

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07219

研究課題名(和文)がん細胞分泌性免疫抑制因子の同定による腫瘍悪性化機構の解明

研究課題名(英文) Study for mechanisms of tumor progression by identification of immunosuppressive factors secreted from cancer cells

研究代表者

狩野 有宏 (Kano, Arihiro)

九州大学・先導物質化学研究所・准教授

研究者番号：30403950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：多くのがん細胞に炎症性サイトカインであるIFN- $\gamma$ の産生を抑制する活性があることを見出した。そこでこの抑制活性を指標に、がん細胞培養上清からの抑制因子の同定に取り組んだ。その結果、複数のタンパク質を抑制活性の候補として見いだした。また、すでに抑制因子として同定しているM-CSFと、悪性化の原因として報告のある、G-CSFの欠損細胞の作製を行った。作製に成功した各欠損細胞を比較した結果、G-CSF欠損細胞は増殖速度が遅いことを観察した。また、移植モデルでは著明に脾臓肥大が抑制されることを観察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫ががんを監視し、その出現と増大を防ぐ一方、がんはその監視システムから様々な方法で逃れていると考えられている。本研究に先立ち、免疫によるがん排除の最前線を担うT細胞を活性化するIFN- $\gamma$ の産生抑制に関わるタンパク質を、がん細胞が分泌することを見いだした。そこで、がん細胞の培養上清からこの抑制因子の分離同定を行い、複数の候補タンパク質を見いだした。また、既に同定したM-CSF、および既報のG-CSFをゲノム編集技術によってがん細胞から欠損させ、がんの悪性化に及ぼす影響について検証した。本研究の成果は、がんが免疫監視を回避し、悪性化するメカニズムの一端を提案するものである。

研究成果の概要(英文)：Many cancer cells suppress IFN- $\gamma$  production in splenocytes. Based on this knowledge, identification of these suppressors from conditioned media was carried out. In the results, several proteins were identified as a candidate for a suppressor of IFN- $\gamma$  production. Additionally, M-CSF: an identified suppressor, and G-CSF: reported as a cause of tumor progression were disrupted by a genome-editing technique. As a result of the comparison of the obtained each disrupted cell, the G-CSF-disrupted cells show a relatively slow growth rate. And the transplanted model in mice showed marked suppressed splenomegaly.

研究分野：分子細胞生物学、がん生物学

キーワード：がん IFN- $\gamma$  免疫抑制 M-CSF G-CSF マクロファージ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

免疫システムががんを監視し、その出現と増大を防ぐ一方 (Immune Surveillance)、がんはその監視システムから様々な方法で逃れているという考えが現在広く受け入れられている。この考え方に基づき、がん抗原やヒト白血球型抗原 (HLA) の発現低下、細胞死誘導シグナルや共刺激分子の欠損、抑制性 T 細胞や未分化骨髄由来細胞の誘導、そして免疫抑制性サイトカインの産生など種々の方法でがんが免疫システムを抑制しているとの報告が近年なされている。私はマウス脾臓細胞と種々のがん細胞との共培養やその培養上清の解析から、多くのがん細胞に炎症性サイトカインである IFN- $\gamma$  の産生を抑制する活性があることを見出した。さらに乳がん細胞 4T1 移植マウスの脾臓細胞の研究により、移植後の日数がより経過するほど、つまり腫瘍がより増大するほど、がん細胞による IFN- $\gamma$  産生抑制が顕著になることを見だし報告した [1]。4T1 移植モデルでは、類白血病反応と、主に顆粒球による著しい脾臓肥大、そして近年がんによる免疫抑制機構の一つとして注目されている Myeloid Derived Suppressor Cell (MDSC) の増殖が報告されている [2]。この MDSC の増殖は、4T1 細胞が大量に分泌する液性タンパク質、G-CSF に依存していることが報告されているものの、がん担持マウスの脾臓細胞培養で観察される IFN- $\gamma$  産生抑制への関与は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究に先立ち、がん担持マウスの脾臓細胞の IFN- $\gamma$  産生を抑制する活性として 4T1 細胞培養上清から、M-CSF を見だし、さらに M-CSF とは異なる複数の抑制活性も観察している。そこで本研究では、以下の課題を研究目的とした。

