

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861097

研究課題名(和文)大腸癌における間質線維芽細胞の活性度と癌の悪性度に関する研究

研究課題名(英文)Study on the malignancy and activity of stromal fibroblasts in colon cancer

研究代表者

家田 淳司(Ieda, Junji)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：50637907

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：当科ではこれまで、癌間質の線維芽細胞でb2-integrin epitopeの一部とされるP4H9が発現することを報告してきた。P4H9を認識する分子(PDM)は線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化に関与することを明らかにした。本研究では、大腸癌臨床検体におけるPDMの発現と臨床病理学的因子との関連について検討した。多変量解析にて線維芽細胞のPDMの発現はリンパ節転移、血行性転移と関連を認めた。また、PDMを発現する線維芽細胞の存在する大腸癌では術後生存期間が不良であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Our previous study using a mammary fat pad mouse model showed that P4H9, produced by the b2 integrin epitope, detected a molecule on fibroblasts in response to carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) expressing cancer cells. P4H9-detected molecule (PDM) expression appeared to be associated with myofibroblast differentiation. In this study, we investigated whether PDM is expressed on fibroblasts and cancer cells in clinical tissue samples, and whether the presence of PDM-expressing colorectal cancer cells is correlated with clinicopathological features of patients. Multivariate analysis showed that PDM-expressing spindle-shaped fibroblasts were an independent risk factor for lymph node metastasis, hematogenous metastasis, and poor survival. A Kaplan-Meier survival curve indicated that PDM-expressing spindle-shaped fibroblasts were associated with shorter survival time ( $P < 0.0001$ ).

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は、化学療法の進歩や分子標的薬の開発により年齢調整死亡率はやや低下している。しかし、大腸癌の罹患率や死亡者数は増加の一途であり、更なる治療の改善・向上が必要と考えられる。大腸癌では、肝転移や肺転移などの遠隔転移がみられても、切除可能であれば生存率の改善が期待できる。これまで私は大腸癌の先進部において CEACAM1 の isoform balance の変化が大腸癌の浸潤・転移に關与することを報告してきた。CEACAM1 は CEA family, immunoglobulin superfamily に属する膜貫通型の糖蛋白である。CEACAM1 は細胞内ドメインの長さの違いにより CEACAM1-long と CEACAM1-short に分類される。これまで大腸癌では CEACAM1 の発現が低下することが報告されてきたが、CEACAM1 は早期大腸癌では発現が低下、進行大腸癌でも癌表層部では発現が低下するが、浸潤先進部において発現が再度増強することを報告した。さらに、浸潤先進部における CEACAM1 の isoform が CEACAM1-long 有意になるとリンパ節転移、血行性転移が増加し、生存率も不良となることを報告した。近年の化学療法の進歩、手術の進歩により多発転移が認められても、化学療法と手術の組み合わせにより治療前に切除不能と判断された症例が切除可能となる Conversion therapy が可能となり、長期生存が可能な症例もみられるようになった。今後、更に強力な浸潤・転移を抑制することにより、生存率も改善できると考えられた。

癌間質 Carcinoma-associated fibroblasts (CAF) は乳癌などで癌の増殖に關与し、血管新生や転移などのプロセスにも關与することが報告されている。しかし、CAF と癌との相互作用のメカニズムについては未だ不明な点が多く、非腫瘍組織における fibroblast との発生や働きの違いについても不明である。これまで、当科では接着分子である CEACAM1 に着目し、CEACAM1 の isoform

balance が変化することにより、癌の形態が変化すること (Yokoyama et al. Oncogene, 2007) や、癌浸潤先進部における形態変化、脱分化と癌の浸潤、転移に關する報告を行ってきた (Oku et al. Clin Cancer Res, 2008)。

しかし、癌浸潤先進部における形態変化と癌間質の相互關係や浸潤、転移に關するメカニズムについては明らかではない。これらのメカニズムが明らかに解明できれば、新規の治療ターゲットとなると考えた。

