

博士(医学)木下桂一

学位論文題名

Imatinib mesylate inhibits the proliferation-stimulating effect of human lung cancer-associated stromal fibroblasts on lung cancer cells

(メシリ酸イマチニブは肺癌関連間質線維芽細胞の肺癌細胞に対する増殖刺激作用を抑制する)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

肺癌は先進諸国において最も発症率の高い癌の一つであり、2008年にはアメリカ国内で16万人もの肺癌患者が亡くなっている。原発腫瘍の切除や化学療法にもかかわらず、未だ十分な治療成績が得られていないのが現状である。肺癌患者の予後を改善するには、より有効な新しい治療戦略の開発が必要である。

腫瘍組織には、癌細胞以外に線維芽細胞、内皮細胞、炎症細胞など様々な間質細胞が混在している。腫瘍の転帰は形質転換した癌細胞の変化だけでなく、間質細胞などの腫瘍微小環境にも依存していることがわかつてきた。線維芽細胞は多くの充実性腫瘍における腫瘍間質の主要構成要素であり、その制御が腫瘍の発育、進展の抑制につながる可能性が指摘されている。腫瘍間質内の線維芽細胞は、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) タンパクにより特徴づけられる筋線維芽細胞形質を発現し、癌関連間質線維芽細胞 cancer-associated stromal fibroblasts (CAFs) とも呼ばれる。一方、血小板由来増殖因子 platelet derived growth factor (PDGF) は、線維芽細胞に対する強力な分裂促進作用を持ち間質増生を促す重要な因子であることも示されてきた。腫瘍の増殖を抑制する手段として癌細胞に多大な影響を及ぼす CAFs を標的にすることは新しい癌治療の可能性を秘めていると考えられる。私は肺癌組織における CAFs の増殖を抑制すれば、間接的に肺癌細胞の増殖を抑制できるのではないかと推論した。そこで PDGF 受容体 (PDGFR) チロシンキナーゼに対し阻害活性を持つメシリ酸イマチニブを用いて、肺癌関連間質線維芽細胞 (CAFs) の増殖を抑制することにより、共存する肺癌細胞の増殖抑制が可能か否かを調べた。

【材料と方法】

北海道大学病院腫瘍外科においてインフォームドコンセントの得られた非小細胞肺癌患者 7 症例から切除されたヒト肺腫瘍組織および正常肺組織から初代培養線維芽細胞を樹立した。同様にインフォームドコンセントの得られた非小細胞肺癌患者 14 症例の切除標本を対象として免疫組織化学的検討を行った。癌細胞はヒト肺癌細胞株 A549 他 4 株、線維芽細胞株は 2 株を購入して実験に用いた。それぞれの培養細胞における遺伝子発現については半定量的 RT-PCR 法で確認した。PDGF シグナル伝達に対するイマチニブの阻害作用は PDGFR $\beta$  のリン酸化 Tyr751 を認識する抗体を用いて Western Blotting 法により解析した。培養線維芽細胞を 0.5% 血清存在下で 2~4 日間培養し、各処理後その培養上清を得た。細胞増殖能は WST-8 assay で測定した。

統計学的検討は Kruskal Wallis H-test および Mann-Whitney U-test を用いて  $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。

## 【結果】

- (1) ヒト肺癌切除標本 14 症例すべてにおいて腫瘍間質内に多数の $\alpha$ -SMA 陽性線維芽細胞が観察されたが、癌細胞にはその発現は認められなかった。
- (2) 検討されたすべての培養線維芽細胞において $\alpha$ -SMA および fibroblast activation protein (FAP) 両方の遺伝子発現が認められた。また、PDGFR は検討されたすべての線維芽細胞に発現しており、PDGF は癌細胞優位に発現が認められた。
- (3) 肺腫瘍由来線維芽細胞 (CAFs) をイマチニブ ( $1\mu M$  or  $10\mu M$ , 4 時間) で処理すると PDGFR $\beta$  のリン酸化および下流のシグナル伝達経路は阻害された。
- (4)  $10\mu M$  のイマチニブで処理された CAFs の増殖は、未処理のものに比べ有意に抑制された ( $p < 0.05$ )。しかし、 $1\mu M$  のイマチニブ処理では有意な増殖抑制を示さなかった。
- (5) CAFs の培養上清は A549 細胞、他 2 種の肺癌細胞株の増殖を有意に亢進させた ( $p < 0.05$ )。
- (6)  $10\mu M$  のイマチニブで処理された CAFs の培養上清では、未処理の培養上清に比較して A549 細胞に対する増殖促進作用が有意に低下した ( $p < 0.05$ )。

