

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19551

研究課題名（和文）高転移腫瘍の空間的トランスクリプトーム解析による癌転移の新しい予測・治療法の開発

研究課題名（英文）Spatial transcriptome analysis of highly metastatic tumours to develop new methods for the prediction and treatment of cancer metastasis

研究代表者

久場 敬司（Kuba, Keiji）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：10451915

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：高転移腫瘍の空間的トランスクリプトーム解析で見出したリンパ節・肺転移の新たな制御因子Galectin-7の役割、意義を明らかにすることを研究目的として研究を行った。腫瘍免疫抑制の領域でGalectin-7の発現は上昇していたが、Galectin-7は免疫細胞の活性化にほとんど影響を与えなかった。また、癌細胞でも低酸素はGalectin-7の発現に影響を与えなかったが、TNF-αによりGalectin-7の発現が制御されることが分かった。さらに、G-CSFが好中球浸潤の誘導や細胞増殖に重要であることを見出した。ヒト食道癌の組織アレイ解析でG-CSF高発現は予後不良と関連することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、Galectin-7の阻害が食道や頭頸部の扁平上皮癌に対する治療に応用できることを世界に先駆けて明らかにした。とりわけGalectin-7の阻害には細胞増殖を抑制する作用がなく転移を特異的に抑えることから、通常の抗がん剤のような副作用の危険性が少ないことが利点であると考えられる。また、本研究で新たにG-CSFが癌細胞の増殖と免疫抑制を促進しがん悪性化に寄与することが分かり、さらに食道癌の予後不良と関連することが明らかになった。Galectin-7とG-CSFの2つの標的を合わせて食道や頭頸部の扁平上皮癌の治療、診断に応用することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of the study was to clarify the role and significance of Galectin-7, a new regulator of lymph node and lung metastasis found in spatial transcriptome analysis of highly metastatic tumors. Although Galectin-7 expression was elevated in areas of tumor immunosuppression, Galectin-7 had little effect on immune cell activation. Hypoxia also did not affect Galectin-7 expression in cancer cells, but Galectin-7 expression was revealed to be regulated by TNF-α. Furthermore, G-CSF was found to be important for induction of neutrophil infiltration and cell proliferation. Tissue array analysis of human esophageal cancer showed that high G-CSF expression correlated with poor prognosis.

研究分野：薬理学

キーワード：扁平上皮癌 腫瘍免疫 転移 空間的トランスクリプトーム T細胞 Galectin-7 がん微小環境 G-CSF

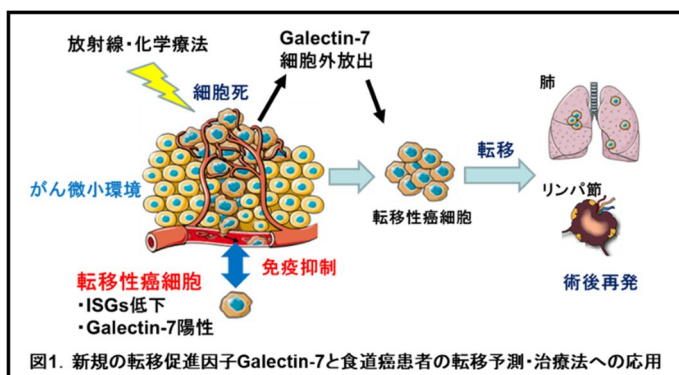
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

食道扁平上皮癌は、様々な集学的治療法の開発にも関わらず、5年生存率は依然として低く、術後の転移、再発が予後不良につながる。術前の放射線治療や化学療法で原発腫瘍のがん細胞の多くが死滅し、根治手術を行ったにも関わらず、転移により再発するケースが問題となる。近年、免疫チェックポイント阻害剤など目覚ましい進歩があるものの未だ十分とはいえない。また、新規の治療薬は開発、製造におけるコストや時間が創薬開発のボトルネックとなり、いったん薬剤として承認されてからも高額な医療費の負担増など医療経済学的な問題も生じつつある。

