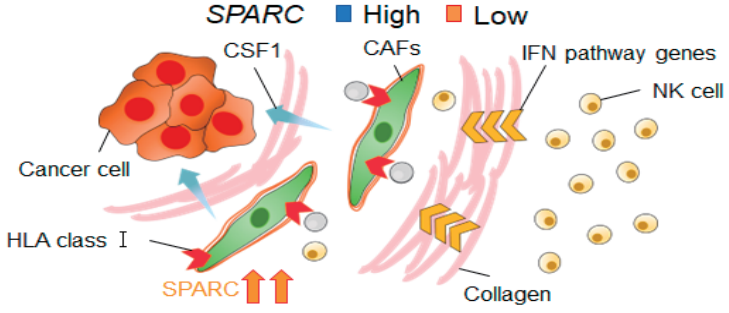
62　癌間質転移関連機序の解明と新規治療法開発	山下　継史

【目的】本研究は癌間質の転移進展機序を解明し新規治療法開発を目指すものである。我々は、これまでに独自の結腸癌原発組織由来の DNA および mRNA に対して *secreted protein acidic and rich in cysteine*（*SPARC*）の DNA メチル化および遺伝子発現定量を行い、臨床病理学的解析を行った。前者は癌細胞の、後者は癌間質細胞における *SPARC* 分子状況を反映していると考えられ、結腸癌の進展や予後に関係していたのは、癌の DNA 異常ではなく癌間質の発現異常であった。microdissection により癌細胞と間質細胞を分けて包括的遺伝子発現解析を行った結果、*SPARC* の間質発現は癌細胞の 17 倍であった。*SPARC* 発現は癌に面する fibroblast に限局していることが報告されているため、*SPARC* の癌転移への関与は、癌間質の cancer-associated fibroblast（CAF）における *SPARC* の下流変化が原因であると仮説を立てた。そこで、CAF 細胞 YS1 において *SPARC* ノックダウンを行い下流遺伝子の探索を行った。

【方法】YS1 の *SPARC* ノックダウンを行い、マイクロアレイを用いて遺伝子発現変化を同定した。遺伝子変化は real time PCR で検証した。YS1 の *SPARC* ノックダウンを行い表現型の変化を調べた。線維芽細胞転移活性を反映する gel contraction assay を行い、また癌細胞への影響を見るために癌細胞との共培養による癌浸潤能と nude mouse の移植率を算定した。癌間質プロファイルの public database（GSE35602）解析を行い、癌間質における *SPARC* と下流遺伝子の関係を検証した。さらに、包括的遺伝子探索を行い *SPARC* と関連する CAF marker 候補を同定した。CAF marker 候補遺伝子の予後解析（GSE17538）を行い AUC で順位付けを行った。*SPARC* 下流で発現が誘導され、癌間質で *SPARC* との高い相関を示した *CSF1* に注目した。*CSF1*、*CSF1R* のノックダウンによる *SPARC* 誘導癌浸潤能変化を調べた。

【結果】YS1 の *SPARC* ノックダウンを行い下流遺伝子として collagen family、補体 C1 family、IFN-stimulatedgene（ISG）、HLA family を同定し、さらに癌間質において SPARC との相関が強い遺伝子（R＝0.9 or beyond）を絞った。Collagen family として、COL1A1、COL3A1、COL8A1、COL5A2、COL5A1 等が、C1 family として C1S、C1R が、ISG として IFIH1、IRF7 等が、HLA family として HLA-F 等が real time PCR で検証された。YS1 の *SPARC* ノックダウンにより gel contraction が有意に抑制され、SPARC は CAF 細胞の転移能活性化に関わる可能性が示唆された。癌細胞との共培養により SPARC は癌浸潤能亢進とヌードマウス生着率増加に関与していた。YS1 と癌細胞のクロストークを探るために、SPARC が標的とする secretion factors に注目した。cS／E 比が低く SPARC との関連が高い遺伝子を包括的に探索して CSF1 を同定した。一方で、CAF marker 候補として、SPARC と関連が強く（R＝0.9 or beyond）、cS／E ratio＝10 or beyond の条件で発現の強い 115 個の遺伝子を同定した。すでに知られている CAF marker（FAP、VIM、ACTA2、PDGFRB）が含まれていた。CAF marker 候補遺伝子の発現が強かった 76 個の遺伝子について予後解析を行うと 63 個が有意（$p<0.05$）な悪性予後因子であった。AUC で順位付けを行うと最も強い予後因子には COL family（COL8A1、COL5A2、COL5A1、COL6A3、COL11A1、COL12A1）が enrich された。YS1 と癌細胞の共培養において、YS1 および癌細胞をそれぞれ *CSF1*、*CSF1R* でノックダウンすると癌細胞の浸潤が抑制された。以上から、SPARC による癌浸潤に CSF1-CSF1R axis が関わっている可能性が示唆された（図）。

