

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870157

研究課題名(和文)がん血行性転移における肝臓環境因子の統合的理解

研究課題名(英文)A better understanding of liver environmental factors on hematogenous metastasis.

## 研究代表者

西條 栄子 (SAIJOU, Eiko)

東京大学・分子細胞生物学研究所・技術専門職員

研究者番号：60376647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓は血行性転移の高発部位として知られており、特に大腸がんの肝転移例は多い。この素過程を理解するため、大腸がん細胞株Colon26をマウス皮下に移植し、転移が成立する前の肝臓の免疫細胞を検討した。その結果、Ly6G陽性の好中球が肝臓に多量に移入していた。肝臓の遺伝子発現を定量的RT-PCRにて検討した結果、ケモカインKCの発現が有意に上昇していた。皮下にColon26を移植したマウスは、脾臓を介した肝臓への血行性転移が減少した。好中球を免疫的に除去したマウスでは、脾臓を介した肝臓への血行性転移が亢進した。したがって、肝臓転移に対して、好中球は抑制的に働くことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Liver is known as frequently hematogenous metastatic organ. To perform a detailed analysis of liver immune cells, colon cancer cell line Colon26 was transplanted subcutaneously into Balb/c mice. As a result of this transplantation, Ly6G positive neutrophil migration was observed prior to liver metastasis of cancer cells. A quantitative RT-PCR experiment shows that significant over expression of chemokine KC in the liver. Liver metastasis was reduced by subcutaneous cancer transplant by using via spleen metastasis model. Immuno-depletion of neutrophil significantly enhances liver metastasis by using via spleen metastasis model. These results indicate that neutrophil plays inhibitory role on colon cancer liver metastasis.

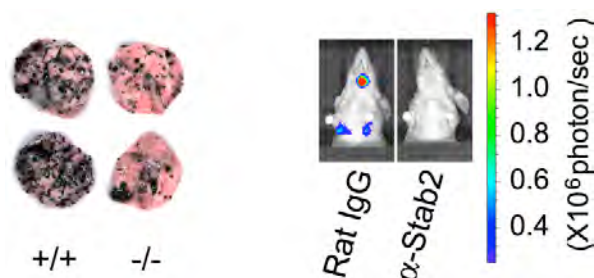
研究分野：疾患生物学

キーワード：転移

### 1. 研究開始当初の背景

生体の化学工場である肝臓は、血管を介して様々な臓器／組織につながっており、他の組織で発生したがん細胞が流入しうるために、血行性転移の主要な標的臓器である。とりわけ、消化管からの血液が門脈を経由して絶えず流入しているため、大腸で生じたがんの10-30%は肝臓に転移する。肝臓の脈管構造である類洞は、通常の血管と異なり基底膜を持っていないため、転移の障壁が少なく血管外遊走が容易である。さらに、肝臓は免疫寛容臓器であるため、転移が成立しやすいと考えられている。

がんの転移は原発巣から遊走したがん細胞が他の臓器で接着、浸潤、生着することで完了する。そのため、がん細胞の血管内皮細胞への付着は重要な過程である。申請者らは、多糖類の一種ヒアルロン酸(HA)によるがんの転移抑制効果を示してきた(PNAS 2012; Hirose, Saijou et al.). HAはがん細胞と血管内皮細胞との接着に関与することが知られるが、そのスカベンジャー受容体である Stabilin-2(Stab2)は、肝類洞内皮細胞で特異的に発現し、血中 HA を除去する最も主要な受容体として機能している。Stab2 欠損マウスでは、血中の HA 濃度が野生型の約 60 倍にも達しており、B16 黒色腫の肺への転移が著しく減少することを見出した(図 1 左)。また、Stab2 阻害抗体の投与によっても、血中 HA レベルが上昇し、SCID マウスに移植したヒト乳がん細胞の自発的肺転移が著しく減少した(図 1 右)。



《図 1 Stab2 阻害によるガン細胞の転移抑制。(左) Stab2 遺伝子欠損による肺での B16 黒色腫結節の減少。(右) Stab2 阻害

抗体投与によるヒト乳癌 MDA-MB-231 細胞の自発的転移の抑制。》

このように、血中 HA が激増することにより、がん細胞あるいは血管内皮細胞はマスクされ、がん細胞の内皮細胞への接着と肺への転移が抑制されることが示された。これらの結果は、肝臓の特定の機能ががんの転移に大きな影響を与えることを初めて明確に示したものである。この HA を介したがん細胞と内皮細胞との接着過程は、肝臓への転移においても Stab2 を介して行なわれている可能性が高い。そこで本研究では、まず確立された大腸がんの肝転移モデルを使用し、Stab2 機能の肝転移に対する作用を検証することとした。一方、肝臓は、門脈経由で消化管から大量の外来物質が流入するために、自然免疫における前線基地でもある。肝臓は、外来物質に対するフィルターとしての機能を果たす一方で免疫応答を適度に抑制している。また、内皮細胞とともに類洞を構成する星細胞は制御性 T 細胞(CD4+, CD25+, FoxP3+)を増殖させ、免疫抑制作用を示すことなども知られている。このような肝臓特有の免疫寛容機構ががんの浸潤後の生着に重要な役割を担っているものと考えられる。