原発腫瘍の組織は病態の進行に伴い複雑な非均一性を示し、特異的ながん微小環境が浸潤・転移には重要であることが知られている。当研究者らは本研究課題の開始以前からヒト食道癌の転移モデルとしてマウス扁平上皮癌細胞(NRS1M 癌細胞)を同系のC3HeNマウスを皮下移植し、リンパ節転移、肺転移を評価するモデルを用いて研究を行っていた(Surgery 2013; Surg Today 2017)。この研究の中で、NRS1M 癌細胞の腫瘍組織の凍結切片で空間的トランスクリプトーム解析(Visium, 10x Genomics)を行い、転移を規定するがん微小環境因子の同定を試みた。その結果、低酸素応答や細胞死が活発な領域では、抗原提示、インターフェロン応答など腫瘍免疫に関わる遺伝子群の発現が有意に低下していることを見出した。この免疫応答が低下した領域が転移に寄与するがん微小環境ではないかと考え詳細な解析を行ったところ、新たに転移制御因子 Galectin-X (Galectin-7)を同定することに成功した。Galectin-7は、糖鎖-ガラクトシド構造を認識し結合するタンパク質群の一つであり、個体発生分化、形態形成、細胞死といった多様な生命現象に関与することが知られているが、癌における役割、意義はほとんどわかっていない。

Galectin-7は *in vitro* の NRS1M 癌細胞では培養上清中に分泌されないが、担癌マウスでは、癌細胞を移植後の4週間前後から血中で Galectin-7 が検出されるようになった。同時期に肺やリンパ節の微小転移が確認されることから、細胞外へ分泌された Galectin-7 はがん転移に寄与することが考えられた。そこで、CRISPR-Cas9を用いて Galectin-7 欠損の NRS1M 癌細胞を作製し、マウスに移植した結果、コントロールに比べリンパ節・肺の転移が顕著に抑えられることが分かった。この時、原発腫瘍の大きさには差がなかったことから、Galectin-7 は転移を特異的に制御する因子であると判断された。さらに、Galectin-7 が *in vivo* での癌細胞の細胞死やダメージによって分泌されると考えられることから、ヒト食道癌患者においても術前の放射線や化学療法によるがん細胞の細胞死・ダメージによって Galectin-7 が分泌され、わずかに生き残っている癌細胞の転移を逆に活発化させることが考えられた。さらに、新規の転移制御因子 Galectin-7 を治療薬のみならず転移予測のバイオマーカー開発に応用できる可能性が考えられ、転移の診断薬として早期に開発を進め、既存の術前治療や外科治療の方針決定にすぐに役立つことが期待された。



## 2. 研究の目的

本研究では、高転移腫瘍の空間的トランスクリプトーム解析で見出した食道癌のリンパ節・肺転移の新たな制御因子 Galectin-7 の役割、意義を明らかにし、それに基づいて癌転移の新しい予測法、治療法開発のための基盤を創成することを研究目的とする

## 3. 研究の方法

### (1) Galectin-7 の発現と細胞外分泌機構の解明

*In vivo* がん微小環境では、低酸素などにより Galectin-7 が癌細胞の細胞死やダメージによって細胞外に分泌されると予想されたことから、*in vitro* 培養系で低酸素環境による発現誘導や細胞外への分泌の誘導について検討した。また、術前の放射線治療や化学療法による細胞死を模倣した *in vitro* 実験系において、Galectin-7 が細胞死によって DAMPs として分泌されるかを検討した。

### (2) Galectin-7 による免疫抑制の機序解明

Galectin-7 の転移誘導の機序として樹状細胞抗原提示能の低下、T細胞の疲弊または細胞死が考えられた。実際、*in vitro* で Galectin-7 を添加したマウス樹状細胞ではアポトーシスが誘導

された。そこで、腫瘍組織を用いて **FACS** 解析を行い、樹状細胞を含めた各免疫細胞集団の割合および遺伝子発現プロファイルを解析し、詳細な **Galectin-7** 標的細胞の同定を行った。

