

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23701067

研究課題名（和文） 腫瘍微小環境における小胞体ストレス応答制御薬剤の作用機序の解析

研究課題名（英文） Characterization of the unfolded protein response (UPR) modulators in solid tumor microenvironment

研究代表者

齋藤 さかえ (SAITO SAKAE)

京都大学・医学（系）研究科（研究院）・研究員

研究者番号：20335491

研究成果の概要（和文）：小胞体ストレス応答は、低酸素・低栄養などの腫瘍微小環境における細胞の適応応答のひとつであり、治療や抗がん剤の標的として注目されている。これまでにいくつかの小胞体ストレス応答阻害剤で抗腫瘍効果が報告されているが、がん細胞と同様のストレス環境下にある腫瘍間質細胞や浸潤細胞への影響はほとんど知られていない。本研究では、腫瘍組織より低酸素領域にあるがん細胞及び免疫細胞を単離して遺伝子発現を解析し、細胞特異的に発現する遺伝子を同定した。また、これらの遺伝子発現誘導の一部が小胞体ストレス応答阻害剤により抑制されることを示した。

研究成果の概要（英文）：Solid tumors have regions of hypoxia and glucose deprivation, in which cancer cells activate the unfolded protein response (UPR). The UPR in cancer cells plays an important role in their survival under stress conditions, and thus the UPR is a potential target of antitumor therapy. Several UPR inhibitors are shown to exert antitumor activity in vivo. However, the effect of the UPR inhibitors on tumor microenvironment is not fully understood. We show that the UPR inhibitors suppress the gene expression both in cancer cells and in macrophages under hypoxic conditions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：腫瘍微小環境、小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 腫瘍微小環境：がん微小環境は、がん幹細胞ニッチの構築、腫瘍の増殖や血管新生、がん細胞の浸潤や転移等に関与し、がんの発生と成長に重要な役割を果たしている。また、がん細胞の薬剤耐性の獲得にも深く関連することが知られており、治療や抗がん剤の標的として注目され、研究の進展が期待される分野である。

固形腫瘍特有の微小環境として、腫瘍の内部には低酸素や低栄養・低グルコースといったストレス環境が存在することが知られている。一般に、腫瘍は増殖が著しく早いため、血管の量が不足している。また、腫瘍血管は正常に比べ脆弱な構造をしているため、腫瘍内部は血流が低く不均一になっており、酸素や栄養の届かない領域が生じる。これに対し、がん細胞はストレス適応応答の機構をもっており、厳しい環境下での生存を可能にして

いる。がん細胞のストレス耐性の獲得は、がんの悪化や抗がん剤耐性の一因となる。近年、がん細胞のストレスに対する細胞応答の分子機構の解明が進み、低酸素誘導因子を中心とした低酸素応答や、小胞体に局在するストレスセンサーを介した小胞体ストレス応答 (Unfolded protein response; UPR) など、腫瘍微小環境への適応に様々なシグナル伝達経路が関与していることが明らかになってきた。

(2) UPR を標的とした抗がん剤 : UPR は低酸素、低グルコースなど種々のストレスによって活性化されるシグナル伝達経路であり、ストレス下でのがん細胞の生存や増殖に重要な役割を果たしていることが知られている。我々は、UPR を標的としたがん分子標的治療法の開発を目指し、これまでに、放線菌より単離した新規化合物 versipelostatin、抗糖尿病薬ビグアナイド化合物、ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤、他7種類の化合物にグルコース飢餓特異的なUPR阻害活性があることを報告してきた。この他にも、UPR経路を標的とした阻害剤として、ATF6阻害剤 AEBSF、IRE1-XBP1阻害剤 trierixin、irestatin、PERK-eIF2 α 阻害剤 salubrinalなどが報告されている。これらのUPR抑制活性を持つ化合物の一部では、担がんマウスにおいて抗腫瘍効果が認められており、抗がん剤としての開発が期待されている。しかし、生体内でがん細胞及びがん間質細胞を含めた腫瘍微小環境にこれらの化合物がどのように作用しているのか、全体像を検討した研究例は数少ない。

