

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16352

研究課題名（和文）癌関連線維芽細胞におけるサイトカイン制御因子を標的とした新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of new therapeutic methods targeting cytokine regulators in cancer-related fibroblasts

研究代表者

塚越 真梨子 (Tsukagoshi, Mariko)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60781317

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）：肝癌の進展における癌関連線維芽細胞（CAF）の機能に注目し、CAFによるサイトカイン産生の制御に関わるG protein-coupled receptor 68(GPR68)を標的とした新規治療法を開発することを目的とした。肝癌検体からCAFを樹立し解析すると、肝癌CAFのGPR68発現は弱酸性刺激で増加し、CAFの増殖が促進した。またサイトカインIL-6およびIL-8の産生が増加した。GPR68の抑制によりサイトカイン産生が抑制され、肝癌の増殖、浸潤が抑制された。これらの結果から、GPR68によるサイトカイン分泌制御により肝癌CAFの活性が抑制され、肝癌の進展が抑制できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌は予後不良で、ウイルス肝炎感染を伴わない肝癌が増加傾向であり、新たな治療戦略が求められている。近年、癌微小環境における癌関連線維芽細胞(CAF)の機能が注目されている。本研究ではCAFがサイトカインを介して肝癌進行に関わることに注目し、サイトカイン制御因子G protein-coupled receptor 68(GPR68)が肝癌進展に与える影響を検討した。GPR68によるサイトカイン分泌制御により肝癌CAFの活性が抑制され、肝癌の進展が抑制できる可能性が示された。今後GPR68は肝癌の新たな治療ターゲットとなり、既存制癌剤併用での治療効果増強等、革新的治療に結びつく可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Hepatocellular carcinoma (HCC) is a malignancy that is challenging to treat. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are reported to promote the malignant behavior of HCC cells via cytokines. We focused on the function of CAFs in the progression of HCC and aimed to develop a new therapeutic method targeting G Protein-Coupled Receptor 68 (GPR68). The expression of GPR68 in HCC CAFs was increased by acidic condition, and the proliferation of CAFs was promoted. In addition, the production of cytokines IL-6 and IL-8 was increased. The production of cytokines was weakened by the knockdown of GPR68. Additionally, the cancer-promoting effect of CAFs was weakened by the knockdown of GPR68 by siRNA. These results indicate that the regulation of cytokine secretion by GPR68 may suppress the HCC-promoting effect of CAFs and suppress the progression of HCC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：癌関連線維芽細胞 肝癌 癌微小環境 GPR68 サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

肝癌は全世界で年間約 70 万人が罹患し、日本における年間死亡者数は約 3 万 5 千人とされ、主要な悪性疾患のひとつである。肝癌の主な要因として、B 型肝炎あるいは C 型肝炎ウイルスの持続感染があり、近年はアルコール性肝硬変や肥満、非アルコール性脂肪性肝疾患を背景とした肝癌が増加傾向にある。手術、焼灼療法、塞栓療法、化学療法、放射線療法などが行われているが、いまだ難治性で予後不良な疾患であり、新たな治療戦略が必要である。

癌組織には癌細胞だけでなく、それを支える間質も多く存在する。間質は線維芽細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞や、細胞外マトリクスおよび生理活性物質(サイトカインなど)で構成され、特殊な環境が構築されている。こうした癌の微小環境が、癌の増殖や浸潤・転移を引き起こし、薬剤耐性獲得や免疫反応回避を介して癌の悪性化に寄与することが注目されている。癌の微小環境における癌細胞・間質細胞および免疫細胞の細胞間ネットワーク機構を解明することで、革新的な制御機構の開発が可能になると考えられる。

癌関連線維芽細胞(Cancer associated fibroblast(CAF))は多くの固形癌の癌組織に存在している活性化した線維芽細胞であり、癌の進展、悪性化に寄与する。肝臓においては、慢性炎症や線維化は肝癌発癌のリスクであり、CAF の機能の解明やその制御は、癌の進展を抑制し、免疫逃避を克服する上で重要な役割を果たしている可能性がある。

