

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20105

研究課題名(和文)新規転移性腎癌モデルを用いた転移巣での腫瘍微小環境形成機構の解明及び治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of tumor microenvironment formation mechanism in metastatic lesion using new metastatic renal carcinoma model and its application to therapy

研究代表者

山野 荘太郎 (Yamano, Shotaro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：80614528

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)：癌の増殖と転移には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。申請者は、ラット腎細胞癌(RCC)より RCC 細胞株を樹立後、免疫状態が正常である野生型ラットへの腎被膜下移植(同種同所移植)から高頻度に肺転移するモデルを開発した。

本研究では上記モデルを用いて肺高転移株を樹立した。高転移株は親株と比較し *in vivo*、*in vitro* 両方においてがん悪性化が亢進していることが明らかとなった。これらの細胞株から網羅的遺伝子発現解析を行った結果、高転移株において転移能に寄与する可能性があるタンパク質XとYを同定した。

今後タンパク質XとYを介した肺転移巣での腫瘍微小環境への役割解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：Tumor microenvironment formation is one of the most critical event for cancer metastasis and malignancy. previously we generated the novel metastatic model of renal cancer using rat renal cell carcinoma cell line rRCCd5 which are established by us. In this study, we generated the highly lung metastatic clones of rRCCd5 via *in vivo* selection method, and underwent the phenotype screening of metastatic clones *in vivo* and *in vitro* and transcriptome analyses. These analyses revealed that over-expressions of protein X and Y in the highly metastatic clones might contribute to accelerate the lung metastasis ability via facilitating the cancer cluster formation by cancer cell adhesion dys-regulation.

Further study are needed for understanding the relationship between the protein X or Y and tumor microenvironment formation in the lung metastatic lesions of renal cancers.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：肺転移 癌細胞塊 腎細胞癌 高転移株

1. 研究開始当初の背景

癌に罹患したヒトはなぜ命を落とすのか。多くの癌患者は、特定の臓器にできた癌が「転移」し、多臓器不全に陥り、死に至る。癌死を克服し寿命を全うするためには、癌転移の機序を明らかにし、制することが重要であると考えられる。古くから癌の転移には腫瘍微小環境の形成が重要な役割を果たしていることが知られている (Folkman: NEJM 1971)。これまでの世界的な癌転移研究から腫瘍微小環境の形成には癌関連線維芽細胞 CAF、腫瘍血管内皮細胞 TEC、腫瘍関連マクロファージ TAM を始め、近年では好中球 NET (Jonathan C.: JCI 2013)、制御性 T 細胞を中心としたリンパ球 TIL (Aurelien M.: JCI 2013) や血小板 (myriam L.: Cancer Cell 2011) の関与も明らかになり、転移に必要なニッチの研究はますます加速している。

2. 研究の目的

癌の増殖と転移には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。申請者は、ラット腎細胞癌 (RCC) より RCC 細胞株を樹立後、免疫状態が正常である野生型ラットへの腎被膜下移植 (同種同所移植) から高頻度に肺転移するモデルを開発した。本モデルでは、腫瘍微小環境を構成する線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージや好中球のみならず、T 細胞を代表とするリンパ球が腫瘍内に認められ、転移性腎癌のホットスポットである免疫療法の評価も可能である。本研究は申請者が開発した新規腎癌肺転移モデルを用い、遠隔臓器への転移のメカニズムを腫瘍微小環境の形成に焦点を合わせて解析し、既存治療薬及び新規治療薬の有効性評価の一助となるモデルの創出及び転移機序解明を目的とする。

3. 研究の方法

肺高転移株の樹立:

これまでに、EHEN 誘発ラット腎細胞腫瘍より癌細胞株 rRCCd5 を樹立した。本株の腎皮膜下移植肺転移系を用いて、本移植を 5 回繰り返し、肺高転移株 2 株を再度樹立した。以下は、本樹立株と親株の比較を行うことで転移関連因子の同定を行った。

1) 高転移株及び親株を用いた移植実験

高転移株 2 種及び親株を用いた腎皮膜移植を行い、移植 4 週間後における肺転移能の検討を行った。及び移植後一般状態の悪化及び個体死をエンドポイントとして生存曲線を作成した。

2) in vitro phenotype screening

高転移株及び親株を用いて WST-8 法による細胞増殖能の検討、フローサイトメーターを用いて Side Population 及び CD44, CD133 抗体を利用した癌幹細胞能の検討、及び抗がん剤を用いた薬剤耐性能の検討を行った。加えて、コラーゲン/マトリゲルを用いた 3

次元培養における浸潤能の検討、トリプシン処理後のがん細胞塊形成能の検討を行った。

3) 3 次元培養サンプルを用いた各種オミクス解析

コラーゲン/マトリゲルを用いて 3 次元培養を行ったサンプルに対して Exon array 及び miRNA array を行い、高転移株で発現異常を示す分子に対して解析を行った。

4) 遺伝子ノックダウン実験

上記オミクス解析により選別した遺伝子 X 及び Y に対して、siRNA によるノックダウンを行い、細胞増殖能、癌細胞塊形成能及びリン酸化チロシン量の解析を行った。

