

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07422

研究課題名(和文) がん微小環境形成・腫瘍進展に関わるHYBID-ヒアルロン酸代謝機構の病理学的解析

研究課題名(英文) Pathological analysis of HYBID-mediated hyaluronic acid metabolism involved in the tumor microenvironment creation

研究代表者

下田 将之 (Shimoda, Masayuki)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：70383734

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)：本研究では、HYBIDによるヒアルロン酸代謝とがん微小環境との関連に関して解析を行った。Hybid遺伝子欠損マウスを用いた腫瘍移植モデルでは、野生型マウスと比較し腫瘍形成能に変化が見られるとともに、限界希釈法を用いた腫瘍移植実験においても腫瘍形成能に違いが認められた。また、組織学的に腫瘍周囲にヒアルロン酸沈着増加が認められ、Hybid遺伝子欠損間質細胞の培養上清中には、野生型間質細胞と比べて、より高分子化したヒアルロン酸の貯留が見られることが明らかとなった。以上の結果から、間質細胞由来HYBIDはヒアルロン酸分解を介して腫瘍形成に関与している可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高分子ヒアルロン酸は実用化に成功した細胞外マトリックスの一つであるが、その生体内での詳細な代謝機構は未だ解明されていない。生理的・病的状態において多岐にわたる作用を発揮することが推測されるHYBIDによるヒアルロン酸分解系機構の解明は、様々な疾患の治療や予防に役立つ可能性があると考えられる。本研究成果は、ヒアルロン酸分解制御に基づくがんに対する治療法開発の基礎的データとなりうる可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：Hyaluronan (HA) plays an important role in the development and maintenance of tissues, and its degradation is implicated in many pathologic conditions. We recently reported that HA-binding protein involved in HA depolymerization (HYBID) is a key molecule in HA depolymerization, but its developmental and pathologic functions remain elusive. In this project, we analyzed the relationship between HYBID-mediated hyaluronic acid metabolism and the tumor microenvironment. Using the tumor xenograft model, the different tumorigenicity were observed between Hybid-deficient and wild-type mice. Histologically, increased hyaluronic acid deposition was observed around the tumor, and polymerized hyaluronic acid was increased in the culture supernatant of Hybid-deficient stromal cells. These results suggest that stromal cell-derived HYBID is involved in the tumorigenesis via hyaluronan acid degradation.

研究分野：病理学

キーワード：がん微小環境 ヒアルロン酸代謝 線維芽細胞 免疫細胞

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物である人体は、細胞と細胞間物質から構築されており、生体内における多彩な細胞機能は、細胞間物質からなる組織内微小環境によって厳密に規定されている。組織内微小環境因子には、細胞膜表面や細胞間に局在する細胞外マトリックス (extracellular matrix=ECM) とそれに結合する生理活性物質 (増殖因子、サイトカイン、ケモカインなど) が含まれ、悪性腫瘍や炎症などの多くの疾患においてはプロテアーゼによる組織内微小環境因子代謝異常を介して組織の増殖・破壊・改築が進行する。発生や再生医学などにおいても ECM をはじめとする細胞間物質や間質細胞が生理的状态での細胞の増殖・接着・運動や幹細胞ニッチなどを規定することが報告されている Nat Immunol 4:583, 2004; Nature 441:1075, 2006。従って、プロテアーゼによる ECM 代謝の制御は生理的・病的組織における組織内リモデリングにきわめて重要であり、その役割解明は新規の疾患治療法開発につながると推測される。

ヒアルロン酸 (Hyaluronic acid=HA) は、D-グルクロン酸と N-アセチル-D-グルクロサミンの二糖繰り返し構造からなる ECM の一種で、組織や体液中に存在し、組織形成や恒常性維持に深く関わっている。近年 ECM の分解産物が腫瘍進展などに関わる分子として注目されており、低分子 HA はその代表的分子として知られている。ハダカデバネズミにおいて高分子 HA は発がん抑制に関与する Nature 499:346, 2013 一方で、低分子化した HA は種々のシグナルカスケードを惹起して血管新生や炎症を促進することが知られており、生体内における HA 産生・分解は組織内微小環境を理解する上で非常に重要と考えられる。しかし、生体内における HA 分解の詳細なメカニズムは十分解明されていないのが現状である。