2. 研究の目的

腫瘍にはがん細胞だけでなく、免疫細胞、線維芽細胞や血管など種々の間質細胞が存在しており、腫瘍の成長に重要な役割を果たしていることが知られている。UPR抑制剤を抗がん剤として投与した場合、がん細胞に作用すると同時に、周囲の細胞にどのような影響を与えているのかを明らかにすることは、生体における抗腫瘍作用の全体像を理解する上で重要である。また、低酸素や低栄養といったストレス領域は腫瘍の内部に散在しており、位置や範囲は腫瘍の成長と同時に刻々と変化している。微小環境を観察したり、あるいはストレス領域にある細胞を単離して化合物の作用を解析するためには、生体内でストレス領域を検出できる実験系の構築が必要である。

以上の知見より、本研究では、UPR抑制活性をもつ抗がん剤の生体内での作用機序を明らかにすることを目的とし、担がんマウスを用いて腫瘍のストレス領域及びUPRの活性

化を検出する実験系を構築した。また、ストレス領域にあるがん細胞及び腫瘍浸潤細胞における遺伝子発現解析を行い、UPR制御化合物の作用機序の解析を遂行した。

3. 研究の方法

細胞におけるUPRの活性化を検出するため、転写因子XBP1の小胞体ストレス特異的スプライシング部位の下流に緑色蛍光タンパク質(GFP)もしくはルシフェラーゼ遺伝子を融合したレポーター遺伝子を作成し、発現ベクターにクローニングした。レポーター遺伝子はレンチウイルスを用いてLewis肺がん由来3LL細胞に導入し、安定発現株を作成してマウスに移植し、腫瘍の成長に伴うUPRの活性化を経時的に観察した。腫瘍内部のストレス領域の検出には、組織低酸素検出試薬Hypoxyprobeを使用した。

腫瘍の移植はC57BL/6マウスを用い、麻酔下で皮下に3LL細胞(3×10^5 個)を移植した。移植後4日目(約25 mm³)、8日目(約134 mm³)、12日目(約210 mm³)に腫瘍組織を摘出し、コラゲナーゼ/ディスパーゼを用いて細胞を単離して、細胞表面マーカー(CD45, NK1.1, CD11b, Ly6C, Gr-1, F4/80, CD31)及び抗Hypoxyprobe抗体で多重染色した。その後、フローサイトメトリーによりがん細胞及び免疫細胞、血管内皮細胞を含む腫瘍浸潤細胞のサブセットの割合を測定した。また、組織切片標本を作製し、免疫組織染色により腫瘍内における各細胞の局在を調べた。

同時に、腫瘍組織よりUPR活性化細胞及び低酸素/通常酸素領域にある3LL細胞及びマクロファージのサブセットをセルソーターによって単離し、total RNAを精製してマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。データ解析には、KEGG、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)、Connectivity Map、NextBioなどを利用した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果 : 3LL細胞の皮下移植モデルにおいて、移植後4日目、8日目、12日目の腫瘍におけるCD31陽性細胞の割合は、腫瘍の成長にしたがって減少する。この時、Hypoxyprobeによって検出される低酸素細胞の数は増加していたが、腫瘍全体の細胞数に対する割合で考えると、増加の度合いは僅かであった。同じ腫瘍において、3LL細胞におけるUPRの活性化をレポーターアッセイ及びUPRマーカーGRP78タンパク質の発現により調べた結果、移植後4日目からUPRの活性化が認められるが、顕著なUPRの活性化が見られたのは12日目以降であった。したがって、Hypoxyprobe陽性細胞の割合の変化との間に

