

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 1 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462542

研究課題名(和文) 婦人科癌における癌微小環境の再構築-新規治療を目指して

研究課題名(英文) Reconstitution of gynecological cancer microenvironment

研究代表者

村田 卓也 (Murata, Takuya)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：20714207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞は生体内で最も適応しており、その環境外では増殖することが困難である。癌の微小環境を生体外で再構築することは未だ困難である。シャーレ内や実験動物で癌の微小環境を再構築することができれば、その系を用いて癌研究の新たな解析が可能となり、独創的な治療法の開発につながる。今回、子宮頸癌の微小環境に最も多く存在する線維芽細胞(以下、CAFと略す)を子宮頸癌細胞ME180と共にヌードマウス皮下に移植することにより、ME180の単独移植では生じないリンパ節転移を40%という高い確率で起こすことに成功した。CAFと共存させることにより癌細胞のみでは認められなかった子宮頸癌の生物学的性質が再現できた。

研究成果の概要(英文)：Reconstitution of cancer microenvironment in vitro and/or in vivo is still difficult to achieve. If complete reconstitution of cancer microenvironment be possible, it will be the break through to new cancer treatment, making cancer drug screening easier and find new biological mechanism that can be a new treatment target. In the course of the study, we found that cancer-associated fibroblast can make ME180, cervical cancer cell line, metastasize to lymph nodes at the rate of as high as 40%, by co-transplanting these two kind of cells in nude mouse subcutaneously, that never occurred if single kind of cancer cell was transplanted. By further studying this phenomenon, it may be possible to reconstitute cervical cancer microenvironment in nude mouse subcutaneous completely.

研究分野：がんの微小環境解析

キーワード：がんの微小環境 癌関連線維芽細胞 子宮頸癌 細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

癌細胞と癌の微小環境に存在する細胞との間には、相互作用が存在し、癌の増殖、浸潤、転移を促進し、治療抵抗性の原因になっていることが報告され、その基礎的および臨床的知見が蓄積途上にあった。癌細胞に作用するのではなく、その微小環境にある細胞に作用する薬剤である Bevacizumab(癌の腫瘍血管に作用する)や Nivolumab(癌局所の免疫調節細胞に作用する)の効果が臨床研究で証明され、癌治療を考えるときに、癌細胞のみを標的とするのではなく、その微小環境に存在する細胞の機能を標的とするものの有効性が多くの癌で実証されつつあった。我々は、子宮頸癌の微小環境に最も多く存在する線維芽細胞(癌関連線維芽細胞;以下、CAFと略す)が *in vitro* と *in vivo* の両実験系において癌細胞の増殖を促進し、その分子メカニズムとして EGFR のリガンドである HB-EGF と血小板増殖因子である PDGF-B を介した癌細胞と CAF の相互作用が存在していることを明らかにし、両経路の阻害が分子標的となる可能性を示した(Cancer Res, 71, 6633-6642, 2011)。

PARP 阻害剤にみられるように癌治療に効果が認められるかどうかを治療前に予測する precision medicine と癌の個別化治療(テーラーメイド癌治療)が非常に重要であることが明らかとなり、臨床経過を反映した動物実験系が必要となると考えられる。そして癌の再構築系として、ヌードマウスの同所移植系がその個人の癌の生物学を反映した最もすぐれた系であることが報告されていた。しかし、同所移植は、乳癌では比較的容易であるが、子宮頸癌や卵巣癌などの婦人科癌では小手術が必要であり汎用性に限界があった。また、100%の確率で癌組織が生着し増殖進展するわけではなく、その利用には、改善の余地を残していた。

2. 研究の目的

婦人科癌の微小環境をヌードマウスの皮下に再構築し、癌細胞近くに存在する他の細胞(癌の微小環境細胞)が癌細胞の増殖、浸潤、転移、治療抵抗性といった患者さんの癌の性質にどのような影響をおよぼしているのかを解析し、その分子メカニズムを明らかにするとともに、新たな分子標的をみつけることにより、これまででない癌治療を開発することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

子宮頸癌に関して、癌の微小環境に最も多く存在する CAF が子宮頸癌細胞の増殖を促進する作用を有しており、そのメカニズムとして HB-EGF と PDGF-B という2つの増殖因子のシグナル経路が新たな分子標的として明

らかとなった。この両経路阻害の有効性を明らかにし、新たな治療法となる可能性を解析する。癌細胞と CAF をヌードマウスの皮下に共移植し、EGFR 阻害剤である Erlotinib と PDGFR 阻害剤である Imatinib を投与し、移植腫瘍の増殖変化を観察した。初代培養細胞の CAF は増殖に限界(Hayflick の増殖限界)があるため、大量の CAF が必要となることが見込まれる阻害剤を投与する実験では、CAF に *hTERT* と *SV40LargeT* を導入して作製した不死化 CAF を用いて解析した。