SPARC による癌転移機序モデル



62. 癌間質転移関連機序の解明と新規治療法開発

山下　継史

北里大学 医学部 新世紀医療開発センター 先進外科腫瘍学

Key words：癌転移，癌関連線維芽細胞，SPARC，CSF1，コラーゲン

緒　言

外科手術療法あるいは周術期療法の進歩により癌患者の予後は大きく改善してきたが、進行癌の治療成績は満足するものとはなっていない。それは、癌の再発や転移が現代の最新医療をもってしても十分に制御できていないからである。この状況を破るためには癌転移の分子機序を明らかにしその原因に対する対処法を解明する以外に方法はない。癌の予後因子に関しての報告は多数あるが十分に検証されたといえる予後因子は明らかでない。例えば、我々はこれまでにリンパ節転移や遠隔転移に関連があると報告されている遺伝子（*c-myc*、*Ascl2*、*PRL3*、*CD44*、lnRNA-*MALAT1*、*H19*、*HOTAIR* 等）について同じ結腸癌組織を用いて組織 mRNA の定量的 PCR で精密にその発現を調べ臨床病理学的因子との相関を解析し過去の報告の検証を行った。これらの遺伝子はいずれも癌で過剰発現していたが、驚いたことに癌悪性度との関連を示す遺伝子は一つもなかった［1，2］。その後、それまでの研究［3］から再び注目した間質マーカー *secreted protein acidic and rich in cysteine*（*SPARC* ）の発現解析を行い初めてリンパ節転移や遠隔転移との関連を確認できた（図 1）。

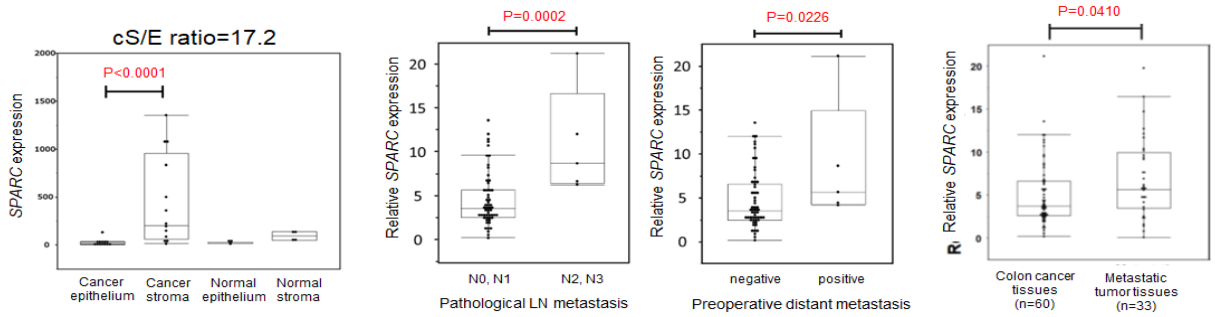


図 1. 結腸癌における *SPARC* mRNA 発現と転移の関連

Microdissection による *SPARC* 発現は癌間質特異的に確認され（左図）、結腸癌 bulk 組織における発現は高度リンパ節転移（N2、N3）（左中図）、遠隔転移（M1）（右中図）、転移臓器（右図）で有意に高値であった（t 検定）。cS/E ratio (cancer stroma／epithelium expression ratio).

