

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05994

研究課題名(和文)筋線維芽細胞のSET発現上昇が「癌ニッチ」に果たす役割の解明

研究課題名(英文)Role of increased SET expression in myofibroblasts in the "cancer niche"

研究代表者

佐藤 晃一 (Sato, Koichi)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：90205914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、筋線維芽細胞のSET発現上昇が癌ニッチに果たす役割を解明することで、がん関連筋線維芽細胞(CAFs)を標的とした抗がん戦略への基盤となることを目的として実施した。CAF様細胞株LmcMFを用い、SETが筋線維芽細胞の表現型やがん組織の成長に与える影響を検討した結果、CAF活性化因子TGF- β によるSmad3リン酸化はSET KDによって促進されること、OPG mRNAの発現はSmad3阻害によって抑制されること、TGF- β 刺激によるSmadプロモーター活性はSET KDによって促進されることを明らかとした。以上より、癌ニッチにおけるSETの役割の一部が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは人と伴侶動物のどちらにおいても死因の1位となっており、より有効な新規治療法の開発が望まれている。筋線維芽細胞はがん細胞により教育され、癌ニッチにおいて重要な役割を果たすことから創薬標的として注目されている。そのため、正常組織の筋線維芽細胞とがん組織の筋線維芽細胞(CAFs)の違いを明らかにすることが、新規抗がん戦略の創出に不可欠である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the role of increased SET expression in myofibroblasts in the cancer niche, and to provide the basis for anticancer strategies targeting cancer-related myofibroblasts (CAFs), I carried out this project.

As a result of investigating the effect of SET on myofibroblast phenotype and cancer tissue growth using the CAFs-like cell line LmcMF, Smad3 phosphorylation by the CAFs activator TGF- β was promoted by SET KD. It was clarified that the expression of OPG mRNA is suppressed by Smad3 inhibition and that the Smad promoter activity by TGF- β stimulation is promoted by SET KD. From the above, a part of the role of SET in the cancer niche has been clarified.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：がん SET 筋線維芽細胞 CAFs がんニッチ 微小環境

1. 研究開始当初の背景

近年、がんの成長・悪性化には、癌ニッチ（がん組織中の微小環境）が重要な役割を果たしていることが明らかになってきた（参考総説 BioMed. Res. Int., 2014）。特に、筋線維芽細胞はがん細胞から「教育」を受けて表現型を変化させ、癌ニッチにおいて重要な役割を果たすことから、創薬標的として注目されている。しかし、教育により筋線維芽細胞の表現型が変化する分子機構は依然として明らかになっていない。申請者は、組織学的解析をする中で、がん組織中ではがん細胞だけでなく筋線維芽細胞でも SET 発現が上昇していることを見出し、がん細胞の悪性化に寄与するタンパク質 SET が、癌ニッチの主役である筋線維芽細胞においてもがん促進性に機能し、筋線維芽細胞を標的とした抗がん戦略への基盤となるのではないかと着想した。

上述のように、がんの成長・悪性化には、癌ニッチが重要な役割を果たしている。特に、筋線維芽細胞はがん細胞から「教育」を受けて表現型が変化し、癌ニッチにおいて重要な役割を果たすことから、創薬標的として注目されている。しかし、教育による筋線維芽細胞の表現型変化の分子機構は明らかになっていない。その一因として、適切な筋線維芽細胞株が存在しなかったことがあげられるが、申請者はこの問題を解決するため、世界で初めてマウス腸筋線維芽細胞株 LmcMF (CAF 様がん細胞) を樹立した。一方、細胞内脱リン酸化酵素阻害タンパク質 SET は、がん細胞の悪性化に寄与するため、新規抗がん剤の分子標的として注目されている。申請者は、SET 発現ががん細胞の幹細胞性を維持することでがんの悪性度を高めることを見出し、この研究においてがん細胞だけでなく CAFs でも SET 発現が上昇していることを発見した。これは、がん細胞による筋線維芽細胞の教育には SET 発現増加が関与しており、筋線維芽細胞を標的とした抗がん戦略においても標的になり得ることを示唆すると考えている。

2. 研究の目的

本研究は、筋線維芽細胞の SET の発現上昇が癌ニッチに果たす役割を解明することで、筋線維芽細胞を標的とした抗がん戦略への基盤となることを目的とする。これまでの抗がん剤創薬は、その多くががん細胞自身を標的としたものであった。しかし、本研究ではがん組織の成長に大きな影響を与える癌ニッチと筋線維芽細胞に着目し、視座の転換を促す。本研究は、「がんの悪性化の過程において、がん細胞のみならず筋線維芽細胞においても SET 発現が上昇する」という申請者の発見から立案されている。がん悪性化に寄与するタンパク質 SET が、がん細胞のみならず、癌ニッチの細胞においても役割を果たすという着想に本研究の特色があり、がん細胞と癌ニッチを同一の分子標的抗がん剤の作用点にするという斬新な発想を持った創薬への展開が期待できる基盤研究となる。

3. 研究の方法

【研究計画】本研究では以下の2項目を平行して実施することを目標に据えていたが、項目 A での細胞レベルの検討で、より発展的な成果が出てきたことから、予定を変更し項目 A の研究に焦点を絞って研究を進めた。

項目 A 筋線維芽細胞の SET 発現が細胞自身の表現型に与える影響：マウス腸筋線維芽細胞

において SET の発現を上昇・低下させ、筋線維芽細胞の表現型（増殖，遊走，サイトカイン発現の変化など）に与える影響とその分子機構を解明する。

項目 B 筋線維芽細胞の SET 発現ががん組織の成長に与える影響：がん細胞を移植したがんモデルマウスとがん組織オルガノイドに SET 発現を変化させた筋線維芽細胞を混合し SET 発現による筋線維芽細胞の表現型変化ががん組織の成長に与える影響を解析する。

