

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16214

研究課題名(和文)がん再発時における免疫学的がん微小環境の解明

研究課題名(英文)Immunological cancer microenvironment during cancer recurrence

研究代表者

浅野 達雄 (Asano, Tatsuo)

東京女子医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：60708080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はリンパ節転移の機序解明に焦点をおいた。リンパ節細網線維芽細胞のサブセットのうちリンパ節濾胞の最外層に局在し辺縁洞を裏打ちする辺縁細網細胞(MRC)に着目し、定常状態・前転移状態・転移後におけるMRCの遺伝子変化をRNA-seqによって解析した。その結果、転移前後における特徴的な遺伝子発現変化を認めため遺伝子変化に着目し遺伝子欠損マウスの作製を試みた。候補遺伝子によってはリンパ節欠損の表現系があり転移実験の評価が困難であるため候補遺伝子のスクリーニングにウイルスによるリンパ節への遺伝子導入を計画したが、効率が悪く手法の改良を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、リンパ節へのがん転移が起点となって遠隔転移が起きることが報告されているため、我々はリンパ節転移の機序解明に焦点をおいた。定常状態・前転移状態・転移後における辺縁細網細胞の遺伝子変化をRNA-seqによって解析しリンパ節転移前後における遺伝子変化の網羅的解析を行った。その結果、転移前後における特徴的な遺伝子発現変化を認めた。これらの遺伝子変化の意義を突き止めることで、リンパ節転移や遠隔転移の予防につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：We focused on elucidating the mechanisms of lymph node metastasis. We focused on the marginal reticular cells (MRC), a subset of lymph node fibroblasts that localize in the outermost layer of lymph node follicles and line the marginal sinuses, and analyzed the genetic changes of MRC in the steady state, pre-metastatic state and post metastasis by RNA-seq. As a result, characteristic gene expression changes were observed before and after metastasis, and the conditional knockout mice were generated. Since some conditional knockout mice have lymph node defective phenotypes, it is difficult to evaluate them in metastasis experiments. For screening of candidate genes, gene transfer into lymph nodes by virus was planned, but the efficiency was not good, and the method is being improved.

研究分野：免疫学

キーワード：リンパ節転移

1. 研究開始当初の背景

【がん治療の問題点】現在の日本では、がんは最大の死亡原因である。がん治療の進歩は目覚ましく、従来は有効な治療法が存在しないと考えられていた遠隔臓器転移合併例であっても、抗がん剤治療(分子標的薬を含む)や免疫チェックポイント阻害剤を使用することで、根治または長期生存が見込まれるようになった。一方で、がん治療後の最大の懸念が再発であることに変化はない。治療に反応しがん細胞が全て消失したように思われても、数ヶ月から数年を経て再発する可能性がある。がん再発の予測は困難であり、腫瘍の大きさや遺伝子変異などを勘案して予防的に抗がん剤投与や放射線照射を行うこともあるが、十分な予防効果が得られているとはいえない。

【がん微小環境における免疫病態】がん細胞の増殖・進展には、これをとりまく微小環境が極めて重要である。がん細胞の間質は線維芽細胞、炎症細胞、免疫担当細胞、サイトカイン、血管、リンパ管、細胞外基質などによって特徴的な微小環境を構築されている。がんの増殖・浸潤・転移のしやすさはがん細胞自体の特性だけではなく、がん細胞と微小環境との相互関係が深く関わっている。研究代表者は骨髄から産生される可溶性 RANKL ががん細胞に直接作用し骨への走化性を促進していることを報告した(Asano, Nature Metabolism, 2019)。一方で膜結合型 RANKL は破骨細胞分化を介して骨吸収とそれに伴う増殖因子の放出によって、骨転移を促進する(Croucher, Nature Reviews Cancer, 2016)。また RANKL は乳腺上皮細胞に作用し、がん化を促進することも知られている(Schramek, Nature, 2010)。このように同種のサイトカインであっても異なる作用でがんの進展に影響する。近年では特にがん微小環境における免疫病態が注目されている。発がんにおける免疫系とがんの関係は排除相・平衡相・逃避相の3相に分けられる(Schreiber, Science, 2011)。生体に現れた変異細胞は免疫原性が高いため免疫系は異物と判断し、免疫担当細胞が攻撃することによって排除される(排除相)。その後、免疫原性の低いがん細胞は免疫担当細胞からの攻撃にさらされないため、排除されることなく長期にわたって選択的に生存する(平衡相)。この免疫原性の低下はがん抗原の消失と MHC 分子の消失によって誘導される。最終的にがん細胞は制御性 T 細胞や骨髄由来抑制細胞などの免疫抑制細胞を誘導したり、PD-L1 などの免疫チェックポイント分子を発現することで免疫抑制機構を獲得し、臨床的ながんとなる(逃避相)。