近年の TCGA をはじめとした public database の充実により、客観的な包括的発現解析データの利用が可能となっている。そこで、本研究においては結腸癌のマイクロダイセクションによるマイクロアレイデータベースとバルク組織を用いたマイクロアレイデータと予後の結果を交えて、癌関連線維芽細胞（Cancer-Associated Fibroblast：CAF）における *SPARC* 発現の臨床的意義および機能的意義を統合的に論じた。

本研究において、CAF 細胞 YS1 の *SPARC* ノックダウンにより癌転移能の低下（gel contraction 抑制、癌浸潤能の低下、癌生着能の低下）が確認できた。これらを説明する分子的機序を明らかにするために YS1 の *SPARC* ノックダウンにより発現が低下する遺伝子を、イクロアレイを用いて包括的に検索した。その結果、*SPARC* 下流の標的遺伝子

として collagen family、補体 C1 family、IFN-stimulated gene（ISG）、HLA class I familly、あるいは多数の分泌因子の発現低下が確認できた。このうち、collagen family と補体 C1 family は癌間質特異性が高く、特に collagen family は強い予後因子であった。一方、癌間質特異性が低い癌細胞とのクロストークに関連する遺伝子候補として *CSF1* が SPARC 下流遺伝子候補として同定された。遺伝子ノックダウンの実験により、*SPARC* 誘導癌細胞浸潤能が CSF1-CSF1R axis により制御されていることが明らかとなった。

方法および結果

1. YS1 細胞の *SPARC* ノックダウンと結果の検証（real time PCR）

YS1 の *SPARC* ノックダウンを 3 種類の siRNA-SPARC #1、#2、#3 を用いて行った。3 種類のノックダウンの配列のうち、off-target の有無を Wnt2 の反応性を基に判断した。siRNA-SPARC #3 は off target が確認され、以降の実験は siRNA-SPARC #1（siSPARC-1）、siRNA-SPARC #2（si-SPARC2）を用いて行った。Affymetrix expression microarray を用いて発現解析を行い、siSPARC-1 で発現が 2 倍以上低下した遺伝子を選択した（2,086 プローベ）。さらに、si-SPARC2 においても 2 倍以上低下を示した 679 プローベ（567 遺伝子）を選択し、さらに癌間質において *SPARC* 発現と強い相関を示した遺伝子（R＝0.9 or beyond）のうち、発現量の順に上位 30 個をピックした（図 2）。遺伝子発現低下は一部の遺伝子について real time PCR で検証できた（*COL8A1*、*COL1A1*、*HLA-F*）。また、30 個のうち 4 個の遺伝子が IFN-stimulated gene（ISG）（EPSTI1、IFI44、IFIH1、MX2）であり、また分泌因子（Secretion factor、図 2 のサークル S マーク）は癌とのクロストークに関わる可能性があると考えた。

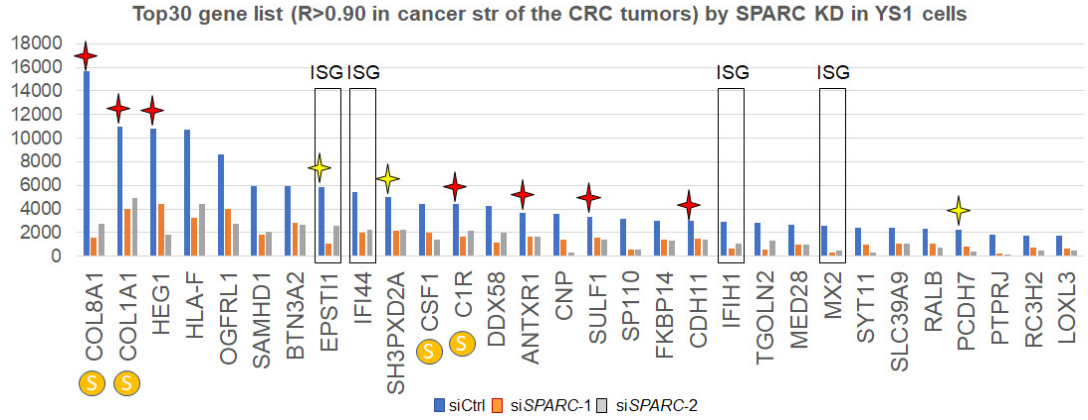


図 2. YS1 の *SPARC* ノックダウンと遺伝子発現低下
YS1 細胞における siSPARC-1、siSPARC-2 により Ctrl に比較して発現が 2 倍以上低下した遺伝子を発現順に列挙（上位 30 位）。

