

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830068

研究課題名(和文) がん-間質間相互作用検出技術を用いた腫瘍微小環境形成メカニズムの解明

研究課題名(英文) Sequencing-based analysis of tumor-stromal interactions

## 研究代表者

砂河 孝行 (Isagawa, Takayuki)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：40418637

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌の発症・進展には炎症細胞や血管細胞、線維芽細胞などにより形成される腫瘍間質が重要な役割を果たしている。本研究では、複数細胞により構成される腫瘍組織内の細胞間相互作用を解析する手法(がん間質インタラクトーム)により膵臓癌移植モデルを解析し、癌細胞から間質への新規シグナル経路としてWNTシグナル経路を同定した。さらに、WNTシグナル経路の活性化はマクロファージの炎症応答を抑制すること、その抑制メカニズムは、NF- $\kappa$ Bシグナル経路の抑制を介していることを見出した。以上のことから、がん細胞由来WNTシグナルによる免疫細胞活性化制御機構が、癌組織における免疫寛容を誘導している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is well known that tumor stroma is composed of inflammatory, vascular and fibroblastic cells and has a pivotal role in cancer development and progression. In this study, we analyzed a xenograft model of pancreatic carcinoma using the tumor-stroma interactome, a method for analyzing cell interactions in the tumor tissue (which is composed of various cells), and identified WNT signal pathway as a novel signal pathway acting from the tumor to the stroma. Furthermore, we revealed that activation of the WNT signal pathway suppressed the inflammatory response of macrophages through the suppression of the NF $\kappa$ B pathway. These results suggest the possibility that the immune-regulatory mechanism mediated by WNT signaling of tumor cells induces immunological tolerance in tumor tissue.

研究分野：分子生物学

キーワード：腫瘍間質 マクロファージ WNT NF $\kappa$ B

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織は、免疫細胞のほか、血管やリンパ管を構成する細胞、線維芽細胞など多様な細胞により構成されている。これら腫瘍細胞を除く細胞は間質細胞と言われ腫瘍微小環境を構築している。これまで腫瘍悪化における微小環境の役割は良くわかっていなかったが近年、マクロファージをはじめとする免疫細胞や線維芽細胞が癌の浸潤や転移に寄与していることが示されてきた。癌間質繊維芽細胞は、腫瘍組織を構築するだけでなく、癌の進展を誘導することが知られている。実際、癌細胞株と線維芽細胞の共培養、もしくはマウスに共移植することで癌細胞株の増殖や腫瘍の亢進が引き起こされることが報告されている (Cell. 2005 May 6;121(3):335-48. Cancer Res. 1999 Oct 1;59(19):5002-11.). また、腫瘍間質の造成は、癌細胞への抗癌剤の到達を妨げ、その効果を減弱させることも知られており、既存の抗がん剤に加えて間質の増殖阻害を組み合わせることにより奏功することも報告されている (J Clin Invest. 2006 Jul;116(7):1955-62. Science. 2009 Jun 12;324(5933):1457-61.). その為、腫瘍間質は、新たな治療標的として注目されている。

2. 研究の目的

癌の発症・進展には炎症細胞や血管細胞、線維芽細胞などにより形成される腫瘍間質が重要な役割を果たしている。また、これら腫瘍間質は癌細胞によって積極的に構築され、癌の進展を促進させることが知られている。我々は、これまで包括的および定量的に評価することの難しかった複数の細胞によって構成される腫瘍組織内の細胞間相互作用を解析する手法を開発している。この手法を用いることによりがん-間質間相互作用における抗体医薬等により介入可能な新たな相互作用の探索と癌間質形成における分子機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

我々は、これまで包括的および定量的に評価することの難しかった複数細胞により構成される腫瘍組織内の細胞間相互作用を解析する手法を開発していた(がん-間質インタラクトーム)。この手法は、担癌動物モデルより抽出した腫瘍組織のトランスクリプトームデータを取得後、ヒト由来、マウス由来の配列に振り分けることでヒト由来である癌細胞とマウス由来である間質の遺伝子発現プロファイルを構築したのち、既存の相互作用データベースと組み合わせることにより、細胞間で相互作用しているシグナル経路を同定する手法である。この手法を用いることで新たながん-間相互作用を検出することが可能である。この手法を用いて複数の癌細胞株を用いた担癌動物モデルについてインタラクトーム解析を行い、癌細胞株及び癌種に特異的もしくは普遍的な相互作用の抽出を行い、癌間質形成メカニズムの解明と新

たな治療標的としての可能性を探る。

4. 研究成果

がん-間質間相互作用の取得を目的に膀胱癌を用いて担癌モデルマウスの作成を行った。得られたモデルマウスより腫瘍を摘出し、がん-間質間における相互作用を包括的に解析するためにインタラクトーム解析を行った(図 1a)。その結果、既に報告のある腫瘍から間質へのシグナルとして VEGFA-FLT1 の相互作用が検出され、その他にも数百の相互作用が検出された。これらの中でより相互依存性の高い相互作用を検討したところ WNT7B、WNT10A を同定した(図 1b)。これら 2 遺伝子の発現は癌細胞でのみ発現が見られ、間質細胞における発現は認められなかった(図 1c)。

