

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15298

研究課題名（和文）PD-L1安定化因子CMTM6によるEwing肉腫転移誘発機構の解明

研究課題名（英文）CMTM6 stabilizes PD-L1 expression and regulates its metastasis in Ewing's sarcoma

研究代表者

吉松 有紀（Yoshimatsu, Yuki）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：60808632

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、免疫チェックポイント分子PD-L1の安定化因子であるCMTM6を介した肉腫細胞の転移メカニズムの解明を目的としている。CMTM6濃縮画分とエクソソーム濃縮画分のsmall RNAシーケンス解析の結果、多くのmiRNAがCMTM6濃縮画分に局在することがわかった。これらの結果から、肉腫細胞はCMTM6を搭載した細胞外小胞にmiRNA等を内包して分泌し、腫瘍微小環境の制御を介して転移を誘導していると考えられる。また、希少がんの患者由来がんモデルは一般には入手しがたいが、この本モデルを用いて転移のメカニズムを検証していくことは希少がんのみならず通常のがんへも波及すると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CMTM6は免疫チェックポイント分子PD-L1の安定化に必要であることが複数報告されている。エクソソームを介したPD-L1の血中分泌量と免疫チェックポイント阻害剤の奏効性の関連や、PD-L1自身ががん細胞の転移と関連するとの報告がある。腫瘍微小環境中の栄養飢餓状態により腫瘍細胞内のCMTM6の発現上昇に起因する、CMTM6小胞の分泌量の増加はPD-L1阻害剤の不応性のみならず、他の細胞膜レセプターを標的とした治療薬の奏効性にも影響を与える。当初の予定通り、CMTM6の機能解析は進んでおり、生物学的に極めて興味深いデータも多く取得できた。

研究成果の概要（英文）：Patient-derived cancer model is a pivotal tool to promote cancer research. Ewing's sarcoma (EWS) is a highly aggressive and metastatic malignant tumor of bone and soft tissues, whose incidence is peak in children and young adulthood. Control of metastasis based on the molecular targeting contributes to improve patient prognosis. To this end, we screened expression of microRNAs in clinical samples to identify target molecules, which regulate malignant properties of EWS cells. Microarray analysis indicated that PD-L1 is significantly down-regulated in the cases with poor prognosis. Although PD-L1 did not affect cell proliferation, it strongly repressed migration of EWS cells. Gene expression analysis revealed that PD-L1 targeted CMTM6, a chemokine-like membrane protein with unknown function. Depletion of CMTM6 by siRNAs strongly inhibited migration of EWS cells. Our data suggest that at least the expression of PD-L1 and CMTM6 is involved in metastasis onset.

研究分野：希少がん、肉腫

キーワード：ユーイング肉腫 CMTM6 免疫チェックポイント PD-L1 miRNA

1. 研究開始当初の背景

所属する本研究室にて、免疫チェックポイント分子 PD-L1 の安定化因子である CMTM6 は、肉腫細胞を低栄養状態で培養することで発現上昇することや、細胞膜へとアクチンフィラメントを利用して局在し、細胞外へと分泌されることが見出されていた。興味深いことに、CMTM6 の発現を抑制した細胞では、細胞増殖の抑制が誘導されること、細胞膜に局在する成長因子レセプター等の発現が低下することがわかっていった。

