

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者 (職名)	氏名	所属施設				
	山田 侑子 ㊟ (研究助教)	施設名	東京医科大学	所在地	新宿区新宿6-1-1	電話
研究課題	コラーゲンを標的とした新規肺癌治療法の開発					
研究目的	癌微小環境において癌細胞周囲の線維化が悪性度を促進することが知られていたが、その由来は不明であった。近年肺癌において癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast : CAF) と呼ばれる細胞群が間質線維組織の増殖および腫瘍血管の増生を介して肺癌の増殖、浸潤、転移を促進することが明らかとなったが、線維化そのものが悪性度促進に果たす役割は不明である。申請者らは肺線維症においてmiRNAの一種miR-29bがコラーゲンを直接標的とすることで肺の線維化を抑制し、気道内局所投与で臨床症状を改善させることを確認し、報告した。本研究ではmiR-29b誘導体を更に改良した新規誘導体を用いて、超高効率にコラーゲン発現を抑制することによる肺癌細胞の増殖抑制効果を検討するとともに、将来の臨床応用を目指し、画期的な極低侵襲投与方法となりうるmiR-29b誘導体噴霧吸入による新規肺癌治療法の開発を目的とする。					
研究方法	今年度は、浸潤性肺腺癌におけるCAFの免疫化学的検索を行った。1) 当分野における浸潤性肺腺癌の病理解剖例を抽出する。2) 癌およびCAFを含む標本を抽出する。3) 免疫組織化学染色 ( $\alpha$ -SMA, FAP, Fascin) および特殊染色 (EVG) を行う。3) 癌およびCAFについて染色結果を評価する。4) 患者の臨床情報と照らし合わせて、免疫染色の陽性所見と、年齢、性別、転移、腫瘍径、組織型についての解析を行う。以上より、CAFにおける免疫組織学的特徴と臨床病理学的因子および予後因子 (再発、転移、治療効果、予後) との関連を解析した。新規の標的分子としてFascinに注目した。					
研究成果	本研究では、CAFおよびコラーゲンを標的とした肺癌の新規治療法の確立を長期的な目標とし、剖検例を用いて、肺癌のCAFの免疫組織化学的性質を検討することを目的とした。これまで、樹状細胞や癌組織に対するfascinの免疫組織化学は広く行われてきたが、CAFの同定は行われたことがない。CAFは腫瘍の進行、浸潤、転移、化学療法抵抗性を促進し、膵臓がんや乳がんの予後不良と関連することが報告されていることから、CAFにおけるFascinの発現はこれらの機能に関連している可能性が高いと考えられた。 本研究では、癌細胞におけるfascinの発現も検討した。全ての癌組織においてFascin染色は陽性を示した。これらの結果は、肺腺癌の78%がFascinに陽性であったという過去の報告と同様である。過去の研究では、乳癌や肺癌においてFascinの発現は転移や細胞浸潤などの予後不良と相関する					