われわれはタイ原産の熱帯植物の葉から単離された Conophylline が、肝癌細胞株において CAF 活性化を抑制し、癌の増殖・進展を抑制することを明らかにした。Conophylline を投与した CAF 培養上清を解析したところ、IL-6, IL-8 などのサイトカイン産生が抑制されていた。さらに CAGE (cap analysis of gene expression) 解析を用いて mRNA の変化を網羅的に検討し、サイトカインの発現制御に関わる因子として G protein-coupled receptor 68(GPR68) を同定した。GPR68(OGR1:Ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1)は細胞外プロトンを感じ取るプロトン感受性 GPCR (G タンパク質共役型受容体)であることが明らかとなっている。細胞外 pH の低下がプロトン感受性 GPCR を介して、種々の細胞内情報伝達系を活性化することが報告されている。炎症部位では解糖系亢進による乳酸産生増加等により pH が低下するが、pH 低下が炎症部位の細胞機能にさまざまな影響を与えられている。GPR68 は炎症性サイトカインの産生に関与するとされ、炎症応答を調節する可能性がある。癌では解糖系が亢進し酸素供給も不足するため、組織内 pH は低下しており、細胞の増殖や様々な応答を変化させる。そこでプロトン感受性 GPCR である GPR68 は、癌治療の新たなターゲットとなる可能性がある。GPR68 を介したサイトカイン制御および CAF の抑制機序を解明することで、肝癌の新たな治療戦略を構築し、肝癌の進展が抑制できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、1. 肝癌における GPR68 の機能を明らかにする、2. GPR68 が腫瘍免疫環境に及ぼす影響を明らかにする、3. GPR68 の制御による新たな治療開発の可能性を追求することである。本研究では、発癌や治療抵抗性における癌の微小環境の重要な構成細胞である CAF の役割と、GPR68 を介した細胞内シグナル伝達系に注目した点が独創的と言える。これまでに癌細胞に注目した研究は盛んにすすめられてきた。しかし癌の浸潤、転移の機序や、免疫抑制環境の構築に関しては十分な説明ができず、近年間質の重要性が認識されてきた。本研究では CAF やサイトカインといった癌間質、およびその細胞内シグナル伝達に注目することで、癌微小環境における腫瘍進展や免疫抑制機序の解明につながる可能性がある。とくにプロトン受容体 GPR68 に着目することで、癌の特殊な免疫抑制環境改善の方法を見出す可能性がある。さらに既存の制癌剤との併用による治療効果増強や、免疫チェックポイント阻害剤との相乗効果など、革新的な治療の開発に結びつく可能性がある。CAF は肝癌のみならず、他の消化器癌においても悪性化に重要な因子と考えられており、本研究が広く消化器癌の新たな治療開発につながる可能性があり、治療成績の向上や予後の改善が期待できる。

## 3. 研究の方法

### in vitro 系での GPR68 発現評価および pH 応答性解析

ヒト肝癌切除標本より樹立した CAF および Lx-2(ヒト肝星細胞株)を用いて、GPR68 の発現をタンパクレベル(Western blot)で解析する。次に pH 応答性を解析するため、培養液を pH7.2~6.4 まで 5 段階に調整し、弱酸性 pH 刺激による CAF および Lx-2 の発現を解析する。

### GPR68 抑制による効果の検証

GPR68 を介したシグナルがサイトカイン産生制御に関わることを検証するため、GPR68 を siRNA で抑制し、サイトカイン産生の変化を検証する。

### GPR68 抑制による肝癌細胞の機能解析

GPR68 を siRNA で抑制した CAF の培養上清を用いて、肝癌細胞株の増殖能、浸潤能などに与える影響を in vitro で解析する。

### 弱酸性刺激による肝癌 CAF サイトカイン産生能の検証

In vitroにおいて、ヒト肝癌切除標本より樹立したCAF1において、弱酸性刺激によるサイトカイン産生能を検討する。培養液をpH7.0, 6.8, 6.6, 6.4に調整し、肝癌CAFを48時間培養した後、サイトカイン(IL6, IL-8)産生の評価をRT-PCRで行う。

肝癌CAFにおけるGPR68発現評価およびpH応答性解析

新たにヒト肝癌切除標本からCAF3を樹立し、GPR68発現およびpH応答性を再検証する。

ヒト肝癌切除標本におけるGPR68発現(免疫染色)

肝癌切除標本においてGPR68免疫染色により発現を評価する。。

肝癌細胞と肝癌CAFにおけるGPR68発現評価(Western blot)

