

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：20K09535

研究課題名（和文）ヒアルロン酸分解酵素による前立腺癌の腫瘍免疫逃避機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of Tumor Immune Evasion Mechanisms in Prostate Cancer by Hyaluronan-degrading enzyme

研究代表者

飛澤 悠葵（Tobisawa, Yuki）

岐阜大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：70623768

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）：癌は依然として罹患者が増え続けており、癌増殖メカニズムの解明や、悪性化の機序に関する研究は進んでいるが未だ未解明な部分が多い。本研究では細胞外マトリックスに豊富に存在する機能性糖鎖ヒアルロン酸の代謝に注目し、癌悪性化メカニズムとの関連性を検証した。本研究では新規に発見した細胞膜貫通型ヒアルロン酸分解酵素TMEM2が分子単独でヒアルロン酸を分解する事を明らかにした。さらにこの酵素の活性抑制が泌尿器癌の悪性化を引き起こす可能性が示唆された。以上の結果から癌微小環境におけるヒアルロン酸代謝は癌の生存、悪性化に重要である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では新規ヒアルロン酸分解酵素TMEM2がその分子単独で酵素活性を示すことを明らかにしており、今後この分子の発現異常、活性異常による疾患の発見につながる可能性がある。また癌微小環境でのヒアルロン酸代謝が癌の生存、悪性化に寄与する可能性を示す結果から、このメカニズムを標的とした新規薬剤の開発につながる可能性がある。また、このメカニズムを解明することで、既存薬剤の効果の有無を制御する機構の発見にもつながる可能性があり、学術的意義は高いと考える。

研究成果の概要（英文）：Cancer continues to affect an increasing number of people, and while research on cancer proliferation mechanisms and malignancy processes has progressed, many aspects remain unresolved. This study focuses on the metabolism of hyaluronic acid, a functional glycosaminoglycan abundantly present in the extracellular matrix, to examine its correlation with cancer malignancy mechanisms. We identified that the newly discovered transmembrane hyaluronidase TMEM2 independently degrades hyaluronic acid. Moreover, it was suggested that inhibition of this enzyme's activity could lead to the malignancy of urological cancers. These findings indicate that the metabolism of hyaluronic acid in the tumor microenvironment may be crucial for cancer survival and malignancy.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：ヒアルロン酸 ヒアルロン酸分解酵素 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

現在、日本における前立腺癌の罹患率は急激な増加傾向を見せており男性癌罹患率の第1位になることが予想されている。すでに欧米では罹患率は1位であり、癌による死亡者数も2位であることから有効な治療法の確立は世界的な課題である。近年、PD-1やCTLA4を標的とした免疫チェックポイント阻害剤による有効性が黒色細胞種、腎癌をはじめ種々の癌種において高い有効性を示すことが報告されているが、**前立腺癌においては未だ有効性は確立されていない。**

ヒアルロン酸はグルクロン酸とN-アセチルグルコサミンの2糖が繰り返し連なる構造をとっており、細胞外マトリックス中に豊富に含まれる成分であることが知られている。ヒアルロン酸は合成酵素HAS1、HAS2、HAS3、および分解酵素HYAL1、HYAL2などが知られ、生体内で合成・分解される。体重70kgの成人における総ヒアルロン酸重量は約15gであり、その30%が一日で置き換わることが知られている。癌細胞とヒアルロン酸の関連については多くの報告があり、**膀胱癌では合成酵素HAS2の発現が再発予知に有効であること、HYAL1の高発現が悪性化に関与すること**などが報告されている。また、**間質細胞におけるヒアルロン酸の増加が乳癌および前立腺癌の悪性度と相関することが報告されており、癌細胞の悪性化、浸潤および転移とヒアルロン酸代謝は密接に関連することが予想される。**

しかしながら、これまでの研究では癌細胞そのもののヒアルロン酸分解機構や分解産物の細胞外への影響を研究したものが多く、生体内において**腫瘍細胞と免疫細胞の相互作用へのヒアルロン酸代謝機構の影響**について明らかにしたものは少ない。最近、Jacksonらのグループが活性化された樹状細胞におけるヒアルロン酸がリンパ管内皮細胞上のLyve-1との結合に重要であり、**ヒアルロン酸を除去することでその結合が阻害され免疫反応が成熟しない**ことを報告した (Johnson LA. et al. Nature Immunol. 2017) (Fig.1)。樹状細胞は腫瘍免疫においても**細胞障害性T細胞への抗原提示に関わる重要な細胞**である (Fig.2)。