患者さんの癌の性質を正確に反映した癌の微小環境の再構築として、子宮頸癌微小環境で最も多く存在する CAF を初代培養し、子宮頸癌培養細胞と共にヌードマウスの皮下に共移植した。子宮頸癌培養細胞としては、ME180 を GFP で蛍光ラベルした細胞(ME180/GFP)を用い、蛍光により癌細胞自身の増殖の様子と、周辺臓器やリンパ節転移、遠隔転移などを GFP の蛍光を指標に観察できるようにした。対照として ME180/GFP のみをヌードマウスに移植した腫瘍をとり、両者を比較解析した。

婦人科癌の再構築系の開発およびそのバンクの作製に向けた準備実験として婦人科癌の手術検体や生検検体から癌組織を採取し、婦人科癌組織から細胞を初代培養した。また、ヌードマウスの同所もしくは皮下に組織移植し、腫瘍量の増加を図るとともに腫瘍サイズ変化や転移の有無、薬剤感受性などの癌の生物学的な性質を解析した。また、生着した腫瘍は別のヌードマウスの皮下に継代移植し、ヌードマウス移植腫瘍でのバンク化を試みた。

HER2 陽性子宮頸部扁平上皮癌をヌードマウスの子宮頸部(同所)に移植し、癌の増殖、進展を解析した(米国カリフォルニア大学との共同研究)。

不死化 CCF と子宮頸癌細胞の共培養を行い、TGF- β が癌細胞の増殖、浸潤、転移へどのような影響を与えているのかを解析した(京都大学との共同研究)。

4. 研究成果

ME180/GFP と初代培養 CAF をヌードマウスに共移植した結果、癌細胞の増殖、移植腫瘍の増大が促進された。また、GFP 蛍光を検索した結果、単径部や腫瘍近傍に蛍光が集積した組織を認めた(10匹のうち4匹)。この組織は、肉眼的にはリンパ節腫大であり、免疫組織学的に検討した結果、LCA 抗体で染色されるリンパ球が多数認められ、組織内に GFP 蛍光癌細胞を認めた。すなわち、リンパ節転移であることが確認された。転移を起こした4匹のうち、3匹が単径リンパ節転移であり、また1匹は移植腫瘍近傍の皮下リンパ節転移であった(2カ所)。また、局所浸潤は、腫瘍近傍の皮下リンパ節転移を2カ所に起こしていたマウス1匹で観察された。これまで

の報告では、ヌードマウスの皮下移植系では浸潤転移はきわめてまれにしか起こらない (Nature Review Cancer, 15, 451-452, 2015)。この場合も、ME180/GFP 単独の移植ではリンパ節転移は、同じ観察期間では起こらない (9匹のうち0匹) ことから、CAF が癌細胞のリンパ節転移能を有する (もしくは少なくとも促進する) ことが明らかとなった。この発見は、リンパ節転移のメカニズムの解明につながると言える。また、リンパ節転移実験系として簡便に利用できる系であり画期的な発見である。

不死化 CAF を用いて ME180/GFP とのヌードマウスの皮下共移植実験を 6 匹で行ったところ、リンパ節転移は同じ観察期間で起こらなかった。これは、不死化 CAF が初代培養 CAF において認められた ME180 をリンパ節転移させる能力を喪失したと考えられた。そのため、不死化 CAF と初代培養 CAF を比較することによりリンパ節転移に必要な遺伝子やタンパク質を解析すれば、新たな転移メカニズムの解明につながるかと推測された。さらにこれを発展させ、皮下移植腫瘍では稀な、肝臓、肺、脳、骨といった遠隔臓器への転移を皮下移植腫瘍で起こす遺伝子を探索し、見つけることができれば、これまで、皮下移植という一般的に浸潤転移が起きない移植腫瘍の実験系を、浸潤転移を解析できる実験系として利用できる可能性が示されたと言える。

婦人科手術もしくは生検検体の癌組織を細胞培養培地内に静置し、細胞の初代培養を行った。子宮頸癌 12 例、子宮体癌 3 例、卵巣癌卵管癌 3 例で行った。子宮頸癌と子宮体癌では、線維芽細胞の初代培養が全例で可能であった。しかし、癌細胞の初代培養細胞は分離できなかった。卵巣癌卵管癌では、初代培養細胞は全く分離できなかった。

