

令和元年9月17日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15589

研究課題名(和文)キメラマウス作成技術を用いた細胞非自律的腫瘍形成の証明

研究課題名(英文)Non-cell autonomous tumor formation evidenced by chimeric mice analyses analysis

研究代表者

川口 義弥 (Kawaguchi, Yoshiya)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号：60359792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：タモキシフェン誘導性に変異型Kras/P53を発現し、なおかつPdx1を欠失させるES細胞を、CAG-CAT-EGFPマウスから得たEGFP陽性細胞blastocystに注入してキメラマウスを作成し、タモキシフェンを投与したところ、EGFP陽性細胞が細胞非自律的に腫瘍化し、腫瘍全体の増大と繊維化組織形成を促進した。Pdx1欠失によるミトコンドリアストレスによって惹起されたSASPが癌ニッチ形成のトリガーとして機能したと考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの癌幹細胞理論は、発癌変異を起こした細胞の子孫細胞が癌腫の全てを構成するというものであった。ところが、今回の研究により、発癌変異を起こした細胞がミトコンドリアストレスをおこすことで周囲の正常細胞の異型化/増殖を刺激し、繊維化の進行も伴って全体としての腫瘍進行が著しく促進されることを示した。化学療法や放射線照射が、細胞ストレスを引き起こし得ることを鑑みると、これまで重視されてきた癌幹細胞を標的した治療戦略に加えて、ストレスを契機とした細胞非自律的腫瘍化をターゲットとする新たな治療戦略の構築が望まれる。

研究成果の概要(英文)：We created chimeric mice by injecting non-green ES cells that can induce expression of oncogenic KRas/p53 and inactivate Pdx1 in a tamoxifen-dependent manner into the EGFP+ green blastocyst. Upon tamoxifen injection, we observed non-autonomous tumorigenesis of the surrounding EGFP+ cells and rapid tumor growth associated with aggressive fibrosis in the pancreas. We speculate that SASP (Senescence associated secretory phenotype) induced by the mitochondrial stress caused by Pdx1 inactivation triggered cancer niche formation that favored rapid tumor growth.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：細胞非自律的制御 がん キメラマウス

## 1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞の概念は、遺伝子変異の集積した initiator cell が自己複製能と不均等分裂による娘細胞を生む能力の両方を備えた幹細胞としての性格を獲得し、癌腫を形成する全ての細胞が癌幹細胞の子孫細胞で構成されるというものである。

これまでの癌研究では、initiator cell 形成に至る遺伝子変化の集積を多段階発癌モデルとして提示され、臨床標本を用いた解析から、それがほぼ証明されている。その後、癌腫を形成してゆく過程において、周囲の上皮細胞や間質細胞、免疫細胞等とのシグナルのやりとりを介した細胞コミュニティが形成されて癌ニッチを構成すると理解され、癌腫においては豊富な間質繊維化組織の形成がニッチとして機能すると考えられている。

確かに癌幹細胞の概念は、娘細胞と幹細胞の治療有効性の違いを論拠とする癌幹細胞クローンの治療抵抗性を論じる上でも一定の説得力がある。その一方で、ショウジョウバエの eye disc を使った実験モデルで、「発がん遺伝子変異を特定の細胞に起こし、ミトコンドリアストレスを加えると、遺伝子変異を持たない周囲の細胞までもが細胞非自律的な腫瘍形成を来す」という興味深い報告がなされた (Ohsawa et al. Nature, 2012)。従来の癌幹細胞理論のみでは説明できない現象である。

さて、細胞ストレスによって引き起こされる SASP: Senescence Associated Secretary Phenotype は、ストレスを受けた細胞自身が細胞老化 (senescence) を来たして細胞周期を停止する一方で、周囲細胞への増殖刺激を引き起こす現象である。この現象は、組織再生においては臓器恒常性維持に寄与すると考えられるが、癌の病態においては諸刃の剣ともいべき位置付けとなることが想定される。つまり、ストレスを受けた細胞が細胞周期を停止するのは、癌進展に抑制的に働くと考えられるが、SASP によって周囲細胞の増殖刺激が加わると、癌の進展を促進する可能性がある。先に述べたショウジョウバエの eye disc を使った実験モデルは、細胞ストレスと発癌シグナルの併存によって SASP を介した癌進展が促進することを立証している。癌の自然経過における腫瘍の増大による組織低酸素状態だけでなく、放射線照射や化学療法を行った治療行為が潜在的に細胞ストレスを惹起することを鑑みると、ショウジョウバエ eye disc と同様の SASP 現象が哺乳類の癌でも起こるか否かは非常に重要な問題提起である。仮にそれが証明された場合には、癌の癌ニッチ形成の病態解明や治療法開発に、全く新たな視点をもたらす可能性がある。癌治療は必ずしも癌幹細胞クローンのみをターゲットとするものとは限らず、癌ニッチを含めた細胞コミュニティ全体を

