

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03500

研究課題名(和文)臓器間相互作用による抗転移細胞の解明

研究課題名(英文)Anti-metastatic cells in tumor-stimulated organs

研究代表者

中村 佐千枝(平塚佐千枝)(Hiratsuka, Sachie)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：60313087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌が原発巣から転移する際には、転移が起きる前に、転移先の臓器において癌細胞の生着を有利にする“転移前ソイル”が形成されるため、このソイルを消去することが癌転移の抑制には重要である。抗転移細胞として、特殊なNK(ナチュラルキラー)細胞は、肝臓で教育され、肺のソイルで機能する。しかしながら、この細胞群は原発癌の進行に伴い、その能力が消失することが示唆されている。今回の研究で、抗転移細胞の疲弊のメカニズムを解明し、中心となる分子を抑制することで、疲弊を回復することが可能になった。結果としてマウスのレベルで、転移は抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の転移抑制は難しく、このステップに関与する癌の側、宿主側の要素は多数分かっているが、転移を特異的に抑制できる方法は確立されていない。この度の抗転移ナチュラルキラー細胞は、転移する前、あるいは早期の微小転移の段階で機能を発揮する細胞で、マウスで発見されたものである。原発の癌がだんだん大きくなるにつれ、転移を抑制すべき臓器の場所に移動できなくなり、免疫細胞の疲弊(疲れ)がおきることも分かってきた。今回の研究で、この疲弊を回復することが可能になり、転移に特異的な抑制を行える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The Blockade of metastasis is the critical point. In metastatic phase, a primary tumor prepares the pre-metastatic soil in the organs that is hospitable for metastatic tumor cells. Recently, anti-metastatic immune cells have been found. These cells were educated in liver, then moved to the pre-metastatic lungs. However, those cells lost the anti-metastatic ability during primary tumor development. In this experiments, we found the exhaustion mechanism and a factor in the specific NK cells. Inhibition of the factor caused recover anti-metastatic activities in the cells resulting in metastatic suppression.

研究分野：分子生物学 癌

キーワード：がんの転移 抗転移細胞 転移前ソイル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 背景 1

癌による死亡原因のうち 90%以上は転移によるため、癌転移に対する有効な新規診断・治療法の研究が求められている。申請者らは、動物モデルを用いた実験を行い、癌原発巣が、遠隔臓器をあらかじめ刺激しておくことにより、癌細胞の転移先での生着率を高めているという現象を見出し「転移前土壌」と名付けた。その後の研究により、転移前土壌を消去する能力のある抗転移細胞が存在することを申請者らは見出した。

#### 背景 2

転移前土壌をもつマウス肺では、血管透過性が上昇した部位でフィブリノーゲンが多く検出される。癌で亡くなった患者の肺を調べると、明らかな転移を認めていない肺の局所においても、フィブリノーゲンの沈着が血管周囲に確認できた。このことから癌患者の肺にも転移前土壌があると想定される。

#### 背景 3

抗転移細胞は B220CD11cNK1.1 マーカー陽性の NK (ナチュラルキラー) 様細胞であり、肝臓で何らかの刺激を受けて教育され、その後肺に移動して抗転移能を発揮するというユニークな性質をもつものであることが判明した。

### 2. 研究の目的

申請者らの研究により、NK 様の抗転移細胞は、原発癌の小さい初期には肝臓から肺に移動し抗転移能を発揮しているが、原発癌の進行に伴いその移動は抑制されるようになり、肺で転移前土壌を消失させる効果も見られなくなっていることがわかった。

そこで、本研究では、

- (1) 抗転移細胞が転移土壌を消失させる分子メカニズムはどのようなものなのか？
- (2) その細胞の移動が原発癌の進行に伴い抑制されるのはなぜなのか？
- (3) その抑制を解除することは可能か？ということの解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究では、マウス体内において特定の臓器に滞在している細胞を追跡できる実験システムを用いた。蛍光タンパク質 Kikume Green-Red は紫光の照射により、その蛍光波長を緑から赤に変化させるタンパク質である。そこで Kikume Green-Red トランスジェニックマウスを用いた実験を行った。マウスの肝臓に 405nm の紫光を、強力光源を用いて照射し、照射された部位に存在する細胞の蛍光波長が変化していることを、照射部位の組織切片を蛍光顕微鏡下で観察することで確認した。

(2) 次に、LLC 細胞などの癌細胞を移植した担癌マウスの肝臓に光照射後 48 時間おいてから肝臓と肺を取り出した。これらの臓器をコラゲナーゼで消化したのちに、高速セルソーターを用いて蛍光波長が変化している細胞を単離した。肝臓から肺に移動した細胞と、肝臓から移動しなかった細胞から mRNA を回収し、遺伝子発現比較をマイクロアレイを用いて行った。

(3) 転移前土壌に接着しうる分子を同定し、抗転移に関与して組織間を移動できる分子の指標とした。抗転移細胞の遺伝子調節には、担癌マウス肺または肝臓より細胞を調製した。

(4) 原発癌の小さい初期状態での抗転移細胞と原発癌が進行した状態での抗転移細胞の遺伝子発現プロファイルを定量 PCR により比較した。発現データの変動が大きかった遺伝子を選び出し、その siRNA を抗転移細胞にトランスフェクションすることにより活性が変化するかどうかを調べた。また抗転移細胞をさまざまな条件下で培養し、その遺伝子発現変化を *in vitro* で再現できることが可能かどうかを調べた。

(5) 最終的に、疲弊した抗転移細胞の活性を回復させることができる因子を決定し、コントロールすることで、癌の転移を抑制できるかどうか検討した。

#### 4. 研究成果

今回の研究の知見から、抗転移細胞の移動や活性調節は転写レベルで行われていると想定された。そこでこれらの遺伝子発現データから発現の変動が見られる転写因子を網羅的に抜き出し、個別に siRNA を設計した。siRNA を肝臓から採取した抗転移細胞にトランスフェクションし、*in vitro* でフィブリノーゲンの沈着が解消できるかどうかを調べた。この候補 siRNA により最も変化のあった抗転移細胞の表現系は、肺の癌転移前土壌に蓄積するフィブリノーゲン結合タンパク質の変動であった。疲弊した抗転移細胞に、候補 siRNA を作用させると、機能は回復し、*in vitro* においてフィブリノーゲンへの接着能、癌細胞への殺傷能力も回復した（論文投稿準備中）。今後は、この siRNA の効果が大きいものに対して、担癌マウスを用いた転移アッセイにも適用させ、個体レベルでの実験でその効果を確認する予定である。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomita Takeshi, Kato Masayoshi, Mishima Taishi, Matsunaga Yuta, Sanjo Hideki, Ito Ken-ichi, Minagawa Kentaro, Matsui Toshimitsu, Oikawa Hiroyuki, Takahashi Satoshi, Takao Toshifumi, Iwai Noriki, Mino Takashi, Takeuchi Osamu, Maru Yoshiro, Hiratsuka Sachie	4. 巻 12
2. 論文標題 Extracellular mRNA transported to the nucleus exerts translation-independent function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-23969-1	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平塚 佐千枝
2. 発表標題 血管透過性とがん転移
3. 学会等名 日本生化学会東北支部86回例会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 平塚 佐千枝
2. 発表標題 血管透過性とがん
3. 学会等名 JCVA(日本心血管協会) 学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020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
研究 分 担 者	富田 毅  (Tomita Takeshi)  (20302242)	信州大学・学術研究院医学系・准教授    (13601)	
研究 分 担 者	加藤 真良  (Kato Masayoshi)  (70402104)	信州大学・学術研究院医学系・助教    (13601)	

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