

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05919

研究課題名(和文) PP2A活性制御を軸とした癌ニッチにおける癌関連筋線維芽細胞CAFsの役割解明

研究課題名(英文) Role of cancer-associated myofibroblast (CAF) in the cancer niche based on the regulation of PP2A activity

研究代表者

佐藤 晃一 (Sato, Koichi)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：90205914

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)：癌幹細胞は、周辺の微小環境(癌ニッチ)をゆりかごとして成長する。そのため、癌細胞本体を直接攻撃するのではなく、癌ニッチを標的として癌細胞を兵糧攻めにする創薬戦略が注目されており、実際に血管新生阻害剤が実用化されている。癌関連筋線維芽細胞(CAFs)は、癌ニッチを構成する重要な細胞であり、創薬標的として注目されているが、近年の研究から、CAFsには癌促進性の悪玉CAFsと癌抑制性の善玉CAFsが存在することが明らかになってきた。本研究では、がん抑制性の新たなCAFsを同定することに成功し、CAFsががん抑制機能を獲得する分子機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌関連筋線維芽細胞(CAFs)には、悪玉CAFsと善玉CAFsが存在し、がん治療を考えるうえでは、悪玉を減らし善玉を増やす必要がある。本研究では、善玉CAFsの新たなマーカーを同定することに成功し、さらにそのタンパク質がCAFsを善玉に変える分子機構を明らかにした。本研究の成果は、CAFsが善玉になるか悪玉になるかを分かつ機構の解明につながる。また将来的に、CAFsにおいてそのタンパク質の発現を誘導できれば、善玉CAFsによるがん治療の実現につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells grow in their surrounding microenvironment, known as the tumor niche. Consequently, in addition to directly targeting the cancer cells, a drug strategy targeting the tumor niche to starve the cancer cells has garnered attention. Indeed, anti-angiogenic agents have already been implemented. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are crucial components of the cancer niche and have been highlighted as potential drug targets. However, recent research has revealed the existence of both pro-tumorigenic (bad) CAFs and tumor-suppressive (good) CAFs. In this study, we successfully identified a novel tumor-suppressive CAF and elucidated the molecular mechanism by which CAFs acquire their tumor-suppressive function.

研究分野：獣医薬理学

キーワード：がん SET 筋線維芽細胞 CAFs がんニッチ 微小環境

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は、周辺の微小環境（癌ニッチ）をゆりかごとして成長する。そのため、がん細胞本体を直接攻撃するのではなく、癌ニッチを標的として癌細胞を兵糧攻めにする創薬戦略が注目されており、実際に血管新生阻害剤が実用化されている。癌ニッチの重要な構成因子として癌関連筋線維芽細胞（CAFs）が存在する。CAFsの由来は、常在型の筋線維芽細胞や、血流を介して侵入した間葉系幹細胞（MSC）など様々である。加えて、CAFsにも癌の悪性を促進する「悪玉 CAFs」と抑制する「善玉 CAFs」が存在することが報告され（Mol. Oncol. 2019 13(8):1706等）、CAFsには様々なサブタイプが存在していることが明らかになってきた（図1）。

研究代表者は、本研究開始前に、がん細胞ではがん増悪因子 SET 発現が上昇しており、Protein Phosphatase 2A (PP2A) を阻害することでがん幹細胞性の維持に寄与すること、SET を標的として PP2A 活性を上昇させると抗がん効果が得られることを報告していた（Mol. Can. Res. 2018）。その後の研究から、上皮系の細胞だけでなく間質細胞の一部でも SET タンパク質が発現していることを明らかにしていた（PLoS ONE 2019）。また、MSC の CAFs への分化において PP2A の活性化が重要な役割を果たすことを報告していた（J. Biochem. 2020）。

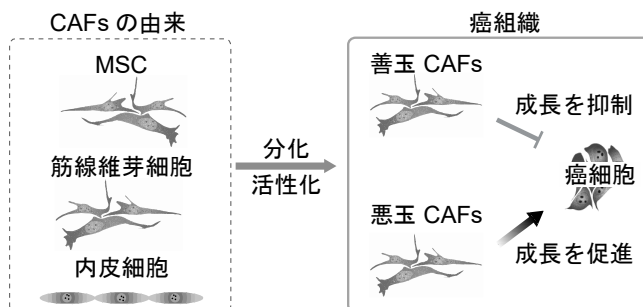


図1 CAFsの由来は様々で、サブタイプも存在する

2. 研究の目的

以上の背景のもと、「CAFsを標的とした創薬は実現可能か？」という大きな学術的な問いに対して、①CAFsにはどのようなサブタイプが存在し、各々どのような役割を果たすのか？②CAFsの各サブタイプへの分化は、どのような分子機構で制御されているのか？という疑問に答えることを目的として本研究を構想した。具体的には、以下の2つの課題について解析を行った。