視野に入れるべきである。こう考えると、癌の特徴である豊富な間質繊維化組織を伴った癌ニッチがどのように形成されてゆくのか? は極めて重要な問題である。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、「ショウジョウバエ eye disc で見られた、細胞ストレスを契機とした細胞非自律的腫瘍形成機構が哺乳類でも起こり得るのか? (癌幹細胞クローン以外の細胞が、癌腫細胞コミュニティに参画するのか?)」という検証と、「もし、細胞非自律的腫瘍形成が起こるのであれば、それは癌ニッチ形成機構の中で、どのような位置付けがなされるのか?」の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

癌幹細胞クローンの同定や SASP を含む細胞間シグナルのやり取りの解析には発がんモデルと lineage tracing (細胞系譜解析) を組み合わせた実験手法がこれまでの golden standard であった。この実験手法は、理論上、lineage label された細胞は癌幹細胞の子孫細胞であり、lineage label されない細胞が子孫細胞でないことを示すが、実際には Cre 活性が理論通り 100% であることの証明はどこまでいっても不可能であるという問題がある。つまり、lineage label されない細胞が本当に子孫細胞でないのか? それとも、実際は発癌シグナルが発現しているが、細胞系譜解析上 lineage label されなかった細胞なのか? の区別を 100% 立証することができない。

そこで本研究では、論理的に隙のない手法で仮説を検証する為に、キメラマウスを用いた解析を行った。つまり、「タモキシフェン投与によって発癌シグナルが発動し、Xgal 陽性細胞となる細胞」と「タモキシフェンの影響を受けず、常に EGFP 陽性である細胞」の混ざったキメラ個体を作成した。このキメラマウスにタモキシフェンを投与後、initiator cell (Xgal 陽性/EGFP 陰性) と周囲の正常細胞 (EGFP 陽性) がどのような相互関係のもとに癌腫細胞コミュニティを形成してゆくか? の解析が理論上 100% の精度で可能となる。

細胞ストレス負荷方法として、まずは initiator cell に Pdx1 ノックアウトを行って不可逆的なミトコンドリアストレスを与え、周囲の EGFP 陽性細胞の挙動を解析する方針とした。

## 4. 研究成果

キメラマウスを用いた細胞非自律的腫瘍形成の証明

① Pdx1 ノックアウトによる癌幹細胞クロー

ンに対するミトコンドリアストレスモデルでの細胞非自律的腫瘍化の証明

タモキシフェン誘導性に変異型 Kras/P53 を発現し、なおかつ Pdx1 を欠失させ、Xgal 陽性として lineage trace できる ES 細胞 (ElastaseCreER;LSLKrasG12D;LSLTrp53R172H/wt;pdx1flox/flox;ROSA26r) を、すべての細胞が常に EGFP 陽性となる CAG-CAT-EGFP マウス (Kras/P53/Pdx1 はすべて正常型) から得た胎盤胚に injection してキメラマウスを作成し、6~8 週令でタモキシフェンを投与した。

その結果、タモキシフェン投与後 1 ヶ月時点の解析で明らかなミトコンドリアの形態異常/クリステの減少が電子顕微鏡解析で明らかとなり、Pdx1 を失った細胞 (EGFP 陰性) が P16 陽性の老化細胞となった。その一方で、周囲の EGFP 陽性腺房細胞が pERK 陽性/pHH3 陽性となって増殖能が刺激されており、経時的に ADM, PanIN を経て浸潤性膵癌の構成成分となり、3 ヶ月後には免疫細胞の浸潤と間質繊維化を伴った大きな腫瘍を形成することがわかった。一方、Pdx1 ノックアウトを行わない場合は、細胞非自律的腫瘍化は起こらず、腫瘍形成も遅延し、3 ヶ月時点では明らかな繊維化を伴った肉眼的腫瘍を形成するに至らなかった。このことは、ショウジョウバエ eye disc で見られた、発癌シグナルとミトコンドリアストレスの併存による細胞非自律的腫瘍化が哺乳類でも確かに起こっており、この細胞非自律的腫瘍化が癌幹細胞理論のみでは説明できない腫瘍進展の加速化、具体的には増殖刺激、細胞異型化及び組織繊維化によるニッチ形成に寄与している可能性を強く示唆している。

膵癌のニッチと考えられている繊維化組織の形成に関しては、古くから免疫細胞浸潤による慢性炎症がその原因と考えられている。実際、組織繊維化はタモキシフェン投与後 3 ヶ月の時点で明らかに進行しており、F4/80 陽性マクロファージ、CD4 陽性 T 細胞、CD20 陽性 B 細胞が Pdx1 ノックアウト癌組織に浸潤していることが分かったが、Pdx1 欠失によるストレス負荷を行わない、発癌遺伝子活性化のみの組織では上記免疫細胞浸潤は極めて乏しかった。