4. 研究成果

1) 高転移株及び親株を用いた移植実験

親株と比較して、高転移株 2 種ともに、有意に高い肺転移能を示した。加えて、高転移株では、親株と比較し生存曲線が有意に短縮された。

2) in vitro phenotype screening

2 次元培養において、親株と比較し、高転移株で WST8 により増殖能の有意な亢進、FCM により CD44/CD133 double positive 及び SP 分画の有意な増加を認めた。さらに、sunitinib 及び everolimus 処理により高転移株で IC50 の亢進が認められた。以上の結果より、高転移株では細胞増殖能の亢進のみならず幹細胞性の亢進が認められ、薬剤耐性能が増加していることが明らかとなった。

3 次元培養において、高転移株で高度の protrusion 形成を認め、基質を溶解させ周囲への浸潤が認められた。一方、親株では明確な protrusion 形成を認めず、高転移株において獲得された形質であることが考えられた。

3) 3 次元培養サンプルを用いた各種オミクス解析

Exon array の結果、親株と比較し、両方の高転移株で共通して 1.5 倍以上及び以下に異常発現した遺伝子はそれぞれ 159 及び 538 種類であった。これら遺伝子リストに対して GO 解析を行った結果、vasculature development ($p=3.00E-0.7$) 及び tube development ($p=0.026$) 等浸潤に類似したアノテーションがノミネートした。

4) 遺伝子ノックダウン実験

上記 Exon array 解析の結果、我々は 2 種類の遺伝子 X 及び Y に着目した。これら遺伝子に対して siRNA を用いてノックダウンすると細胞増殖能が有意に抑制され、がん細胞塊形成も阻害された。さらに、リン酸化チロシンの抗体である 4G10 で WB を行った結果、リン酸化が减弱している蛋白質が多数あることが観察された。

以上をまとめると、本研究により肺転移能が亢進する2つの高転移株を樹立し、その機序の一端を明らかにすることに成功した。今後本研究ツールを用いて癌細胞と転移先の臓器における非癌細胞との細胞間コミュニケーションを明らかにすることにより、転移成立における微小環境の優位性を明らかにしたいと考えている。

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8件)

1. Tachibana H, Gi M, Kato M, Yamano S, Fujioka M, Kakehashi A, Hirayama Y, Koyama Y, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H. Carbonic anhydrase 2 is a novel invasion-associated factor in urinary bladder cancers. *Cancer Sci.* 2017 Mar;108(3):331-337.
2. Ishii N, Gi M, Fujioka M, Yamano S, Okumura M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid exerts promotion effects on hepatobiliary carcinogenesis in a rat medium-term multiorgan carcinogenicity bioassay. *J Toxicol Pathol.* 2017 Jan;30(1):39-45.
3. Yamaguchi T, Gi M, Yamano S, Fujioka M, Tatsumi K, Kawachi S, Ishii N, Doi K, Kakehashi A, Wanibuchi H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 52 weeks. *Exp Toxicol Pathol.* 2017 Jan;69(1):1-7.
4. Hirayama Y, Gi M, Yamano S, Tachibana H, Okuno T, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H. AntiOPD-L1 treatment enhances antitumor effect of ecerolimus in a mouse model of renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2016 In press
5. Inaba H, Goto H, Kasahara K, Kumamoto K, Yonemura S, Inoko A, Yamano S, Wanibuchi H, He D, Goshima N, Kiyono T, Hirotsune S, Inagaki M. Nde1 suppresses ciliogenesis in proliferating cells by regulating the trichoplein-Aurora A pathway. *J Cell Biol.* 2016 Feb 15;212(4):409-23.
6. Yamano S, Gi M, Tago Y, Doi K, Okada S, Hirayama Y, Tachibana H, Ishii N, Fujioka M, Tatsumi K, Wanibuchi H. Role of deltaNp63posCD44vpos cells in the development of N-nitroso-tris-chloroethylurea-induced peripheral-type mouse lung squamous cell carcinomas. *Cancer Sci.* 2016 Feb;107(2):123-32. **(Selected as a cover)**
7. Xie XL, Gi M, Fujioka M, Doi K, Yamano S, Tachibana H, Fang H, Kakehashi A, Wanibuchi H. Ethanol-extracted propolis enhances BBN-initiated urinary bladder carcinogenesis via non-mutagenic mechanisms in rats. *Food Chem Toxicol.* 2015 Sep;83:193-200.
8. Gi M, Fujioka M, Yamano S, Shimomura E, Ishii N, Kakehashi A, Takeshita M, Wanibuchi H. Determination of Hepatotoxicity and Its Underlying Metabolic Basis of 1,2-Dichloropropane in Male Syrian Hamsters and B6C3F1 Mice. *Toxicol Sci.* 2015 May;145(1):196-208.
- 9.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山野 莊太郎 (YAMANO, SHOTARO)

国立がん研究センター研究所・希少がん
研究分野・特任研究員
研究者番号 (80614528)