課題1：SET陽性CAFsとSET陰性CAFsの機能にはどのような差があるのか？

課題2：SET発現がCAFsのフェノタイプにどのような影響を与えるのか？

3. 研究の方法

課題1：C57BL/6マウス由来の大腸筋線維芽細胞株 LmcMF を筋線維芽細胞型の CAFs のモデルとして用いて、SET 発現の抑制が表現型に与える影響を解析した。また、C57BL/6マウス由来大腸がん細胞株 MC38 と LmcMF を C57BL/6マウスに移植することで、生体におけるがんの成長に対して LmcMF が与える影響を解析した。

課題2：LmcMF細胞のSET発現抑制が、細胞内シグナルに与える影響を包括的に理解するため、RNA-seqを行った。筋線維芽細胞型のCAFsの分化に重要な TGF-βシグナルに対してSET発現抑制が与える影響を、生化学的・細胞生物学的に解析した。

4. 研究成果

成果1：SET陽性CAFsががん抑制的に機能することを明らかにした。

我々は、研究開始以前にマウス大腸から単離した筋線維芽細胞を不死化し、マウス大腸筋線維芽細胞株 LmcMF を樹立していた（World J. Gastro. 2013）。本研究で、LmcMF はαSMA陽性の筋線維芽細胞型のCAFs (MyCAF) の発現パターンを有していることが明らかになった。また、初代培養大腸筋線維芽細胞と LmcMF のマーカー発現を比較した所、LmcMF は初代培養細胞と比較してSET発現が顕著に高いことが明らかになり、SET陽性のCAFsのモデルになることが分かった。

レンチウイルスを用いて LmcMF 細胞に non-targeting shRNA (shNT) と SET-targeting shRNA (shSET) を安定的に発現させ、SET発現の抑制が LmcMF の表現型に与える影響を解析した。SET発現抑制は、LmcMF のαSMA発現などの既知のCAFsマーカー発現や細胞増殖には影響を与えないことが明らかになった。一方で、大腸がん細胞株 MC38 と LmcMF を混合して C57BL/6マウスに移植した単がんモデルの解析では、SET発現を抑制した LmcMF と混合した MC38 の成長が顕著に促進された（図2）。組織学的な解析の結果、摘出したがん組織はほぼすべて MC38 で構成されており、LmcMF の生体内での増殖速度の差が組織重量に影響しているわけではないこ

とが明らかになった。したがって、SET 陽性の CAFs はがんの成長を抑制する機能を果たすことが示唆された。

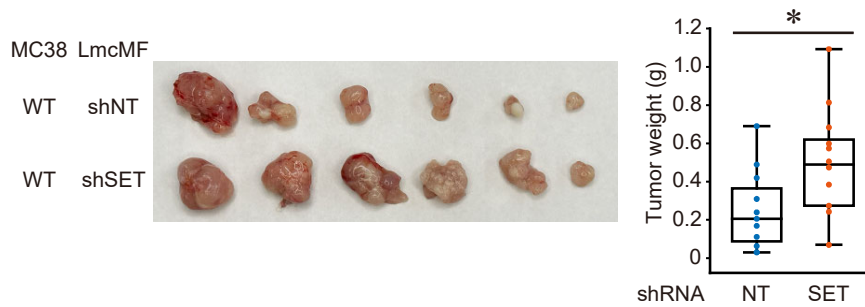


図2 C57BL/6 マウスに、マウス大腸がん細胞株 MC38 とマウス筋線維芽細胞株 LmcMF を混合して皮下に移植した。21 日後に摘出した腫瘍の代表的な写真と腫瘍の重さの定量図を示した。