相関が見られなかった。

次に、腫瘍から単離した細胞をフローサイトメトリーにより解析した結果、CD45, CD11b, CD4, CD8, Gr-1, Ly6C等の表面マーカーを発現する多数の免疫細胞が腫瘍に浸潤していることがわかった。これらの腫瘍浸潤細胞の種類を明らかにするため、腫瘍内の CD45 陽性細胞（全体の約 50%）について解析した結果、CD11b 陽性 Gr-1 陽性の Myeloid-derived suppressor cells（ミエロイド由来サプレッサー細胞、MDSCs）の浸潤が最も多く（70-80%）、好中球・マクロファージが主な細胞であることが分かった。マクロファージを Ly-6C の発現によりサブセットに分けたところ、好中球及び Ly-6C 陽性の M1 型炎症性マクロファージの浸潤は 4 日目のが最も多く、その後徐々に減少した。これに比べて、Ly-6C 陰性の常在性マクロファージの割合は腫瘍の成長に伴って増加し、12 日目には炎症性マクロファージより多くなることがわかった。同時に Hypoxyprobe 陽性の CD45 陽性腫瘍浸潤細胞について解析した結果、低酸素領域では CD11b 陽性、Gr-1 陰性、F4/80 陽性細胞の数が腫瘍の成長に伴って増加していた。

がん細胞及び腫瘍浸潤細胞における低酸素領域での遺伝子発現変化を明らかにするため、それぞれの細胞をセルソーターにより単離しマイクロアレイにより解析した。その結果、がん細胞だけでなく、腫瘍浸潤マクロファージにおいても低酸素領域で UPR や低酸素応答に関連する遺伝子が活性化していることが明らかになった。低酸素領域のがん細胞においては VEGF、マクロファージにおいては IL-10、MMPs などの発現が特に亢進していたが、これらの遺伝子の発現誘導の一部は UPR 阻害剤活性をもつビグアナイド化合物により抑制されることが示された。

(2) 今後の展望：① これまでの研究から、腫瘍に浸潤するミエロイド由来サプレッサー細胞の中には強力な免疫抑制活性をもつ細胞が存在することが報告されている。本研究では 3LL 腫瘍に浸潤したミエロイド由来サプレッサー細胞で特異的に発現する遺伝子を同定しており、これらの遺伝子が、がん治療の新たな分子標的となる可能性がある。

② 本研究では、ストレス領域の検出に組織低酸素検出試薬を使用した。腫瘍の内部では低酸素と同じ場所に低グルコースや低 pH といったストレス環境も存在している。遺伝子発現解析を行う場合には、腫瘍微小環境で活性化される様々なストレス応答に関する複数のシグナル伝達経路を考慮した解析手法が必要であり、これによってストレス応答の分子基盤の全体像が解明されることを期待している。

③ 本研究で確立した組織低酸素及び UPR

の活性化を検出する手法は、腫瘍微小環境の動態を明らかにすることができる有用なツールであり、UPR を標的とした治療法の開発や評価に応用できる。前述のように、これまでに報告された UPR 制御化合物には、抗がん剤として期待されるものも数多くある。UPR を標的とした疾患治療の研究の推進が期待される。

④ 化合物の作用機序の解明は、創薬研究及びバイオマーカー開発の迅速化や臨床試験の合理化につながる。創薬におけるクリティカルパス研究として重要な取り組みであると考えている。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

(1) Sakae Saito, Aki Furuno, Junko Sakurai, Hae-Ryong Park, Kazuo Shin-Ya, Akihiro Tomida. Compound C prevents the unfolded protein response during glucose deprivation through a mechanism independent of AMPK and BMP signaling. *PLoS One*. 7(9), 2012, e45845. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0045845

(2) Masaru Ushijima, Tetsuo Mashima, Akihiro Tomida, Shingo Dan, Sakae Saito, Aki Furuno, Satomi Tsukahara, Hiroyuki Seimiya, Takao Yamori, Masaaki Matsuura. Development of a gene expression database and related analysis programs for evaluation of anticancer compounds. *Cancer Science*. 104(3), 2013, 360-368. 査読有
DOI: 10.1111/cas.12071

〔学会発表〕（計 2 件）

(1) 齋藤さかえ、芳賀直実、築茂由則、新家一男、富田章弘 グルコース飢餓環境下における小胞体ストレス応答（UPR）制御薬剤の作用機序の解析、第 15 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2011 年 6 月 22～24 日、東京

(2) 齋藤さかえ、新家一男、富田章弘 Dorsomorphin はグルコース飢餓により誘導される小胞体ストレス応答を阻害する、第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3～5 日、名古屋

5. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 さかえ (SAITO SAKAE)
京都大学・医学（系）研究科（研究院）・
研究員
研究者番号：20335491