(1) 4T1 細胞培養上清の粗精製分画に、複数の IFN- $\gamma$  抑制活性を見だししている。Western blotting の結果から、これらの活性は M-CSF によるものではないことが判明している。この分画の精製を進め、新たな IFN- $\gamma$  抑制因子を同定する。

(2) 同定した IFN- $\gamma$  産生抑制因子の遺伝子をクローニングし、リコンビナントタンパク質を作製する。このリコンビナントタンパク質の IFN- $\gamma$  産生抑制活性を検証する。また、M-CSF、G-CSF、そして新たに同定した IFN- $\gamma$  産生抑制タンパク質をゲノム編集技術によって欠損させた 4T1 細胞株を作製する。この細胞の移植実験により、腫瘍増大、転移能、および、脾臓肥大に及ぼす影響を検証する。

(3) 4T1 細胞を移植をすることにより、脾臓中に IFN- $\gamma$  産生抑制を担う細胞が出現することが判明している。この新たに脾臓に出現する細胞の解析と同定を試みる。

上記した検証により、がん細胞の免疫抑制による、がん悪性化機構の新たなメカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) M-CSF とは異なる IFN- $\gamma$ 産生抑制因子の同定

4T1 細胞培養上清を 2 L 回収し、硫酸沈殿によって濃縮する。この濃縮産物を脾臓細胞の IFN- $\gamma$  産生抑制活性を指標に、疎水カラム イオン交換カラム ゲルろ過カラムによって分離、精製を進める。この 2 L 回収を少なくとも 5 回繰り返し、合計 10 L を目標に回収、精製を行う。最終的に、電気泳動を実施し、切り出したゲル片の質量分析 (MALDI-TOF/MS) と、Peptide Mass Fingerprint (PMF) 解析によって、タンパク質同定を試みる。

#### (2) リコンビナントタンパク質の作製と、IFN- $\gamma$ 産生抑制活性の検証

候補タンパク質の遺伝子を PCR 法によってクローニングし、発現ベクターを構築する。目的のタンパク質は分泌性であると考えられることから、候補遺伝子を発現させた細胞の培養上清から候補タンパク質を得る。この候補タンパク質の IFN- $\gamma$  産生抑制活性を、脾臓細胞培養によって検証する。

#### (3) 候補遺伝子欠損 4T1 細胞の作製と腫瘍悪性化の検証

ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 システムによって候補遺伝子の欠損 4T1 細胞を作製する。作製した欠損株をマウスに移植し、腫瘍増大、転移、および脾臓肥大への影響を検証する。

### 4. 研究成果

#### (1) M-CSF とは異なる IFN- $\gamma$ 産生抑制因子の同定

研究の方法に記したように IFN- $\gamma$  産生抑制活性を指標に分画、精製を進め、電気泳動を実施した。結果的に回収量は 10 L で十分であったと判断されたが、当初、ミスにより血清を含んだ培地と混ぜてしまい、多大な時間の損失となった。また、ゲル濾過分画後においても、まだ多くのタンパク質が混在していると判断されたことから、当初予定してなかった、二次元電気泳動を行って分離した。得られたゲル片を Trypsin 消化し、MALDI-TOF/MS 解析を行った。次にスペクトルデータの PMF 解析を行った。様々な条件にて種々検討を行った結果、いずれも機能が明確には定まっていない、Multiple Myeloma Tumor-associated protein 2、および R-Sponding3 homolog が候補タンパク質として挙がってきた。そこで、これらの抗体を購入し、発現の確認を行ったが、少なくとも Western blotting では検出できなかった。ここまでの検討の結果、明確に候補タンパク質の同定にはいたらなかったことから、LC-MS/MS 解析によるタンパク質同定を検討中である。