## 2. 研究の目的

癌における腫瘍上皮細胞は、いろいろな種類の間質細胞とともに癌の microenvironment を形成している。癌組織において、 $\alpha$ -smooth muscle actin を発現する筋線維芽細胞が存在することが知られている (Sappino et al. Int J Cancer, 1988)。筋線維芽細胞は"活性型線維芽細胞"としても知られ、癌組織のみでなく炎症や創傷治療でも認められる (Mueller et al. Nat Rev Cancer res, 2004)。Orimo らは、乳癌において癌の増殖を促進し、血管新生をうながし、筋線維芽細胞の特徴を示すものを CAF と定義した (Orimo et al. Cell, 2005)。ケモカイン stromal-derived factor-1 (SDF-1) の発現は癌と間質 fibroblast の interaction に關与し、筋線維芽細胞の分化を誘導する報告している。大腸癌において、癌間質線維芽細胞の  $\alpha$ -smooth muscle actin の発現が強く、筋線維芽細胞の発現が強くなると、リンパ節転移や血行性転移と關連し、生存率に關して予後不良となることが報告されている (Tsuji no et al. Clin Cancer Res, 2007)。

しかし、筋線維芽細胞の発生の由来については、確立した見解はなく、Cancer-associated myofibroblast は血液循環中の骨髓由来細胞であるという報告もされている (Chauhan et al. J Clin Pathol, 2003)。骨髓由来 CAF については、enhanced

green fluorescent protein (EGFP)移植モデルにより腫瘍間質に type I collagen mRNA と  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)を発現する細胞と、血管周囲細胞に発現する CD31 を発現する腫瘍血管細胞の 2 群がみられることが報告されている。本研究では、大腸癌培養細胞を用いた medium を使用し、fibroblast の myofibroblast への分化、誘導能を検討し、マウス xenograft model に implant し、腫瘍の増殖能や血管新生能についての比較検討を行う。さらに、大腸癌臨床検体から抽出した CAF と同患者の非腫瘍部大腸から抽出した線維芽細胞を用いて臨床検体における腫瘍の悪性度の変化について検討を行った。

### 3 . 研究の方法

大腸癌組織、正常組織における癌間質線維芽細胞の活性度の評価

病理組織学的に腺癌の確定診断を得られた大腸癌の手術症例を対象とする。選択基準は術前に本試験の目的および内容を説明し、同意を得た患者とする。患者の同意については担当医師により試験の実施に際し、試験の内容を患者とその家族に十分に説明し、試験について患者本人の自由意志による同意を取得する。同意は必ず文書によって取得する。病理学的に腺癌と診断を受けた進行大腸癌で和歌山県立医科大学で根治切除を施行した症例 150 例を対象とする。

大腸癌術後病理検査後のパラフィンブロックを使用し、薄切標本を作成する。H.E.染色により進行大腸癌浸潤先進部における癌間質の形態、線維芽細胞の成熟度と臨床病理学的因子に関して検討を行う (Ueno H et al. Gut, 2004)。免疫組織化学染色を施行し、癌間質線維芽細胞の  $\alpha$ -smooth muscle actin, vimentin などの発現強度について検討する。さらにその発現強度と臨床病理学的因子について検討を行う。正常組織での間質についても同様に免疫組織化学染色を施行し、同一

患者における癌浸潤先進部と正常組織での間質での  $\alpha$ -smooth muscle actin や vimentin の発現強度の変化についての検討を行う。

