

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830070

研究課題名(和文) 癌微小環境における腫瘍関連マクロファージの生体機能イメージング

研究課題名(英文) Functional intravital imaging of tumor-associated macrophages in tumor microenvironment

研究代表者

上岡 裕治 (KAMIOKA, Yuji)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：50511424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：癌微小環境は癌細胞と間質細胞との複雑な相互作用によって生まれる。本研究課題では二光子励起顕微鏡を用いた生体FRETイメージングによって、マウスモデルで再現した癌微小環境における細胞動態・分子活性を調べた。当初、腫瘍関連マクロファージに注目して研究を開始した。しかし、今回のマウスモデルではマクロファージよりも好中球が癌細胞と強く関わっていたため、研究対象を好中球に変更した。in vitro、in vivoの実験結果から、4T1マウス乳がん細胞から分泌されるオステオポンチンが癌細胞凝集を惹起し、その後のERK活性上昇を伴う好中球凝集と好中球細胞死が癌細胞転移を促進していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Tumor microenvironment (TME) consists of complex interactions between tumor cells and stroma cells. In this project, cellular behaviors and activity of ERK in TME of tumor-bearing mice were investigated by intravital Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) imaging with two-photon excitation microscope. Initially, we focused on tumor associated macrophages (TAM) in TME, however, neutrophils in TME showed more important relationship with tumor cells than TAM in our model. Our results showed that osteopontin secreted from 4T1 mouse breast tumor cell induced cell aggregation followed by ERK activation in neutrophils and neutrophil-specific cell death NETosis. In agreement with previous reports, NETosis inhibitor DNase I inhibited lung metastasis of 4T1 cells. These observations suggest that osteopontin promotes metastasis of 4T1 cells by activating neutrophils and inducing NETosis.

研究分野：細胞生物学、イメージング

キーワード：生体蛍光イメージング FRET 癌微小環境 好中球 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

申請者の所属する研究室では、FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer: 蛍光共鳴エネルギー移動) を利用した活性モニター分子(以下、FRET バイオセンサー)を数多く作製し、シグナル伝達分子の活性変化を可視化することに成功してきた。

ところが、FRET バイオセンサーを細胞内で恒常的に発現させる場合、蛍光タンパク質遺伝子間の相同組換え反応やサイレンシングなどの問題が起こることがわかった。そのため、FRET バイオセンサーを発現する遺伝子組換えマウス(以下、FRET マウス)の作出は長い間成功していなかった。

しかし近年、申請者らは Tol2 トランスポゾンを利用した遺伝子導入法により先述の技術的問題を解決し、FRET マウスを作出することに成功した。さらに二光子顕微鏡を用いた生体イメージングの技術開発により、炎症環境下での好中球の動態とキナーゼ活性変化を撮影することに成功し、生体イメージングによる多次元生命システム解析のための研究基盤は整ってきた。

癌の悪性化過程(増殖・浸潤・転移)において、癌細胞は「癌微小環境」と呼ばれる癌に優位な「場」を形成することが知られている。癌微小環境は癌細胞と間質細胞との複雑な相互作用によって生まれ、またダイナミックに変化し続けている。したがって、癌悪性化の分子メカニズムを解明するためには、癌微小環境をそのまま解析する必要があり、生体内の細胞動態、分子活性を直接イメージングする以外に術はない。また生体の三次元組織をイメージングすることで得られる膨大な多次元データを解析し、癌微小環境における各因子(癌細胞、間質細胞、細胞外基質、サイトカインなど)を動的な「生命システム」として理解する必要がある。

2. 研究の目的

体内で癌微小環境を構成する因子(細胞、サイトカイン)は非常に多種多様である。そこで本研究ではまず、腫瘍関連マクロファージ(TAM)と癌細胞との相互作用に注目する(図1)。

免疫細胞は本来、外来異物や癌細胞などを排除する役割を担っている。しかし近年、マクロファージの一部は腫瘍関連マクロファージ(TAM)と呼ばれ、癌の悪性化に関与することが示唆されている。TAM への分化誘導機序に関しては種々のサイトカインの関与が *in vitro* において報告されているが、*in vivo* での詳細な TAM の分化誘導機序および TAM の細胞動態は未だ不明である。本研究では、癌微小環境中を構成するさまざまな細胞の中でも、未だに不明な点が多

