癌-間質相互作用を利用した癌の抑制

特集 抗がん剤の molecular targeting

川 田 学*

Tumor suppression by modulation of tumor-stromal cell interaction

Every organ or tissue is mainly composed of its characteristic epithelial cells and its stroma. Epithelial-stromal cell interaction between the epithelial cells and the surrounding stroma regulates growth and function of the highly differentiated epithelial cells and homeostasis of the tissue. Because characters of the epithelial cells and the stroma are different from each tissue, the epithelial-stromal cell interaction is specific to each tissue. Like normal tissue, solid tumor tissue is composed of tumor cells and surrounding stroma including fibroblasts, macrophages, and endothelial cells. Since most solid tumor is generated from epithelial cells, growth of the tumor cells is regulated by the surrounding stroma through diffusible factors and/or adhesion similar to normal tissue. This tumor-stromal cell interaction plays a significant role in tumor growth, invasion, and metastasis, but the molecular mechanisms underlying the interaction are still unclear due to its complexity. However, recent studies have revealed some basic backgrounds for the tumor-stromal cell interaction concerning specific tumor types. This review article has focused especially on fibroblasts among stroma and briefly summarized recent advance of the tumor-stromal cell interaction. The fibroblasts promote tumor growth in one condition, but they also suppress it in another condition. There is a chance to control the tumor growth by modulating the tumor-stromal cell interaction. The perspective for development of an antitumor drug that modulates the tumor-stromal cell interaction is also discussed.

Manabu Kawada*

key words : tumor-stromal cell interaction, solid tumor, tumor stroma, fibroblast, antitumor drug

体内の各組織・器官は、そこに特有な上皮細胞と周囲の間質によって形成されている。高度に分化した上皮細胞の増殖や機能および組織・器官の構造の維持は、上皮細胞とその周囲の間質との間の上皮-間質相互作用によって制御されている。それぞれの組織・器官の上皮細胞が特有であるように、それらを支える間質もその組織・器官で特有であり、両者の間の上皮-間質相互作用も特有である。

一方、臨床における「がん」は、癌細胞のみではなく、その周囲の間質と混在して成立している。固形癌はそのほとんどが上皮由来の細胞から発生することから、正常な組織・器官における上皮-間質相互作用と同様に、癌細胞の増殖に間質が重要な役割

を担っていると考えられる。癌転移における Paget の“seed and soil 説”もまさに癌-間質相互作用を述べたものである¹⁾。癌-間質相互作用は癌細胞の増殖、浸潤、転移に深く関わっていると古くから考えられているが、その複雑さゆえに不明な点が多い。

癌-間質相互作用は、「がん」の発症臓器によって異なると予想されるが、現在いくつかの癌種において、その実体が明らかにされつつある。近年精力的に研究され、癌治療の標的の一つとなっている血管新生も、癌-間質相互作用の結果生じる現象である。血管新生については多数のすぐれた総説があり、そちらを参照されたい。

本稿では、血管内皮細胞ではなく、特に線維芽細胞に焦点をあて、癌-間質相互作用に関する最近の研究報告について簡潔にまとめるとともに、筆者らの実験結果も含めて、癌治療の標的としての癌-間

* Drug Development Unit, Numazu Bio-Medical Research Institute, Microbial Chemistry Research Center (財)微生物化学研究会微生物化学研究センター・沼津創薬医科学研究所創薬基盤研究ユニット

図 1 上皮由来の癌細胞と間質

質相互作用の可能性について紹介したい。

腫瘍組織の成り立ち

正常な組織・器官では、通常上皮細胞層と間質は基底膜を介して、両者は厳密に隔てられている。上皮細胞は外胚葉や内胚葉由来であるのに対して、間質には中胚葉由来の細胞群が多く、組織・器官の発生の初期から両者の役割は異なっている。一概に間質といっても、それは多くのモノの集合体であり、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外基質、線維芽細胞、マクロファージ、血管内皮細胞などで構成されている(図1)。上皮系の固形癌の多くは上皮細胞の増殖の異常と捉えられるが、上皮細胞の過形成や初期の癌細胞の集団よりなる癌巣では、基底膜は維持されていて、上皮細胞や癌細胞と間質は混ざり合うことはない。しかし、一度癌細胞が基底膜を破壊し間質へと浸潤した場合、つまり浸潤性の悪性度の高い「がん」では、癌細胞と間質が隣接したり、混ざり合うようになる。これによって、癌-間質相互作用はさらに密接になると考えられる。

実際、「がん」組織における間質を腫瘍間質(tumor associated stroma)と称し、正常の間質とは区別されている。新生血管も関与するが、一般的に、癌の増殖速度は癌細胞の増殖の速度だけでなく、これに伴う腫瘍間質の形成速度に依存するといわれている。したがって、腫瘍間質の形成速度が間に合わない