### (3) 食道癌患者における **Galectin-7** および **G-CSF** の発現解析

食道癌患者 200 例の原発腫瘍組織のホルマリン固定標本から作製された組織マイクロアレイを用いて **Galectin-7** および **G-CSF** の免疫染色を行い、再発(転移)と発現量との相関を検討した。また、食道癌患者の確定診断後、術前治療の前後ならびに手術の前後の 4 つのタイムポイントで血漿サンプルを採取し、**ELISA** 法で血中の **Galectin-7** 濃度を測定し、転移・再発など患者予後との相関について解析する。連携研究者である秋田大学食道外科の本山悟教授ならびに同大学呼吸器外科の南谷佳宏教授との共同研究で行った。

## 4. 研究成果

### (1) **Galectin-7** の発現と細胞外分泌機構の解析

転移促進因子の実体として **Galectin-7 (Gal-7)** を同定した。in vitro 培養系で低酸素環境による **Galectin-7** の発現誘導や細胞外への分泌の誘導について検討したところ、低酸素による **Galectin-7** の誘導は認められなかった。また、抗がん剤による **Galectin-7** の細胞外分泌の影響を検討したが、細胞死により **Galectin-7** 放出は亢進しなかった。むしろ生細胞が能動的に分泌しているものと考えられた。一方で、腫瘍内の **Galectin-7** 高発現の区域ではサイトカインの発現が低下していたことから、サイトカインが抑制因子として機能していると考え、**IFN-g** や **TNF-a** の **Galectin-7** 産生に対する影響を検討したところ、**TNF-a** 処理により有意に **Galectin-7** の発現が低下した(図 2)。よって、癌細胞と免疫細胞の相互作用により **Galectin-7** の発現が制御されていることが分かった。

### (2) **Galectin-7** による転移誘導の機序解明

**Galectin-7** を欠損させた癌細胞の腫瘍について、腫瘍内の **CD8+** T 細胞や **CD11c+** 樹状細胞について調べたが明らかな免疫細胞の変化は認められなかった。**Galectin-7** はがん細胞自身の浸潤・転移能を高めている可能性が考えられた。がん細胞の遊走、浸潤能についても検討を行ったが、単純な **boyden chamber** 法や **scratch wound healing assay** では遊走能に明らかな変化は見られなかった。細胞の接着能にも変化は見られなかった。低酸素などがん微小環境を模倣する条件などの詳細な検討が必要であるが、いずれにしても **Galectin-7** が in vivo がん細胞の転移能を亢進させると結論づけられた。

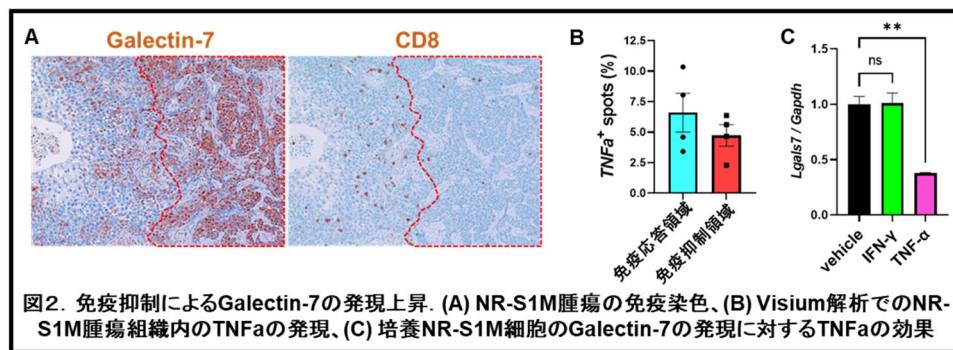


図2. 免疫抑制によるGalectin-7の発現上昇。(A) NR-S1M腫瘍の免疫染色、(B) Visium解析でのNR-S1M腫瘍組織内のTNFaの発現、(C) 培養NR-S1M細胞のGalectin-7の発現に対するTNFaの効果

### (3) 食道扁平上皮癌患者における **Galectin-7** の発現解析

食道癌患者 200 例の原発腫瘍組織のホルマリン固定標本から作製された組織マイクロアレイを用いて **Galectin-7** の免疫染色を行い、転移や予後などの臨床的悪性度と **Galectin-7** 発現量との相関を検討したが、有意な相関は認められなかった。また、食道癌患者の確定診断後、術前治療の前後ならびに手術の前後の 4 つのタイムポイントで採取した血漿サンプルを用いて **ELISA** 法で血中の **Galectin-7** 濃度を測定したが、転移・再発など患者予後との相関も認められなかった。

