

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16768

研究課題名（和文）ミトコンドリア内葉酸代謝酵素を阻害したときのがん微小環境変化の解析

研究課題名（英文）Analysis of cancer microenvironment under inhibition of enzymes of mitochondrial one-carbon metabolism

研究代表者

西村 建徳（Nishimura, Tatsunori）

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：10624869

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）：Mthfd2のノックアウトマウスは胎生致死のため、本研究ではコンディショナルノックアウトマウスを作成することとした。まず、Mthfd2-floxマウスを作成した。そして、このマウスを乳腺特異的にCreを発現するMMTV-Creマウスと掛け合わせ、さらに乳がんのマウスモデルであるMMTV-neuマウスと掛け合わせた。まず、乳腺においてMthfd2がノックアウトされているのかを確認した。次に本マウスの表現型について解析を進めた。まず、がんと関係ない表現型について解析を行った。その結果、出産や授乳をはじめとした表現型は乳腺でMthfd2をノックアウトしても特に問題はないようであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では新規抗癌剤のターゲットとして申請者が見出したミトコンドリア内葉酸代謝酵素を阻害した時のがんが身を置く環境（がん微小環境）がどのように変化するかについて解析を行った。がんの悪性化にとってがんそのものの悪性化も大きな要素であるが、同時にがん微小環境ががんの変化によってどのように変化するのも大きな要素である。本研究では免疫細胞を含めたがん微小環境がミトコンドリア内葉酸代謝酵素を阻害したときにどう変化にするのかについて初めてアプローチした。本研究によりミトコンドリア内葉酸代謝酵素の阻害剤を服用したとき、患者がどのように応答するのかについてより患者に近い形で明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）： We first generated conditional knock-out mice of Mthfd2 at mammary epithelial cells, since whole body knock-out mice are embryonic lethal. To this end, we crossed Mthfd2-flox mice with MMTV-Cre mice, which express Cre protein specifically at mammary epithelial cells. Thereafter, we further crossed this mice with MMTV-neu mice, which are one of the breast cancer mouse model. As we expected, Mthfd2 could not be detected at protein level only at mammary epithelial cells.

When we analyzed phenotype not relevant to breast cancer, there were no problems on birth, and on breastfeeding. To date, we could not observe any changes in Mthfd2 knock-out normal mammary epithelial cells.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：葉酸代謝 ミトコンドリア がん

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア内葉酸代謝酵素の一つである *Mthfd2* を阻害するとがんの悪性を阻害できることがこれまでに数多く報告されてきた。しかし、これまでの研究は細胞レベルでの研究や免疫不全マウスを用いた研究にとどまり、免疫細胞を含めたがん微小環境がミトコンドリア内葉酸代謝酵素を阻害したときにどう変化にするのかについては明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

Mthfd2 を阻害したときにがんの微小環境がどのように変化し、がんの悪性に働くのかそれともがんの生存にとって負に働くのかを明らかにすることで、*Mthfd2* の阻害剤を患者が服用したときにがん微小環境を含めた癌組織がどのように総合的に応答するのかを明らかにすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

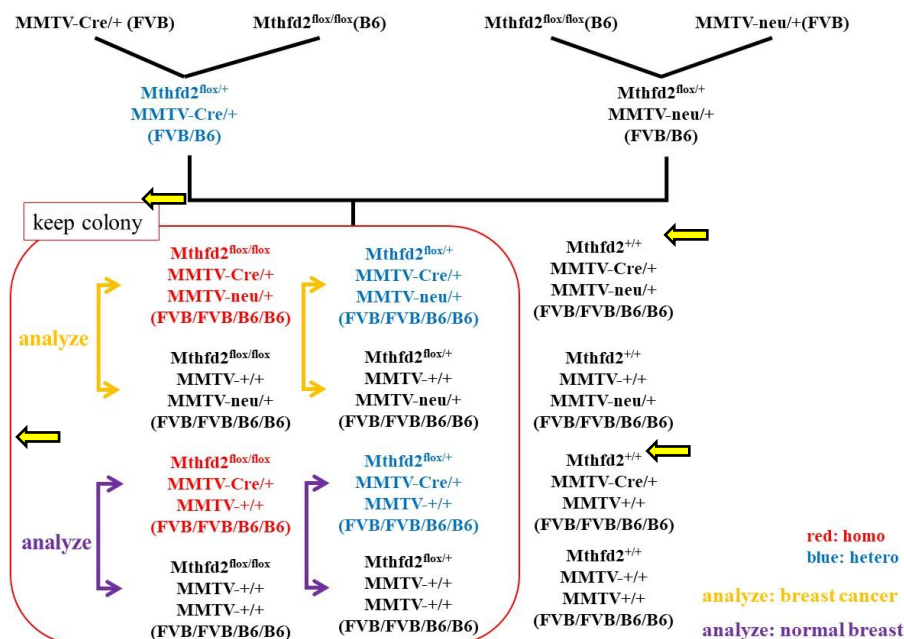
Mthfd2 のノックアウトマウスは胎生致死のため、乳腺でのみ *Mthfd2* がノックアウトされるコンディショナルノックアウトマウスを作成した。具体的には *Mthfd2*-flox マウスと乳腺特異的に Cre を発現する MMTV-Cre マウスを掛け合わせた。その後、乳がんにおける *Mthfd2* 阻害時の乳がん組織の応答を解析するため、乳がんのマウスモデルの一つである MMTV-neu とさらに掛け合わせた。

