

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20820

研究課題名（和文）Osteoprotegerin欠損による大腸癌肝転移の分子機序の解明

研究課題名（英文）.

研究代表者

岡本 拓也（Okamoto, Takuya）

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：20782915

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：骨代謝を調整する因子Osteoprotegerin(OPG)の、大腸癌肝転移巣の腫瘍微小環境での機能を解析した。TCGAを用いた解析では大腸癌におけるOPG発現低下と予後が相関することが分かった。当院の大腸癌患者の免疫染色を用いた解析では、大腸癌原発巣でOPGが低発現を来している群で有意に肝転移が多く、原発巣でOPGが高発現のものでも肝転移巣ではOPG低発現となっているものが多く、OPG発現低下が肝転移の原因となっている可能性が示唆された。大腸癌肝転移マウスモデルを作成し、OPG低発現株は高発現株より肝転移を来しやすく、またその肝転移は抗RANKL抗体で抑制できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人の半数が癌に罹患し、死亡の1/3が癌死と言われる時代において、癌の新規治療法の開発は社会的意義が大きい。しかし、新規抗がん剤開発には膨大な投資が必要となり、その結果新規抗がん剤は高価なものとなる。そのため既に臨床使用されている既存の薬剤の適応応用(drug repositioning)も、新規治療法開発の観点では重要となる。本研究では骨転移の治療薬として既に広く臨床使用されている抗RANKL抗体が大腸癌肝転移のなかでもOPG低発現大腸癌においては有効となる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the function of Osteoprotegerin (OPG) in the tumor microenvironment of colorectal cancer liver metastases. TCGA public database revealed a correlation between low OPG expression and poor prognosis in colorectal cancer. The analysis using immunohistochemistry of our colorectal cancer patients showed that liver metastasis was significantly frequent in the group with low OPG in primary colorectal cancer, and that OPG depletion in liver metastasis was observed in many patients with high OPG in primary colorectal cancer, suggesting that low OPG may be a cause of liver metastasis. We generated a mouse model of colorectal cancer liver metastasis and found that the low OPG-expressing cells were more prone to liver metastasis than the high OPG-expressing cells, and that the liver metastasis was suppressed by anti-RANKL antibody in the low OPG-expressing cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 腫瘍微小環境

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は日本人の癌死でも上位の癌種である。原発に留まっているうちは治癒切除可能なことがほとんどだが、一度遠隔転移を来すと致命的となる。大腸癌は肝転移が最も頻度の高い遠隔転移であるが、その機序は不明なことが多い。大腸癌は遺伝子発現プロファイルを基に、consensus molecular subtype (CMS)として4つのサブタイプに分類されることが知られているが、CMS1 (Microsatellite instability-high, MSI型)とCMS4(間質型)といった、腫瘍微小環境の間質反応が強い型が、CMS2(従来型)やCMS3(代謝型)といった癌細胞そのものの変化の強いものよりも予後が悪いことが報告されている。免疫チェックポイント阻害剤(Immune checkpoint inhibitor, ICI)の登場によりCMS1は長期生存も見込めるようになったが、CMS4はICI不応性で、依然としてまだ有効な治療方法は確立されていない。申請者は腫瘍微小環境における腫瘍-間質細胞応答に着目し、転移形成を来す予後不良因子を同定することで新たな大腸癌肝転移治療方法を模索できないか検討した。

2. 研究の目的

Osteoprotegerin (OPG)はRANKLのデコイ受容体として作用し、おもに破骨細胞のRANKL-RANKシグナリングを調整し骨代謝に重要な役割を果たすことが知られており、癌治療においては、RANKLの中和抗体(OPGと同じ作用をする)が骨転移の際の骨関連有害事象軽減のために使用される。OPGの骨以外での大腸癌腫瘍微小環境における機能は知られておらず、本研究では腫瘍微小環境中のOPG機能解明を試みた。また、抗RANKL抗体のdrug repositioningの可能性を探索した。

