

令和元年6月24日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09095

研究課題名(和文)ケモカイン受容体会合分子フロントが制御する細胞/分子シグナルの解析

研究課題名(英文) Cellular and molecular signals mediated by chemokine receptor-associated molecule FROUNT

研究代表者

寺島 裕也 (Terashima, Yuya)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・講師

研究者番号：90538729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ケモカイン受容体システムは細胞動態に重要な役割を担っており、本研究代表者の発見したケモカイン受容体の細胞内に結合するタンパク質FROUNT(フロント)は、がんの増悪化に関わる新規分子であり、マクロファージの遊走シグナルを促進する。しかし他の細胞現象および細胞内シグナルへの関与は不明である。本研究ではFROUNT欠損マウス由来細胞およびFROUNT阻害薬を用いた細胞/分子レベルの解析によりマクロファージの分化および活性化などの細胞内シグナルへのFROUNTの重要な関与を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ケモカイン受容体シグナルは細胞遊走以外にも細胞分化・活性化等を介したがん・炎症性疾患における関与が報告されている。ケモカイン受容体会合分子FROUNTのこれらの細胞現象における働きを解析することは、「受容体会合分子による細胞動態の制御機構」という新しい研究分野の開拓につながる研究である。また本研究により、開発中のFROUNT阻害薬の作用機序に関する詳しい知見を得られたことで、臨床研究の開始に結びつけることができた。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the roles of FROUNT in various kind of cellular response other than chemotaxis to clarify the mechanisms of the anti-tumor effect of FROUNT inhibitor. Analysis using cells prepared from FROUNT-deficient mice and FROUNT-inhibitor reveals that FROUNT is involved in cellular shape change and activation status upon chemokine stimulation. These data suggest that FROUNT inhibitor suppress tumor progression through mechanisms by which FROUNT regulates both migration and activation/differentiation of macrophages in the tumor microenvironment.

研究分野：シグナル制御創薬

キーワード：ケモカイン シグナル制御 創薬 予防・治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

サイトカインの一種であるケモカインは50種類の分泌タンパクファミリーであり、20種程の7回膜貫通Gタンパク共役型のケモカイン受容体への結合を介して細胞の遊走(移動・浸潤)および細胞の分化・活性化を制御している。各細胞サブセットによって発現するケモカイン受容体のパターンが異なり、定常・がん・炎症時の時空間的な細胞動態の制御にケモカイン・ケモカイン受容体システムは重要な役割を担っている。なかでもケモカイン受容体CCR2とCCR5は単球・マクロファージなどに発現するケモカイン受容体で、アミノ酸配列上は相同性の高い受容体であるものの各受容体へ結合するケモカイン、発現細胞、役割はオーバーラップしつつも異なっている。がん・炎症ではCCR2は骨髄から血液循環への単球の動員およびマクロファージへの分化・活性化など、CCR5は組織におけるマクロファージの集積・活性化などを促進することでがんおよび炎症性疾患の増悪化に関わっている。CCR2およびCCR5を阻害する抗がん剤の開発はこれまで進められてきているものの、いまだ上市に成功したものはない。

本研究代表者はこれらのケモカイン受容体の細胞内領域に結合する新規分子「FROUNT(フロントと命名)」を発見し、機能解析を通じてFROUNTは単球およびマクロファージに高発現しており細胞遊走シグナルを促進すること(引用文献、 )がんの増悪化を促進することを見出した。また臨床検体の解析を通してFROUNT発現の高い肺癌患者は術後予後が不良であることを見出した。さらに、13万種類の低分子化合物ライブラリーよりFROUNTの機能を阻害する化合物を探索し、その中でジスルフィラム(既存嫌酒薬、ノックピン)を同定した。ジスルフィラムはFROUNTタンパク質へ直接結合することで、FROUNTとケモカイン受容体の相互作用を強力に阻害することを見出した。しかし、FROUNTが制御する細胞遊走シグナル以外の細胞現象への関与およびこれらの細胞現象へ及ぼすFROUNT阻害薬ジスルフィラムの薬効については明らかではない。

### 2. 研究の目的

本研究では、研究代表者らが最近作出したFROUNT欠損マウスおよびFROUNT阻害薬ジスルフィラムを用いることで、FROUNTにより制御される細胞現象および細胞内シグナルを解析し、いまだ多くが謎とされ残されているケモカイン受容体の細胞内シグナルの活性化機構を明らかとすることで、生体内の細胞動態の制御機構を解明し新たな研究分野を開拓することを本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) FROUNT欠損マウス由来マクロファージの調製

タモキシフェン誘導型FROUNT欠損マウスおよびミエロイド系細胞特異的FROUNT欠損マウスの骨髄細胞を採取し、M-CSF存在下で一週間培養することでマクロファージを分化誘導し、ケモカイン刺激に対する各種応答性の解析に用いた。形態変化の解析においては、腹腔洗浄液より得られたマクロファージを実験に用いた。