### (4) **G-CSF** による癌細胞増殖の促進と好中球浸潤の誘導の 2 機能性の解明

**Galectin-7** の機能解析を行う中で、高転移株の **NR-S1M** 腫瘍において **G-CSF** が発現上昇し好中球の腫瘍内浸潤が亢進していることを見出した。そこで、**CRISPR/Cas9** で **G-CSF** を欠損させた **NR-S1M** 細胞を作製したところ、意外にも **G-CSF** 欠損細胞は in vitro での細胞増殖能が低下していた。さらにマウスの腫瘍移植実験では、原発腫瘍の増大が抑制され、リンパ節転移および肺転移が抑制された(図 3)。この時、末梢の好中球の割合が減少し、**CD8** 陽性 T 細胞の割合が増加していたので、**Ly6G** 中和抗体により好中球を欠失させたところ、原発腫瘍の増殖がわずかではあるが有意に抑制されたことから、**G-CSF** を介した腫瘍関連好中球の誘導も原発腫



瘍の増殖に寄与することが分かった ( 図 4 )

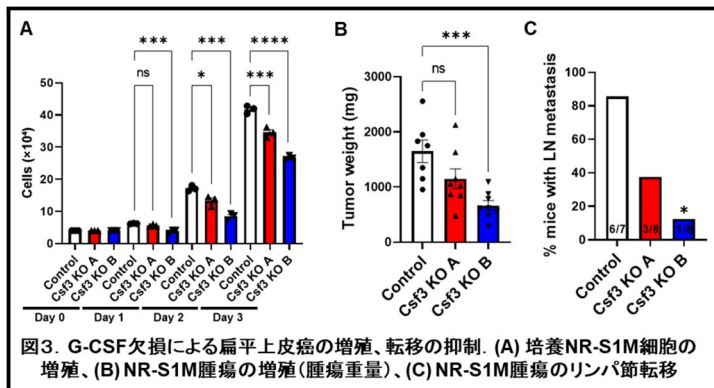


図3. G-CSF欠損による扁平上皮癌の増殖、転移の抑制. (A) 培養NR-S1M細胞の増殖、(B) NR-S1M腫瘍の増殖(腫瘍重量)、(C) NR-S1M腫瘍のリンパ節転移

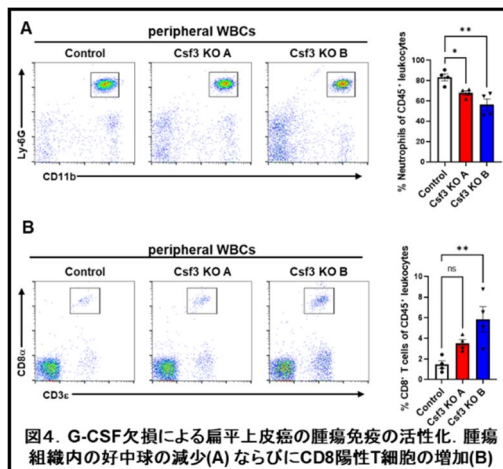


図4. G-CSF欠損による扁平上皮癌の腫瘍免疫の活性化. 腫瘍組織内の好中球の減少(A) ならびにCD8陽性T細胞の増加(B)