4. 研究成果

Mthfd2 KO efficiency



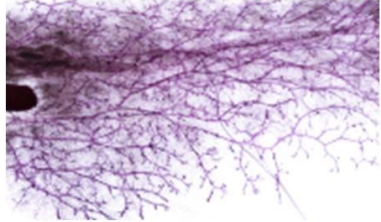
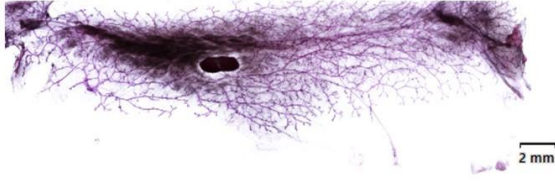
まず、作成した *Mthfd2*-flox/flox:MMTV-Cre マウスにおいて乳腺特異的に *Mthfd2* がノックアウトされているのかを確認した。その結果、タンパク質レベルでこのマウスの乳腺では *Mthfd2* が生成されないことを確認した (左図)。



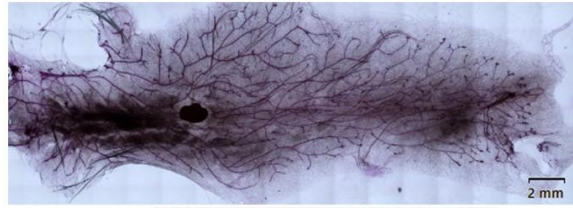
次に本マウスの表現型について解析を進めた。まず、がんと関係ない表現型について解析を *Mthfd2*-flox/flox:MMTV-Cre/+ :MMTV-+/+ を用いて行った (MMTV-+/+ は MMTV-neu の入っていないマウス。左図：紫線の比較 normal breast)。Cre タンパク質は過剰に異所発現させると、影響が出ることが知られているため、本研究では MMTV-Cre はすべてヘテロ (MMTV-Cre/+) の個体を用いた。その結果、乳腺と関係する事象である出産や授乳をはじめとした表現型は乳腺で *Mthfd2* をノックアウトしても特に問題はないようであった。下図に *Mthfd2* 野生型と *Mthfd2* ノックアウトマウスの全乳腺の染色画像を示す (矢印はリンパ節、枝状の構造が乳管)。

Mammary gland Whole-mount staining

Mthfd2-flox/flox:MMTV-+/+ (Mthfd2野生型)



Mthfd2-flox/flox:MMTV-Cre/+ (Mthfd2ノックアウト)



乳腺の発生や出産、授乳に Mthfd2 が大きな影響を与えていないことが示唆されたため、Mthfd2-flox/flox:MMTV-Cre/+;MMTV-neu/+に見られる表現型は腫瘍特異的なものと考えられる(MMTV-neu に関して本研究では全てヘテロ個体を用いた。先行研究では MMTV-neu のホモ個体とヘテロ個体ではほとんど違いはないという報告もあるが、できる限り、条件を揃えるため、本研究ではヘテロ個体 (MMTV-neu/+) のみを用いた)。腫瘍における Mthfd2 の働きを解析するため、本研究では先の掛け合わせ図におけるオレンジ線の比較(breast cancer)を行った。現在までのところ、Mthfd2-flox/flox:MMTV-Cre/+;MMTV-neu/+マウスにおいても腫瘍が形成されることは確認できた。しかし、発生頻度や組織型の変化については統計的に差があるかどうかを示すだけのデータを十分に集めることができなかった。

乳腺における Mthfd2 コンディショナルノックアウトマウスができ、(掛け合わせ図の赤枠”keep colony”内での掛け合わせにより) 現在、コロニー数も拡張することができた。今後、腫瘍のできる頻度や組織型といったがん細胞そのものとがん微小環境の他の細胞の変化について解析を行っていききたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------