大腸癌組織、正常組織から線維芽細胞の抽出

大腸癌手術時、腫瘍摘出直後に腫瘍部位から組織を採取する。また、対照として腫瘍から 5 cm 以上離れた正常組織を採取する。採取した組織は collagenase type I (1mg/ml; Boehringer Mannheim) と hyaluronidase (125 units/ml; Sigma) を用いて 10% fetal calf serum (FCS) を追加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 内で 37 °C で 18 時間分離、培養する。分離した組織を室温で 5 分間攪拌させたのちに、線維芽細胞を多く含む上清を新しい試験管に移す。250 G 5 分間で遠心分離後沈殿物を 10% FCS を追加した DMEM で再度培養する。沈降を繰り返した後に 15 cm ペトリ皿上で培養し、5 回以上細胞の population doubling を繰り返したものを使用する。

in vitro における CAF と正常組織線維芽細胞の違いに関する検討

HT29(ATCC HTB-38), LS174T(ATCC CL188), HCT116(ATCC CCL247)の 3 種類の大腸癌培養細胞を使用する。各培養細胞と CAF, 正常線維芽細胞を 10% fetal calf serum (FCS) を追加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 内で培養する。各培養細胞と CAF と対照となる正常組織線維芽細胞をそれぞれ 1:3 の割合で混ぜて培養を施行する。

マウス xenograft model を用いた in vivo での検討

#### 1 . マウス xenograft model の作成

大腸癌培養細胞として HT29, LS174T, HCT116 の 3 種類の培養細胞を用いる。Cancer-associated fibroblast (CAF) として大腸癌手術摘出標本から抽出した線維芽細胞を用いる。手術摘出標本の腫瘍から 5 cm

以上離れた正常組織から、同様にして線維芽細胞を抽出し、対照として用いる。

各培養細胞を  $1 \times 10^6$  個と各線維芽細胞を  $3 \times 10^6$  個 (1 : 3) を混ぜ、NOD/SCID マウスに皮下注射し、マウス xenograft model を作成する。皮下注射から 8 週間後に腫瘍を採取し、腫瘍径や重量を計測、転移の有無などについて評価する。

## 2. 線維芽細胞による腫瘍増殖能、浸潤能に関する検討

採取した腫瘍を 1%ホルマリンで固定した後、パラフィン包埋ブロックを作成する。パラフィン包埋ブロックから  $2 \mu\text{m}$  で薄切片プレパラートを作成する。H.E.染色により、CAF と非腫瘍部線維芽細胞の違いによる各大腸癌培養細胞の組織型、浸潤の程度、間質の量の変化などについて検討を行う。

## 3. 線維芽細胞の活性度に関する検討

免疫組織化学染色を施行し、活性型線維芽細胞(筋線維芽細胞)の指標となる $\alpha$ -smooth muscle actin( $\alpha$ -SMA) や vimentin などを評価する。正常組織から採取した線維芽細胞が大腸癌培養細胞と混ぜて増殖することによる線維芽細胞の分化の程度について評価を行い、CAF との活性の違いについて検討を行う。これまで、当教室では、癌浸潤先進部における形態変化、脱分化がリンパ節転移と関連することを報告してきた。CAF による間質の変化により癌浸潤先進部の形態変化のメカニズムを解明することにより、癌の転移に関するメカニズムがより明らかになることが考えられる。

## 4. CAF による CEACAM1 isoform balance の変化に関する検討

当科ではこれまで、CEACAM1 isoform balance が変化することにより、癌間質の線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化が誘導されることを報告してきた。本研究では、CAF の働きにより癌細胞の CEACAM1 の isoform balance が変化するかを検討する。

マウスから採取した腫瘍を CEACAM1-long または CEACAM1-short 特異的な抗体を用いて免疫組織化学染色を施行し、癌細胞の CEACAM1 isoform balance の変化について検討を行う。

## 4. 研究成果

癌間質における Carcinoma-associated fibroblast (CAF)が癌の増殖、血管新生、転移などに関与するという報告がされているが、CAF と非腫瘍正常組織における線維芽細胞との違いや、CAF の癌の増殖や転移に関する分子生物学的なメカニズム、CAF の由来などに関してはほとんど不明である。本研究において、大腸癌培養細胞と線維芽細胞を用いた基礎的研究を行うことにより、CAF に関する癌の増殖、転移に関するメカニズムを明らかにすることにより、大腸癌の浸潤や転移を抑制する新たな治療の開発を目的とした。