## ②L-Lysine 投与による一過性ミトコンドリアストレスモデルの検討

上記実験結果を受けて、「がん細胞の代謝ストレスを引き金とした SASP による細胞非自律的腫瘍化によってがん微小環境が改変される事こそが、癌ニッチ形成の初期現象であり、これは Pdx1 欠失モデルだけで

はなく、普遍的な現象ではないか？」と考えるようになった。

そこで、当初の研究計画に追加して、L-Lysine 投与による一過性ミトコンドリアストレス誘導実験を行った。L-Lysine によるミトコンドリアストレスは、ラットで報告があるが、マウスでは報告なく、投与量の検討から始める必要があった。このモデルでは、癌幹細胞クローンだけでなく、周囲の正常腺房細胞にもミトコンドリアストレスが加わる点が Pdx1 ノックアウトモデルとの違いになる。しかしながら、実際のヒト臨床膵癌を想定すると、癌治療における放射線照射や化学療法を契機としたストレスは癌幹細胞クローンだけにかかるわけではないことから、意味のある実験と考えた。

まず、正常マウスを用いた L-Lysine 投与量の検討から始めた。試行錯誤の結果、L-Lysine (1.6g/kg:BW) の投与で 24 時間後に電子顕微鏡での膵腺房細胞ミトコンドリアの変形/クリステの減少が確認され、免疫組織学的検討で、細胞老化マーカー (P16, SA $\beta$ gal) の発現が見られた後、投与 48 時間でマイトファジーが出現したことから、極めて短時間のミトコンドリアストレス~回復が怒るモデルであると判断された。細胞増殖は 1 週間目に明らかとなり、3 週間目には通常レベルに復帰しており、その間明らかな臓器サイズの変化は見られなかったことから、ミトコンドリアストレスを契機とした組織障害/再生モデルと位置づけられる。重要なことに、正常マウスに対するこの条件での L-lysine 投与では、明らかな組織繊維化は見られなかった。

そこで、このミトコンドリアストレスモデルでも細胞非自律的腫瘍化をきたすかどうか? を判定するために、新たなキメラマウスを作成した。タモキシフェン誘導性に変異型 Kras/P53 を発現し、Xgal 陽性として lineage trace できる ES 細胞 (Pdx1 は野生型のまま保たれる) : ElastaseCreER;LSLKrasG12D;LSLTrp53R172H/wt;ROSA26r) を、すべての細胞が常に EGFP 陽性となる CAG-CAT-EGFP マウス (Kras/P53/Pdx1 はすべて正常型) から得た胎盤胚に injection してキメラマウスを作成し、タモキシフェン投与後 1 週間の時点で L-Lysine 投与を行う一過性ミトコンドリアストレス誘発を行った。その結果、前記 Pdx1 ノックアウトによる不可逆的ミトコンドリアストレス癌キメラマウスと同様、EGFP 陽性細胞の細胞非自律的増殖活性上昇と腫瘍化 (ADM/PanIN 形成) が起こり、繊維化の進行 (癌ニッチの成熟) も相まって癌腫全体の増大が促進されることがわかった。L-Lysine モデルでは腫瘍の増大と組織繊維化が Pdx1 ノックアウトモデルよりも早く、より強いストレス~細胞非自律的腫瘍形成が見られた。

結語/考察

以上、2つのキメラマウスモデルによって、「ミトコンドリアストレスと発癌シグナルが併存すると、SASPを介した周囲細胞の細胞非自律的腫瘍化を引き起こし、免疫細胞の局所浸潤を誘導することで癌ニッチが成熟してゆく」と結論され、本研究の目的は当初の計画を超えて達成された。今後の課題として、①細胞非自律的腫瘍形成を担うSASP分子の同定と周囲細胞の増殖／異型化メカニズムの解明、②免疫細胞を癌局所にリクルートして組織繊維化を引き起こす分子機構の解明が重要となる。

また、L-Lysineモデルによる、強い一過性ミトコンドリアストレスによっても細胞非自律的腫瘍化が起こったことは興味深い結果である。電子顕微鏡による観察では、通常マウスではL-Lysine投与後24時間をピークとして回復するミトコンドリア障害が、癌モデルでは3週間たっても遷延していることが分かった。発癌シグナルの存在自身がどのようなメカニズムでストレスからの回復を阻害するのか？言い換えれば、組織再生と癌の違いは何か？という問いかけも今後の重要課題と考える。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

#### ○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

#### ○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/kawaguchi\\_summary.html](http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/kawaguchi_summary.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

川口 義弥 (KAWAGUCHI, Yoshiya)

京都大学・iPS細胞研究所・教授

研究者番号: 60359792

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

吉田昌弘 (YOSHIDA, Masahiro)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員