【再発時のがん微小環境は原発巣とどのように異なるか?】

がんの種類や組織型の違いによって根治的治療後の再発の頻度や転移しやすい臓器が異なることを考慮すると、臓器ごとの免疫学的ながん微小環境は異なると思われる。しかし、根治的治療後のがんの再発を模した実験モデルは確立しておらず、再発時のがん微小環境の理解は十分には進んでいない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がん再発時におけるがん微小環境の免疫学的機序を解明し、がん治療後の再発を予防する方法を開発することである。これまでにマウスモデルを用いて、原発腫瘍を誘導することや、肺や骨などの各種臓器への転移を誘導する研究は多々行われているが、治療後再発に焦点をおき評価する系の報告は乏しく、よりヒトでの現実的な治療経過を模している点で独自性

がある(Gomez-Cuadrado, Disease Models and Mechanisms, 2017)。本研究は再発に関わるがん細胞側の因子と、がん周囲の微小環境の因子とを同時に解析することで、その相互作用を理解できる点が創造性が高い。

3．研究の方法

近年、リンパ節へのがん転移が起点となって遠隔転移が起きることが報告されているため、我々はリンパ節転移の機序解明に焦点をおいた。ヒト・マウスともに高頻度にリンパ節転移を行うがん種として乳がんと悪性黒色腫を選択する。マウス悪性黒色腫細胞 B16F10 株、マウス乳がん細胞 E0771 株に ZsGreen と Luciferase を遺伝子導入し解析を容易にした。悪性黒色腫細胞は側背部に皮下注後 3 週間、乳がん細胞は第 4 乳腺に注入後 5 週間でセンチネルリンパ節転移が成立する。

(1) 定常状態・前転移状態・転移後における SSM-MRC-LEC Niche の解析

- ・フローサイトメトリーによる細胞数や細胞比率の比較
- ・構造変化の組織学的評価 (HE 染色・免疫染色)

(2) 定常状態・前転移状態・転移後における SSM, MRC, LEC の遺伝子変化の解析

- ・ソーティングし各細胞毎に RNA-seq を行い、リンパ節転移前後における遺伝子変化の網羅的解析を行った。

4．研究成果

我々は所属リンパ節においては SSM-MRC-LEC で形成される微小環境 (SSM-MRC-LEC Niche) に変化があり転移が促されると仮説をたて研究計画を立案し検証した。定常状態・前転移状態・転移後における MRC の遺伝子変化を RNA-seq によって解析しリンパ節転移前後における遺伝子変化の網羅的解析を行った。その結果、転移前後における特徴的な遺伝子発現変化を認めため遺伝子変化に着目し遺伝子欠損マウスの作製を計画した。候補遺伝子によっては Cre/loxp システムによる Conditional knockout mice を作製しても、リンパ節欠損の表現系があり転移実験の評価が困難であることが判明した。そこで候補遺伝子のスクリーニングにウイルスによるリンパ節への遺伝子導入を計画したが、効率が悪く手法の改良を試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Tsukasaki Masayuki, Asano Tatsuo, Muro Ryunosuke, Huynh Nam Cong-Nhat, Komatsu Noriko, Okamoto Kazuo, Nakano Kenta, Okamura Tadashi, Nitta Takeshi, Takayanagi Hiroshi	4. 巻 32
2. 論文標題 OPG Production Matters Where It Happened	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108124 ~ 108124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.108124	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
---------	---------