2. YS1 の *SPARC* ノックダウンと表現型の変化

次に YS1 の *SPARC* ノックダウンを行い表現型の変化を調べた。線維芽細胞の癌転移活性を反映する gel contraction assay を行いゲル収縮が有意に抑制された。癌細胞への影響を見るために癌細胞との共培養による癌浸潤能と nude mouse の移植率を算定した。両者とも *SPARC* ノックダウンにより抑制された。大腸癌細胞株 SW480、DLD1 を用いた浸潤実験の結果を図 3 に示す。

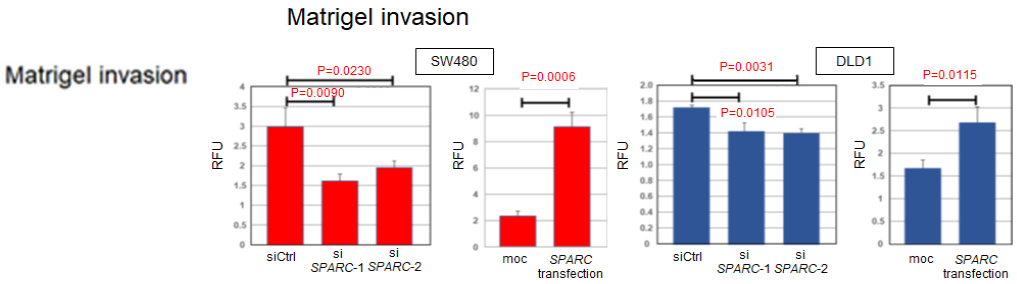


図 3. *SPARC* ノックダウンと強制発現による大腸癌浸潤能の変化

YS1 細胞の *SPARC* ノックダウン上清は、Ctrl 上清より SW480 の癌浸潤を低下させ（左図）、一方で YS1 細胞の *SPARC* 強制発現の上清は moc 上清より SW480 の癌浸潤を増強した（左中図）。DLD1 も同様であった（右中図、右図）。統計処理は t 検定で行った。

3. 大腸癌 CAF marker 候補遺伝子の同定

癌間質プロファイルの public database（GSE35602）解析を行い、癌間質における *SPARC* と下流遺伝子の関係を検証した（図 2 には R=0.9 or beyond の遺伝子をピック）。さらに、包括的遺伝子探索を行い *SPARC* と関連する CAF marker 候補をマイクロアレイ遺伝子から抽出し発現の多い 115 個に絞った。115 個の CAF marker 候補遺伝子は、すでに良く知られている CAF markers（*FAP*、*VIM*、*ACTA2*、*PDGFRB*）に加えて collagen family、補体 C1 family（*C1S*/*C1R*）等の *SPARC* 下流遺伝子候補（図 4）が共通していた。

