

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18K07287  
研究課題名(和文) 腫瘍マクロファージと癌幹細胞に発現するTim-3を標的とした抗腫瘍治療法の開発

研究課題名(英文) Targeted inhibition of Tim-3-positive tumor-associated macrophages suppresses tumorigenicity of cancer cells

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究は、腫瘍マクロファージ(TAMs)による腫瘍細胞の幹細胞様特性獲得とそれに伴う発癌活性促進の分子機序の解明を行い、難治性固形癌に対する治療効果の改善に向けた基礎的知見を得ることを目的とした。その結果、Tim-3陽性TAMsは腫瘍細胞に幹細胞様特性を誘導することが明らかとなり、この幹細胞様特性を持った腫瘍細胞は高い腫瘍形成能を持つことがわかった。我々は3つのTAMs由来責任因子を同定し、責任因子を抑制したTAMsは、腫瘍細胞に幹細胞様特性を誘起することができなかった。これらのことから、TAMsは腫瘍細胞に幹細胞様特性を誘導し腫瘍形成促進に関与していることが明らかとなった。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌などの難治性固形癌は、現状の治療法では十分な完治が見込めないことから、さらなる新規治療法の開発が急務である。特に、腫瘍細胞が獲得する抗癌剤抵抗性の解明は、新規治療法の開発において重要な課題となっている。本申請研究では、腫瘍マクロファージ(TAMs)が腫瘍細胞に幹細胞様特性を付与することを明らかとした。この結果は、今後、難治性癌のもつ抗癌剤抵抗性解除を目的とした新規治療法の開発において、貴重な知見を提供し、現行の治療法をより効果的にするための重要な糸口を提供するものといえ、学術的および社会的意義が高いものといえる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to determine whether tumor-associated macrophages (TAMs) induce a stem cell property of cancer cells and promote the tumorigenicity of cancer cells. We showed that a small population of TAMs expressed Tim-3 and Tim-3-positive TAMs induced the stem cell property of cancer cells. Cancer cells co-cultured with Tim-3-positive TAMs have a high tumorigenic potential. We also identified three candidate factors concerning an induction of stem cell property. Silencing of three candidate factors in Tim-3-positive TAMs inhibited the induction of stem cell property for cancer cells. These results suggest that TAMs is involved in the induction of stem cell property and tumorigenic potential of cancer cells.

研究分野：腫瘍学

キーワード：腫瘍マクロファージ 幹細胞様特性

## 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。とくに、膵臓癌や乳癌は、現在、臨床行われている治療法（原発巣切除、放射線治療、ホルモン療法、化学療法や分子標的治療）を施しても、なお予後不良が高頻度で誘発される。この主な原因として、『抗癌剤耐性能の獲得』および『他臓器への転移・浸潤』を契機とした腫瘍細胞の再進展と転移能増強があるとともに、転移・浸潤した腫瘍細胞の制御・抑制が非常に困難であることが挙げられ、未だ有効な治療法が皆無である。

最近、腫瘍微小環境を構成する腫瘍マクロファージ (Tumor-associated macrophages, TAMs) が腫瘍細胞の抗癌剤耐性能と転移・浸潤促進に関与していることが報告されており、TAMs の腫瘍細胞への発癌活性促進と腫瘍微小環境での『免疫ニッチ』としての作用が注目されている。しかしながら、TAMs が腫瘍細胞の抗癌剤耐性能や転移・浸潤能促進をどのように誘導しているかが不明、他臓器へ転移・浸潤した腫瘍細胞の増殖がいつどのようにして惹起されているのかが不明、原発巣の腫瘍細胞と他臓器へ転移・浸潤した腫瘍細胞との性質が異なり、治療が困難であること、正常細胞においても転移・浸潤に関与する分子機序が存在し、その機序に対する抑制は非常に副作用のリスクが高いことといった問題点が未解決のままである。これらの問題点の解決策を見出すことは、難治性癌である膵癌や高転移・浸潤性乳癌などの抗癌剤耐性能獲得の回避や転移・浸潤の制御をもとにした治療効果の劇的な改善の糸口を切り開くものといえる。