場合、癌細胞は壊死してしまう。

多くの癌種において、癌-間質相互作用が存在すると予想されるが、特にいくつかの癌種については、密接に関与することがわかってきた。特に、乳癌や前立腺癌などでは、癌細胞の増殖に間質が重要な役割を果たしているといわれている^{2,3)}。前立腺癌では、その進行状態によって間質の混在度が変化するが、その病理組織からは明らかな間質と癌細胞の共存が見てとれる⁴⁾。また大腸癌では、線維化が顕著な症例は予後がわるいとの報告があり、筋線維芽細胞の癌細胞への集積が、大腸癌細胞の浸潤性を促進する重要な役割を果たしていると考えられる⁵⁾。

このように、臨床の「がん」組織中に間質が多く存在することは病理組織の観察から明らかであるが、どのように間質が「がん」の成立に関わっているのか、具体的に介在する分子群については不明な点が多い。

腫瘍組織での間質の役割

前述したように、間質はコラーゲンやフィブロネクチンなどのマトリックス成分とそれを産生する細胞からなる結合組織、新生血管、リンパ球やマクロファージなどの炎症性細胞など、さまざまな細胞と物質によって構成されている(図1)。「がん」との関係では、腫瘍組織に浸潤したマクロファージ(TAM)や血管新生なども腫瘍間質に含まれる。腫

図 2 癌-間質相互作用

瘍組織の新生血管が未成熟であるように、腫瘍間質は正常な組織の間質とは特性が異なると考えられている。腫瘍間質が癌細胞の増殖を促進する一方で、正常な組織の間質は、むしろ癌細胞の増殖を抑制する働きがあるとも予想されている。このような癌-間質相互作用には、パラクライン的、オートクライン的に作用する増殖因子や増殖抑制因子の分泌や、ECM の産生、それを分解する酵素群や細胞の接着など、さまざまな要因が関与する(図 2)。

1. 細胞外基質(ECM)

線維芽細胞や筋線維芽細胞の主要な役割は細胞外基質(ECM)の産生である。ECM は蛋白、糖蛋白、プロテオグリカン、グリコサミノグリカンなどで構成され、組織の構造を支持したり、増殖因子などの貯蔵庫としての役割も果たしている。コラーゲンは組織の強度や弾力性に寄与している。

一方、フィブロネクチンやラミニンは、細胞接着蛋白としても働き、癌細胞のインテグリンとの結合は接着や運動だけでなく増殖にも影響する。コラーゲンタイプ I, III やフィブロネクチンの産生が、線維芽細胞と乳癌細胞の共培養によって促進されることが報告されている⁹⁾。

2. 分解酵素

癌細胞が浸潤、転移する過程において、癌細胞のみでなく、間質の線維芽細胞やマクロファージも、ECM を分解するさまざまなプロテアーゼやその下流の活性化因子を分泌する。分泌されるプロテアー

ゼは、I 型コラーゲナーゼ、MMP-2、MMP-9、ストロメライシン 1, 3 やウロキナーゼなど多様である。また、プロテオグリカンを分解し、ECM 中に貯蔵された増殖因子などの遊離や癌細胞の転移にも関与するヘパラーゼも知られている⁷⁾。たとえば、乳癌細胞 MCF-7 が線維芽細胞の MMP 産生を誘導することがわかっており⁸⁾、これら分解酵素の発現は、癌細胞や線維芽細胞から分泌された EGF, bFGF, TNF- α や HFG などによって調節されている⁹⁾。

3. 増殖因子、サイトカイン

間質の特に線維芽細胞や筋線維芽細胞は、さまざまな増殖因子やサイトカインを分泌する。VEGF, PDGF などは、癌細胞による新生血管の形成に重要な働きをする。また、血管新生に重要なサイトカインの一つでもある IL-8 が、非小細胞肺癌を共培養することで、正常な肺線維芽細胞からの産生が上昇するなど¹⁰⁾、その分泌が癌-間質相互作用によって制御されている。

bFGF は、癌細胞および線維芽細胞からも産生されるが、bFGF のレセプター FGF-R をある種の前立腺癌細胞が発現し、また、その FGF-R のドミナントネガティブ体が癌細胞の増殖を阻害することから、bFGF はパラクライン的にも作用すると考えられている^{11,12)}。また、IGF-II は正常な乳腺線維芽細胞では少ないが、腫瘍から分離した線維芽細胞は IGF-II を多く分泌し、さらに、乳癌細胞 MCF-7 との共培養によって、乳腺の線維芽細胞の IGF-II 産生が増加するなど¹³⁾、腫瘍間質では増殖因子やサイ

