

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：36301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06736

研究課題名（和文）腫瘍随伴マクロファージが分泌するプロサポシンによる癌伸展作用の解明

研究課題名（英文）Analysis of cancer elongation system by prosaposin secreted by tumor-associated macrophages

研究代表者

鍋加 浩明（NABEKA, Hiroaki）

松山大学・薬学部・教授

研究者番号：60581098

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）：神経が傷ついた時にプロサポシンと呼ばれる物質が増えて神経を守ります。一方、がん細胞が広がっていく時にも、がんの近くの細胞がプロサポシンを放出し、そのプロサポシンをがん細胞が受け取っていることが分かりました。これはがん細胞が広がっていく時にプロサポシンを栄養のように取り込むことを示しています。例えば脳梗塞のとき、プロサポシンは傷ついた神経に対して良い効果を示します。一方、大腸がんのときはがんに対して栄養になってしまい、反対に体に悪い効果となってしまいます。そこでプロサポシンを分泌させたり止めたりを自由に切り替えることができるようになれば、新たながん治療方法となる可能性があります。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロサポシンはもともと体の中にある物質です。プロサポシンには体にいい効果もあり、全身のプロサポシンを減少させてしまうと副作用が出てしまいます。そこで、がんのまわりだけプロサポシンを減らせるという新しいがん治療方法を開発しています。プロサポシンを細胞の中で分解させることで、周囲のがん細胞に栄養を与えないという治療方法です。栄養が足りなくなったがんは伸びるのをやめます。

研究成果の概要（英文）：When nerves are damaged, a protein called prosaposin increases and protects the damaged nerves. On the other hand, it has been found that when cancer cells spread, cells near the cancer release prosaposin, which the cancer cells receive. This indicates that when cancer cells spread, they take in prosaposin like nutrients. For example, in the case of cerebral infarction, prosaposin has a positive effect on damaged nerves. On the other hand, in the case of colon cancer, prosaposin becomes a nutrient for the cancer, which has a negative effect on the body. Therefore, if we could freely switch between secreting and stopping prosaposin, it could become a new cancer treatment method.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：プロサポシン 腫瘍随伴マクロファージ 癌進展 ソルチリン mRNA 大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は長年プロサポシンの研究を行い、プロサポシンに強力な神経栄養因子作用があることを報告してきた。一方、TAMs(Tumor-associated macrophages)は腫瘍に随伴して見られるマクロファージである。予備実験で大腸癌病理組織の TAMs にプロサポシンの増加を認め、また TAMs に向かって伸展する大腸癌細胞にはプロサポシン受容体の増加を認めた。これはプロサポシンが TAMs から分泌され、大腸癌の伸展に関わっている新たな機能を持つ可能性を示唆していた。

2. 研究の目的

本研究ではプロサポシンの発現が TAMs にどのように作用し、プロサポシンを発現している TAMs が大腸癌の伸展にどのように関与するかを明らかにすることを目的としている。また、TAMs 内におけるプロサポシン発現シグナルを解析することは大腸癌のみならず新たな癌治療方法の開発に繋がる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) 病理検体でのプロサポシンと受容体の発現の検討：

ヒト大腸癌病理組織検体を薄切し、脱パラフィン後に免疫組織化学を行う。研究代表者が独自に作成したプロサポシン特異抗体を用いて免疫組織化学を行い、プロサポシンとその受容体 GPR37、GPR37L1 の腫瘍組織レベルでの局在を光学顕微鏡により確認する。さらに TAMs とされるマクロファージの存在を認めた検体については、TAMs の重要マーカーである CD163、CD204 に対する抗体とプロサポシンに対する抗体での三重免疫蛍光染色を行い、コンフォーカル顕微鏡で観察する。

他の癌との比較のため胃癌、乳癌、子宮頸癌、肺癌などの組織についてもプロサポシン、GPR37、GPR37L1 で免疫染色および観察を行った。

(2) 病理検体での臨床的検討 (悪性度とプロサポシン・受容体発現との関連)：

病理検体の病理学的悪性度と TAMs の存在、およびプロサポシンと受容体の発現強度 (ウエスタンブロットングおよび免疫染色画像解析)の間に相関が有るか否かを検討する。これらをまとめ、統計的にこれらの相関の強さを検討する。