## 2. 研究の目的

本申請研究は、難治性固形癌に対する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、再発と転移促進を解決すべく、TAMs が腫瘍細胞の幹細胞特性獲得とそれに伴う発癌と転移活性促進を誘導する分子機序の解明を行い、現在の臨床で実施されている難治性固形癌に対する治療効果の劇的な改善に向けた基礎的知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

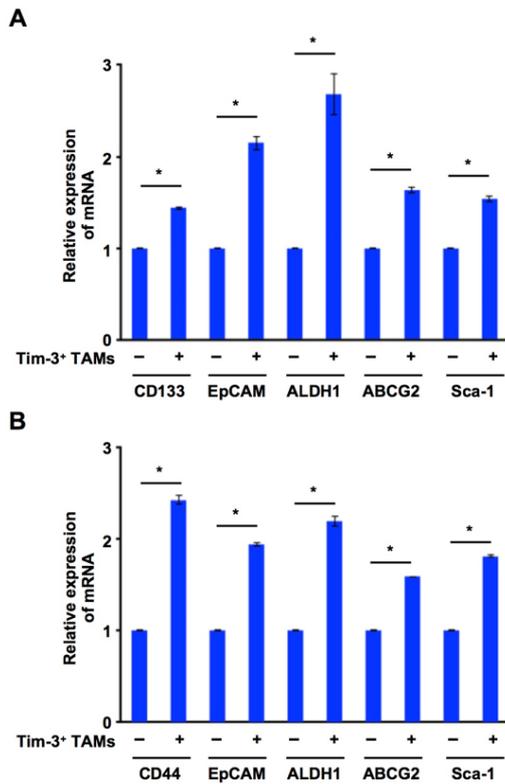
(1) ヒト腫瘍細胞 (PANC1 膵臓癌細胞株、MDA-MB-231 乳癌細胞株) を移植し作製した腫瘍モデルマウスの腫瘍組織からセルソーターを用いて採取した Tim-3 陽性および Tim-3 陰性 TAMs とヒト腫瘍細胞 (PANC1, MDA-MB-231) を共培養して、腫瘍細胞での幹細胞マーカー (CD133, CD44, EpCAM, ALDH1, Lgr-5, Sca-1, ABCG2) および Tim-3 の発現について定量的 PCR、ウエスタンブロット、フローサイトメトリー解析で検討した。また、Tim-3 と幹細胞マーカーを発現する腫瘍細胞を免疫不全マウス (BALB/c nu/nu マウス) に同所移植し、腫瘍形成能について調べた。

(2) 候補因子 (IL-6, HB-EGF, MFG-E8) に対する siRNA を導入した Tim-3 陽性 TAMs と腫瘍細胞 (MC38 マウス大腸癌細胞株、4T1 マウス乳癌細胞株、PANC1, MDA-MB-231) の共培養を行い、腫瘍細胞での幹細胞マーカー (ALDH1, ABCG2) の発現について定量的 PCR、ウエスタンブロット、フローサイトメトリー解析で検討した。また、候補因子を含む培養培地で培養した腫瘍細胞 (MC38, 4T1, PANC1, MDA-MB-231) における幹細胞マーカー (ALDH1, ABCG2) の発現についても検討した。さらに、候補因子を処理した腫瘍細胞 (MC38, PANC1) を BALB/c nu/nu マウスに皮下移植して、腫瘍形成能についても検討した。

(3) 候補因子 (IL-6, HB-EGF, MFG-E8) を処理した腫瘍細胞 (MC38, PANC1) に対して抗癌剤 (パクリタキセル、ジェムシタビン) を処理した時の細胞生存率について調べた。また、候補因子を処理した腫瘍細胞 (MC38, PANC1) を BALB/c nu/nu マウスに皮下移植し、モデルマウスに対して、抗癌剤 (パクリタキセル、ジェムシタビン) を投与した時の腫瘍形成抑制を測定した。さらに、腫瘍モデルマウスに対して、候補因子 (IL-6, HB-EGF, MFG-E8) に対する中和抗体と抗癌剤 (ジェムシタビン) を併用投与した時の抗腫瘍効果について検討した。