肝癌細胞株(PLC)および肝癌CAFについて、酸性(pH6.6)培養下でのGPR68発現部位をタンパクレベルで解析する。

#### 4. 研究成果

in vitro系でのGPR68発現評価およびpH応答性解析

ヒト肝癌切除標本より樹立したCAFおよびLx-2(ヒト肝星細胞株)においてタンパクレベル(Western blot)においてGPR68が発現することを確認した。弱酸性pH刺激によるCAFおよびLx-2の発現を解析したところ、肝癌CAFにおいて、弱酸性刺激によりGPR68はタンパクレベルにて減少したが、mRNAレベルにおいては発現増加を認めた。肝癌CAFの増殖能を検討したところ、弱酸性刺激後48時間において、増殖能の有意な低下を認めた。Lx2についても同様の検討を行ったところ、タンパクレベルおよび増殖能について、弱酸性刺激による有意な低下を認めた。

GPR68抑制による効果の検証

GPR68をsiRNAで抑制すると、サイトカインのうちIL-6, Osteopontin, Angiogenin, IL-8の産生が有意に抑制された。(図1)

GPR68抑制による肝癌細胞の機能解析

GPR68をsiRNAで抑制すると、CAFによる肝癌細胞増殖抑制効果が抑制された。またGPR68抑制によりCAFの浸潤促進効果が抑制された。

弱酸性刺激による肝癌CAFサイトカイン産生能の検証

ヒト肝癌切除標本より樹立したCAF1において、弱酸性刺激により、IL-6, IL-8 mRNAともに有意な増加を認めた。

肝癌CAFにおけるGPR68発現評価およびpH応答性解析

新たに樹立したCAF3において、GPR68は酸性環境においてmRNAレベルで有意に増加した。サイトカイン産生能についてもCAF3では、CAF1と同様に酸性環境下においてIL-6およびIL-8がmRNAレベルで有意に増加することを確認した。

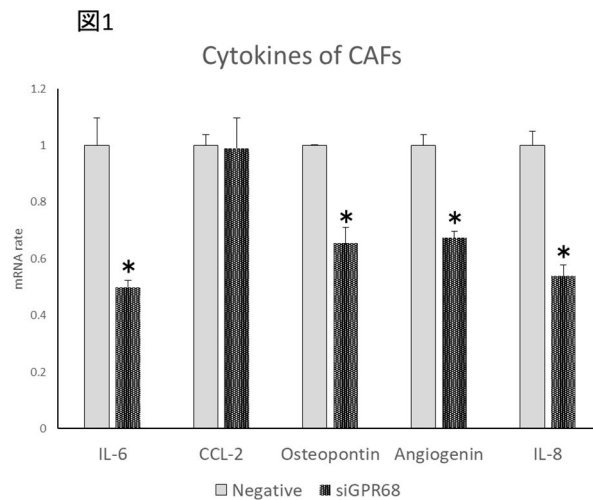
ヒト肝癌切除標本におけるGPR68発現(免疫染色)

肝癌切除標本において、癌部の細胞質にGPR68の高発現を認めた。一方肝癌周囲間質においては、細胞膜上にGPR68高発現を認めた。この結果から、癌部と癌間質とでGPR68発現部位が異なることが明らかとなった。

肝癌細胞と肝癌CAFにおけるGPR68発現評価(Western blot)

肝癌CAFでは酸性環境において細胞膜におけるGPR68発現が増加した。肝癌細胞では酸性環境においても細胞膜におけるGPR68の発現増加は認めなかった。一方で肝癌細胞では細胞質におけるGPR68発現の増加を認めた。このことから、酸性環境が肝癌CAF細胞膜上のGPR68発現に関与する可能性が考えられた。

これらの結果から、GPR68によるサイトカイン分泌制御により肝癌CAFの活性が抑制され、肝癌の進展が抑制できる可能性が示された。



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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamanaka Takahiro, Harimoto Norifumi, Yokobori Takehiko, Muranushi Ryo, Hoshino Kouki, Hagiwara Kei, Gantumur Dolgormaa, Handa Tadashi, Ishii Norihiro, Tsukagoshi Mariko, Igarashi Takamichi, Watanabe Akira, Kubo Norio, Araki Kenichiro, Umezawa Kazuo, Shirabe Ken	4. 巻 20
2. 論文標題 Conophylline Inhibits Hepatocellular Carcinoma by Inhibiting Activated Cancer-associated Fibroblasts Through Suppression of G Protein-coupled Receptor 68	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1019 ~ 1028
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.MCT-20-0150	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 -

〔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
---------	---------