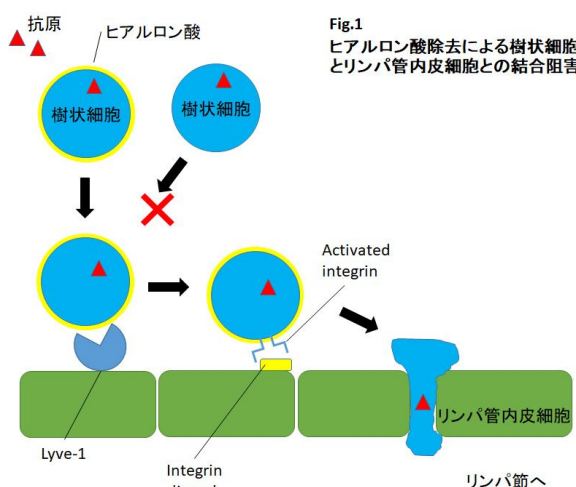


Fig.1
ヒアルロン酸除去による樹状細胞とリンパ管内皮細胞との結合阻害

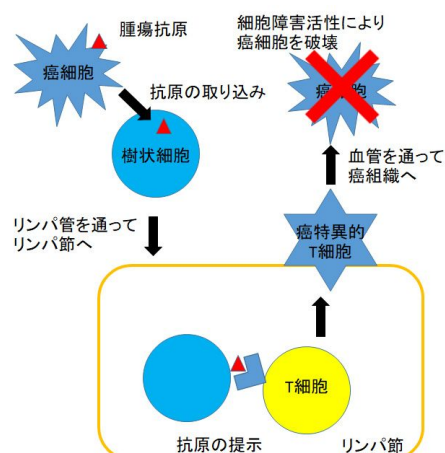


Fig.2 腫瘍免疫における樹状細胞の役割

これまでの研究により、**Transmembrane protein-2 (Tmem2) が細胞表面におけるヒアルロン酸分解酵素**であることを報告してきた (Yamamoto H. et al. J Biol Chem. 2017) (Fig.3)。Tmem2 と相同性の高い Cemip はすでにヒアルロン酸分解酵素であることは報告されており (Yoshida H. et al. Proc Natl Acad Sci. 2013)、**Cemipの高発現は癌悪性度と相関することが報告されている** (Zhang P. et al. FASEB J. 2018)。

以上のことから、**樹状細胞上のヒアルロン酸を癌細胞が Cemip もしくは Tmem2 により分解し、樹状細胞のリンパ節への遊走を阻害することで腫瘍免疫応答を負に制御している**という仮説をたてた。本研究では、樹状細胞上のヒアルロン酸に対する癌細胞のヒアルロン酸分解酵素の影響を検討するとともに免疫系による癌細胞排除機構への影響を明らかにする (Fig.4)。

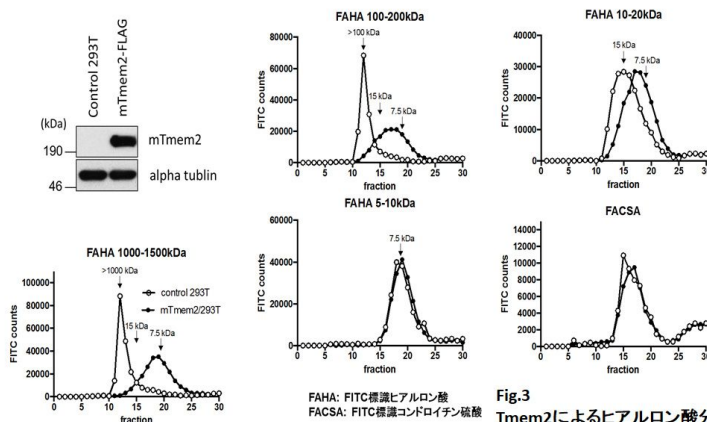


Fig.3
Tmem2によるヒアルロン酸分解

2. 研究の目的

本研究では、1. 樹状細胞上のヒアルロン酸に対する癌細胞のヒアルロン酸分解酵素の影響を検討し、2. ヒアルロン酸の分解活性が免疫系による癌細胞排除機構に対しどのような影響を及ぼすかを明らかにする (Fig.4)。