### 2. 研究の目的

転移はがんの予後を著しく不良にするため、転移の素過程を理解することは転移の予防法を開発する上で重要である。肝臓は血行性転移の高発部位として知られており、特に大腸がんの肝転移例は多い。その理由としては、肝臓特有の血管系である類洞は基底膜を持たず、がん細胞の浸潤を容易にしている点や、肝臓は免疫寛容臓器であるため、転移が成立しやすい点などが挙げられる。しかし、その詳細なメカニズムについてはよく分かっていない。本研究では、

転移を許容する肝臓の特徴的な構成細胞に焦点を当て、肝転移におけるそれらの役割およびがん細胞の浸潤過程を肝転移モデルマウスにより解析する。がん細胞の接着に関しては類洞内皮細胞を、浸潤後の生着に関してはがん細胞から放出されるエクソソームの免疫細胞群に対する作用を中心に解析し、肝臓への転移の素過程を解明することを目指す。

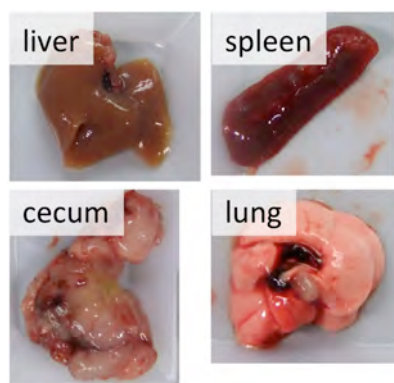
### 3. 研究の方法

マウスを用いて、脾臓に注入した大腸がんの肝臓への転移モデル系を導入し、肝類洞壁細胞および免疫系細胞の肝転移への関与を解析する。当研究室では、肝疾患モデルマウスの解析を積極的に行っており、類洞細胞、免疫細胞群をセルソーターにより分離、解析する手法を確立している。本研究計画では、各細胞を細胞膜抗原の発現により厳密に分画し、肝臓の病態における動態を検討する。次に、がん細胞の放出する全身性の因子が転移先の免疫環境を変化させている可能性を考え、自発的大腸がん肝転移モデルによく使用されるColon26細胞株が放出するエクソソームの精製とその分析を行う。その上で、各細胞種が増加・減少する病態モデル、あるいは肝臓でのサトカイン・miRNAの強制発現などの条件を設定し、がん細胞の転移を評価して、がん転移との関連を探る。さらに、それらの細胞を薬剤あるいは遺伝的に除去、または分離して移植することで、がん細胞の転移に対する作用をより直接的に検証する。

### 4. 研究成果

#### 肝転移モデルの導入

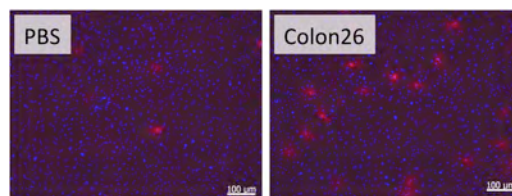
手技的に簡易で短期間に評価が可能なマウスの肝転移系を導入した。当初、C57BL6系統のマウスの脾臓に同系統の大腸がん細胞 CMT93 を注入し肝臓への転移を評価したが、試した全ての Dose で肝臓への転移が見られなかった。そこで、BALB/c 系統のマウスに同系統の大腸がん細胞 Colon26 を移植したところ、転移が確認されたため、以降、Colon26 株を用いて評価を行った。



《図 2 盲腸移植。移植後 4 週目で各臓器に転移が見られた。》

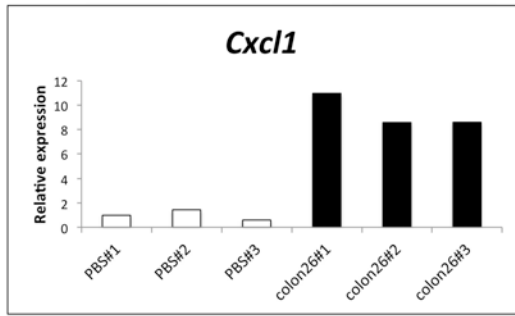
#### 前転移モデルの構築

がんの転移が起きる前には、すでに転移先組織中で免疫細胞の変化が生じている可能性が考えられる。そこで、BALB/c マウス皮下に Colon26 細胞を移植し、この担がんマウスを前転移モデルとした。肝臓中の免疫細胞画分を免疫染色にて検討した結果、Ly6G 陽性で表される好中球が著しく増加していた。



《図 3 Colon26 皮下移植 10 日後の肝臓好中球。Ly6G 陽性細胞が赤、核が青色で表されている。》

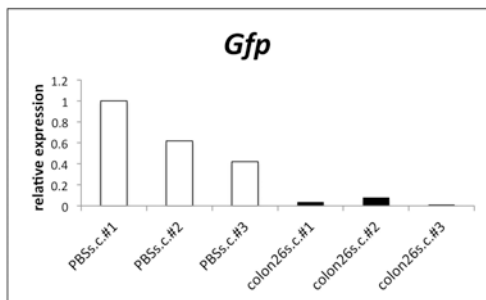
次に、好中球増加の原因を探るため、好中球誘引性のケモカイン類の遺伝子発現を定量的 qPCR で検討した。その結果、担がんマウスの肝臓では PBS コントロールと比較して、Cxcl1 遺伝子の発現が増加していた。