(3) 培養マクロファージでのプロサポシン分泌機構の解明：

プロサポシン発現によるマクロファージの形態変化を観察する為に、培養細胞株 RAW264 にプロサポシン遺伝子をエレクトロポレーションで遺伝子導入して観察する。

遺伝子導入により発現させたプロサポシンが非分泌型か分泌型かを同定するため、免疫二重標識法によりプロサポシンとソルチリンを別の蛍光色素で標識し、ソルチリンとプロサポシンの共同在を確認する。

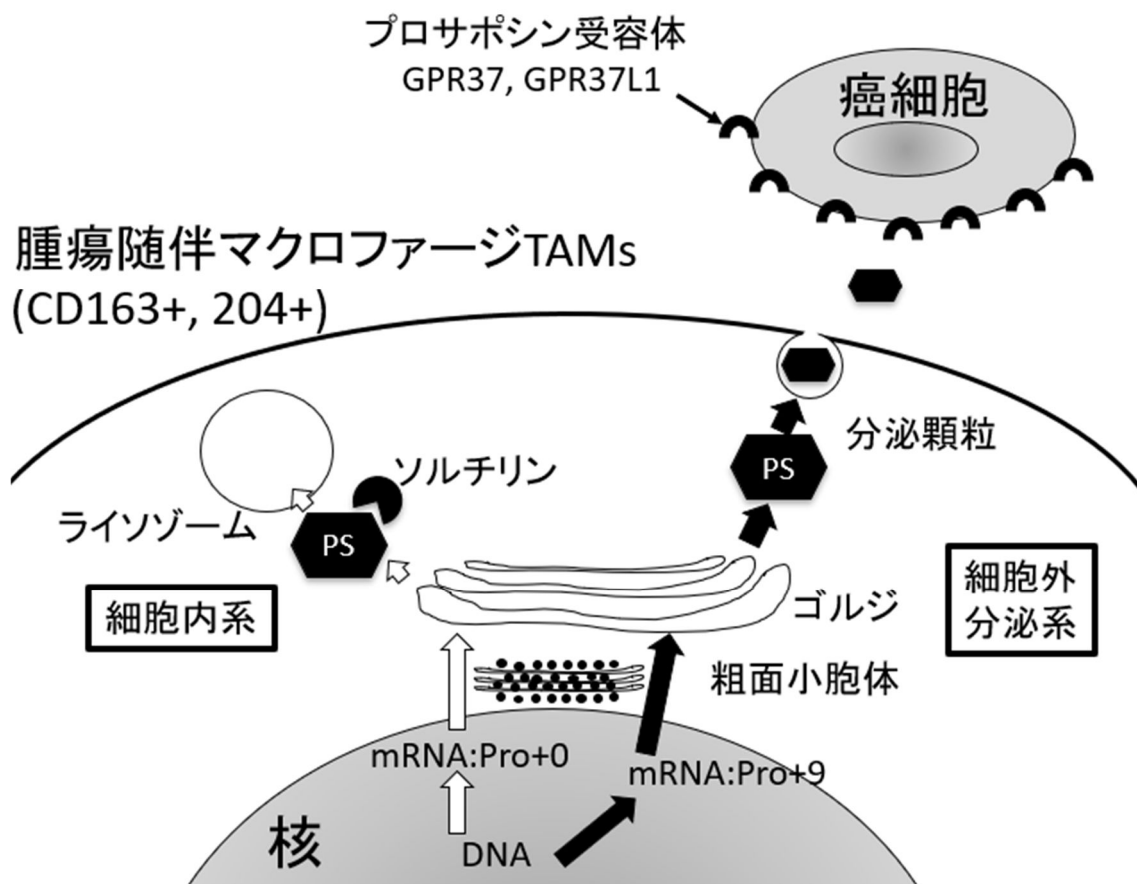
また、プロサポシンの細胞内動態を観察する為に、研究代表者らが独自に開発した蛍光標識プロサポシン遺伝子をエレクトロポレーションで遺伝子導入しライブセルイメージングで観察する。プロサポシンはライソゾーム酵素でもあるので、ライソゾームマーカーであるライソトラッカーとともに蛍光標識プロサポシンを観察することにより、ライブセルイメージングにおいても非分泌型か分泌型か同定できる。