#### (2) ケモカイン刺激依存的な形態変化の解析

細胞をガラスベースディッシュ内で培養し、ガラス面に接着させた。刺激を加える2時間前に無血清の細胞遊走アッセイバッファー(RPMI-1640, 2mM L-Glutamine, 10mM HEPES, 0.1%BSA)に置換したのち、ケモカインを添加し、刺激を加えた。の評価には、細胞遊走アッセイバッファーに置換する際に各濃度の阻害剤を添加して前処理を行った。刺激後すみやかにPFA溶液を添加して細胞を固定し、1% Tritonにて浸透化処理を行ったのち、蛍光標識ファロイジンにより重合アクチンを染色した。蛍光顕微鏡にて細胞形態の画像を取得した。

#### (3) ケモカイン刺激依存的な細胞遊走活性の解析

細胞懸濁液を5 $\mu$ m孔の細胞遊走チャンバーのフィルター上に添加し、下層に添加したケモカインに対して遊走した細胞数をセルカウンティングキットにより測定し、遊走活性を定量した。

#### (4) マウス実験的肺転移モデルの解析

マウスメラノーマ細胞株B16をマウス尾静脈より移植し、10日後に肺に形成された転移巣の数を計数した。阻害剤の薬効評価においては、移植の前日および翌日に阻害剤またはコントロールとして溶媒を腹腔内投与した。一部の肺葉はコラゲナーゼ処理により細胞懸濁液を調製し、フローサイトメーターにより構成細胞ポピュレーションの解析を行った。

#### (5) FROUNT欠損および阻害による細胞増殖・細胞傷害への影響の解析

細胞増殖活性の定量には、テトラゾリウム塩WST-1の細胞内脱水素酵素による還元によって生じるホルマザン由来の吸光度を測定した。細胞傷害の定量には、細胞傷害によって培養上清中に放出された乳酸脱水素酵素(LDH)の量を測定した。

#### (6) フローサイトメトリーを用いた細胞表面マーカー解析

がん組織より酵素消化により腫瘍構成細胞の懸濁液を調製し、マクロファージマーカー分子お

よび分化・活性化マーカー分子に対する各種標識抗体で染色し、フローサイトメーターにて測定した。

#### 4. 研究成果

(1) FROUNT 欠損・FROUNT 阻害によるケモカイン刺激依存的な細胞遊走および細胞形態変化  
FROUNT 欠損およびコントロールマウス由来の単球・マクロファージを用いて細胞遊走および細胞形態変化への FROUNT の関与を解析した。コントロールマウス由来細胞においては、ケモカイン刺激に伴い仮足の著しい突出が認められ、葉状仮足の形成が盛んであるのに対して、FROUNT 欠損マウス由来細胞では、仮足形成に乏しく、形成される仮足は糸状仮足様の形態を示していた。また、FROUNT 阻害薬ジスルフィラムの処置によってもフロント欠損細胞と同様の形態的な違いが観察された。さらに、この FROUNT 欠損細胞に特徴的な形態変化について、PI3K 阻害剤の影響を解析したところ、FROUNT 欠損およびジスルフィラム処理と同様にケモカイン刺激依存的な形態変化が減弱したことから、見出した細胞形態の変化は PI3K 依存的であることが示唆された。また、マウス担癌モデルがん組織よりマクロファージを調製し、細胞形態を観察したところ、コントロールマウスのがん組織由来マクロファージは葉状仮足を多数形成しているのに対して、FROUNT 欠損マウス由来マクロファージでは葉状仮足が著明に減少し、糸状仮足様の形態を示す細胞が多く認められ、*in vitro* で見られた FROUNT 欠損およびジスルフィラム処置細胞と同様の形態変化が *in vivo* においても観察された。

#### (2) FROUNT 欠損・FROUNT 阻害による細胞増殖・毒性への影響

ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞株を用いて、ジスルフィラムの細胞毒性を評価した結果、WST-1 アッセイによる毒性試験において変化は認められず、FROUNT 阻害による細胞毒性は確認できなかった。また、これと同一の阻害剤処置条件にて細胞遊走活性の低下が認められた。この遊走活性は PI3K 阻害剤で抑制されたことから、PI3K 依存的な細胞内シグナルを介することが示唆される。これらのことから、FROUNT 阻害により細胞増殖および毒性に依存することなく PI3K を介した細胞遊走シグナルを阻害していることが考えられた。

マウス腫瘍モデルにおいて FROUNT 阻害により抗腫瘍活性が得られるメカニズムとしてがん細胞に対する直接的な増殖抑制・傷害作用の可能性を検討した。細胞増殖活性は WST-1 アッセイにて、細胞傷害作用を LDH アッセイにより測定した。その結果、FROUNT 阻害剤では 2 種類のがん細胞（マウス肺がん細胞株 LLC およびメラノーマ細胞株 B16）に対する増殖抑制、傷害作用は認められなかった。一方、既存の抗がん薬として臨床で使用されている 5-フルオロウラシル（5-FU）についてはジスルフィラムでは細胞に影響を与えない濃度域においてがん細胞に対する増殖抑制および細胞傷害を認めた。

