

令和元年6月14日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10560

研究課題名(和文)大腸がん肝転移におけるTD0発現による微小環境変化の解明とその臨床応用

研究課題名(英文)Elucidation of tumor microenvironmental via expression of TD0 in liver metastasis of colorectal cancer and its clinical application

研究代表者

宮崎 利明(Miyazaki, Toshiaki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：50589075

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)：がん幹細胞が転移などの過程に関与している事が明らかになりつつある。本研究において、大腸がん臨床検体由来のがん幹細胞の特質を有するスフェロイド細胞において網羅的メタボローム解析と遺伝子発現解析を行った所、原発巣由来に比べ、肝転移巣由来のスフェロイド細胞において、キヌレニン量が増加し、キヌレニン合成酵素TD02の発現が亢進していた。マウス大腸がん細胞株において肝転移への影響を検証した所、TD02 過剰発現細胞において肝転移が亢進し、転移巣における免疫細胞の集積が変化していた。これらの知見より、TD02の発現誘導は、キヌレニンの産生増加、免疫系の制御を介して、大腸がん転移を促進すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キヌレニンの合成を担うTD02はがん細胞内で発現が上昇しているが、未だキヌレニンやTD0のin vivoにおける免疫抑制やがん細胞転移の作用メカニズムの解明は十分ではない。本研究によりTD02は、キヌレニンの産生増加、免疫系の制御を介して、大腸がん転移を促進させることを新たに明らかにした。キヌレニンやTD0がもたらす微小環境変化と転移メカニズムの関係が明らかになることにより、TD0とキヌレニンをターゲットとした診断マーカーならびに、新規分子標的の発見により臨床への応用に貢献することができる可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSC) represent a small fraction of cancer cells and are associated with malignant traits of cancer such as tumorigenesis and metastasis. Elucidation of the biological nature of CSCs will be important to understand the refractory traits of cancer and to devise new strategies for cancer therapy. In an attempt to identify biochemical alterations associated with metastatic traits of cancer, we compared metabolic profiles of spheroids established from CSCs derived from non-metastatic cancers and metastatic foci. We found that Kynurenine was up-regulated in spheroids derived from metastasized liver. In accordance, levels of TD02, an enzyme responsible for Kynurenine production, were higher in metastatic CSCs than in non-metastatic ones. TD02 over-expression promoted liver metastasis and suppressed accumulation of immune cells around the metastatic lesion. These results indicate that TD02 plays an important role in liver metastasis though Kynurenine production.

研究分野：がん幹細胞

キーワード：大腸がん 肝転移 Kynurenine TD02

1. 研究開始当初の背景

日本における大腸がん罹患率は、近年増加しており、年齢別にみると50歳以上で増加する特徴を有している。また、近年の急激な増加傾向から、新たな治療法開発の重要性が認識されてきている。大腸がんは、肝臓・肺・リンパ節への転移が多く見られる。しかしながらそのメカニズムの解明は十分なされていない。

キヌレニン(tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO2))はトリプトファン代謝経路のひとつとして同定され、indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO1)やtryptophan 2,3-dioxygenase (TDO2)により合成される。TDO2の発現は、正常では主に肝臓や脳で見られるが、様々な悪性のがんにおいて発現が上昇していることから、TDO2が大腸がんにおける病態生理に影響を与えていることが予想された。実際、予後不良のグリオブラストーマでは、TDO2の発現が亢進していることが報告されている。これらのことより、TDO2が大腸がんの悪性化において重要な役割をしていることが示唆された。

近年、多くの研究グループにより、大腸がんを含めた多くの難治がん種においてがん幹細胞の存在が報告されており、がん幹細胞の存在が発がん・転移・薬剤抵抗性の過程に大きく関与している事が明らかになりつつある。また、*in vitro*におけるがん幹細胞の継代培養法の樹立は、がん幹細胞の生物学的特徴の理解や薬剤耐性がんを叩くための治療法の開発手段に必須と考えられる。当研究室では、大腸がん臨床検体からスフェロイド細胞の継代培養系を確立しており、そのスフェロイド細胞が幹細胞マーカーの発現、分化能力、そしてマウスにおいて腫瘍形成能を示すことから、がん幹細胞の特徴を有していることを明らかにした。また、大腸がん原発巣から樹立したスフェロイド細胞に比べ、肝転移した大腸がんから樹立したスフェロイド細胞において、メタボローム解析により細胞内に置けるキヌレニン量が増加していることやマイクロアレイ解析によりTDO2の発現が亢進していることを発見している。このことから、がん幹細胞の転移にTDO2やキヌレニンが関与していることが示唆された。

キヌレニンはAryl hydrocarbon receptor (AhR)と結合することが報告されている。AhRは、薬剤代謝酵素系をはじめ、発がん性に関連した遺伝子を制御する以外に、強い免疫抑制作用が知られている。また、免疫系細胞に取り込まれキヌレニンは、免疫反応の抑制や細胞死が誘導されることが報告されている。このことからTDO2はキヌレニンを産生し、AhRを介することにより発がん、薬剤耐性、そして免疫制御に関与していることが示唆された。