トカインなどの産生が正常とは異なる場合が多い。

HGF は初代培養肝細胞の増殖因子として、1984 年に大阪大学の松本、中村らによって発見された¹⁴⁾。HGF は上皮-間質相互作用のメーディエーターとして、発生過程におけるさまざまな組織・器官の形成、および、損傷に伴う組織・器官の再生に重要な役割を担っている¹⁵⁾。一方、癌-間質相互作用において、HGF は多くの癌細胞の浸潤、転移、さらには血管新生を促進し、癌悪性化にも関与している¹⁶⁾。癌細胞は、HGF のレセプターである c-Met/HGF レセプターを発現し、多くの癌細胞は IL-1, bFGF, PDGF などを分泌して、間質の線維芽細胞に HGF の産生を促進している¹⁶⁾。

このように癌-間質相互作用は、さまざまな因子によって制御されているが、各組織・器官がその特有な間質細胞によって成立していることを考えると、癌-間質相互作用も、その「がん」組織特有のものであり、臓器特異性があると予想される。原発を離れた癌細胞がある特定の臓器で転移巣を形成するのも、Paget の“seed and soil 説”にあるように、転移先での癌-間質相互作用が癌細胞にとって有利に働いた結果であるといえる¹⁾。

組織が損傷を受けたとき、その部位の防御や修復のために肉芽組織が形成される。間質の癌細胞に対する反応も、こうしたいわゆる損傷治癒に酷似しており、“がんは治らない傷である”とも称されている¹⁷⁾。肉芽形成により、新たに間質がつくられ、そこにさらに癌細胞が増殖、浸潤し、「がん」の生育を助ける。したがって、「がん」の進行には癌細胞の癌遺伝子や癌抑制遺伝子のみではなく、間質も重要な要因であると考えられる。

間質細胞による癌細胞の増殖の制御

臨床の「がん」組織に間質が混在するが、間質が癌細胞の増殖に与える影響についてはさまざまな方法で実験的に解析されている。その実験方法は、さまざまな癌細胞株と間質、特に線維芽細胞の組み合わせで共培養したり、マウスに同所接種する手法が用いられている。癌-間質相互作用は複雑であるた

間質による増殖促進作用		間質による増殖抑制作用	
間質細胞		間質細胞	
正常	癌組織	正常	癌組織
正常	Chung ら ¹⁸⁾	正常	
不死化	Krtolica ら ²⁴⁾	不死化	
癌	Picard ら ¹⁸⁾ Camps ら ²⁰⁾ Gleave ら ²¹⁾ Krtolica ら ²⁴⁾ Cornil ら ²⁶⁾	癌	Shirasawa ら ²⁰⁾ Cornil ら ²⁶⁾ Degeorges ら ²⁰⁾ Arnold ら ²⁰⁾ Bourhis ら ²⁰⁾
	Olumi ら ²²⁾		Kooistra ら ²⁷⁾
	Olumi ら ²²⁾		
	Roozendaal ら ²³⁾		

■：由来する臓器が同じもの

図 3 間質細胞による上皮系細胞の増殖促進と抑制

本文で紹介した研究論文を図にまとめた。正常な間質細胞と癌細胞の組み合わせで解析した研究が多い。

め、その実験系は重要である。たとえば、初代培養の際に生体から分離すると、細胞の元来の性質の多くが失われてしまうように、腫瘍組織から癌細胞とその間質をうまく分離し、さらに実験室で再構築することはきわめて困難である。事実、実験系を複雑にすれば解析は困難になり、また、単純化した場合に生体をどれだけ反映できているのかという問題は、常に気にしなければならない点である。

これまでの研究報告の主なものを図 3 にまとめた。一般的に、臨床「がん」から分離した癌細胞すべてが、ヌードや scid などの免疫不全マウスに腫瘍を形成できるのではなく、マトリゲルと一緒に、ときには orthotropic に接種すると腫瘍を形成するのは、一部、癌-間質相互作用が必要不可欠な因子であることを示しているといえる。たとえば、それ単独では、ヌードマウスに腫瘍を形成しない癌細胞を、WAG ラット線維芽細胞と一緒に接種すると腫瘍が形成され、さらに、その線維芽細胞の培養上清を癌細胞と接種しても腫瘍が形成される¹⁸⁾。

一方、Chung らは Nb ラットの線維芽細胞と上皮細胞を分離し、これらをマウスの同所に接種して腺癌を形成させた¹⁹⁾。さらに、Camps らはラットの前立腺線維芽細胞と前立腺癌や乳癌の細胞をヌードマウスに移植することで、癌の増殖速度が速くなることを示した²⁰⁾。筆者らの結果からも、ヒト前立腺癌 DU-145 の scid マウスでの増殖が前立腺間質細胞によって加速されることがわかった(図 4)。