【項目 A 筋線維芽細胞の SET 発現が細胞自身の表現型に与える影響】

A-1 教育により SET 発現が上昇する分子機構を解明する

大腸癌患者の腫瘍組織を用いた免疫二重染色の解析から，腸筋線維芽細胞が教育を受けることで SET 発現が上昇することは明らかとなったが，がん細胞が産生するどの因子（サイトカイン等）が筋線維芽細胞の SET 発現を上昇させるのか，その分子機構は明らかになっていない。申請者は，マウス大腸上皮細胞株 aMoC1 にがん促進因子 RasV12 を発現させると，各種サイトカインの発現が変化することを確認している。そこで，マウス腸筋線維芽細胞（初代培養系および細胞株 LmcMF を使用）へ発現上昇が確認されたサイトカインを処置することにより，SET 発現上昇に関与するサイトカインを同定する。さらに，各種阻害剤を用いて SET 発現の上昇を引き起こすシグナル伝達機構を明らかにする。

A-2 SET 発現の上昇が筋線維芽細胞の表現型に与える影響を解明する

がん細胞による教育が，筋線維芽細胞の SET 発現を上昇させるが，SET 発現上昇が自身の表現型をどのように変化させるか明らかにできていない。そこで，レンチウイルスベクターを用いて LmcMF の SET 発現を増加・減少させ，細胞増殖能，遊走能，サイトカイン発現に与える影響を解析する。

A-3 表現型の変化をもたらすシグナル伝達機構を解明する

項目 A-2 で変化が認められた表現型について，SET 発現がどのようなシグナル伝達に影響を与えることでその変化をもたらさせるかを明らかにする。SET はタンパク質脱リン酸化酵素 PP2A の阻害タンパク質であることから，特に PP2A の基質となる因子に着目して解析する。

4. 研究成果

2018 年度から 2019 年度は，研究計画に沿った実験を行うことで，以下の（1）および（2）を明らかとし，それらのデータを使って論文を作成し投稿した。その後，投稿論文に対する revise 実験などを行い，最終的に accept となった [PLoS One. 2019 Sep 26;14(9)]。さらに，（3）および（4）の研究を実施する事で，新たな知見を得て，本研究計画の最終目標の遂行を目指した。

（1）正常マウス消化管の非上皮経細胞（筋線維芽細胞等）における SET 陽性細胞の割合を，免疫染色より検討した結果，正常組織にも SET の発現が明らかとなった。（2）胃がんモデルマウスより摘出した胃組織を用いて，非腫瘍部と腫瘍部の筋線維芽細胞における SET 発現を検討したところ，腫瘍部において有意な SET 発現率上昇が明らかとなった。また，ヒト大腸癌患者においても，同様の結果が得られた。（3）レンチウイルスベクターを用いて LmcMF の SET 発現抑制細胞を作成し，CAFs マーカー発現，細胞増殖，細胞遊走，サイトカイン分泌の変化について検討した。（4）サイトカインで活性化された環境下で SET の影響を検討するために，TGF- β を用いて LmcMF を刺激し，SET 発現有無の変化を観察した。2020 年度は，CAFs 様筋線維芽細胞株である LmcMF を用い，SET が筋線維芽細胞の表現型やがん組織の成長に与える影響を解明するため，以下の事項について検討した。2019 年度

に発表した論文 [PLoS One. 2019 Sep 26;14(9)] の内容をさらに進展させることを目指して研究を行った。昨年度までの結果より, SET 発現を抑制することで TGF- β 刺激による OPG 産生が抑制されたことから, SET の発現は TGF- β を介する情報伝達系に作用する可能性が示唆された。そこで, TGF- β 刺激による情報伝達系を明らかにするため, SET 発現がどのようなシグナル伝達に影響を与えることでその変化がもたらされるかを明らかにすることを目的に研究を行った。

なお, 標的分子として TRAIL (TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand) が重要な因子であるデータを得ていたことから, その検討を深掘りした。その結果, TGF- β 刺激によって誘導される Smad3 のリン酸化は SET KD によって有意に促進されること、誘導される OPG mRNA の発現は Smad3 阻害によって有意に抑制されること、さらに TGF- β 刺激によって誘導される Smad のプロモーター活性は SET KD によって有意に促進されることを明らかとした。

以上より、癌ニッチにおける SET の役割の一部が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Umata K, Sakai Y, Ikeda S, Tsuji S, Kawasaki H, Ohama T, Sato K	4. 巻 14
2. 論文標題 Distribution of SET/I2PP2A protein in gastrointestinal tissues.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PloS One	6. 最初と最後の頁 e0222845
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0222845.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田俊太、大山ゆき、辻竣也、大浜剛、佐藤晃一
2. 発表標題 肺癌細胞株A549細胞においてPP2A複合体とその阻害タンパク質PME-1が果たす役割の解明
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 真春 大山 ゆき 大浜 剛 佐藤 晃一
2. 発表標題 Protein phosphatase 2Aとその阻害タンパク質PME-1のタンパク質間結合を制御する分子機構の解明
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬田康司、川崎秀吉、辻竣也、大浜剛、佐藤晃一
2. 発表標題 がん関連線維芽細胞におけるPP2A阻害タンパク質SETの役割の解明
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------