がん細胞株を用いたマウス実験的肺転移モデルにおいて、FROUNT 阻害剤の投与により著明に転移巣形成が抑制され、マクロファージの集積抑制が認められたが、がん細胞に対する直接的な増殖抑制・細胞傷害活性を示した 5-FU では有意な転移抑制作用は認められなかった。これらの結果より、FROUNT 阻害により、がん細胞に対する直接的な作用によらず、マクロファージの活性制御を介して、がん細胞の転移巣形成を阻害していることが示唆された。

#### (3) FROUNT 欠損および FROUNT 阻害によるマクロファージ分化・活性化状態の変化

マクロファージはケモカイン刺激を受けて CCR2 および CCR5 を介して遊走するとともに、これらのケモカインシグナルは腫瘍促進性マクロファージへの分極化および活性化を誘導することが知られている。FROUNT 欠損および FROUNT 阻害による遊走活性への作用に加えて、分化・活性化状態の変化を解析するために、フローサイトメーターを用いて腫瘍におけるマクロファージの細胞表面マーカーの発現を解析した。その結果、FROUNT 欠損マクロファージにおいては、MHC class II、CD80、CD86 等の活性化マーカー分子の発現減弱が認められた。また M2 型に分極化したマクロファージのマーカーである CD206 の発現低下も認められた。これらの変化は、ジスルフィラムを投与したマウスの腫瘍マクロファージにおいても認められた。

以上より、FROUNT はマクロファージの遊走シグナルのみならず、腫瘍促進性マクロファージへの分化および活性化にも関与しており、ジスルフィラムの処置によりがん微小環境のマクロファージにおける FROUNT 機能を阻害し遊走および分化・活性化を制御し、腫瘍抵抗性の環境を構築することでがんの進展を抑制することが示唆された（発表論文）。本研究成果は別研究課題における FROUNT 阻害薬ジスルフィラムのがん患者を対象とした非臨床研究の基盤となり、臨床研究の開始へ結び付けた（臨床研究実施計画・研究概要 jRCT ID: 031180183）。

#### < 引用文献 >

Terashima Y. *et al.* Pivotal function for cytoplasmic protein FROUNT in CCR2-mediated monocyte chemotaxis. *Nature Immunology*. 2005; 6(8):827-35.

Toda E.\*, Terashima Y. (Equal contribution) *et al.* FROUNT is a common regulator of CCR2 and CCR5 signaling to control directional migration. *J Immunology*. 2009; 15;183(10):6387-94.

Toda E., Terashima Y. (Corresponding author) et al. Identification of a binding element for the cytoplasmic regulator FROUNT in the membrane-proximal carboxy-terminal region of chemokine receptors CCR2 and CCR5. *Biochem. J.* 2014; 457:313-322.

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計2件)

Terashima Y. et al., Targeting FROUNT with Disulfiram Regulates Macrophage Responses in Cancer, *Cell Press Sneak Peek*, January 2018, SSRN Electronic Journal, DOI:10.2139/ssrn.3155880 (査読なし)

寺島裕也、他、マクロファージ制御による新たながん治療薬の開発、*細胞* 2016 48 (13) p8-p12 (査読なし)

### 〔学会発表〕(計5件)

寺島裕也、腫瘍促進性マクロファージ制御分子 FROUNT の機能を阻害する抗がん薬の開発研究、口頭、第22回日本がん免疫学会総会、2018年

Terashima Y. et al., FROUNT is a novel target to control chemotactic response of tumor-associated macrophage, 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society, Kanazawa (国際学会), 2017年

寺島裕也、細胞動態の分子メカニズムに着目した疾患の診断/治療/予防法の研究開発、口頭、寺島裕也、第87回日本衛生学会学術総会(招待講演), 2017年

寺島裕也、アカデミア発創薬探索研究 疾患に関わる細胞動態のメカニズムとその制御法(招待講演)、第89回日本生化学会大会、2016年

寺島裕也、疾患の発症/悪化の鍵となる免疫細胞の動くメカニズムを解明してコントロールする、第14回日本予防医学会学術集会、2016年

### 〔産業財産権〕(計3件)

寺島裕也、他、がん又は炎症性疾患の微小環境を制御する剤、特許、出願番号:特願2015-000978, PCT/JP2016/050214, 出願人:東京大学, PCT出願:2016年

寺島裕也、他、がん又は炎症性疾患患者の予後を予測する方法、出願番号:特願2015-003630, PCT/JP2016/500555, 出願人:東京大学, PCT出願:2016年

寺島裕也、他、鎮痛および鎮静の剤、特許、出願番号:特願2018-15635, 出願人:東京大学, 国内出願:2018年

### 〔その他〕

ホームページ: <https://k-matsushimalab.org/research/project-d/>

## 6. 研究組織

研究分担者なし