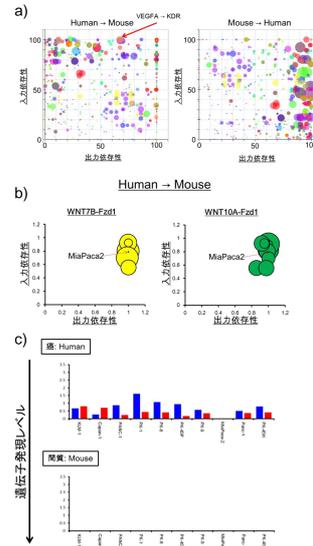


Fig.1. 膀胱がん細胞株Xenograftモデルを用いたがん-間質間相互作用の包括的解析

これまで、繊維芽細胞の活性化に伴う組織線維化での WNT シグナル経路の重要性についての知見は多く報告されていたが免疫細胞におけるその意義については不明であった。そこで、炎症における主要なエフェクター細胞であるマクロファージ炎症応答におけるそ

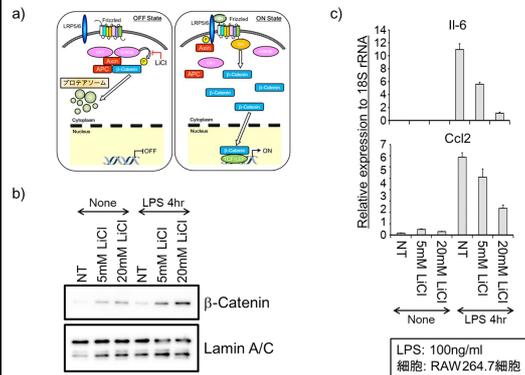


Fig.2 WNTシグナル活性化は炎症応答を抑制する

の意義を検討するために WNT シグナルの活性化誘導剤である LiCl をマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞に処理することで検討を行った。WNT シグナルは、リガンドであ

る WNT が受容体に結合すると細胞内で分解されているβ-Catenin が安定化・蓄積し、核に移行することでサイクリン D などの増殖関連遺伝子の発現を誘導する。LiCl はβ-Catenin の分解を制御するリン酸化酵素 GSK3β を阻害することで WNT シグナルを活性化することが知られている(図 2a,b)。そこで、LiCl により WNT シグナルを活性化した RAW264.7 細胞に LPS による刺激を行うことで炎症応答に対する WNT シグナルの効果を検討した。その結果、WNT シグナル活性化は炎症応答により誘導される Il-6 及び Ccl2 といった炎症性のサイトカインやケモカインの発現誘導を抑制

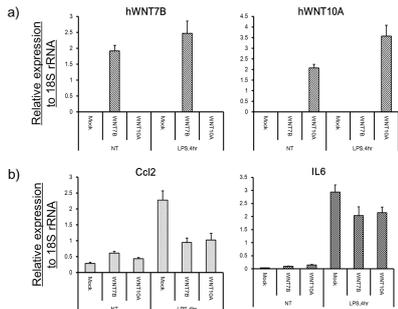


Fig.3. WNT7B及び10Aはマクロファージにおける炎症応答を抑制する

ることが明らかとなった(図 2c)。さらに、初代細胞であるマウス腹腔マクロファージについても検討したところ同様の抑制効果が得られた。そこで、今回同定した WNT7B 及び 10A が同様に炎症応答を抑制するかどうかを確認するために Human WNT7B 及び 10A を RAW264.7 細胞に過剰発現することにより、LPS による活性化への影響を定量 PCR により評価した(図 3a)。その結果、LiCl 同様に WNT7B 及び 10A の強制発現は LPS による炎症性活性化を抑制することが示された(図 3b)。次に、WNT シグナルは、その下流でβ-Catenin による標的遺伝子の転写を誘導するが、マクロファージ炎症性活性化に対する抑制効果が転写を介するかどうかについて検討を行った。β-Catenin の阻害剤である iCRT5 は、古典的

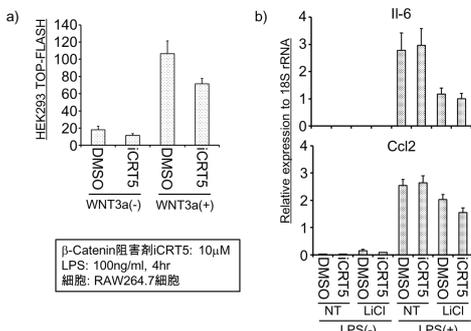


Fig.4. WNTシグナル活性化によるマクロファージ炎症応答の抑制はβ-Cateninによる転写を介さない

WNT シグナル経路によるβ-Catenin を介した転写活性を抑制することが知られている(図 4a)。そこで、iCRT5 存在下における LiCl の炎症抑制効果について検討を行ったところ、iCRT5 はその抑制効果に影響しなかった(図