《図4 肝臓 total RNA からの定量的 RT-PCR。Colon26 皮下移植により、Cxcl1 の遺伝子発現量が増加している。》

#### 好中球増加の生理的な意義

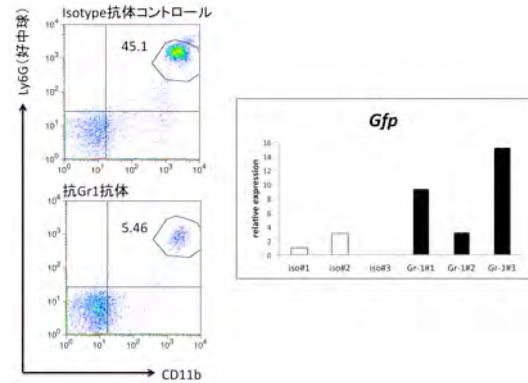
肝臓内での好中球増加が大腸がん肝転移に与える影響を調べるために、次に、担がんモデルマウスの脾臓に Colon26 細胞株を注入し、転移を模倣した。その結果、PBS コントロールと比較して、担がんモデルマウスの肝臓では、転移したがん細胞が減少していた。



《図5 肝臓 total RNA からの定量的 RT-PCR。Gfp は Colon26 細胞の量を表す。皮下に Colon26 細胞を担がんすることにより、脾臓から肝臓への転移が減少する。》

したがって、担がんによって増加した肝臓内の好中球は、大腸がんの転移を負に調節することが示された。好中球による転移の負の調節能を確認するため、転移模倣実験

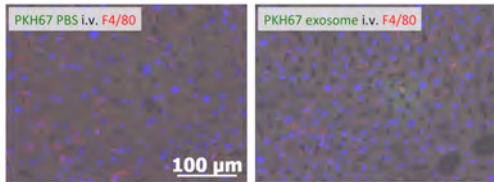
において、Gr-1 抗体を用いた好中球除去を行った。その結果、アイソタイプコントロールと比較して、肝臓内好中球の著しい減少と、転移したがんの増加が観察された。



《図6 好中球除去による担がんの転移抑制のキャンセル。(左) 皮下移植後 14 日目の肝臓血球画分の FACS 解析 (右) 移植後 17 日目の肝臓 total RNA からの定量的 RT-PCR。》

#### 好中球増加の分子機構

肝臓内の好中球増加は、皮下に移植した Colon26 大腸がんによって引き起こされる。したがって、がんから何らかの因子が分泌され、肝臓まで到達することにより、免疫細胞画分を変化させていることが予想される。この因子の候補として、エクソソームがある。エクソソームはほとんどの細胞が分泌する膜小胞であり、内部には miRNA やたんぱく質が含まれる。膜に閉じ込められた miRNA などの小分子は、遠隔部位まで到達できるため、異なる組織において遺伝子発現調節を行う能力を持つ。そこで、Colon26 からエクソソームを精製し、PKH-67 でラベルしたのちに、マウスに静脈投与した。その結果、マウス肝臓にエクソソームが到達していることが確認された。



《図7 がん由来のエクソソームは肝臓に到達する。精製したエクソソームをPKH67でラベルし、尾静脈から注入し、24時間後にサンプリングを行った。》

今後は、このエクソソームに含まれるエフェクター分子を同定するとともに、肝臓におけるエクソソームの直接の標的細胞を同定し、転移抑制の詳細な分子機構を明らかにしていく。

#### 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)

[学会発表] (計3件)

(1) 発表者名 Eiko SAIJOU, Michitaka MATSUDA, Yutaka ENOMOTO, Minoru TANAKA, Atsushi MIYAJIMA (西條栄子、松田道隆、榎本豊、田中稔、宮島篤)

演題 Role of liver M2-like cells in liver fibrosis

学会 第20回 肝細胞研究会

発表日 2013年9月27日

場所 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

(2) 発表者名 Eiko SAIJOU, Michitaka MATSUDA, Yutaka ENOMOTO, Minoru TANAKA, Atsushi MIYAJIMA (西條栄子、松田道隆、榎本豊、田中稔、宮島篤)

演題 Role of liver M2-like macrophages in liver fibrosis

学会 第87回 日本生化学会大会

発表日 2014年10月18日

場所 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 (京都府・京都市)

(3) 発表者名 西條栄子、松田道隆、榎本豊、田中稔、宮島篤

演題 マウス肝線維化における好中球の役割

学会 第29回 肝類洞壁細胞研究会学術集会

発表日 2015年10月31日

場所 秋田市にぎわい交流館 AU (秋田県・秋田市)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

西條 栄子 (SAIJOU EIKO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・技術専門

職員

研究者番号：60376647