図4 前立腺間質細胞による前立腺癌細胞の造腫瘍性の増大
前立腺間質細胞のみでは scid マウスに腫瘍を形成しないが、前立腺癌細胞 DU-145 単独(○)にくらべて、前立腺間質細胞と一緒にマウスに接種すると(■)明らかに腫瘍の生育が速くなる。

このようにある種の線維芽細胞は、癌の増殖を *in vivo* で増大させることがわかったが、その後の研究から線維芽細胞には特異性があることがわかってきた。たとえば、前立腺癌細胞 LNCaP の *in vivo* での造腫瘍性は、ヒトの骨線維芽細胞やラットの前立腺線維芽細胞では増大したが、NIH 3 T 3 や腎臓や肺由来の線維芽細胞では増大しなかった²¹⁾。

一方、前立腺癌から分離した線維芽細胞は、正常な前立腺上皮細胞と一緒にマウスに接種しても腫瘍を形成しないが、SV 40 ラージ T 抗原で不死化した上皮細胞と一緒に接種すると腫瘍を形成した²²⁾。また、乳癌から分離した線維芽細胞は乳癌細胞の増殖を促進したが、近隣の正常な線維芽細胞は促進しなかった²³⁾。さらに、線維芽細胞の状態によっても異なり、老化した線維芽細胞 WI-38 は不死化した角化細胞や乳腺上皮細胞、乳癌細胞の増殖を *in vitro*, *in vivo* で促進する²⁴⁾。

これらとは反対に、間質細胞によって癌細胞の増殖が抑制される例もある。線維芽細胞 WI-38 との共培養やその培養上清によって癌細胞の増殖が抑制される報告がある²⁵⁾。さらに、癌の進行度によっても変化する場合もあり、皮膚由来線維芽細胞によって初期のメラノーマの増殖は抑制されるが、進行したメラノーマの増殖は増大する²⁶⁾。また、Kooistra らは

前立腺間質細胞によって前立腺癌細胞 PC-3, LNCaP の増殖が抑制され、その培養上清でも抑制活性を報告しており、前述とは異なる結果を得ている²⁷⁾。さらに、前立腺肥大症の間質によっても前立腺癌細胞 LNCaP の増殖は抑制されるが、この正体は IL-6 であることが報告されている²⁸⁾。このほか、子宮内膜の正常な間質細胞の培養上清による子宮内膜癌の増殖抑制や²⁹⁾、正常な乳腺組織から分離した線維芽細胞による乳癌細胞 MCF-7 の増殖抑制などが報告されている³⁰⁾。

このようにある種の癌細胞は、その臓器由来の線維芽細胞によって増殖速度が速くなるが、その逆の場合もある。また、由来の臓器にかかわらず、線維芽細胞によって癌細胞の増殖速度が速くなったり、遅くなったりする場合もある。このように統一した結果が得られないのは、線維芽細胞が、その分離や培養の条件によって、癌細胞にとって正にも負にも働くことを意味している。しかし、これは潜在的に線維芽細胞が持っている性質であるとも予想されることから、生体内でも同様に正あるいは負に働く局面があると考えられる。筆者らはこのような背景から、間質のなかでも特に線維芽細胞に興味を持って研究を行っている。

癌細胞による間質の活性化

正常な組織では間質は増殖性も低く、組織の恒常性を保つだけの必要最低限度の因子しか産生していない。しかし、損傷治癒と同様に癌細胞によって基底膜が分解され損傷が起きると、間質は反応性の状態に変化し、増殖性が高くなり、ECM、増殖因子や分解酵素などを盛んに分泌するようになる。損傷治癒の場合、線維芽細胞や血管平滑筋細胞が筋線維芽細胞に変化するといわれている。線維芽細胞はビメンチンを、平滑筋細胞は SM アクチンを発現しているが、筋線維芽細胞はその両方を発現している。したがって、筋線維芽細胞はその表現型から線維芽細胞と平滑筋細胞の中間体と捉えられている⁴⁾。筋線維芽細胞は乳癌、肺癌、大腸癌、胃癌、前立腺癌などの腫瘍組織に多くみられている⁴⁾。

「がん」組織中の間質細胞とその周辺の正常組織の

間質細胞は異なる。たとえば、乳癌細胞 MCF-7 や ZR-75.1 の増殖は、乳癌から分離した線維芽細胞の培養上清では増殖が加速するが、近隣の正常部位から分離した線維芽細胞は無効であった²³⁾。また、前立腺では上皮細胞だけでなく間質細胞もアンドロゲンレセプターを発現しているが、前立腺癌では癌細胞に隣接する間質細胞のアンドロゲンレセプターの発現量が周辺の正常な間質細胞にくらべて減少していることが報告されている^{31,32)}。