成果2：SET 発現が、CAFs の TGF- β シグナルを抑制することを明らかにした。

MyCAF の分化には TGF- β シグナルが重要な役割を果たす。LmcMF 細胞の SET 発現抑制が、細胞内シグナルに与える影響を包括的に理解するため、LmcMF shNT および shSET を TGF- β 刺激・無刺激の条件で培養し、RNA-seq を行った (図3A)。Gene Set Enrichment Analysis を行ったところ、SET 発現抑制により LmcMF が間葉系から上皮系へと変換していること (図3B)、TGF- β シグナルが低下していること (図3C) が明らかになった。TGF- β 刺激は細胞内の Smad をリン酸化・活性化させることが知られている。細胞生物学的な解析から、SET 発現抑制は、TGF- β 刺激時の LmcMF の Smad3 リン酸化と活性化を抑制することが明らかになった。

以上の結果から、SET は CAFs の TGF- β シグナル活性を抑制することで、がん抑制性の機能を付与している可能性が示唆された。

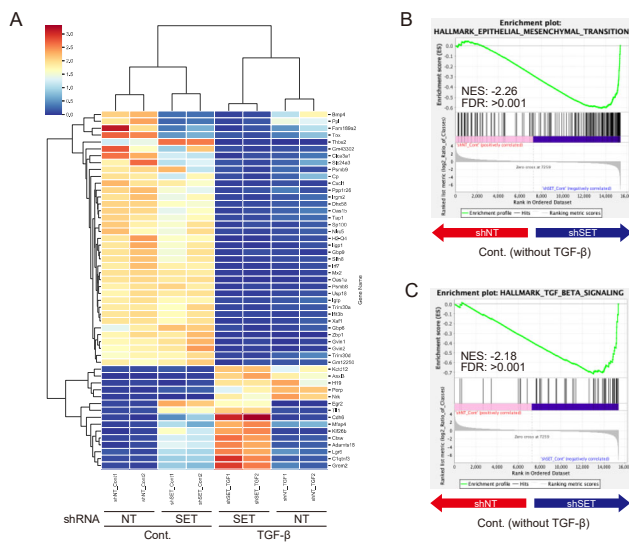


図3 (A) shNT および shSET 発現 LmcMF 細胞を TGF- β 刺激・無刺激の条件で培養し、RNA-seq を行った。発現変動の大きかった遺伝子を用いたヒートマップ。(B、C) 無刺激条件下で SET 発現抑制が上皮間葉転換 (B) および TGF- β シグナル (C) 関連 gene set の発現に与える影響を、Gene Set Enrichment Analysis を用いて解析した。

成果3：がん細胞における SET が、がんの悪性化に寄与する分子機構を明らかにした。

PP2A は、極めて重要ながん抑制因子であり、がん細胞の中では SET などの PP2A 阻害タンパク質が PP2A の働きを抑えることで、がん細胞の幹細胞性を高めている。我々は以前、SET は PP2A を抑制して、c-Myc や E2F1 といったがん促進性の転写因子のタンパク質を安定化することで、がん幹細胞性を高めていることを報告していた (Molecular Cancer Research 2018)。一方で、骨肉腫細胞株 HOS 細胞などの一部のがん細胞株ではこの理論が当てはまらないことも明らかになっていた。がん組織の本体であるがん細胞における SET の役割を解明するため、HOS 細胞を用いて新たな幹細胞性維持機構の解明を目指した。その結果、SET は PP2A 活性を抑制することで Akt を活性化していること、活性化した Akt は、① タンパク質の翻訳を制御する mTORC1/p70S6K シグナルの活性化と、② 転写を制御する PRC1 複合体の構成因子 Bmi-1 タンパク質の安定化を介して、幹細胞性を高めていることが明らかになった。

一連の研究成果は、「PP2A inhibitor SET promotes mTORC1 and Bmi1 signaling through Akt activation and maintains the colony-formation ability of cancer cells.」として、*Journal of Biological Chemistry* の 2024 年 1 月号に掲載された (オンライン公開 2023 年 12 月 22 日)。

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 1件）

1. 著者名 Kohyanagi Naoki, Kitamura Nao, Ikeda Shunta, Shibutani Shusaku, Sato Koichi, Ohama Takashi	4. 巻 300
2. 論文標題 PP2A inhibitor SET promotes mTORC1 and Bmi1 signaling through Akt activation and maintains the colony-formation ability of cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 105584 ~ 105584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2023.105584	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 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富田耕作、馬田康司、大浜剛、佐藤晃一
2. 発表標題 SETはがん関連線維芽細胞のosteoprotegerin産生を制御する
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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