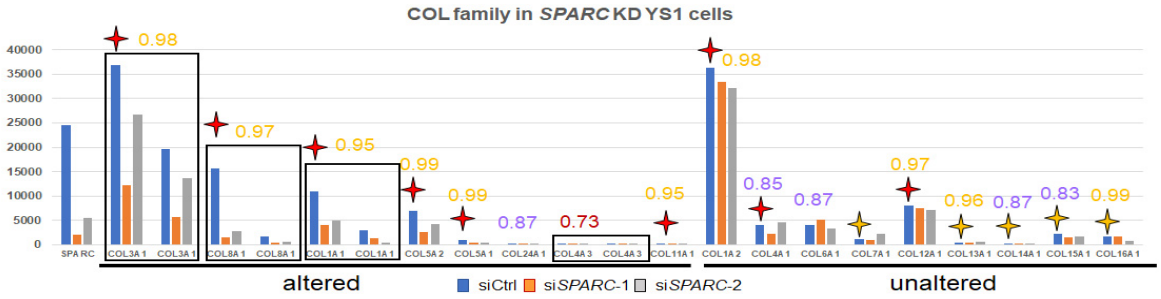


図 4. *SPARC* ノックダウンによる collagen family の発現変化

YS1 細胞の *SPARC* ノックダウンにより発現が低下したコラーゲン（altered）（図 4 左）を示す。

4. 大腸癌 CAF marker 候補遺伝子の予後解析

CAF marker 候補遺伝子のうち、発現が高い 76 個について結腸癌の public database を用いて予後解析を行った（GSE17538）。AUC で順位付けを行うと上位に collagen family が enrich された。面白いことにほとんどの候補遺伝子が予後不良因子であり、有意な差を示した遺伝子が 76 個中 63 個に上った。Top10 の遺伝子を順に列挙すると *PRKCDBP*、*COL8A1*、*THBS2*、*COL5A2*、*INHBA*、*SPARC*、*COL5A1*、*COL6A3*、*COL11A1*、*COL12A1* であった（図 5）。

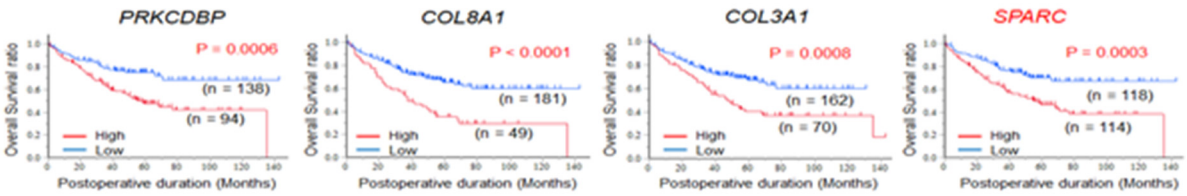


図 5. 大腸癌 CAF markers と悪性予後（GSE17538）

CAF markers の中で強い予後因子となった *PRKCDBP*、*COL8A1*、*COL3A1*、*SPARC* の結腸癌における予後曲線。

5. *SPARC* 誘導癌浸潤は CSF1/CSF1R axis を介する

SPARC 下流で発現が誘導され、癌間質で *SPARC* との高い相関を示した *CSF1* に注目した（図 6）。注目した理由としては、*SPARC* 下流の分泌因子のうち cS／E ratio が低かったためである（図 6、右パネル）。癌とのクロストークに関連する遺伝子は癌特異性である必要がないと考えた。

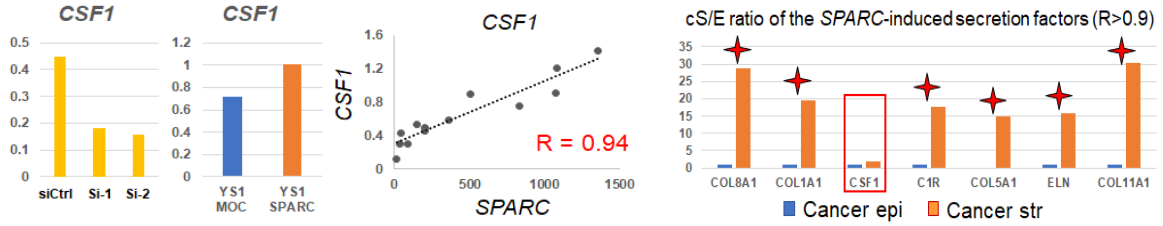


図 6. *SPARC* による *CSF1* の誘導と CSF1 の cS/E 比の特有性

YS1 細胞における *SPARC* ノックダウンにより CSF1 発現は低下し（左図）、SPARC 強制発現により CSF1 発現は増加した（左中図）。癌間質における CSF1 発現は SPARC 発現と強く相関し（右中図）、S／E 比は特有に低かった（右図）。