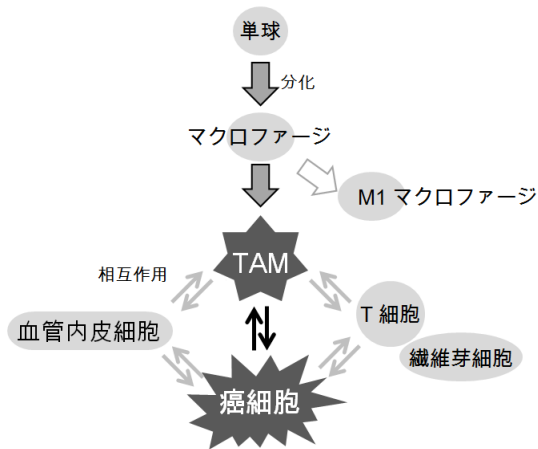


図1 癌微小環境を構成する各種細胞と細胞間相互作用 本研究課題の対象を濃い色(白抜き文字)で示した。

い腫瘍関連マクロファージ(Tumor-Associated Macrophage, TAM)に注目し、生体イメージングと多次元データの半自動解析によって TAM の分化誘導(発生)機序と TAM の生体内での動態を明らかにするため、3. 研究の方法に記載した研究課題に取り組んだ。

3. 研究の方法

(i) 単球・マクロファージから TAM への分化過程において、細胞増殖・分化を司るシグナル伝達分子 ERK および PKA の活性変化を生体イメージングする。

(ii) TAM の生体内動態と共に、細胞運動を制御する低分子量 G タンパク質 Rhoファミリー(RhoA, Rac1, Cdc42)の活性変化、および ERK, PKA の活性変化を可視化する。

(iii) 上述の(i)、(ii)で ERK, PKA および低分子量 G タンパク質の活性変化をもたらす因子(サイトカイン、細胞間相互作用)を特定する。

生体イメージングで得られるデータは多次元データ(三次元空間での多色タイムラプスデータ)であるため、解析を半自動化させるプログラムを作成し、解析の高速化を計る。

将来的にはこの多次元データを元に癌微小環境の生体システムシミュレーションができるように、T細胞や繊維芽細胞などの他因子からのデータ収集を目指す。

4. 研究成果

平成26年度

FRET マウス骨髄から回収した単球前駆細胞をレシピエントマウスに移植し、マクロファージの生体内 FRET イメージングを行った。レシピエントマウス(BALB/c または C57BL/6)にはマウス乳がん細胞(4T1)、また

は Lewis 肺がん細胞(3LL)を移植(担癌)し、担癌部周囲または転移巣を観察した。また、マウスを生きたまま観察するために、Imaging window を設計し、観察系を立ち上げた。マクロファージが癌細胞周囲に集まっている様子を数日間連続してイメージングすることに成功した。また薬剤によるマクロファージの depletion を行うことで、癌にも影響を及ぼすことを確認した。

当初の予定では、単球前駆細胞を M1 または M2 マクロファージ (TAM-like) に予め *in vitro* で分化させてから移植に用いる予定であったが、M1、M2 という分類自体がもはや時代遅れという情報を複数の情報源から入手したため、この分類にはこだわらず、癌細胞との相互作用や運動性の違いに注目することにした。

また、画像データから生体由来の自家蛍光物質を除くプログラムなどを作成した。*In vitro* でのマクロファージ分化とイメージングも行った。

平成 27 年度

単球・マクロファージ特異的に Cre recombinase を発現する LysM-Cre マウスと FRET マウスを交配させ、単球・マクロファージの生体イメージングを行う予定であったが、マウスの入手が遅れた。そこで、並行していたマウス骨髄移植モデルで主に、顆粒球 (Ly6G 陽性) と単球 (F4/80 陽性) の細胞動態ならびに細胞内 ERK 活性を測定することができた。また、癌細胞の肺転移を二光子顕微鏡観察できる系を立ち上げた (図 2、図 3)。



図 2 麻酔状態のマウス生体肺を観察できるシステム (一部)