4. 研究成果

病理組織検体全症例の画像解析を行うとともに陽性細胞数を一定の基準で計測し一覧表を作成した。事前実験から症例数を増やして検討したが、事前実験で見られた癌悪性度とプロサポシンの分泌量との間に明らかな相関関係は認められなかった。これは癌による非特異的な炎症反応のために増加したプロサポシンを検出してしまっている可能性があった。そこで腫瘍随伴マクロファージの M1 型（炎症性）、M2 型（抗腫瘍型）に着目し、抗腫瘍型である M2 型マクロファージのみで悪性度との関連の検討を進めている。

ヒト大腸癌培養細胞株 SW480 においてプロサポシンレセプター GPR37 の発現上昇を確認した。この系を用いることで、プロサポシンを使用した癌進展実験および抑制実験を行うことができた。

分泌型のプロサポシンはゴルジ装置でソルチリンと結合しないことが判明し、プロサポシン mRNA の長さの違いがプロサポシンのソーティング機構に関係をしていることが明らかとなった。



これまでの研究成果を上図にまとめた。腫瘍随伴マクロファージ (TAMs) 内においてプロサポシン (PS) は細胞内系 (白矢印) と細胞外分泌系 (黒矢印) の2種類の転帰をとる。細胞内系のプロサポシンはゴルジ装置でソルチリンと結合し、ライソゾームで加水分解される。一方、mRNA の長さの違い (9ヌクレオチド長い) によりプロサポシンはゴルジ装置でソルチリンとは結合せず、分泌顆粒によって細胞外に分泌される。(細胞外分泌系)

細胞外に分泌されたプロサポシンはプロサポシン受容体 GPR37 および GPR37L1 を高発現する癌細胞 (大腸癌の進展部位に多い) に取り込まれ、癌の進展を促進する。

以上の内容について現在論文にまとめているところである。

当初想定していなかった事象としては、多くの大腸癌検体において腫瘍随伴マクロファージが炎症性マクロファージである M1 型であったことである。癌に伴う炎症により集結した M1 型は本研究とは無関係であり、本研究においては組織修復・血管新生・免疫抑制的な役割をもつ M2 マクロファージのみを研究対象とする必要があった。そのため CD204 に加え CD163 を M2 型 TAMs マーカーとして使用し再実験を行い、予定よりも遅れが生じたが当初のテーマのまま実験を継続することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Taniguchi Miho, Nabeka Hiroaki, Yamamiya Kimiko, Khan Md. Sakirul Islam, Shimokawa Tetsuya, Islam Farzana, Doihara Takuya, Wakisaka Hiroyuki, Kobayashi Naoto, Hamada Fumihiko, Matsuda Seiji	4. 巻 16
2. 論文標題 The expression of prosaposin and its receptors, GRP37 and GPR37L1, are increased in the developing dorsal root ganglion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0255958
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0255958	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 -

1. 著者名 Khan Sakirul, Takeuchi Akihide, Nabeka Hiroaki, Khan Farzana, Shimokawa Tetsuya, Takanezawa Sota, Saitou Takashi, Imamura Takeshi, Tachibana Tetsuya, Nishizono Akira, Hamada Fumihiko, Matsuda Seiji	4. 巻 26
2. 論文標題 Administration of prosaposin-derived neurotrophic factor to neural tube defects facilitates regeneration and restores neurological functions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106277 ~ 106277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2023.106277	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 -

1. 著者名 Yamamiya Kimiko, Li Xuan, Nabeka Hiroaki, Khan Sakirul, Khan Farzana, Wakisaka Hiroyuki, Saito Shoichiro, Hamada Fumihiko, Matsuda Seiji	4. 巻 71
2. 論文標題 Tracking of Prosaposin, a Saposin Precursor, in Rat Testis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 537 ~ 554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1369/00221554231198570	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 -

1. 著者名 Khan Farzana, Khan Sakirul, Nabeka Hiroaki, Mimuro Hitomi, Nishizono Akira, Hamada Fumihiko, Matsuda Seiji	4. 巻 395
2. 論文標題 Neurotoxic stimulation alters prosaposin levels in the salivary systems of rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell and Tissue Research	6. 最初と最後の頁 159 ~ 169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00441-023-03847-6	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
---------	---------