4b)。以上のことから WNT シグナル活性化による炎症応答抑制にはβ-Catenin による転写活性には関与しないと考えられた。そこで、WNT シグナルによる炎症抑制効果が LPS-Tlr4 シグナルをどのように抑制しているのかについて検討を行った。LPS は、Tlr4 に結合すると IKK 複合体の活性化を誘導し、転写因子 NFκB を活性化することで様々な炎症性サイトカインやケモカインの転写誘導を起こすことが知られている(図 5a)。そこで、NFκB の核移行に影響があるかどうかについて検討するために、細胞を細胞質画分、核画分に分けて抽出し、NFκB ファミリーの各因子(p65/RelA, c-Rel, p50)についてウェスタンプロットによる検討を行った。その結果、LiCl による WNT シグナルの活性化は p65/RelA, c-Rel 及び p50 の核への蓄積の減弱が見られた(図 5b)。以上の知見から、マクロファージにおける WNT シグナル活性化は LPS 刺激に伴う NFκB の核移行を抑制することでマクロファージ炎症性活性化を抑制していることが明らかとなった。

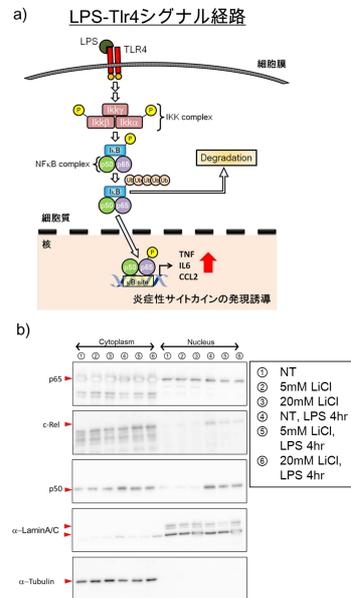


Fig.5. WNTシグナル活性化はLPS刺激に伴うNFκBの核移行を抑制する

本研究により、癌細胞は WNT シグナルを介してマクロファージの炎症性活性化を抑制することで腫瘍組織内における免疫寛容を誘導している可能性が示唆された。

今後、免疫寛容に於ける WNT シグナルの意義を明らかにすることは癌間質を標的とした新たな治療戦略の開発に資するものと考えられる。

## 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 3 件)

1. Semba H, Takeda N, Isagawa T, Sugiura Y, Honda K, Wake M, Miyazawa H,

Yamaguchi Y, Miura M, Jenkins DM, Choi H, Kim JW, Asagiri M, Cowburn AS, Abe H, Soma K, Koyama K, Katoh M, Sayama K, Goda N, Johnson RS, Manabe I, Nagai R, Komuro I.

HIF-1 -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity.

Nat Commun. 2016 May 18;7:11635. 査読有.

- Hanihara-Tatsuzawa F, Miura H, Kobayashi S, Isagawa T, Okuma A, Manabe I, MaruYama T.

Control of Toll-like receptor-mediated T cell-independent type 1 antibody responses by the inducible nuclear protein I B- . J Biol Chem. 2014 Nov 7;289(45):30925-36. 査読有.

- Kobayashi S, Hara A, Isagawa T, Manabe I, Takeda K, MaruYama T.

The nuclear I B family protein I BNS influences the susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis in a murine model. PLoS One. 2014 Oct 27;9(10):e110838. 査読有.

〔学会発表〕(計 3件)

1. 砂河 孝行(Takayuki Isagawa)、河村 大輔(Daisuke Kohmura)、佐藤 玲子(Reiko Sato)、貴志 一樹(Kazuki Kishi)、鈴木 良平(Ryohei Suzuki)、石川 俊平(Shumpei Ishikawa)

表題: シーケンシングによるがん-間質間相互作用の網羅的解析

Title: Comprehensive analysis of tumor-stromal interactions

日本人類遺伝学会第 60 回大会

発表日時: 2015 年 10 月 14 日(水) ~ 17 日(土)

会場: 京王プラザホテル(東京都新宿区)

2. 砂河孝行、佐藤玲子、貴志一樹、鈴木良平、河村大輔、石川俊平

表題: P1-278 シーケンスを用いたがん-間質間相互作用の網羅的解析

Title: P1-278 Comprehensive analysis of tumor-stroma interactions

第 104 回日本病理学会総会(愛知県名古屋市)

発表日時: 2015 年 4 月 20 日(木) ~ 5 月 2 日(土)名古屋国際会議場

3. 砂河孝行、横田紗雪、貴志一樹、鈴木良平、河村大輔、石川俊平

表題: 腫瘍由来 WNT シグナルはマクロファージの炎症応答を抑制する

第 12 回 がんとハイポキシア研究会

発表日時: 平成 26 年 11 月 21 日(金) ~ 22 日(土)

会場: ホテルマリターレ創世佐賀(佐賀

県佐賀市)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

砂河 孝行(Isagawa Takayuki)

東京医科歯科大学難治疾患研究所・特任助教

研究者番号: 40418637

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

武田憲彦(Takeda Norihiko)

東京大学医学部循環器内科・特任講師

研究者番号: 40422307