研究 成 果	<p>ことが示されているが、本研究では転移の有無と腫瘍細胞のFascinの陽性染色の間に有意な相関は認められなかった。</p> <p>さらに、CAFにおけるFAP, <math>\alpha</math>-SMA, Fascinの発現を検討した。特に、CAFにおけるFascinの発現はかつて報告されていない。CAFにおいてFascinの発現が観察され、FAPおよび<math>\alpha</math>-SMAの発現と強い相関関係が認められた (<math>p &lt; 0.005</math>)。既存のCAFマーカーであるFAPや<math>\alpha</math>-SMAと同様に、FascinはCAFのマーカーとして有用であると考えた。</p> <p>腫瘍細胞とCAFにおけるFascinの共発現の意義については、腫瘍細胞におけるFascin陽性染色の割合は、CAFにおけるFAP、<math>\alpha</math>-SMA、Fascin陽性細胞の割合と相関していることが示された (<math>P &lt; 0.001</math>)。Fascin陽性の癌細胞は高い浸潤活性を示し、そのような細胞がCAFを促進した可能性がある。Fascinは腫瘍細胞とCAF間のクロストークに関わっているものと思われた。Fascinは肺癌の新規治療ターゲットとなる可能性が考えられた。</p> <p>上記内容を論文として報告した。</p> <p>Fascin as a useful marker for cancer-associated fibroblasts in invasive lung adenocarcinoma <i>Medicine</i> 2021;100:35(e27162)</p>
今 後 の 予 定	<p>In vivo実験および三次元培養系に備え、CAFの培養条件と肺癌細胞株の共培養条件の検討に比較的時間がかかっているが、おおよその条件は決定しつつある。</p> <p>肺癌-CAFクロストークを模倣できる実験系として、近年樹立された癌細胞-線維芽細胞混在三次元培養系を樹立し、miR-29bによるコラーゲン産生抑制による癌細胞増殖への影響を観察する。さらにコラーゲン抑制の癌細胞増殖の足場への影響、またCAFから分泌されるサイトカインの半減期等を変化させようかについて検討する。</p> <p>次に、噴霧吸入によるmiR-29b低侵襲投与とその肺癌への治療効果の検討を行う。改良型miR-29bをマウスに気管内噴霧投与し、組織への到達度を検討する。この実験には蛍光標識した核酸を用いる予定である。次に、A549肺癌細胞株をヌードマウスに移植した担肺癌モデルマウスに対し、同様に改良型miR-29bを経気道的に投与する。1) 生存期間の延長がみられるか、を観察した後に解剖を行い、2) 転移の数や腫瘍のサイズに影響があるか、3) 間質の増生を抑制しているか、を検討する。具体的には、サンプリングした左肺から、miR-29bの標的分子あるcol1a1, col3a1の発現をqPCRで定量的に解析する。右肺は組織標本を作成し、HE染色や特殊染色、免疫染色を行ってCAFおよびコラーゲン線維を観察し、線維化を評価する。もし肺癌治療効果、線維化の抑制効果がみられれば、応募者が所属する研究室で飼育している自然発症型肺癌モデルであるK-ras (G12D) ノックインマウスに対して同様に経気道的投与を行い、治療効果の有無について検討し、今後の臨床応用に向けた基礎的データを取得する。</p>

様式第3号

公益財団法人 東京医科大学がん研究事業団 がん研究助成金収支決算報告書

令和 4年 5月 23日

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者所属施設名

東京医科大学分子病理学分野

氏 名

山田 侑子

Ⓔ

収 支 決 算 書

(単位 円)

交付を受けた助成金額		金 1,000,000 円		
	費 目	明 細	単 価 及 金 額	計 額
支 出 内 訳	設備、備品費	Macbook Pro	330600	330600
	消耗品費			669400
	計			1,000,000
過 △ 不足額				0
備 考	ゆうちょ手数料は消耗品に含む			

## 支 出 費 内 訳

区 分	金 額	根 拠
設備、備品費	330600	Macbook Pro
消 耗 品 費	110	ゆうちょ硬貨手数料
	23925	Anti- $\beta$ actin 20536-1-AP
	81345	Anti-Periostin antibody ab14041
	75735	Anti-FAP $\alpha$ antibody
	32725	抗ヒトアミロイド $\beta$ モノクローナル抗体
	440	ゆうちょ振込手数料
	32725	ニチレイファーストレッド基質キット
	176605	Dako EnVision System/HRP, Rabbit/Mouse (DAB+)
	440	ゆうちょ振込手数料
	19734	Photoshop elements 2022
	220	ゆうちょ振込手数料
	64020	takara Ex Premirer DNA polymerase dye plus
	37026	Xba I

※注意：旅費（出張費、宿泊費、交通費）は研究経費に入りません。

支 出 費 内 訳

区 分	金 額	根 拠	
消 耗 品 費	440	ゆうちょ振込手数料	
	28930	Trypsin-EDTA solution	
	40656	13ml滅菌ツープポジションチューブ	
	440	ゆうちょ振込手数料	
	10890	冷却加熱アルミブロック 2.0mlチューブ用40well	
	220	ゆうちょ振込手数料	
	39600	エコノスピン for RNA	
	220	ゆうちょ振込手数料	
	2525	SONY USB 16GB	
	209	3M ポストイット	
	220	ゆうちょ振込手数料	

※注意：旅費（出張費、宿泊費、交通費）は研究経費に入りません。