#### (2) Tag 配列挿入 M-CSF リコンビナントタンパク質の作製

4T1 細胞培養上清中の M-CSF の発現量は数十 pg/ml と微量であり、Western blotting による検出は通常困難である。また抗 M-CSF 抗体による検出感度も悪い。そこで、Tag 配列の挿入を試みた。M-CSF はその発現の際、N、C の両末端がプロセッシングされる。そのため、単純に C 末端の終止コドン上流に、Tag 配列を挿入しても発現されない。これは、C 末側のプロセッシング領域を除き、その C 末端に Tag 配列を付加することで解決できる。しかしながら M-CSF は、C 末端のプロセッシングのされ方によって、大小、分子量の異なる二つのタンパク質が発現する(図 1)。従って、Tag が付加された大小二つの M-CSF を自然な状態で発現させるためには、N 末端に Tag を挿入することが必要であった。検討の結果、シグナル配列下流に適切なスペーサーを介して Tag を挿入することにより、Tag が付加された M-CSF が発現し、細胞外に分泌される事を見いだした。図 2 では抗 Tag 抗体を用い、Western blotting 法で検出できることを示している(図 2 #4)。さらにこのスペーサーを含む Tag 配列をゲノム中の M-CSF コード領域にノックインを行った 4T1 細胞を作製した。作製したノックイン細胞をマウスに移植し、血中の M-CSF を Tag 配列を指標に検出した結果、十分な感度で測定できることが判明した(図 3)。また、このことはマウス自身が発現する M-CSF と、移植した 4T1 細胞由来の M-CSF を区別して検出できることを意味している。