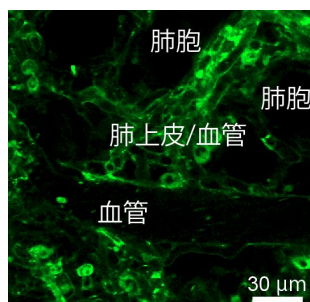


図 3 マウス生体肺の蛍光画像

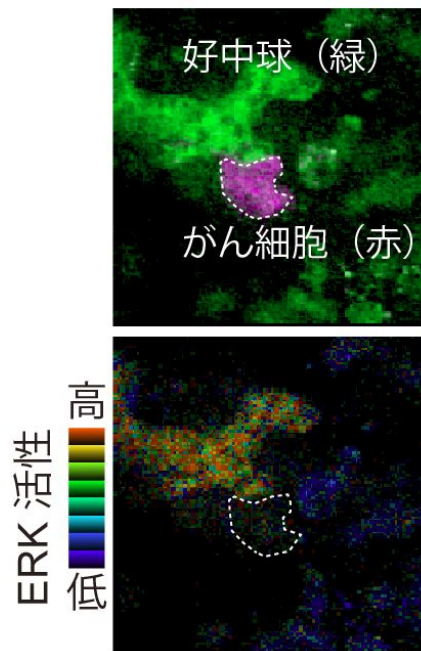


図 4 がん細胞周囲の好中球凝集と ERK の活性化

乳がん細胞 4T1 の担癌マウス肺では顆粒球 (好中球) の細胞数増加と ERK 活性の上昇が認められた (図 4)。特に、顆粒球 (好中球) での ERK 活性が癌転移に重要であることがわかってきたため、抗体アレイを用いて 4T1 がん細胞から分泌される因子の特定を進めた。4T1 から分泌されるサイトカイン、ケモカインの中でもオステオポンチンに注目し、オステオポンチン欠損株を作成して実験を進めたところ、がん細胞凝集にオステオポンチンが関与することがわかった。

平成 28 年度

マウス乳がん 4T1 細胞を用いた生体肺イメージングでは当初予定していたマクロファージ (TAM) よりも、腫瘍関連好中球 (Tumor-associated Neutrophil, TAN) のほうが観察できる細胞数が多いこと、がん細胞から分泌される因子の影響を強く受けていることなどから、TAN に焦点を移して解析を進めた。

in vitro, in vivo の実験結果から、4T1 乳がん細胞はオステオポンチン依存的に細胞凝集塊を作ることがわかり、癌細胞凝集塊に好中球が集まる過程で好中球の ERK 活性が上昇することがわかった。この好中球での ERK 活性化の後、好中球は好中球特異的な細胞死 NETosis を行うことで、癌細胞の転移を促進することがわかった (図 5)。

これまでの成果をまとめ、Cancer Science に論文として発表した。

本研究課題当初の計画からは研究対象が少し変わってしまったが、好中球細胞死が癌細胞転移を促進する可能性を見出した。

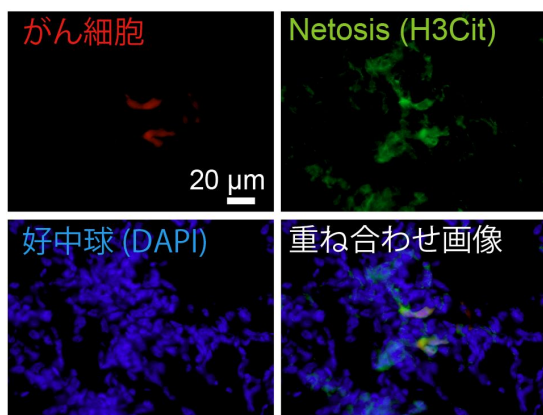


図5 がん細胞の周囲で見られた好中球細胞死 (NETosis)

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6件)

Yuji Kamioka, Kanako Takakura, Kenta Sumiyama, Michiyuki Matsuda
Intravital Förster resonance energy transfer imaging reveals osteopontin mediated polymorphonuclear leukocyte activation by tumor cell emboli
Cancer Sci. 108(2): 226-235 (2017).
DOI: 10.1111/cas.13132 査読あり

Saori Takaoka, Yuji Kamioka, Kanako Takakura, Ai Baba, Hiroaki Shime, Tsukasa Seya, Michiyuki Matsuda
Live imaging of transforming growth factor- activated kinase 1 activation in Lewis lung carcinoma 3LL cells implanted into syngeneic mice and treated with polyinosinic:polycytidylic acid.
Cancer Sci. 107(5):644-52 (2016)
DOI: 10.1111/cas.12923. 査読あり

〔学会発表〕(計2件)

第73回 日本癌学会学術総会
2014年9月27日
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
癌転移と血管新生の生体 FRET イメージング
上岡裕治、山内文生、松田道行

第24回 日本がん転移学会学術集会
2015年7月23日
シティプラザ大阪(大阪府大阪市)
二光子励起顕微鏡を用いた癌微小環境の分子活性イメージング
上岡裕治

〔図書〕(計1件)

がんの分子イメージング(浦野泰照 編 化学同人 2015年)18章 がん細胞シグナルの in vivo イメージング
上岡裕治・松田道行

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等
京都大学大学院 医学研究科 病態生物医学講座

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/fret/>

関西医科大学 附属生命医学研究所 分子遺伝学部門

<http://www3.kmu.ac.jp/molgent/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

上岡 裕治 (KAMIOKA Yuji)
京都大学・大学院医学研究科・特定助教

平成28年度より

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号: 50511424