筆者らは、前立腺癌細胞と間質細胞を用いた実験から、前立腺癌細胞の培養上清が間質細胞のアンドロゲンレセプターを減少させることを見いだした³³⁾。また前述したように、線維芽細胞からの増殖因子や分解酵素の産生が癌細胞によって制御されているように、癌細胞の作用によって間質細胞はなんらかの影響を受けている。間質は臓器特異的であるが、その構成はヘテロであり、癌種、癌の進行度によっても異なることから、癌細胞からの影響因子はよくわかっていない。

Rowley らは、一連の研究から reactive stroma という言葉で腫瘍間質を称している。彼らは癌細胞が間質細胞を活性化すると仮説を立て、臨床組織を解析した結果、前立腺癌の間質は線維芽細胞と筋線維芽細胞が混在していることを見いだした³⁴⁾。線維芽細胞が筋線維芽細胞へと変化することを活性化とし、これを担うものが TGF- β 1 であると示唆した。その後の研究から、活性化した間質と前立腺癌細胞 LNCaP をマウスに同所接種して腫瘍を形成させたとき、TGF- β 1 のシグナルを阻害すると血管新生および癌の増殖が抑制されることを報告している³⁵⁾。このように TGF- β 1 は、癌細胞による間質活性化の要因の一つであると考えられる。

癌治療の標的としての癌-間質相互作用

癌-間質相互作用の利用は「がん」の成立に着目しており、その特異的な相互作用を標的とすれば、従来の癌細胞を標的にした治療法とは異なる新たな癌治療法が生み出せると考えられる。それでは、癌-間質相互作用を人為的に操作することによって、「がん」の抑制は可能なのであろうか。

1. NK 4

癌細胞の増殖に対して間質が正に働く、つまり増殖因子の分泌として重要なものの一つは HGF である。HGF による癌-間質相互作用による「がん」の悪性化を阻止するために、大阪大学の松本、中村らは HGF アンタゴニスト NK 4 を作製した³⁶⁾。NK 4 は、HGF のエラスターゼ消化産物で、c-Met/HGF レセプターに結合する部分構造を有し、HGF による癌細胞の増殖、浸潤を *in vitro*, *in vivo* において抑制した³⁷⁾。

さらに最近では、NK 4 が血管新生も阻害することが報告され³⁸⁾、NK 4 は癌休眠療法として期待されている。この成果は癌-間質相互作用の重要性とその利用による「制がん」への可能性を示している。

2. 間質による癌細胞の負の制御

間質はある条件では、「がん」の発達に時として負に働く局面がある。筆者らは間質が負に働くことに強い関心を持った。つまり、線維芽細胞を刺激することによって癌細胞に不利な状況をつくれないか、そのような増殖抑制因子を産生させることはできないだろうかということである。

この可能性を検証するために、間質との関与が密接であり、また、今後日本でさらに増加が予想される前立腺癌をモデルに検討した。実験系として、癌細胞と線維芽細胞の共培養系を用いたが、両細胞の直接的な接着も加味するため、線維芽細胞をプレートに培養し、その上から癌細胞を撒く方法を用いた。種々の線維芽細胞と前立腺癌細胞との共培養を行い、さまざまなサイトカインで刺激して癌細胞の増殖に与える影響を調べた。

その結果、IL-1 β や TNF- α といった炎症性サイトカインが、前立腺癌細胞 LNCaP の単独培養では若干の増殖抑制はしきないが、線維芽細胞 WI-38 との共培養で LNCaP の増殖を強く阻害することがわかった³⁹⁾。さらに、IL-1 β や TNF- α を添加して培養した線維芽細胞の培養上清でも増殖が強く阻害されたことから、これらサイトカイン処理によって、線維芽細胞からなんらかの抑制因子が分泌されていると考えられた。実際、TNF- α 、特に IL-1 β の刺激で線維芽細胞が IL-6 を分泌し、サイトカイン処

B WI-38 培養上清中の IL-6 の濃度

	IL-6 (ng/ml)
無処理	0.82 ± 0.046
IL-1β 5 ng/ml	43.1 ± 2.46
TNF-α 5 ng/ml	4.70 ± 0.814

図 5 サイトカインによる癌-間質相互作用の制御

A: 線維芽細胞 WI-38 を IL-1 β や TNF- α を添加して培養すると、その培養上清によって前立腺癌細胞 LNCaP の増殖は阻害されるが、このとき抗 IL-6 抗体や抗 IL-6 レセプター抗体を加えると、その阻害作用はキャンセルされる。

B: 線維芽細胞 WI-38 を IL-1 β や TNF- α を添加して培養した培養上清中の IL-6 の濃度

C: 前立腺癌細胞 LNCaP を線維芽細胞 WI-38 と共培養すると、IL-1 β や TNF- α が線維芽細胞の分泌する IL-6 を介して、LNCaP 細胞の増殖を阻害する。