婦人科手術検体の癌組織をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍生着を調べた。12 例の癌組織移植のうち 4 例が生着し、腫瘍の増大を認めた。しかし、その後、3 例では腫瘍の増大が停止し、子宮頸癌の 1 例においてのみ別のヌードマウスの皮下および子宮頸部に移植し増殖させることができた。この 1 例は、ヌードマウス移植腫瘍でのバンク化に成功した。

バンク化に成功した移植腫瘍を組織学的に検討した結果、元の子宮頸癌組織と類似していた。子宮頸部 (同所) に移植した腫瘍についてシスプラチンと Nab-パクリタキセルを投与し、腫瘍縮小効果を判定した。その結果、シスプラチン投与マウスでは腫瘍縮小が認められたが、Nab-パクリタキセル投与マウスでは、腫瘍縮小を認めなかった。このように患者さんから採取した臨床検体をヌードマウスの皮下に移植し、ヌードマウスの皮下で継代し、バンク化を実現し、同所移植した腫瘍について抗癌剤感受性を解析できることが示された。

HER2 陽性の子宮頸癌組織を同所移植し

て癌の進展を解析した結果、その子宮頸癌の患者さんの臨床経過と同様に局所浸潤、所属リンパ節転移、肝転移、肺転移が発生した。また、組織像、HER2 染色性がともに保存され、子宮頸癌で同所移植が患者さんの癌の生物学的性質を再現する動物実験系として優れていることが改めて示された。

CAF が癌の微小環境において浸潤を促進するかどうかを解析した。がん細胞の上皮間葉転移 (EMT) を起こさせ、浸潤転移を促進させると考えられている TGF- β に注目し、子宮頸癌において果たしている機能を解析した。臨床検体の病理組織において、TGF- β の発現亢進とリンパ節転移および脈管侵襲との間に有意な相関が認められた。また、不死化 CAF を子宮頸癌培養細胞と共培養し解析した結果、活性型 TGF- β 発現量が増加していると共に子宮頸癌細胞の浸潤能が亢進していることが明らかとなった。

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 4 件)

1. Murata T, Mekada E, Hoffman RM. Reconstitution of a metastatic-resistant tumor microenvironment with cancer-associated fibroblasts enables metastasis. Cell Cycle. 2017 Mar 19;16(6):533-535.

2. Murakami T, Murata T, Kawaguchi K, Kiyuna T, Igarashi K, Hwang HK, Hiroshima Y, Hozumi C, Komatsu S, Kikuchi T, Lwin TM, DeLong JC, Miyake K, Zhang Y, Tanaka K, Bouvet M, Endo I, Hoffman RM. Cervical Cancer Patient-Derived Orthotopic Xenograft (PDOX) Is Sensitive to Cisplatin and Resistant to Nab-paclitaxel. Anticancer Res. 2017 Jan;37(1):61-65.

3. Hiroshima Y, Zhang Y, Zhang N, Maawy A, Mii S, Yamamoto M, Uehara F, Miwa S, Yano S, Murakami T, Momiyama M, Chishima T, Tanaka K, Ichikawa Y, Bouvet M, Murata T, Endo I, Hoffman RM. Establishment of a patient-derived orthotopic Xenograft (PDOX) model of HER-2-positive cervical cancer expressing the clinical metastatic pattern. PLoS One. 2015 Feb 17;10(2):e0117417.

4. Nagura M, Matsumura N, Baba T, Murakami R, Kharma B, Hamanishi J, Yamaguchi K, Abiko K, Koshiyama M, Mandai M, Murata T, Murphy SK, Konishi I. Invasion of uterine cervical squamous cell carcinoma cells is

facilitated by locoregional interaction with cancer-associated fibroblasts via activating transforming growth factor-beta. Gynecol Oncol. 2015 Jan;136(1):104-11.

〔学会発表〕(計 2件)

2017/4/14 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会 広島市 広島グリーンアリーナ
子宮頸癌関連線維芽細胞の癌増殖促進遺伝子の解析
ポスター発表

2014/9/27 第 73 回日本癌学会学術総会 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜 Uterine cervical cancer-associated fibroblasts enhance lymph node metastasis in nude mouse models of cervical cancer
ポスター発表

〔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

<http://www.kawasaki-og.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者 村田 卓也 (Takuya Murata)
(35303) 川崎医科大学・医学部・産婦人科学 1・講師

研究者番号：20714207

(2)研究分担者 中村 隆文 (Takafumi Nakamura)
(35303) 川崎医科大学・医学部・産婦人科学 1・教授

研究者番号：20303969

(3)研究分担者 下屋 浩一郎 (Koichiro Shimoya)
(35303) 川崎医科大学・医学部・産婦人科学 1・主任教授

研究者番号：40291950