YS1 細胞の *CSF1*、*CSF1R* のノックダウンによる SPARC 誘導癌浸潤能変化（SW480）を調べた（図 7）。

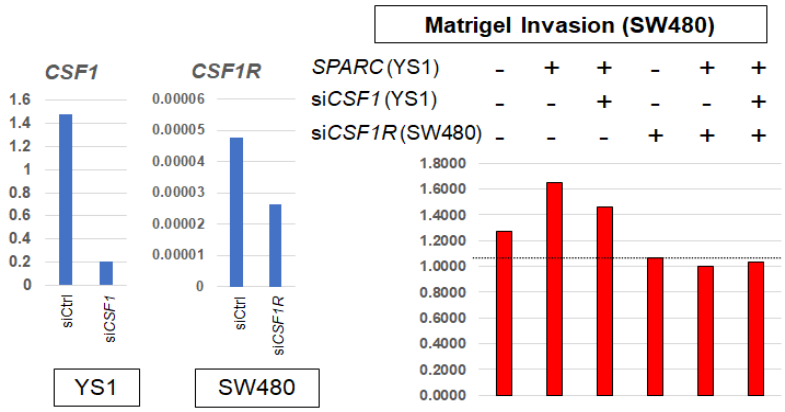


図 7. YS1 に対して *SPARC* 誘導を行い *CSF1-CSF1R* axis ノックダウン SW による 480 癌細胞浸潤を評価

YS1 における *SPARC* 強制発現を *CSF1* ノックダウンすると癌細胞 SW480 の浸潤能が低下した。また、SW480 の *CSF1R* をノックダウンすることでさらに強く癌浸潤が抑制された。

考　察

本研究で *SPARC* の大腸癌転移に関わる分子機序の一部を解明できた。これまでに *SPARC* が癌では遺伝子プロモーターの DNA メチル化で発現が低下し、一方癌間質で発現が亢進していることが知られていた。我々は本研究において micorodissection を用いた発現プロファイルの特徴を客観的指標で表現することに成功した。すなはち、cS／E ratio＝10 or beyond は癌間質特異的発現遺伝子として重要な客観的指標となる。CAF marker の必要条件であった。また、間質マーカーとして知られる *SPARC* との強い相関（R＝0.9 or beyond）は、もう一つの CAF marker の必要条件でもあった。この両者を満たす遺伝子が *FAP*、*VIM*、*ACTA2*、*PDGFRB* というよく確立された CAF marker を全て含んでいたことは極めて重要な所見といえる。よって、我々はこの二つの条件を満たす遺伝子は本研究では CAF

marker と呼ぶこととした。

CAF marker の予後因子解析ではそのほとんどが悪性予後の indicator であり、特に上位にコラーゲンファミリーが enrich された。上位の top10 にコラーゲンファミリーが 6 個上がってきたが、これらの調節をする *SPARC* がやはり含まれていた（6 位）。*SPARC* より AUC が高かったコラーゲンファミリー遺伝子は *COL8A1* および *COL5A2* だけであった。以上から *SPARC* はコラーゲン産生に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、またそれは宿主の防御反応としてよりも癌進展の協力者としての意義が高いことを暗示する結果となった。

今回、*SPARC* により起こる変化のうち最も目立ったものが ISG の誘導であった。近年の研究で、SPARC はマクロファージにおいて TLR4-IRF3 を介して IFN を誘導する経路を活性化することが報告されている［4］。このようにして誘導された IFN は *IRF7*、*STAT1* の誘導により ISG 発現上昇を起こす positive feedback loop を形成する。*IFNAR1* の活性変異（SA 変異）では *IRF7*、*STAT1* 誘導を伴う NK 細胞や CD8 陽性細胞の誘導が確認されている［5］。このことから、*SPARC* による免疫細胞誘導が IFN 経路の活性化を介して癌細胞ではなく癌間質細胞に対して起こっていることが理解できる。さらに、*SPARC* が HLA family（*HLA-F* だけでなく *HLA-A*、*B*、*C*、*D*、*E* も）を誘導することから（data not shown）、CAF に引き寄せられた免疫細胞（特に NK 細胞）が CAF 表面において不活化されることが想定される。以上から、免疫細胞浸潤を伴う線維化はもっとも高い悪性化の特徴といえる。

一方、*SPARC* は *CSF1* を誘導することが明らかとなり癌とのクロストークに関わると考えられた。*CSF1* の発現は *SPARC* との強い相関を示したが（R＝0.94）、cS／E ratio は低かった。*CSF1* はもともと癌間質の TAM（tumor-associated macrophage）の活性化に重要な役割を果たすものだが、一定の条件下では癌の浸潤に関わる［6］。我々の検討においても、*SPARC* により亢進する YS1 による SW480 細胞浸潤亢進は、YS1 の *CSF1* ノックダウンもしくは、SW480 の *CSF1R* のノックダウンにより著明に抑制されることが明らかとなった。このことは、CSF1-CSF1R axis が癌間質の TAM だけではなく大腸癌の浸潤能にも直接影響を及ぼす可能性を示唆するものといえる。