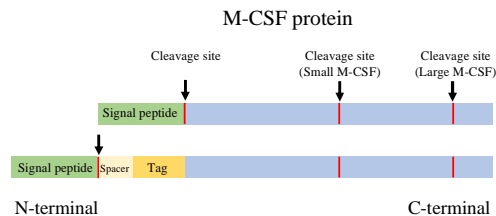


図 1 .Tag 配列付加 M-CSF

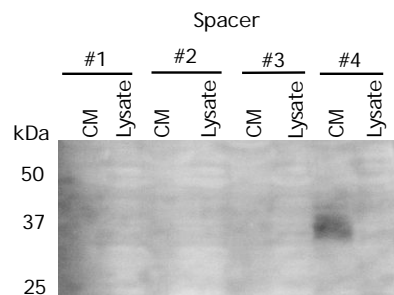


図 2 . Signal sequence 下流のスペーサーの検討による M-CSF の細胞外への発現分泌

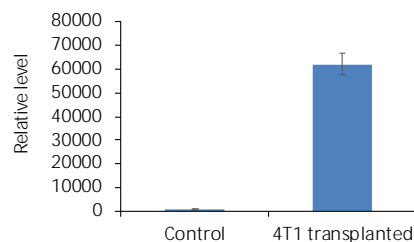


図 3 .ノックイン 4T1 細胞移植後のマウス血中 M-CSF の検出

### (3) 候補遺伝子欠損 4T1 細胞の作製と腫瘍悪性化の検証

研究の当初、ゲノム編集細胞の単離の仕方を確立できていなかったことから、薬剤耐性遺伝子および蛍光マーカーを指標に細胞選択が可能なシステムを用いてゲノム編集を行い、M-CSF および G-CSF のノックアウト (KO) 株を得ることに成功した。これら細胞は wild type と大きく変わらずに増殖することを確認した。しかしながら、本研究ではマウスへの移植を計画していることから、外来タンパク質の存在による予期せぬ免疫応答を極力避けたいと考え、Cas9 タンパク質を直接使ったゲノム編集を行う事を試みた。種々検討の結果、それぞれ 15 クローンのノックアウト細胞を得ることに成功した。特に形態に異常性のない 6 クローンを選択し、混合培養を行い、ELISA 法により、培養上清中の M-CSF、G-CSF の測定を行った。その結果、それぞれノックアウト細胞では該当タンパク質がいずれも全く検出されないことを確認した。一方、G-CSF KO 細胞の M-CSF 発現は、ほぼ wild type と変わらないレベルであるのに対し、M-CSF KO 細胞の G-CSF 発現は、wild type に比べ 2 倍近く多きことが判明した。また、それぞれの細胞の増殖速度を測定した結果、M-CSF KO 細胞は wild type と変わらない一方、G-CSF KO 細胞はおよそ 2/3 程度に遅くなっていた。続いて、それぞれのノックアウト細胞を用い、マウス皮下への移植実験を行った。統計的に意味のあるデータがそろっていない段階ではあるが、すでに報告されているように G-CSF KO 細胞では、顕著に腫瘍肥大が抑制されることを観察した。これは Gr-1 陽性の Myeloid derived suppressor cell (MDSC) の増殖が押さえられたことによるものと考えられた。同様に、G-CSF KO 細胞移植では、腫瘍への浸潤細胞も顕著に少なかった。一方で、Gr-1 や CD11b などの単球マーカー、あるいは M2 macrophage マーカーの CD206 の存在比は大きく変わっていない傾向が伺えた。

### <引用文献>

1. Kano, A. Tumor cell secretion of soluble factor(s) for specific immunosuppression. *Sci. Rep.*, **5**, 8913 (2015)
9. DuPre, S. and Hunter, K. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Exp. Mol. Pathol.*, *Journal Article* **82**, 12-24. (2007)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kano Arihiro, Iwasaki Takuma, Shindo Mitsuru	4. 巻 20
2. 論文標題 Bongkreikic acid facilitates glycolysis in cultured cells and induces cell death under low glucose conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100683 ~ 100683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100683	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 狩野有宏	4. 巻 45
2. 論文標題 がん細胞分泌性免疫抑制因子の同定による腫瘍悪性化機構の解明	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 メディカル・サイエンス・ダイジェスト	6. 最初と最後の頁 16-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kamita Moses, Shindo Mitsuru, Kano Arihiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Macrophage Colony-Stimulating Factor mediates its Immunosuppressive Activity through the Emerging Myeloid Cells during Tumor Progression	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Evergreen	6. 最初と最後の頁 18 ~ 22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.5109/1929659	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山下 聖人、公 せい、新藤 充、狩野 有宏
2. 発表標題 4T1細胞培養上清中の免疫抑制性因子の探索
3. 学会等名 日本分子生物学会 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 狩野 有宏、深見 契弥、新藤 充
2. 発表標題 ボンクレキン酸は解糖系を促進し、低グルコース環境下で細胞死 を誘導する
3. 学会等名 日本分子生物学会 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 狩野 有宏、山下 聖人、公 せい、Moses K Kamita、新藤 充
2. 発表標題 4T1移植担がんマウスの免疫抑制
3. 学会等名 日本分子生物学会 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 深見 契弥、新藤 充、狩野 有宏
2. 発表標題 解糖系阻害剤2-DGとボンクレキン酸の共刺激による細胞障害 性
3. 学会等名 日本分子生物学会 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 狩野有宏
2. 発表標題 ボンクレキン酸によるがん細胞選択的細胞障害性の解析
3. 学会等名 第60回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Jing Gong, Moses Kamita, Mitsuru Shindo, Arihiro Kano
2. 発表標題 Role of M-CSF expressed from 4T1 tumor cells in immune activation
3. 学会等名 2018 IMCE International Symposium
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 公 せい, Kamita Moses, 新藤 充, 狩野 有宏
2. 発表標題 M-CSF suppresses IFN- secretion in splenocytes of tumor-bearing mice
3. 学会等名 2017年 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考