理の培養上清による増殖阻害活性も、IL-6 の抗体や IL-6 レセプターの中和抗体でキャンセルされることがわかった(図 5)³⁹⁾。

このように、前立腺癌細胞 LNCaP を正常線維芽細胞 WI-38 と共培養することにより、IL-1 β や TNF- α が線維芽細胞の分泌する IL-6 を介して癌細胞の増殖を阻害することがわかった。この結果から、ある種の癌細胞は間質から負の因子を分泌させることで抑制できると考えられた。

3. 低分子化合物による癌-間質相互作用の制御

低分子化合物によって、間質から癌に対する負の因子を産生させることができれば、新たな制癌剤の可能性があると考え、筆者らは活性物質の探索系へと前述の共培養実験系を応用した。つまり、目的とする活性物質は、間質や癌細胞単独では増殖を抑制しないが、両者の共培養で強く癌細胞の増殖のみを阻害する物質である。物質の探索系は迅速かつ簡便であるのが好ましいが、共培養系は複雑であり、いくつかの工夫が必要であった。試行錯誤の結果、マイクロプレートを用いて、共培養で癌細胞のみを選択的に染色、定量する方法を確立した。また、共培養において臓器特異性をより考慮し、前立腺間質細胞を用いることにした。

マイクロプレートでの細胞増殖測定では MTT がよく用いられている。筆者らも当初 MTT を用いていたが、この方法では共培養の実験で癌細胞と間質細胞両方の総和となってしまう、癌細胞の増殖を選択的に測定できない。一方、中性脂質を染色するローダニルブルーは間質細胞との共培養で癌細胞を選択的に染色する(図 6 A~C)²⁴⁾。そこで、このローダニルブルー染色を用いて癌細胞の増殖を定量する方法を構築した。ローダニルブルー染色法は、細胞数とよく相関し、また MTT 法とくらべて、共培養での間質による癌細胞の増殖への影響もよりよく検出できることがわかった(図 6 D, E)。さらに、ある種の前立腺癌細胞は低血清条件下で、間質細胞によって増殖が促進されることがわかった(図 6 E)。

この方法を用いて、既存の抗がん剤の癌-間質相互作用に与える影響を調べた結果、5-FU やプレオマイシンは間質細胞と共培養するとその抗腫瘍活性が

図 6 ロードニルブルー染色法を用いた癌-間質共培養実験系

A～C：ロードニルブルーで染色すると癌細胞が選択的に染色される。

D：癌細胞の細胞数にもよく相関する。

E：前立腺癌細胞と前立腺間質細胞を共培養し、癌細胞の増殖を単独培養と比較した。MTT 法とくらべて、共培養したときの間質細胞による癌細胞の増殖の増加がよりはっきりと検出できる。

増強されることがわかった(図 7)。さらに、微生物培養液をソースとして活性物質の探索を行い、一放線菌培養液に活性を見いだした。その活性物質を単離精製した結果、大村らがセルロース合成の阻害剤として発見した Phthoxazolin A と同定した⁴⁰⁾。Phthoxazolin A は前立腺癌細胞単独での培養にくらべ、前立腺間質細胞との共培養で癌細胞の増殖を強く阻害した(図 7)。

Phthoxazolin A で処理した前立腺間質細胞の培養上清でも癌細胞の増殖が強く阻害されたことから、Phthoxazolin A の作用で間質細胞が産生するなんらかの癌抑制因子の分泌、あるいは増殖因子の産生が阻害されたと考えられる。この結果から、低分子化合物によっても癌-間質相互作用を利用した「制がん」効果を期待できることが示唆された。

おわりに

現在、筆者らはさらなる活性物質の探索を行いながら、Phthoxazolin A の作用機構の解析を行っている。Phthoxazolin A によってなんらかの癌細胞増殖抑制因子が間質細胞から分泌されると予想しているが、その分子標的の解析には従来の古典的な方法論だけでなく、間質細胞が産生する因子の網羅的な解析も必要であると感じている。癌-間質相互作用の実験系は複雑ゆえに、簡素化した場合それが本当を見ているのかという問題がある。現在の筆者らの方法がベターであるかどうかはわからないが、解析からなんらかの因子にたどり着けるのではないかと期待している。そしてその分子メカニズムが解明できれば、より理論的な創薬に向けた物質の探索が可

図 7 低分子化合物による癌-間質相互作用の制御
A: 前立腺癌細胞単独(○)と前立腺間質細胞と共培養(●)したときの、低分子化合物による増殖抑制効果
B: Phthoxazolin A の構造