今回の助成金を用いて *COL8A1* および *C1S* ノックダウンの実験も追加している。*COL8A1* ノックダウンにより ISG は逆に誘導されることから *COL8A1* は *SPARC* の下流で negative feedback の役割が確認できた。一方で、*COL8A1* ノックダウンにより IL6ST／STAT3 経路や PTN などの癌転移促進因子の抑制が確認された。一方、*C1S* ノックダウンにより *COL5A2*、*COL5A1*、*COL6A3* の低下に加え、*PTGS2* やケモカイン（*CXCL5*、*CXCL10* ）などの発現低下が確認された。癌転移の CAF 治療標的同定にはさらなる詳細な分子機序の解明が望まれる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は北里大学大学院医学系研究科先進外科学研究室の贊裕介亮医師、奥野晃太医師、藤山芳樹医師、大木慶子医師、渡部晃子医師であり、多大なる研究の協力に対して深く謝辞を表する。

文　献

1） Yokota K, Tanaka Y, Harada H, Kaida T, Nakamoto S, Soeno T, Fujiyama Y, Yokota M, Kojo K, Miura H, Yamanashi T, Sato T, Nakamura T, Watanabe M, Yamashita K. WiNTRLINC1/ASCL2/c-Myc Axis Characteristics of Colon Cancer with Differentiated Histology at Young Onset and Essential for Cell Viability. Ann Surg Oncol. 2019 Dec;26(13):4826-4834. doi: 10.1245/s10434-019-07780-3. Epub 2019 Sep 23. PMID: 31549316.

2） Kaida T, Fujiyama Y, Soeno T, Yokota M, Nakamoto S, Goto T, Watanabe A, Okuno K, Nie Y, Fujino S, Yokota K, Harada H, Tanaka Y, Tanaka T, Yokoi K, Kojo K, Miura H, Yamanashi T, Sato T, Sasaki J, Sangai T, Hiki N, Kumamoto Y, Naitoh T, Yamashita K. Less demand on stem cell marker-positive cancer cells may characterize metastasis of colon cancer. PLoS One. 2023 Apr 25;18(4):e0277395. doi: 10.1371/journal.pone.0277395. PMID: 37098074; PMCID: PMC10128954.

3) Yamashita K, Upadhay S, Mimori K, Inoue H, Mori M. Clinical significance of secreted protein acidic and rich in cystein in esophageal carcinoma and its relation to carcinoma progression. Cancer. 2003 May 15;97(10):2412-9. doi:10.1002/cncr.11368. PMID: 12733139.
4) Ryu S, Sidorov S, Ravussin E, Artyomov M, Iwasaki A, Wang A, Dixit VD. The matricellular protein SPARC induces inflammatory interferon-response in macrophages during aging. Immunity. 2022 Sep 13;55(9):1609-1626.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2022.07.007. Epub 2022 Aug 12. PMID: 35963236; PMCID:PMC9474643.
5) Katlinski KV, Gui J, Katlinskaya YV, Ortiz A, Chakraborty R, Bhattacharya S, Carbone CJ, Beiting DP, Girondo MA, Peck AR, Puré E, Chatterji P, Rustgi AK, Diehl JA, Koumenis C, Rui H, Fuchs SY. Inactivation of Interferon Receptor Promotes the Establishment of Immune Privileged Tumor Microenvironment. Cancer Cell. 2017 Feb 13;31(2):194-207. doi: 10.1016/j.ccell.2017.01.004. PMID:28196594; PMCID: PMC5313042.
6) Patsialou A, Wang Y, Pignatelli J, Chen X, Entenberg D, Oktay M, Condeelis JS. Autocrine CSF1R signaling mediates switching between invasion and proliferation downstream of TGFß in claudin-low breast tumor cells. Oncogene. 2015 May 21;34(21):2721-31. doi: 10.1038/onc.2014.226. Epub 2014 Aug 4. PMID:25088194; PMCID: PMC4317382.