申請者所属の研究室では HA 分解に中心的役割を果たす新規糖鎖分解酵素として HYBID (HYaluronan-Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization; 別名 KIAA1199) を同定し Proc Natl Acad Sci USA 110:5612, 2013、申請者が中心となって *Hybid* 遺伝子欠損 (KO) マウスの作製に成功し Am J Pathol 187:1162, 2017、ようやく生体レベルでの HYBID-高分子 HA 代謝の解析研究が可能となってきた。腫瘍間質構成細胞にはがん関連線維芽細胞や腫瘍随伴マクロファージが含まれるが、これらの細胞は様々な液性因子産生を介してがん進展を促進することが知られており Semin Cell Dev Biol 21:19, 2010、腫瘍内間質細胞による HYBID-HA 代謝系はがん細胞を取り巻く ECM ネットワーク形成においてきわめて重要であることが推測される。

2. 研究の目的

本研究では、HA 分解に中心的役割を果たす新規糖鎖分解酵素 HYBID に着目し、*Hybid* KO マウスおよびヒト肺がん組織や初代培養間質細胞 (線維芽細胞や免疫細胞) を用いて、がん微小環境形成・腫瘍進展における HYBID-HA 代謝系の役割を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、*Hybid* KO マウスおよびヒト肺がんパラフィン標本を用いてがん微小環境形成・腫瘍進展における間質細胞由来 HYBID-HA 代謝系の役割およびその作用機構を明らかにする。具体的には以下の 3 項目を遂行した。

(研究項目) *Hybid* KO マウスを用いた腫瘍形成における腫瘍内微小環境解析

(1)HYBID-HA 代謝に注目した腫瘍内微小環境の解析：これまでの解析から *Hybid* KO マウスは外見上の大きな異常は示さず、がん細胞移植モデルが可能であることがわかっ

ている。標識したマウス肺がん細胞株を wild-type (WT)あるいは Hybrid KO マウスの皮下に移植し、腫瘍の発育を観察した。また、摘出した腫瘍標本を用いて、RNA *in situ* hybridization 法（既に確立済み）により腫瘍内での HYBID 発現細胞の同定を行うとともに、各種免疫染色や HABP 染色を行うことにより腫瘍内の組織学的変化と間質 HA 代謝・沈着との関連について検討した。

(2)腫瘍間質内 HA 代謝に関わる間質細胞の同定とその機能解析： WT あるいは Hybrid KO マウスより初代培養線維芽細胞や免疫細胞を単離・培養し、培養上清中 HA 量を ELISA 法で定量するとともに、ゲル濾過カラムを用いて蛍光標識した高分子 HA の分解能を評価した。

(研究項目) ヒト肺がん組織・初代培養間質細胞を用いた HYBID-HA 代謝機構の機能解析

免疫組織化学的手法を用いてヒト肺がん組織における HA 沈着レベルを解析するとともに、これまでに定量化したこれらのがん組織での腫瘍内間質細胞プロファイル（各種免疫細胞や線維芽細胞の浸潤程度）と比較・検討している。また、個々の症例における高あるいは低 HA 沈着間質部に浸潤している各種間質細胞数を定量化し、腫瘍組織内での HA 代謝と間質細胞浸潤程度を詳細に検討することにより、腫瘍内 HA 代謝に関与している間質細胞の同定を行っている。さらに、HYBID との二重染色を行い HYBID 発現間質細胞の同定を行うとともに、各種臨床病理学的因子との関連を検討し、間質由来 HYBID の臨床的な意義を検討している。

(研究項目) 間質由来 HYBID-HA 代謝によるがん細胞への作用解析

WT あるいは Hybrid KO 各種間質細胞由来培養上清存在下あるいは高分子量（あるいは低分子量）HA 存在下において肺がん細胞を培養し、細胞増殖能、浸潤能やがん幹細胞マーカーなどを解析し、間質細胞由来 HYBID-HA 分解系によるがん細胞への影響を検討した。