2. 研究の目的

本研究では、免疫チェックポイント分子 PD-L1 の安定化因子である CMTM6 を介した肉腫細胞の転移メカニズムの解明を目的としている。CMTM6 は、PD-L1 以外の細胞膜レセプターの安定供給にも関連していると考えられる。遺伝子発現の網羅的解析から、CMTM6 のノックダウン (KD) により、特定 miRNA の活性化が誘導されている可能性を見出した。事実、それら miRNA は、細胞内の発現量が CMTM6 KD により上昇していた。CMTM6 が細胞外へと分泌されることから、CMTM6 は細胞外小胞として特定 miRNA を内包して分泌されていると仮定することができる。細胞外小胞を培養上清から調製し、さらにそれを密度勾配遠心法で分離すると、CMTM6 はエクソソームマーカーとは異なる画分に分画される。細胞外小胞の各画分に濃縮されるタンパク質を質量分析により網羅的に解析した。その結果、CMTM6 の濃縮画分には、RNA processing に関する因子が濃縮されていること、エクソソームとは明らかに異なることがわかった。さらに、CMTM6 濃縮画分とエクソソーム濃縮画分の small RNA シークエンス解析の結果、多くの miRNA が CMTM6 濃縮画分に局在することがわかった。これらの結果から、肉腫細胞は CMTM6 を搭載した細胞外小胞に miRNA 等を内包して分泌し、腫瘍微小環境の制御を介して転移を誘導していると考えられた。

3. 研究の方法

肉腫の細胞外 miRNA の解析のために、患者由来細胞株を樹立し、機能未知であった CMTM6 の解析をおこなった。CMTM6 は免疫チェックポイント分子 PD-L1 の安定化に必要であることが複数報告されている。近年、エクソソームを介した PD-L1 の血中分泌量と免疫チェックポイント阻害剤の奏効性の関連や、PD-L1 自身ががん細胞の転移と関連するとの報告があった。そこで、CMTM6 がエクソソームと異なる細胞外小胞の構成因子であり、miRNA 等も同時に分泌することで微小環境を制御するとのこれまでの結果は、極めて意義深い。即ち、腫瘍微小環境中の栄養飢餓状態により腫瘍細胞内の CMTM6 の発現上昇に起因する、CMTM6 小胞の分泌量の増加は PD-L1 阻害剤の不応性のみならず、他の細胞膜レセプターを標的とした治療薬の奏効性にも影響を与える。所謂、薬剤への不応性の根本的なメカニズムの一つである可能性が考えられた。また、その様な状況から逃れるために、周辺非がん細胞の制御を分泌 miRNA が担うことで、転移の誘発が基本的には同一のシステムに介在されると考え、分泌メカニズムの理解も必須の条件となる。本研究では、種々の阻害剤を用いて、CMTM6 の分泌との影響を検討してきた。エクソソーム分泌阻害剤で CMTM6 の細胞外分泌も抑制される一方、薬剤 X に関しては、エクソソームの分泌は強く抑制される一方、CMTM6 の分泌や RNA 制御関連因子と多くの miRNAs の分泌が促進されることを見出した。即ち、CMTM6 はエクソソームと異なる分泌経路で分泌されており、内包物もエクソソームとは異なることがわかった。