能になると考えている。

これまでの癌研究は、癌細胞の細胞膜を境界線とするならば、主に細胞膜の内側で起こっている現象、つまり、癌細胞側の遺伝子異常に基づく解析を中心に進められてきた。そして、このなかから多くの癌治療の分子標的が見いだされている。一方で、癌-間質相互作用も「がん」の成立に重要な要因であると思われ、細胞膜の外で起きている現象も癌治療の分子標的を見いだす手立てになると考えられる。

より生体に近い状態での癌-間質相互作用を解析するためには、腫瘍間質の分離技術の向上が必要不可欠である。また、腫瘍間質と正常間質とのゲノム解析やプロテオーム解析によって、新たな展開がみえると思われる。そのなかから、本当の癌-間質相互作用がみえてくるに違いない。

また、創薬にはこれら癌-間質相互作用を修飾する物質を簡便に探索する方法も必要である。研究推進の大きな足かせは、癌-間質相互作用の多様性であるといえるかもしれない。なんらかの形で多くの研究者が参画し、この分野が活性化されることを期待している。

文 献

- 1) 矢守隆夫: 臓器微小環境と癌転移. 実験医学 16: 2063-2068, 1998.
- 2) Wiseman BS, Werb Z: Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. Science 296: 1046-1049, 2002.
- 3) Grossfeld GD, Hayward SW, Tlsty TD, Cunha GR: The role of stroma in prostatic carcinogenesis. Endocrine-Related Cancer 5: 253-270, 1998.
- 4) Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR: Reactive stroma in prostate cancer progression. J Urol 166: 2472-2483, 2001.
- 5) 森本 恵, 入村達郎: 腫瘍の線維化と浸潤性, 転移性. 実験医学 16: 2082-2087, 1998.
- 6) Noel A, Munaut C, Boulvain A, Calberg-Bacq CM, Lambert CA et al.: Modulation of collagen and fibronectin synthesis in fibroblasts by normal and malignant cells. J Cell Biochem 48: 150-161, 1992.
- 7) Friedmann Y, Vlodavsky I, Aingorn H, Aviv A, Peretz T et al.: Expression of heparanase in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa and stroma. Evidence for its role in colonic tumorigenesis. Am J Pathol 157: 1167-1175, 2000.
- 8) Ito A, Nakajima S, Sasaguri Y, Nagase H, Mori Y: Co-culture of human breast adenocarcinoma MCF-7 cells and human dermal fibroblasts enhances the production of matrix metalloproteinases 1, 2 and 3 in fibroblasts. Br J Cancer 71: 1039-1045, 1995.
- 9) Wernert N: The multiple roles of tumor stroma. Virchows Arch 430: 433-443, 1997.
- 10) Anderson IC, Mari SE, Broderick RJ, Mari BP, Shipp MA: the angiogenic factor interleukin 8 is induced in non-small cell lung cancer/pulmonary fibroblast cocultures. Cancer Res 60: 269-272, 2000.