4 . 研究成果

本研究では、HYBID によるヒアルロン酸代謝とがん微小環境との関連に関して解析を行った。Hybrid KO マウスを用いた腫瘍移植モデルでは、WT マウスと比較し腫瘍形成能に変化が見られるとともに、限界希釈法を用いた腫瘍移植実験においても腫瘍形成能に違いが認められた。また、組織学的に腫瘍周囲にヒアルロン酸沈着増加が認められ、Hybrid KO 間質細胞の培養上清中には、WT 間質細胞と比べて、より高分子化したヒアルロン酸の貯留が見られることが明らかとなった。Hybrid KO 間質細胞由来培養上清下では、がん細胞の形態に変化が生じることを見出している。現在ヒト肺がん組織を用いて腫瘍組織内での HA 代謝とがん免疫環境との関連を解析するとともに、単離した間質細胞における HYBID の発現や HA 代謝との関連解析を進めている。

現在高分子 HA は変形性関節症治療薬剤、皮膚シワ改善用注射剤などとして実用化されており、細胞外マトリックス成分の中では実用化に成功した分野である。従って、生理的・病的状態において多岐にわたる作用を発揮することが示唆される HYBID-HA 分解系機構の解明は、様々な疾患の治療や予防に役立つ可能性があると考えられる。本研究データは、間質細胞由来 HYBID がヒアルロン酸分解を介して腫瘍形成に関与している可能性を示唆しており、今後 HA 代謝制御に基づく治療法開発の基礎的データとなりうる可能性があると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shimoda Masayuki, Ohtsuka Takashi, Okada Yasunori, Kanai Yae	4. 巻 71
2. 論文標題 Stromal metalloproteinases: Crucial contributors to the tumor microenvironment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13033	査読の有無 有
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 Makino Akitsugu, Tsuruta Masashi, Okabayashi Koji, Ishida Takashi, Shigeta Kohei, Seishima Ryo, Ikebata Akiyoshi, Koishikawa Kaoru, Hasegawa Hirotoishi, Shimoda Masayuki, Fukunaga Koichi, Betsuyaku Tomoko, Kitagawa Yuko	4. 巻 Volume 13
2. 論文標題 <p>The Impact of Smoking on Pulmonary Metastasis in Colorectal Cancer</p>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 OncoTargets and Therapy	6. 最初と最後の頁 9623 ~ 9629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/OTT.S263250	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 Morita Shinya, Shinoda Kazunobu, Yoshida Tadashi, Shimoda Masayuki, Kanno Yoshihiko, Mizuno Ryuichi, Kono Hidaka, Asanuma Hiroshi, Nakagawa Ken, Umezawa Kazuo, Oya Mototsugu	4. 巻 21
2. 論文標題 Dehydroxymethylepoxyquinomicin, a novel nuclear factor- B inhibitor, prevents the development of cyclosporine A nephrotoxicity in a rat model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Pharmacology and Toxicology	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40360-020-00432-3	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 Nishimura Tomoyasu, Shimoda Masayuki, Tamizu Eiko, Uno Shunsuke, Uwamino Yoshifumi, Kashimura Shoko, Yano Ikuya, Hasegawa Naoki	4. 巻 69
2. 論文標題 The rough colony morphotype of Mycobacterium avium exhibits high virulence in human macrophages and mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Medical Microbiology	6. 最初と最後の頁 1020 ~ 1033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jmm.0.001224	査読の有無 有
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 Shima Toshiyuki, Shimoda Masayuki, Shigenobu Takao, Ohtsuka Takashi, Nishimura Tomoyasu, Emoto Katsura, Hayashi Yuichiro, Iwasaki Tatsuro, Abe Takayuki, Asamura Hisao, Kanai Yae	4. 巻 111
2. 論文標題 Infiltration of tumor associated macrophages is involved in tumor programmed death ligand 1 expression in early lung adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 727 ~ 738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14272	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1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 下田将之
2. 発表標題 ワークショップ: がんと微小環境 「がん微小環境とメタプロテアーゼ」
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会 (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	西村 知泰 (Nishimura Tomoyasu) (90348649)	慶應義塾大学・保健管理センター (日吉)・講師 (32612)	

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
---------	---------