*In vitro*の細胞培養系においてTDO2の発現は細胞増殖能、転移能、腫瘍形成能、腫瘍免疫の活性を抑制することが報告されている。これらのことより、がん細胞におけるTDO2はキヌレニンを介して細胞増殖、転移、腫瘍増殖を制御しているだけでなく、腫瘍周辺の環境を変えることによって、腫瘍増殖を促進しているとの着想に至った。がん細胞においてTDO2は、キヌレニンを産生・分泌し、自分自身や周辺のがん細胞にパラクラインやオートクラインにより取り込まれ、AhRと結合し増殖能や転移能を亢進させることが示唆されている。しかしながら、がんにおけるTDO2の増殖能、転移能、腫瘍増殖能、そして免疫細胞における免疫抑制作用メカニズムについては十分解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は、大腸がんにおけるTDO2の発現がもたらす微小環境変化と腫瘍増殖のメカニズムを我々が独自に構築した、大腸がん細胞株におけるTDO2の過剰発現系と発現抑制系、大腸がん臨床検体から樹立したスフェロイド細胞、肝転移モデルマウスを用いて明らかにする。また、

臨床サンプルを解析することにより診断マーカーならびに治療の新規ターゲットを見いだすことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *In vitro* の細胞培養系における、細胞増殖、移動能への影響の解析

マウス大腸がん細胞株 CT26 に TDO2-GFP を発現するレンチウイルスベクターを導入することにより TDO2 過剰発現細胞を作成した。この細胞株を用いて細胞増殖、トランスウェルを用いた移動能に対する影響を解析した。

(2) マウスモデルにおける TDO2 発現による肝転移能への影響の解析

構築した大腸がん CT26 細胞をマトリゲルトと混合し、同系の Balb/c マウスの脾臓に移植した。1 週間後、肝転移能を OV110 で解析した。肝臓に転移したがん細胞は、GFP ポジティブ細胞を血球計算盤によりカウントすることで定量した。

(3) 免疫組織化学による転移巣への浸潤した免疫細胞の解析

がん細胞が転移した肝臓を用いてパラフィン切片を作製し、CD4 と CD8 に対する特異抗体による免疫組織化学を行い、肝臓内への T 細胞の浸潤を解析した。

4. 研究成果

(1) マウス大腸がん細胞における TDO2 過剰発現は細胞増殖と移動能共に影響を及ぼさなかった

大腸がん細胞における TDO2 の発現がもたらす影響を、マウス大腸がん CT26 細胞株を用いて、レンチウイルスによる過剰発現系を構築し、*in vitro* の細胞培養系における細胞増殖と移動能に対する影響を解析した。その結果、細胞増殖、移動能共に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

(2) マウス大腸がん細胞における TDO2 過剰発現は肝転移を促進した

個体レベルにおける TDO2 の機能を解析するために、マウスの肝転移モデルを用いて TDO2 を過剰発現した CT26 細胞を脾臓移植し肝転移能への影響を解析した。その結果、コントロール細胞に比べ、TDO2 を過剰発現している細胞において肝転移が亢進していることが明らかとなった。

(3) TDO2 過剰発現細胞の肝転移層において免疫細胞の集積が減少した

キヌレニンは、様々ながん腫において発現が上昇している事、免疫細胞を制御し免疫応答を低下させる事が知られている。そこで、大腸がん細胞における TDO2 及びキヌレニン上昇による転移層における免疫細胞の集積を解析した。その結果、コントロール細胞に比べ、TDO2 を過剰発現している細胞において転移巣における免疫細胞の集積が減少している事が明らかとなった。

これらの知見より、がん幹細胞における TDO2 の発現誘導は、キヌレニンの産生増加、免疫系

の制御を介して、大腸がん転移を促進する重要な役割を担っていることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Miyazaki T, Ikeda K, Sato W, Horie-Inoue K, Inoue S, Extracellular vesicle-mediated EBAG9 transfer from cancer cells to tumor microenvironment promotes immune escape and tumor progression, *Oncogenesis*. 2018 Jan 24;7(1):7. doi: 10.1038/s41389-017-0022-6.

〔学会発表〕(計4件)

宮崎 利明、大畑 広和、曾我 朋義、岡本 康司、Elucidation of novel mechanism of liver metastasis of colon cancer through metabolome analyses of cancer stem cells、第77回日本癌学会 学術総会、2018年9月

宮崎 利明、大畑 広和、曾我 朋義、岡本 康司、大腸がん幹細胞のメタボローム解析による新規肝転移メカニズムの解明、第33回発癌病理研究会、2018年8月

宮崎 利明、大畑 広和、曾我 朋義、岡本 康司、Elucidation of novel mechanism of liver metastasis of colon cancer through metabolome analyses of cancer stem cells、第27回 日本がん転移学会 学術集会・総会、2018年7月

宮崎 利明、大畑 広和、曾我 朋義、岡本 康司、大腸がん幹細胞のメタボローム解析による肝転移メカニズムの解明、第1回 がん代謝研究会・若手の会、2018年1月