3. 研究の方法

大規模公共データベースTCGAを用いて、大腸癌におけるOPG発現と予後との相関をin silicoで解析した。

当科における大腸癌切除標本(原発巣、肝転移巣)をOPGで免疫染色し、予後を含めた患者背景を検討した。

大腸癌細胞株HCT116、SW480、MC38、CMT93において、OPG高発現株と低発現株を樹立し、in vitroで細胞増殖能力や遊走能を評価した。

これらの細胞株を用いて大腸癌肝転移モデルを作成し、腫瘍増大能を評価した。また抗RANKL抗体を投与し、その腫瘍増大抑制効果を評価した。

4. 研究成果

大規模公共データベースTCGAで、大腸癌のコHORT COADREADにおいて、OPG発現の高値と低値二軍に分けて予後を検討すると、5年生存率はKaplan-Meierによるlog-rank検定ではOPG低値の群で有意に悪かった。

当科における大腸癌患者の切除標本をOPGで免疫染色し検討した。正常大腸上皮は比較的OPG発現は保たれていたが、大腸癌細胞ではOPG発現が低下している症例が多かった。

また、Stage I-IIIの患者において、OPG発現低下が有意にrelapse-free survival (RFS)に関係していた。さらに肝転移巣と原発巣とのOPG免疫染色の比較において、肝転移巣でOPG発現が低下していた。また、原発巣ではOPG発現が保たれている症例でも肝転移巣でOPG発現が低下している症例があり(逆の症例は認めなかった)、OPGの発現低下が肝転

移に寄与する可能性が示唆された。

大腸癌細胞株 HCT116、SW480、MC38、CMT93 を用いて、OPG 発現の低い HCT116、MC38 には OPG の過剰発現を、OPG 発現の低い SW480、CMT93 には OPG のノックアウトを行い、それぞれの細胞株において OPG 低発現株と高発現株を作成した。細胞増殖アッセイでは OPG 発現の高低にかかわらず増殖速度に変化なく、wound healing assay でも同様に OPG 発現の高低で変化を認めなかった。つまり OPG 発現は癌細胞への直接的な作用は in vitro では明らかなものは同定できなかった。次に OPG の RANKL デコイ受容体という性質を考え、RANKL-RANK シグナルが重要となるマクロファージに注目した。THP-1 細胞株をマクロファージに分化させた dTHP-1 細胞株を用いて、Transwell migration assay を行った。dTHP-1 の migration は OPG 高発現株と共培養した時に有意に抑制された、OPG は腫瘍微小環境でマクロファージの遊走能を抑制している可能性が示された。再び臨床サンプルに戻ってマクロファージを免疫染色すると、OPG 高発現大腸癌では低発現大腸癌と比較して macrophage の集簇が低値であった。

作成した大腸癌細胞株をマウスに移植し、大腸癌肝転移モデルを作成した。HCT116 細胞株をヌードマウスに肝転移させて異種移植肝転移モデルを作成し、肝転移を評価したところ、OPG 高発現では低発現に比べて転移が抑制される傾向にあったものの、有意ではなかった。次にマウス MC38 細胞株を用いて同種移植肝転移モデルを作成したところ、OPG 高発現では低発現に比べて有意に肝転移が抑制された。腫瘍組織を病理学的に評価すると、OPG 低発現の腫瘍では周囲にマクロファージが集積しているのに対して OPG 高発現の腫瘍では周囲に CD8 陽性 T 細胞が集積しており、OPG が腫瘍微小環境中のマクロファージの集積を抑制し、CD8 陽性細胞を誘導することで抗腫瘍免疫が活性化されていることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1 . 著者名 Hirata Wataru, Itatani Yoshio, Masui Hideyuki, Kawada Kenji, Mizuno Rei, Yamamoto Takamasa, Okamoto Takuya, Ogawa Ryotaro, Inamoto Susumu, Maekawa Hisatsugu, Okamura Ryosuke, Kiyasu Yoshiyuki, Hanada Keita, Okamoto Michio, Nishikawa Yasuyo, Sugimoto Naoko, Tamura Takuya, Hatano Etsuro, Sakai Yoshiharu, Obama Kazutaka	4 . 巻 13
2 . 論文標題 Downregulation of osteoprotegerin in colorectal cancer cells promotes liver metastasis via activating tumor-associated macrophage	5 . 発行年 2023年
3 . 雑誌名 Scientific Reports	6 . 最初と最後の頁 22217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-49312-w	査読の有無 無
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
---------	---------