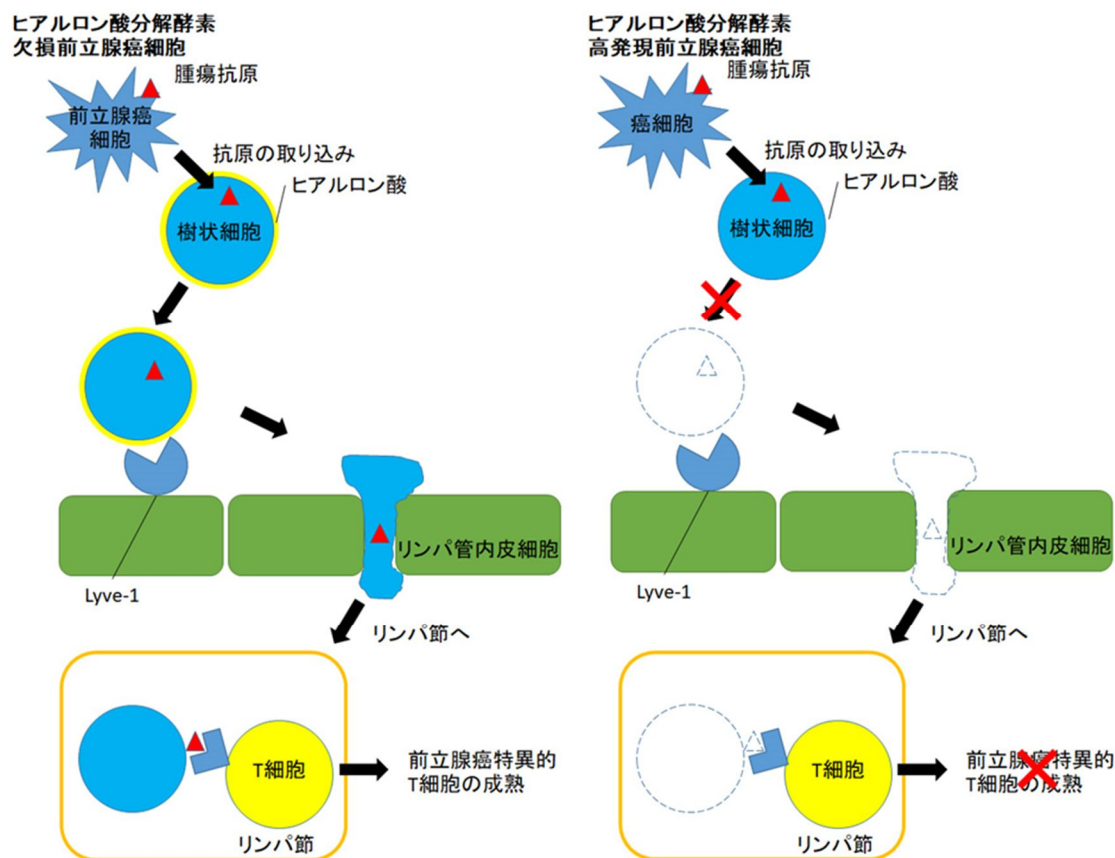


Fig.4 本研究により明らかにする腫瘍免疫機構

3. 研究の方法

ヒアルロン酸分解酵素高発現および発現抑制細胞株の作製

前立腺癌細胞株 TRAMP-C2 は細胞膜貫通型ヒアルロン酸分解酵素 Tmem2 の発現が高いことがわかっているため、CrisprCAS9 システムを用いた遺伝子改変により TRAMP-C2 の Tmem2 の欠損株の作製を行った。また一方、マウス膀胱癌細胞株 MBT-2 は Tmem2 はそれほど高くないこと、また分泌型ヒアルロン酸分解酵素 Cemip が種々の癌種において発現量と予後に相関があることから MBT-2 ではヒアルロン酸分解酵素 Cemip の強制発現株の作製を行った。本研究では免疫系細胞による生体での抗腫瘍効果の討を行うため、焦点をあてている前立腺癌に加え、すでに免疫療法が有効である膀胱がんのモデルを使用し、並行して検討することとし、前立腺癌および膀胱がんのヒアルロン酸分解酵素発現を調整した細胞株を作成した。

