胞内に入り込み、転移する環境を形成することを視覚的に証明した。脂肪肝・非アルコール性脂肪肝などが増加傾向にあるため、背景肝の違いによる癌形成時および転移性癌の癌細胞および癌形成周囲細胞の相互作用を解明し、現在も検討を進めている。

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13件)

以下、全ての論文査読有

1. Suetsugu A, Matsumoto T, Hasegawa K, Nakamura M, Kunisada T, Shimizu M, Saji S, Moriwaki H, Bouvet M, Hoffman RM. Color-coded live imaging of heterokaryon formation and nuclear fusion of hybridizing cancer cells. *Anticancer Res* 2016;36:3827-3831.
2. Matsumoto T, Suetsugu A, Hasegawa K, Nakamura M, Aoki H, Kunisada T, Tsurumi H, Shimizu M, Hoffman RM. Color-coded imaging of syngeneic orthotopic malignant lymphoma interacting with host stromal cells during metastasis. *Anticancer Res* 2016;36:1473-1478.
3. Matsumoto T, Suetsugu A, Hasegawa K, Nakamura M, Shibata Y, Aoki H, Kunisada T, Tsurumi H, Shimizu M, Bouvet M, Hoffman RM. A mouse model of fluorescent protein-expressing disseminated peritoneal lymphoma for fluorescence-guided surgery. *Anticancer Res* 2016;36:4483-4487.

4. Hasegawa K, Suetsugu A, Nakamura M, Matsumoto T, Aoki H, Kunisada T, Bouvet M, Shimizu M, Hoffman RM. Imaging nuclear-cytoplasmic dynamics in primary and metastatic colon cancer in nude mice. *Anticancer Res* 2016;36:2113-2117.
 5. Hasegawa K, Suetsugu A, Nakamura M, Matsumoto T, Kunisada T, Shimizu M, Saji S, Moriwaki H, Bouvet M, Hoffman RM. Color-coded imaging enables fluorescence-guided surgery to resect the tumor along with the tumor microenvironment in a syngeneic mouse model of EL-4 lymphoma. *Anticancer Res* 2016;36:4443-4448.
 6. Suetsugu A, Hiroshima Y, Matsumoto T, Hasegawa K, Nakamura M, Shimizu M, Saji S, Moriwaki H, Bouvet M, Hoffman RM. Recruitment of Cancer-Associated Fibroblasts and Blood Vessels by Orthotopic Liver Tumors Imaged in Red Fluorescent Protein (RFP) Transgenic Nude Mice. *Anticancer Res* 2015;35:5821-5825.
 7. Suetsugu A, Momiyama M, Hiroshima Y, Shimizu M, Saji S, Moriwaki H, Bouvet M, Hoffman RM. Color-Coded Imaging of Breast Cancer-Metastatic Niche Formation in Nude Mice. *J Cell Biochem* 2015;116:2730-2734.
 8. Suetsugu A, Snyder CS, Moriwaki H, Saji S, Bouvet M, Hoffman RM. Imaging the Interaction of Pancreatic Cancer and Stellate Cells in the Tumor Microenvironment during Metastasis. *Anticancer Res* 2015;35:2545-2551.
 9. Matsumoto T, Suetsugu A, Shibata Y, Nakamura N, Aoki H, Kunisada T, Tsurumi H, Shimizu M, Hoffman RM. A Color-coded Imageable Syngeneic Mouse Model of Stromal-cell Recruitment by Metastatic Lymphoma. *Anticancer Res* 2015;35:4647-4654.
 10. Yano S, Hiroshima Y, Maawy A, Kishimoto H, Suetsugu A, Miwa S, Toneri M, Yamamoto M, Katz MH, Fleming JB, Urata Y, Tazawa H, Kagawa S, Bouvet M, Fujiwara T, Hoffman RM. Color-coding cancer and stromal cells with genetic reporters in a patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) model of pancreatic cancer enhances fluorescence-guided surgery. *Cancer Gene Ther* 2015;22:344-350.
 11. Yano S, Zhang Y, Miwa S, Tome Y, Hiroshima Y, Uehara F, Yamamoto M, Suetsugu A, Kishimoto H, Tazawa H, Zhao M, Bouvet M, Fujiwara T, Hoffman RM. Spatial-temporal FUCCI imaging of each cell in a tumor demonstrates locational dependence of cell cycle dynamics and chemoresponsiveness. *Cell Cycle* 2014;13:2110-2119.
 12. Hiroshima Y, Zhao M, Maawy A, Zhang Y, Katz MH, Fleming JB, Uehara F, Miwa S, Yano S, Momiyama M, Suetsugu A, Chishima T, Tanaka K, Bouvet M, Endo I, Hoffman RM. Efficacy of Salmonella typhimurium A1-R versus chemotherapy on a pancreatic cancer patient-derived orthotopic xenograft (PDOX). *J Cell Biochem* 2014;115:1254-1261.
 13. Shimizu M, Shirakami Y, Hanai T, Imai K, Suetsugu A, Takai K, Shiraki M, Moriwaki H. Pharmaceutical and nutraceutical approaches for preventing liver carcinogenesis: Chemoprevention of hepatocellular carcinoma using acyclic retinoid and branched-chain amino acids. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:124-135.
- [学会発表](計10件)
1. 107th American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting (2016年4月19日 New Orleans)
Imaging formation of the tumor microenvironment in orthotopic liver tumors in red fluorescent protein (RFP) transgenic nude mice. Suetsugu A, Hiroshima Y, Matsumoto T, Hasegawa K, Nakamura M, Shimizu M, Saji S, Moriwaki H, Bouvet M, Hoffman RM.
 2. 107th American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting (2016年4月19日 New Orleans)
Color-coded imaging of the tumor microenvironment of malignant lymphoma in a syngeneic mouse model
Matsumoto T, Suetsugu A, Hasegawa K, Nakamura M, Aoki H, Kunisada T, Tsurumi H, Shimizu M, Hoffman RM.
 3. 107th American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting (2016年4月18日 New Orleans)
Imaging of colon cancer-cell mitosis