- 11) Ozen M, Giri D, Ropiquet F, Mansukhani A, Ittmann M : Role of fibroblast growth factor receptor signaling in prostate cancer cell survival. *J Natl Cancer Inst* 93 : 1783-1790, 2001.
- 12) Nakamoto T, Chang C, Li A, Chodak GW : Basic fibroblast growth factor in human prostate cancer cells. *Cancer Res* 52 : 571-577, 1992.
- 13) Singer C, Rasmussen A, Smith HS, Lippman ME, Lynch HT et al. : Malignant breast epithelium selects for insulin-like growth factor II expression in breast stroma : evidence for paracrine function. *Cancer Res* 55 : 2448-2454, 1995.
- 14) Nakamura T, Nawa K, Ichihara A : Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem Biophys Res Commun* 122 : 1450-1459, 1984.
- 15) Matsumoto K, Nakamura T : Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* 239 : 639-644, 1997.
- 16) Nakamura T, Matsumoto K, Kiritoshi A, Tano Y, Nakamura T : Induction of hepatocyte growth factor in fibroblasts by tumor-derived factors affect invasive growth of tumor cells : *in vitro* analysis of tumor-stromal interactions. *Cancer Res* 57 : 3305-3313, 1997.
- 17) Dvorak HF : Tumors : wounds that do not heal. *N Eng J Med* 315 : 1650-1659, 1986.
- 18) Picard O, Rolland Y, Poupon MF : Fibroblast-dependent tumorigenicity of cells in nude mice : implication for implantation of metastases. *Cancer Res* 46 : 3290-3294, 1986.
- 19) Chung LWK, Cang S, Bell C, Zhou HE, Ro JY et al. : Co-inoculation of tumorigenic rat prostate mesenchymal cells with non-tumorigenic epithelial cells results in the development of carcinosarcoma in syngeneic and athymic animals. *Int J Cancer* 43 : 1179-1187, 1989.
- 20) Camps JL, Chang S, Hsu TC, Freeman MR, Hong S et al. : Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 75-79, 1990.
- 21) Gleave M, Hsieh J, Gao C, Eschenbach AC, Chung LWK : Acceleration of human prostate cancer growth *in vivo* by factors produced by prostate and bone fibroblasts. *Cancer Res* 51 : 3753-3761, 1991.
- 22) Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD et al. : Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 59 : 5002-5011, 1999.
- 23) Roosenendaal CEP, Ooijen B, Klijn JGM, Claassen C, Eggermont AMM et al. : Stromal influences on breast cancer cell growth. *Br J Cancer* 65 : 77-81, 1992.
- 24) Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez P, Campisi J : Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis : a link between cancer and aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 12072-12077, 2001.
- 25) Shirasuna K, Morioka S, Watatani K, Hayashido Y, Furusawa H et al. : Growth inhibition and differentiation of human salivary adenocarcinoma cells by medium conditioned with normal human fibroblasts. *Cancer Res* 48 : 2819-2824, 1988.
- 26) Cornil I, Theodorescu D, Man S, Herlyn M, Jambrosic J et al. : Fibroblast cell interaction with human melanoma cells affect tumor cell growth as a function of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 6028-6032, 1991.
- 27) Kooistra A, Konig JJ, Keizer DM, Romijn JC, Schroder FH : Inhibition of prostatic epithelial cell proliferation by a factor secreted specifically by prostatic stromal cells. *The Prostate* 26 : 123-132, 1995.
- 28) Degeorges A, Tatoud R, Fauvel-Lafeve F, Podgorniak M, Millot G et al. : Stromal cells from human benign prostate hyperplasia produce a growth-inhibitory factor for LNCaP Prostate cancer cells, identified as interleukin-6. *Int J Cancer* 68 : 207-214, 1996.
- 29) Arnold JT, Lessey BA, Seppala M, Kaufman DG : Effect of normal endometrial stroma on growth and differentiation in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 62 : 79-88, 2002.
- 30) Bourhis XD, Berhois Y, Millot G, Degeorges A, Sylvi M et al. : Effect of stromal and epithelial cells derived from normal and tumorous breast tissue on the proliferation of human breast cancer cell lines in co-culture. *Int J Cancer* 71 : 42-48, 1997.
- 31) Henshall SM, Quinn DI, Lee CS, Head DR, Golovsky D et al. : Altered expression of androgen receptor in the malignant epithelium and adjacent stroma is associated with early relapse in prostate cancer. *Cancer Res* 61 : 423-427, 2001.
- 32) Olapade-Olaopa EO, MacKay EH, Taub NA, Sandhu DPS, Terry TR et al. : Malignant transformation of human prostatic epithelium is associated with the loss of androgen receptor immunoreactivity in the surrounding stroma. *Clin Cancer Res* 5 : 569-576, 1999.
- 33) Minamiguchi K, Kawada M, Someno T, Ishizuka M : Androgen-independent prostate cancer DU 145 cells suppress androgen-dependent growth of prostate stromal cells through production of inhibitory factors for androgen responsiveness. *Biochem Biophys Res Commun*, in press.
- 34) Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD et al. : Reactive stroma in human prostate cancer : induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clin Cancer Res* 8 : 2912-2923, 2002.
- 35) Tuxhorn JA, McAlhany SJ, Yang F, Dang TD, Rowley DR : Inhibition of transforming growth factor- β activity decreases angiogenesis in a human prostate cancer-reactive stroma xenograft model. *Cancer Res* 62 : 6021-6025, 2002.
- 36) Date K, Matsumoto K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T : HGF/NK 4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor. *FEBS Lett* 420 : 1-6, 1997.
- 37) Date K, Matsumoto K, Kuba K, Shimura H, Tanaka M et al. : Inhibition of tumor growth and invasion by a four-kringle antagonist (HGF/NK 4) for hepatocyte growth factor. *Oncogene* 17 : 3045-3054, 1998.
- 38) Kuba K, Matsumoto K, Date K, Shimura H, Tanaka M et al. : HGF/NK 4, a four-kringle antagonist of hepatocyte growth factor, is an angiogenesis inhibitor that suppresses tumor growth and metastasis in mice. *Cancer Res* 60 : 6737-6743, 2000.
- 39) Kawada M, Ishizuka M, Takeuchi T : Enhancement of antiproliferative effects of interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α on human prostate cancer LNCaP cells by coculture with normal fibroblasts through secreted interleukin-6. *Jpn J Cancer Res* 90 : 546-554, 1999.
- 40) Omura S, Tanaka Y, Kanaya I, Shinose M, Takahashi Y : Phthoxazolin, a specific inhibitor of cellulose biosynthesis, produced by a strain of *Streptomyces* sp. *J Antibiot* 43 : 1034-1036, 1990.