ヒアルロン酸分解酵素発現変化による腫瘍形成能への影響

前立腺癌細胞株 TRAMP-C2 より作製した Tmem2 強制高発現株 TRAMPC2-Tmem2、TRAMPC2-Tmem2KO と親株を MHC クラスが同一の C57BL/6 マウスに移植し、2,3 日おきに腫瘍サイズをデジタルノギスにより測定した。腫瘍サイズは $V = (W^2 \times L) / 2$ (V : 体積 W : 短径 L : 長径) を使用し計算した。

細胞膜貫通型ヒアルロニダーゼ Tmem2 によるヒアルロン酸分解活性の検討

ここまでで得られた結果から、細胞膜貫通型ヒアルロニダーゼ TMEM2 によるヒアルロン酸分解活性が、当初予想した細胞挙動と異なる可能性が生じたため、TMEM2 の酵素活性について詳細な解析を試みた。まず、human TMEM2 がヒアルロン酸分解活性がないとする報告が出ていたため、分泌型の組み換えタンパク質を作製し、mouse TMEM2 と酵素活性を比較した。TMEM2 発現量の多い A549 細胞において CrisprCAS9 システムにより TMEM2 ノックアウト細胞株を作製し、培養上清中のヒアルロン酸の濃度、サイズを測定した。ファージディスプレイにより自身で獲得した Tmem2 の酵素活性阻害抗体を利用し、細胞移動におけるヒアルロン酸分解活性についてマトリゲルを用いた浸潤アッセイを行った。

4. 研究成果

ヒアルロニダーゼ発現調節による腫瘍形成能への影響

前立腺癌細胞株 TRAMP-C2 において Tmem2 高発現株はマウス生体内で全く腫瘍を形成できなかった。想定するメカニズムでは Tmem2 高発現細胞は腫瘍抗原を取り込み獲得免疫に重要な役割を担う樹上細胞上のヒアルロン酸を分解することで腫瘍免疫の成熟を妨害すると予想したが逆の結果となった。さらにこのメカニズムを検証するため TRAMP-C2-Tmem2KO 株と親株を C57BL/6 マウスに移植したところ、親株に比べ Tmem2 欠損細胞株は有意に巨大な腫瘍を形成することが明らかとなった (Fig.5)。癌細胞などの接着細胞においては、Tmem2 のヒアルロン酸分解活性によりヒアルロン酸リッチな細胞外マトリックス上でも成熟した接着斑を形成することができ細胞移動が活発に起こることを報告してきたが、生体内では必ずしも癌細胞にとってプラスではないことが明らかとなった。本結果から考えられる事は、膀胱癌において Tmem2 は上皮間葉転換の過程で発現低下が起こることが明らかとなっており、Tmem2 欠損細胞株が間葉系の性質を強く発揮するために生体内で高悪性化した可能性があると考えられた。

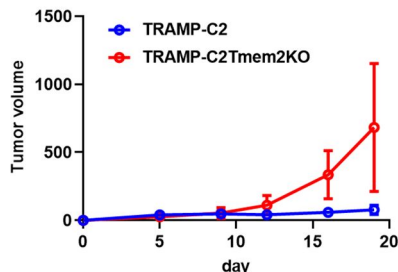


Fig.5 Tmem2KOによる前立腺癌細胞の生体内での増殖能の比較。KO細胞において腫瘍形成能が亢進していた。

Tmem2 のヒアルロン酸分解機構の詳細な解析

細胞が持つヒト TMEM2 がヒアルロン酸分解活性を示すかを A549 および A549TMEM2KO を用いて検討したところ、TMEM2KO により培養上清中のヒアルロン酸濃度に大きな変化は見られなかったが、未消化な 1000kDa を超えるヒアルロン酸が確認された。ヒアルロン酸分解活性は細胞の浸潤能を亢進すると予想し、マトリゲル浸潤能アッセイに Tmem2 の酵素活性阻害抗体を添加した実験を行ったところ、Tmem2 発現の豊富な血管内皮細胞、乳癌細胞の浸潤能の有意な低下が確認された (Fig.6)。