- within liver metastasis in nude mice.
Hasegawa K, Suetsugu A, Nakamura M, Matsumoto T, Aoki H, Kunisada T, Shimizu M, Hoffman RM.
4. AACR Annual Meeting 2015 (2015年4月21日 Philadelphia)
Development of a syngeneic metastatic mouse model of malignant lymphoma.
Matsumoto T, Suetsugu A, Shibata Y, Nakamura N, Aoki H, Kunisada T, Shimizu M, Tsurumi H, Robert M. Hoffman.
5. 第41回日本急性肝不全研究会(2015年5月20日 熊本)
当院におけるB型肝炎再活性化対策の実態
今井健二、末次 淳、清水雅仁
6. Asian Pacific Digestive Week (APDW) (2014年11月24日 Bali)
Imaging exosome transfer from colon cancer cells to stroma at liver metastatic sites.
Suetsugu A, Homma K, Saji S, Moriwaki H, Osawa Y, Ochiya T, Robert M. Hoffman.
7. Experimental Biology 2014 FASEB J (2014年4月26日 San Diego)
Color-coded chemotherapy: S/G2-phase-trapping by methioninase pre-treatment, indicated by FUCCI imaging, enables highly effective cancer chemotherapy.
Yano S, Tome Y, Michelle Digman, Momiyama M, Suetsugu A, Enrico Gratton, Robert Hoffman.
8. AACR Annual Meeting(2014年4月7日 San Diego)
Real-time imaging of exosomes dynamic of cross-talking and cell trafficking in 3D Gelfoam® histoculture.
Yamamoto M, Miwa S, Hiroshima Y, Yano S, Uehara F, Matsumoto Y, Suetsugu A, Kimi Homma, Robert M. Hoffman.
9. AACR Annual Meeting(2014年4月7日 San Diego)
Telomerase-specific GFP-expressing adenovirus enables fluorescence-guided surgery (FGS) for patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) in nude mice
Yano S, Hiroshima Y, Ali Maawy, Matthew H.G. Katz, Jason B. Fleming, Kishimoto H, Suetsugu A, Uehara F, Miwa S, Tazawa H, Michael Bouvet, Fujiwara T, Robert M. Hoffman.
10. AACR Annual Meeting(2014年4月6

日 San Diego, CA, USA)
Imaging of stromal cells during hepatocellular metastasis formation in the RFP-MUP-uPA mouse.

Suetsugu A, Ogata H, Hiroshima Y, Momiyama M, Osawa Y, Moriwaki H, Saji S, Michael Karin, Robert M. Hoffman.

〔図書〕(計1件)

1. 末次 淳, 森脇久隆. 一般財団法人日本消化器病学会監. 消化器病診療(第2版)編集委員会編. 「血液浄化療法」消化器病診療第2版、東京: 医学書院; 2014年 363-365.

〔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

末次 淳 (SUETSUGU, Atsushi)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 30340079

(2) 研究分担者

青木 仁美 (AOKI, Hitomi)
岐阜大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 10550361

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()