### (5) ヒト扁平上皮癌の臨床検体における G-CSF の発現の検討

前述の食道癌患者 200 例の原発腫瘍の組織マイクロアレイを用いて G-CSF の免疫染色を行い解析したところ、G-CSF 高発現群で有意に予後不良となることが分かった。よって、G-CSF は予後予測の血中マーカーとなることが分かり、今後は Galectin-7 との共発現などさらなる解析を進めていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 An Jianbo, Nagaki Yushi, Motoyama Satoru, Kuze Yuta, Hoshizaki Midori, Kemuriyama Kohei, Yamaguchi Tomokazu, Ebihara Takashi, Minamiya Yoshihiro, Suzuki Yutaka, Imai Yumiko, Kuba Keiji	4. 巻 41
2. 論文標題 Identification of Galectin-7 as a crucial metastatic enhancer of squamous cell carcinoma associated with immunosuppression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5319 ~ 5330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-022-02525-1	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 Yamada D, Kojima Y, Hosoya A, Suzuki M, Watabe T, Inoue T, Tsugawa N, Asakawa T, Yonemoto Y, Onizawa M, Nemoto Y, Oshima S, Shimonaka M, Kuba K, Ishida J, Fukamizu A, Penninger JM, Watanabe M, Okamoto R, Nagaishi T	4. 巻 647
2. 論文標題 Apelin expression is downregulated in T cells in a murine model of chronic colitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 72 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.01.068	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 該当する

1. 著者名 Minato Takafumi, Yamaguchi Tomokazu, Hoshizaki Midori, Nirasawa Satoru, An Jianbo, Takahashi Saori, Penninger Josef M., Imai Yumiko, Kuba Keiji	4. 巻 17
2. 論文標題 ACE2-like enzyme B38-CAP suppresses abdominal sepsis and severe acute lung injury	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0270920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0270920	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 該当する

1. 著者名 Yamada D, Kojima Y, Hosoya A, Suzuki M, Watabe T, Inoue T, Tsugawa N, Asakawa T, Yonemoto Y, Onizawa M, Nemoto Y, Oshima S, Shimonaka M, Kuba Ki, Ishida J, Fukamizu A, Penninger JM., Watanabe M, Okamoto R, Nagaishi Takashi	4. 巻 647
2. 論文標題 Apelin expression is downregulated in T cells in a murine model of chronic colitis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 72 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.01.068	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 Yamada Toshiki, Tatematsu Megumi, Takasuga Shunsuke, Fuchimukai Akane, Yamagata Kenki, Seki Shinsuke, Kuba Keiji, Yoshida Hideyuki, Taniuchi Ichiro, Bernhardt G?nter, Shibuya Kazuko, Shibuya Akira, Yamada Takechiyo, Ebihara Takashi	4. 巻 220
2. 論文標題 TIGIT mediates activation-induced cell death of ILC2s during chronic airway allergy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 e20222005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20222005	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 該当する

1. 著者名 Kemuriyama Kohei, An Jianbo, Motoyama Satoru, Nagaki Yushi, Yamaguchi Tomokazu, Sato Yusuke, Wakita Akiyuki, Minamiya Yoshihiro, Kuba Keiji	4. 巻 28
2. 論文標題 Squamous cell carcinoma derived G-CSF promotes tumor growth and metastasis in mice through neutrophil recruitment and tumor cell proliferation, associated with poor prognosis of the patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 573 - 584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13051	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Jianbo An, Yushi Nagaki, Midori Hoshizaki, Tomokazu Yamaguchi, Yuta Kuze, Yumiko Imai, Satoru Motoyama, Yutaka Suzuki, Keiji Kuba
2. 発表標題 Immunosuppression-elicited Galectin-7 is a crucial metastatic enhancer of squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安健博、長岐雄志、星崎みどり、山口智和、久世裕太、今井由美子、本山悟、鈴木穰、久場敬司
2. 発表標題 特異的がん微小環境にて誘導されるGalectin-7は 扁平上皮癌の転移促進因子である
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 煙山紘平, 安健博, 山口智和, 本山悟, 南谷佳弘, 久場敬司
2. 発表標題 癌細胞由来G-CSFによる好中球の動員と腫瘍細胞の増殖促進を介した扁平上皮癌の悪 性化機構
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長岐雄志, 安健博, 本山悟, 山口智和, 星崎みどり, 煙山紘平, 鈴木穰, 今井由美子, 南谷佳弘, 久場敬司
2. 発表標題 扁平上皮癌の不均一性における免疫抑制の微小環境は高転移性細胞の発生をもたらす
3. 学会等名 第32回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 Galectin-7阻害剤を用いた癌転移抑制剤	発明者 久場敬司、本山悟、 安健博、鈴木穰	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-143622	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------