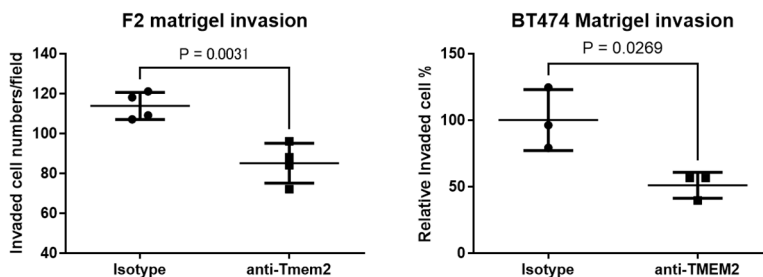


Fig.6 マウス血管内皮細胞株F2およびヒト乳癌細胞株BT474のマトリゲル浸潤におけるTMEM2阻害抗体の効果。マウスおよびヒトのTMEM2に対しそれぞれ活性阻害抗体を獲得した。この抗体を用い、ヒアルロン酸分解活性を阻害するとF2、BT474とも浸潤能の低下が見られた。

また、ヒト TMEM2 の酵素活性を有する細胞外ドメインのみを精製し、詳細に解析を行ったところヒト TMEM2 はマウス TMEM2 同様に TMEM2 単独で酵素活性を示すことが明らかとなった (Fig.7)。また一方で培養細胞を用いた実験では培養上清中に未知のヒアルロン酸分解活性阻害物質の存在が示唆された。

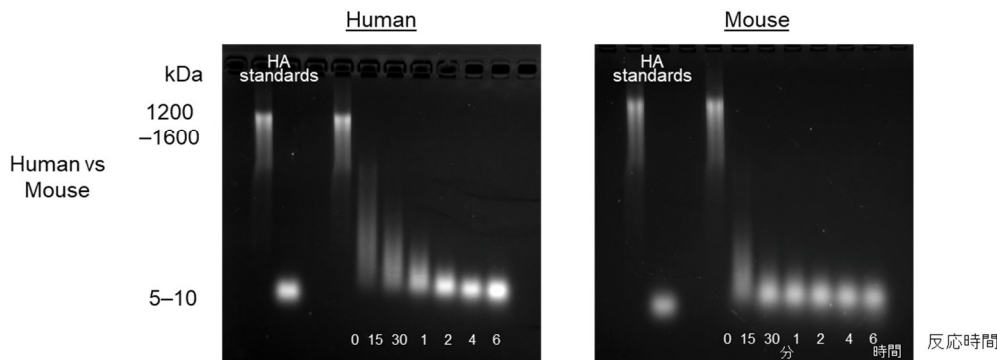
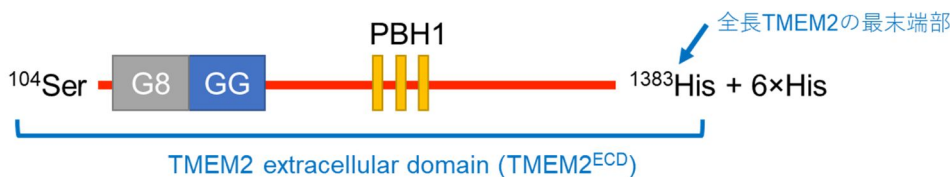


Fig.7 TMEM2細胞外ドメインの組換え体の構築とヒアルロン酸分解アッセイ

上図 ヒトTMEM2細胞外ドメインの模式図

下図 ヒトおよびマウスTMEM2の細胞外ドメイン組み換え体を用いたアッセイ。マウスの分解速度はヒトより速いが、両者ともに2時間程度で1000kDaを超える高分子ヒアルロン酸を5-10kDaまで分解した。

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
研究分担者	中根 慶太 (Nakane Keita) (00566482)	岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授 (13701)	

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