4. 研究成果

細胞外へと分泌される CMTM6 小胞を可視化による動態解析: 蛍光タンパク質のタグを導入したリコンビナント CMTM6 を発現する肉腫細胞株の樹立を行った。培養栄養状態が異なる条件で細胞を培養し細胞外分泌量を蛍光の測定することで定量化し、様々な培養条件を検討し、細胞外分泌に影響を与える栄養素の特定を行い、マウスへと肉腫細胞を移植し、細胞外分泌をモニターした。CMTM6 の分泌と腫瘍組織内への免疫細胞の浸潤やサイトカイン分泌等への影響を定量的に評価した。CMTM6 分泌メカニズムの解明とその意義を検討した。CMTM6 と特定 miRNA の分泌を亢進する薬剤 X は、細胞内標的因子 Y を阻害することが知られている。薬剤の作用機序と CMTM6 分泌の詳細を解析することで、CMTM6 小胞の分泌メカニズムを知ることが可能となる。その細胞内標的 Y をノックダウン (KD) し、CMTM6 の細胞内局在やアクチンフィラメントの変化等の細胞生物学的検討を加えた。また、Y の KD による CMTM6 分泌と miRNA 分泌に対する影響を解析し、CMTM6 と標的因子 Y の相互作用を検討すると同時に、CMTM6 の細胞内で相互作用する因子の検討と miRNA やその制御因子の小胞内へのリクルートに関するメカニズム解析を実施した。CMTM6 の分泌を制御する細胞内ネットワークと肉腫転移誘発との関連を細胞株レベル、さらにはマウスモデルで検討することにより、微小環境制御と細胞外小胞分泌の連携を分子レベルで明らかにし、新たながん治療標的として提示する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Yoshimatsu Yuki, Noguchi Rei, Tsuchiya Ryuto, Kito Fusako, Sei Akane, Sugaya Jun, Nakagawa Makoto, Yoshida Akihiko, Iwata Shintaro, Kawai Akira, Kondo Tadashi | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 Establishment and characterization of NCC-CDS2-C1: a novel patient-derived cell line of CIC-DUX4 sarcoma | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Human Cell | 6. 最初と最後の頁 427 ~ 436 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-019-00312-x | 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 Yoshimatsu Yuki, Noguchi Rei, Tsuchiya Ryuto, Sei Akane, Nakagawa Makoto, Yoshida Akihiko, Kawai Akira, Kondo Tadashi | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 Establishment and characterization of NCC-DFSP3-C1: a novel patient-derived dermatofibrosarcoma protuberans cell line | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Human Cell | 6. 最初と最後の頁 1 ~ 10 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-020-00365-3 | 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 Yoshimatsu Yuki, Noguchi Rei, Tsuchiya Ryuto, Sei Akane, Sugaya Jun, Iwata Shintaro, Yoshida Akihiko, Kawai Akira, Kondo Tadashi | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 Establishment and characterization of NCC-SS3-C1: a novel patient-derived cell line of synovial sarcoma | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Human Cell | 6. 最初と最後の頁 1 ~ 10 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-020-00354-6 | 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 Yoshimatsu Yuki, Noguchi Rei, Tsuchiya Ryuto, Sei Akane, Sugaya Jun, Iwata Shintaro, Sugiyama Masanaka, Yoshida Akihiko, Kawai Akira, Kondo Tadashi | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Establishment and characterization of NCC-ssRMS1-C1: a novel patient-derived spindle-cell/sclerosing rhabdomyosarcoma cell line | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Human Cell | 6. 最初と最後の頁 1 ~ 10 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-020-00359-1 | 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 Yoshimatsu Yuki, Noguchi Rei, Tsuchiya Ryuto, Sei Akane, Sugaya Jun, Suguru Fukushima, Yoshida Akihiko, Kawai Akira, Kondo Tadashi | 4. 巻 1 |
| 2. 論文標題 Establishment and characterization of NCC-ASPS1-C1: a novel patient-derived cell line of alveolar soft-part sarcoma | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Human Cell | 6. 最初と最後の頁 1~10 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 吉松有紀ほか |
| 2. 発表標題 Introduction of patient-derived sarcoma models in National Cancer Center |
| 3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会 (広島) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉松有紀ほか |
| 2. 発表標題 患者由来「肉腫」モデルの構築；希少がん研究の未来を変える研究基盤の構築 |
| 3. 学会等名 患者由来がんモデル講演会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 吉松有紀ほか |
| 2. 発表標題 患者由来肉腫モデルを用いた研究 |
| 3. 学会等名 第18回関東骨軟部腫瘍の基礎を語る会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉松有紀ほか |
| 2. 発表標題 胞巣状軟部肉腫 (Alveolar soft part sarcoma; ASPs) に抗腫瘍効果を示す抗がん剤の探索 |
| 3. 学会等名 第38回日本ヒト細胞学会 (高知) |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 吉松有紀、近藤格 | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 日本臨牀 | 5. 総ページ数 6 |
| 3. 書名 希少がん 「希少がんの未来を変える患者由来がんモデル」 “希少がんーがん診療の新たな課題 ” | |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|