

平成 30 年 8 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18435

研究課題名(和文) 腫瘍マクロファージが誘起する腫瘍細胞の幹細胞特性獲得機序の解明とその応用

研究課題名(英文) Role of tumor-associated macrophages in the acquisition of cancer cell stemness and its application for anti-tumor therapy

研究代表者

米田 明弘 (Yoneda, Akihiro)

北海道大学・産学・地域協働推進機構・特任助教

研究者番号：00451419

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)：多剤化学療法や分子標的治療の問題点である腫瘍細胞の抗癌剤耐性能獲得を解決すべく、腫瘍マクロファージ(TAMs)が腫瘍細胞の幹細胞様特性の獲得とそれに伴う発癌活性促進を誘導する分子機序の解明を目的として、本研究課題を遂行してきた。その結果、TAMs由来のIL6とHB-EGFが腫瘍細胞の幹細胞様特性の獲得に関与し、それらの腫瘍細胞は高い発癌活性を有することが分かった。IL6欠損もしくはHB-EGF欠損マクロファージを有するマウスを用いて腫瘍形成能と抗癌剤効果を調べた結果、腫瘍形成の抑制と抗癌剤効果の向上が確認された。本研究の結果は、癌治療への新しい治療方法の基礎的知見として有用なものといえる。

研究成果の概要(英文)：Chemoresistance of cancer cells is a leading cause of chemotherapy and molecular target therapy against tumors. The purpose of the present study was to clarify the mechanism by which tumor-associated macrophages (TAMs) induce the acquisition of cancer cell stemness and promote the tumorigenic potential of cancer cells. Here we showed that IL-6 and HB-EGF derived from TAMs induce acquisition of cancer cell stemness and enhance the tumorigenicity of cancer cells. The tumorigenicity of cancer cells in mice that have IL-6-depleted or HB-EGF-depleted macrophages was significantly lower than that in wild-type mice. These results indicated that both IL-6 and HB-EGF derived from TAMs play a crucial role in cancer cell stemness and augment of tumorigenic potential of cancer cells, and suggested that targeted depletion of both IL-6 and HB-EGF may become a therapeutic modality for tumors.

研究分野：腫瘍学

キーワード：腫瘍マクロファージ 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、多剤化学療法や分子標的治療により手術不能な進行再発性固形癌の治療成績が改善されつつあるが、現状では完全治癒や長期生存延長を達成するには限界があるのも事実である。その要因の一つとして、抗癌剤耐性を獲得した腫瘍細胞の増殖を契機とした腫瘍進展、および転移能の増強が挙げられる。

腫瘍細胞の抗癌剤耐性獲得には、腫瘍組織内にごく少数存在する癌幹細胞が寄与していることがこれまでの研究成果により提唱されている(Magee et al., Cancer Cell 2012)。癌幹細胞は、元来、造血幹細胞由来腫瘍においてその存在が注目されてきたが、大腸癌や乳癌をはじめとする固形癌においても、多元増殖能および自己複製能などの幹細胞様特性を有する腫瘍細胞群が同定され注目されている。さらに、血管内皮細胞やストローマ細胞などの非腫瘍細胞で構成されている腫瘍微小環境が、癌幹細胞の活性制御のみならず、腫瘍細胞の癌幹細胞への形質転換に寄与している可能性が提唱されている。しかしながら、マクロファージや樹状細胞などの免疫細胞が腫瘍細胞の幹細胞様特性の獲得や抗癌剤耐性獲得に果たす役割、さらには『免疫ニッチ』としての意義についての詳細は明らかにされていないのが現状である。

2. 研究の目的

本申請研究では、上皮性増殖因子受容体キナーゼ阻害剤(EGFR-TKI)やALK 阻害剤といった分子標的療法が使用されていること、罹患人口が多い難治性癌であり、新規治療戦略の構築が急務であるとされているヒトがん腫(非小細胞肺癌、大腸癌、乳癌)を主に用いて、TAMs が『ヒト腫瘍細胞の幹細胞様特性の獲得』と『その機能を介した発癌活性促進』を誘導する機序の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) TAMs によるヒト腫瘍細胞の幹細胞様特性獲得誘導の解析

ヒト腫瘍細胞(NSCLC ヒト非小細胞肺癌、HCT116 ヒト大腸がん細胞株、MDA-MB-231 ヒト乳癌細胞株)を免疫不全マウス(NOD/Scid マウス)に皮下移植して、形成された腫瘍組織から Fluorescence activated cell sorting(FACS)を利用してTAMs を採取した。TAMs およびTAMs 由来培養上清を用いて、ヒト腫瘍細胞(NSCLC, HCT116, MDA-MB-231)を培養して、腫瘍細胞における幹細胞マーカー(CD133, CD44, EpCAM, ALDH1, Lgr-5, Sca-1, ABCG2)の発現を定量的PCR、FACS、Western blot および免疫細胞染色を用いて調べるとともに、幹細胞マーカーを発現するヒト腫瘍細胞群をFACS を用いて分離して、その細胞群のSphere 形成能を調べた。また、幹細胞マーカーを発現するヒト腫瘍細胞群を免疫不全マウス(NOD/Scid マウス)に皮下・同所移植し、腫瘍形成能について調べた。