## 【考察】

本研究における *in vitro* での細胞増殖実験により、我々は肺腫瘍由来線維芽細胞 (CAFs) から得られた培養上清が肺癌細胞の増殖を有意に促進させることを示した。これは CAFs の培養上清には肺癌細胞の増殖活性を亢進させる何らかの可溶性因子が含まれていることを示している。また免疫組織化学染色による検討では、CAFs は肺腫瘍組織内の大部分を占め、肺癌細胞のすぐ近傍を取り囲むようにして存在していることがわかった。これらの実験結果から、肺腫瘍内において CAFs により産生された増殖刺激因子は肺癌細胞の増殖をパラクライン的に促進することが示唆される。RT-PCR 解析では、PDGF の発現は肺癌細胞株において優位に見られ、PDGFR の発現は全ての培養線維芽細胞で確認された。また Western Blotting 解析と細胞増殖実験では、PDGF-BB が PDGFR $\beta$  のキナーゼ活性を刺激し、*in vitro* における CAFs の増殖活性を亢進させることがわかった。従って、これらの実験結果からも PDGF シグナル伝達経路が間質形成において、またその結果として癌の進行にも重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

メシル酸イマチニブが、変異タンパク c-Abl と c-Kit だけでなく、PDGFR チロシンキナーゼも選択的に阻害することは過去の報告からも知られている。本研究でも、イマチニブが PDGFR のキナーゼ活性を阻害し、その下流シグナル伝達経路も抑制することを証明した。また *in vitro* においてイマチニブにより CAFs の増殖が抑制されることを証明した。特にイマチニブを添加した CAFs の増殖活性の抑制は、PDGF-BB を同時添加したときの方が強く現れた。これはつまり、イマチニブによる細胞増殖活性の抑制効果は主に活性化 (リン酸化) した PDGFR の阻害を介して起こることを示唆している。また我々は、イマチニブで処理された CAFs から得られた培養上清では、未処理の CAFs から得られた培養上清と比較して、肺癌細胞への増殖刺激が減弱することを示した。これはつまり、イマチニブ処理によって CAFs から分泌され培養上清中に存在する何らかの可溶性増殖刺激因子の濃度が減少し、その結果、肺癌細胞の増殖活性を減弱させたことを意味している。過去にもイマチニブが CAFs の DNA 合成を阻害するという報告と、またアポトーシスを誘導するという報告があることから、この減弱効果は主にイマチニブによる PDGF シグナル伝達の抑制が原因で起こる CAFs の数の減少に起因していると考えられる。

CAFs を含めた腫瘍間質とそのメカニズムを標的にすることは将来の癌治療に新しい方向性と可能性を与えると期待される。

## 【結論】

メシル酸イマチニブは肺腫瘍間質線維芽細胞 (CAFs) の PDGF シグナルを阻害し、CAFs の増殖だけでなく CAFs による癌細胞への増殖刺激作用をも抑制することで抗腫瘍効果を発揮する可能性が示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 秋田 弘俊

副査 教授 今村 雅寛

副査 教授 守内 哲也

副査 准教授 平野 聰

## 学位論文題名

### Imatinib mesylate inhibits the proliferation-stimulating effect of human lung cancer-associated stromal fibroblasts on lung cancer cells

(メシリ酸イマチニブは肺癌関連間質線維芽細胞の肺癌細胞に対する増殖刺激作用を抑制する)