当科ではこれまで b2-integrin epitope を認識する P4H9 を発現する線維芽細胞と癌細胞の CEACAM1 発現の関連について報告してきた。P4H9-detected molecule (PDM)の発現が線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化に関与することを明らかとした。本研究では大腸癌における PDM の発現と大腸癌患者の臨床病理学的因子の関連について検討した。2002年から2003年に和歌山県立医科大学第2外科で手術を施行した大腸癌患者156名の臨床検体を用いて免疫組織化学染色を施行し、線維芽細胞の PDM 発現率と、大腸癌の転移率、生存率との関連について解析した。免疫組織化学染色にて、PDM 発現群(54例)と PDM 非発現群(102例)に分類した。単変量解析では線維芽細胞の PDM 発現、分化度、深達度、リンパ管浸潤、静脈浸潤がリンパ節転移と有意な関連を認めた。多変量解析では線維芽細胞の PDM 発現のみがリンパ節転移に関する因子であった( $p=0.0066$ )。また、単変量解析で PDM 発現線維芽細胞、深達度、

リンパ管浸潤、静脈浸潤が血行性転移との関連を認めた。多変量解析では線維芽細胞のPDM 発現のみが血行性転移との関連を認めた(p=0.0002)。また、線維芽細胞に PDM を発現するものは生存率も不良であった(P<0.0001)。以上より、PDM を発現する癌間質線維芽細胞は大腸癌の転移や生存期間に関与し、悪性度の指標となることが示された。

#### 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 2 件)

1. Randomized clinical trial of defaecatory function after anterior resection for rectal cancer with high versus low ligation of the inferior mesenteric artery.

Matsuda Kenji, Hotta Tsukasa, Takifuji Katsunari, Yokoyama Shozo, Oku Yoshimasa, Watanabe Takashi, Mitani Yasuyuki, Ieda Junji, Mizumoto Yuki, Yamaue Hiroki.

*Br J Surg.* 2015 Apr;102(5):501-8.

2. Clinical characteristics of anastomotic leakage after an anterior resection for rectal cancer by assessing of the international classification on anastomotic leakage.

Matsuda Kenji, Hotta Tsukasa, Takifuji Katsunari, Yokoyama Shozo, Watanabe Takashi, Mitani Yasuyuki, Ieda Junji, Iwamoto Hiromitsu, Mizumoto Yuki, Yamaue Hiroki.

*Langenbecks Arch Surg.* 2015 Feb;400(2):207-12. 2015 Jan 11.

[学会発表](計 3 件)

下部直腸癌に対する腹腔鏡下括約筋間直腸切除術 (ISR) に関する検討

家田淳司、堀田 司、瀧藤克也、横山省三、松田健司、渡邊高士、三谷泰之、岩本博光、水本有紀、津村亜矢子、出口真彰、山上裕機  
第 28 回日本内視鏡外科学会、2015 年 12 月 12 日、大阪

高齢大腸癌患者に対する総合的機能評価

家田淳司、堀田 司、瀧藤克也、横山省三、松田健司、渡邊高士、三谷泰之、岩本博光、水本有紀、津村亜矢子、出口真彰、山上裕機

第 77 回臨床外科学会、2015 年 11 月 28 日、福岡

下部直腸癌に対する腹腔鏡下内肛門括約筋切除術 (ISR) に関する検討

和歌山県立医科大学第 2 外科

家田淳司、堀田 司、瀧藤克也、横山省三、松田健司、渡邊高士、三谷泰之、水本有紀、津村亜矢子、山上裕機  
第 70 回消化器外科学会、2015 年 7 月 17 日、浜松

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

(1) 研究代表者

家田 淳司 (Ieda, Junji)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号 : 50637907