(2) TAMs 由来因子による腫瘍細胞の幹細胞様特性獲得誘導の解析と責任因子の同定

TAMs の遺伝子発現解析を行い、正常組織由来のマクロファージに比べて、TAMsで高発現の遺伝子群で、腫瘍細胞の幹細胞特性獲得に関与すると考えられる候補因子(IL-6, HB-EGF)をピックアップした。そこで、候補因子に対するsiRNA をTAMs に導入して、候補因子の発現をノックダウンしたTAMs と腫瘍細胞(NSCLC, HCT116, MDA-MB-231, MC38マウス大腸癌細胞株, 4T1 マウス乳癌細胞株)を共培養し、腫瘍細胞の幹細胞マーカー(CD133, CD44, EpCAM, ALDH1, Lgr-5, Sca-1, ABCG2)の発現を定量的PCR、FACS、Western blotおよび免疫細胞染色の手法で検討した。また、候補因子を加えた培地で腫瘍細胞(NSCLC, HCT116, MDA-MB-231, MC38, 4T1)を培養し、幹細胞マーカーの発現を検討した。さらに、候補因子を処理した腫瘍細胞(NSCLC,

HCT116, MDA-MB-231, MC38, 4T1)から幹細胞マーカーを発現する細胞群をFACS で分離して、その細胞群を免疫不全マウス(NOD/Scidマウス)に皮下移植し、腫瘍形成能について調べた。

(3) IL6およびHB-EGFに対する中和抗体と抗癌剤の併用投与による抗腫瘍効果の検証

免疫不全マウス(NOD/Scid マウス)に対してヒト腫瘍細胞(NSCLC, HCT116, MDA-MB-231)を皮下・同所移植を行い、腫瘍モデルマウスを作製した。既に責任因子の候補としている因子(IL-6, HB-EGF)の中和抗体を用いて、作製した腫瘍モデルマウスに対して、責任因子の中和抗体と抗癌剤を併用投与することで、抗腫瘍効果について検討した。

4. 研究成果

(1) TAMs によるヒト腫瘍細胞の幹細胞様特性獲得誘導の解析

腫瘍組織から採取した TAMs と共培養したヒト腫瘍細胞において幹細胞マーカーの発現を調べた結果、幹細胞マーカーを発現する細胞集団が明らかに増加することが明らかとなった。また TAMs 由来の培養上清を用いてヒト腫瘍細胞を培養することにより、幹細胞マーカーを発現する細胞集団が明らかに増加することが分かった。TAMs との共培養、もしくはTAMs 由来培養上清での培養により幹細胞マーカーの発現を誘導されたヒト腫瘍細胞は、Sphere 形成能が非常に高いことが明らかとなった。さらに、このヒト腫瘍細胞を免疫不全マウスに皮下移植して、腫瘍形成を調べると、非常に高い腫瘍形成能を有することが明らかとなった。

(2) TAMs 由来因子による腫瘍細胞の幹細胞様特性獲得誘導の解析と責任因子の同定

正常組織由来マクロファージと TAMs との遺伝子発現解析を行った結果、IL6 と HB-EGF の発現が高いことが分かった。IL6

およびHB-EGFの遺伝子発現をsiRNAで抑制したTAMsと共培養したヒト腫瘍細胞は、コントロールと比べて、幹細胞マーカーの発現する細胞集団の割合が明らかに少なくなった。ヒト腫瘍細胞に対してリコンビナントIL6およびリコンビナントHB-EGF添加して培養すると、幹細胞マーカーを発現する細胞集団の割合が増加することが明らかとなった。リコンビナントIL6およびリコンビナントHB-EGF添加して培養することにより幹細胞マーカーを発現した細胞集団について、腫瘍形成能を調べたところ、腫瘍形成能が高くなることが分かった。

(3) IL6 および HB-EGF に対する中和抗体と抗癌剤の併用投与による抗腫瘍効果の検証

マウス腫瘍細胞(MC38)をマウスに移植後、IL6 中和抗体もしくはHB-EGF 中和抗体を投与した後、抗癌剤を投与したときの腫瘍形成能について調べた。その結果、コントロールと比べて、明らかに腫瘍形成が抑制されることが明らかとなった。

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)

Fujii M, Yoneda A, Takei N, Sakai-Sawada K, Kosaka M, Minomi K, Yokoyama A, Tamura Y. Endoplasmic reticulum oxidase 1 is critical for collagen secretion from and membrane type 1-matrix metalloproteinase levels in hepatic stellate cells. J Biol Chem. (2017) 292:15649-15660. 査読有

米田明弘、武井則雄、澤田香織、田村保明 腫瘍マクロファージによる腫瘍細胞の幹細胞特性獲得機序とその応用 月刊 細胞 Vol.49, 35-38 (2017) 査読無

[学会発表](計2件)

Yoneda A, Takei N, Sawada-Sakai K, Kosaka M, Minomi K, Tamura Y. HSP47 maintains

cancer cell proliferation via its inhibitory effect on ER stress sensor IRE1 α activity. 第76回日本癌学会学術総会

米田明弘、武井則雄、澤田香織、小坂まりな、味吞憲二郎、田村保明 癌細胞におけるHSP47のERストレスセンサーIRE1 α の活性調節機構 第40回日本分子生物学会

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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

米田 明弘 (YONEDA Akihiro)
北海道大学・産学地域協働推進機構・特任
助教
研究者番号：00451419

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()