腫瘍組織には、癌細胞以外に線維芽細胞、内皮細胞、炎症細胞など様々な間質細胞が混在している。線維芽細胞は多くの充実性腫瘍における腫瘍間質の主要構成要素であり、その制御が腫瘍の発育、進展の抑制につながる可能性が指摘されている。腫瘍間質内の線維芽細胞は、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) タンパクにより特徴づけられる筋線維芽細胞形質を発現し、癌関連間質線維芽細胞 cancer-associated stromal fibroblasts (CAFs) とも呼ばれる。一方、血小板由来増殖因子 platelet derived growth factor (PDGF) は、線維芽細胞に対する強力な分裂促進作用を持つことが知られている。そこで PDGF 受容体 (PDGFR) チロシンキナーゼに対し阻害活性を持つメシリ酸イマチニブを用いて、肺の CAFs の増殖を抑制することにより、共存する肺癌細胞の増殖抑制が可能か否かを調べた。本研究の *in vitro* 細胞増殖実験において、肺腫瘍由来線維芽細胞 (CAFs) から得られた培養上清は肺癌細胞の増殖を有意に亢進させた。これは CAFs の培養上清中に肺癌細胞の増殖活性を刺激する何らかの可溶性因子が含まれていることを示している。また免疫組織化学染色による検討では、CAFs は肺腫瘍組織内の大部分を占め、肺癌細胞のすぐ近傍を取り囲むようにして存在していた。従って、肺腫瘍内において CAFs により産生された増殖刺激因子は肺癌細胞の増殖をパラクライン的に促進することが示唆される。RT-PCR 解析では、PDGF の発現は肺癌細胞株優位に見られ、PDGFR の発現は全ての培養線維芽細胞で確認された。また Western blotting 解析では、PDGF-BB が PDGFR $\beta$  のキナーゼ活性を刺激し、*in vitro* における CAFs の増殖活性を亢進させた。すなわち、PDGF シグナル伝達経路が癌組織の間質形成において、またその結果として癌の進行にも重要な役割を果たしている可能性が示唆される。メシリ酸イマチニブは、変異タンパク c-Abl と c-Kit だけでなく、PDGFR チロシンキナーゼも選択的に阻害する。本研究でも、イマチニブが PDGFR のキナーゼ活性を阻害し、その下流のシグナル伝達経路も抑制することを証明した。またイマチニブにより *in vitro* における CAFs の増殖が抑制されることを示した。さらにイマチニブで処理された CAFs から得られた培養上清は、未処理の CAFs から得られた培養上清と比較して、肺癌細胞への増殖刺激能が減弱していた。すなわち、イマチニブ処理によって CAFs から分泌され培養上清中に存在する何らかの可溶性増殖刺激因子の濃度が減少し、その結果、肺癌細胞

の増殖活性を減弱させたと考えられた。以上より、イマチニブは CAFs の PDGF シグナルを阻害し、CAFs の増殖だけでなく CAFs による癌細胞への増殖刺激作用をも抑制することで抗腫瘍効果を発揮する可能性が示唆された。腫瘍間質とその形成メカニズムを標的とすることは将来的な癌治療に新しい方向性と可能性を与えると期待される。

スライドを用いた口頭発表後、副査 今村雅寛教授より CAFs と癌細胞の細胞間相互作用における PDGF 以外の増殖因子や他の間接的機序および直接的な接触を介する機序について質問があった。次に、副査 平野聰准教授より本研究での初代培養線維芽細胞作製法の妥当性および正常肺組織由来と肺癌組織由来の線維芽細胞を分子生物学的に識別可能か否かについて、また初代培養線維芽細胞における FGF（線維芽細胞増殖因子）の発現とイマチニブによるその変化の有無について質問があった。次に、副査 守内哲也教授より CAFs と組織球などの他の間質細胞を光顯的に識別可能か否かについて、またイマチニブや他の分子標的治療薬の悪性腫瘍以外への臨床応用の可能性について質問があった。最後に、主査 秋田弘俊教授より変異タンパク c-Abl、c-Kit、PDGFR 以外のチロシンキナーゼに対するイマチニブの  $IC_{50}$  (50% 細胞増殖阻害濃度) について、本研究で使用したイマチニブの濃度と in vivo や臨床応用する上での相対的な薬剤濃度について、また癌宿主の非癌部肺を正常肺として扱うことの妥当性について質問があった。さらに今後の研究への展望についての言及も求められた。いずれの質問に対しても申請者はその主旨をよく理解し、自らの研究内容と文献的考察を混じえて適切に回答した。

この論文は、イマチニブが CAFs の PDGF シグナルを阻害し、CAFs の増殖だけでなく CAFs による癌細胞への増殖刺激作用をも抑制することで抗腫瘍効果を発揮する可能性を示唆した点で高く評価され、腫瘍間質とその形成メカニズムを標的とする新しい癌治療に方向性と可能性を与えることが期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに充分な資格を有すると判定した。