## 4. 研究成果

(1) Tim-3 陽性および Tim-3 陰性 TAMs とヒト腫瘍細胞 (PANC1, MDA-MB-231) を共培養して、腫瘍細胞での幹細胞マーカー (CD133, CD44, EpCAM, ALDH1, Sca-1, ABCG2) の発現について調べた結果、Tim-3 陽性 TAMs と共培養した腫瘍細胞における幹細胞マーカーの発現レベルは、Tim-3 陰性 TAMs と共培養した腫瘍細胞のそれに比べて、明らかに高かった (図 1)。また、Tim-3 陽性 TAMs と共培養した腫瘍細胞を BALB/c nu/nu マウスに皮下移植し、その腫瘍形成能を測定した結果、Tim-3 陰性 TAMs と共培養した腫瘍細胞の腫瘍形成能に比べて、明らかに高いことが分かった (図 2)。

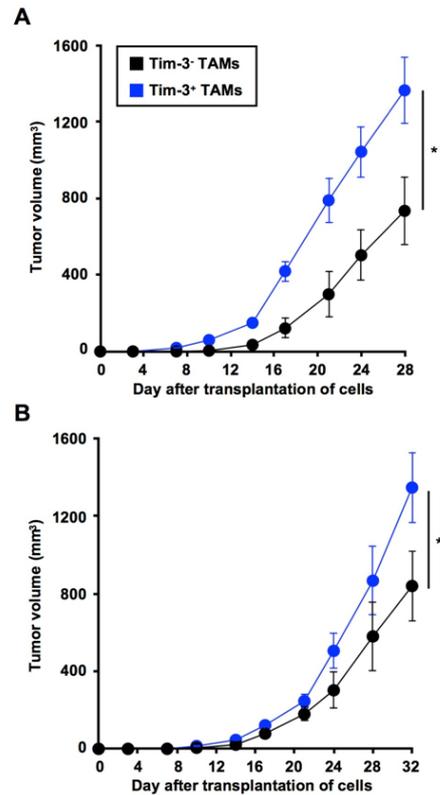


**図1 Tim-3<sup>+</sup>TAMsと共培養したヒト腫瘍細胞における幹細胞マーカーの発現**

Tim-3<sup>+</sup>TAMsを処理したヒト膀胱癌細胞株(PANC1) (A)およびヒト乳癌細胞株(MDA-MB-231) (B)における幹細胞マーカーのmRNAの発現は定量的PCRを用いて測定した。\*: P<0.05

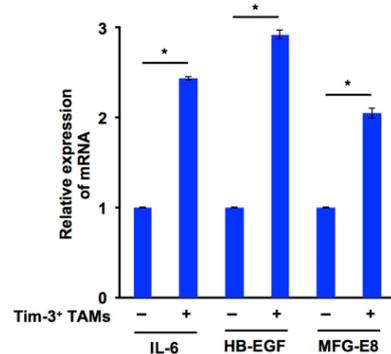
(2) Tim-3 陽性 TAMs と Tim-3 陰性 TAMs の遺伝子発現プロファイルを解析し、IL-6、HB-EGF および MFG-E8 の発現に変化ができたため、さらに、定量的 PCR によりそれらの発現変化を解析した結果、Tim-3 陽性 TAMs での IL-6、HB-EGF および MFG-E8 mRNA の発現レベルは、Tim-3 陰性 TAMs のそれらに比べて、明らかに高いことが分かった (図 3)。そこで、IL-6、HB-EGF および MFG-E8 に対する siRNA を導入した Tim-3 陽性 TAMs と共培養した腫瘍細胞における幹細胞マーカーの発現を調べた結果、IL-6、HB-EGF および MFG-E8 に対するいずれの siRNA を導入した Tim-3 陽性 TAMs と共培養した腫瘍細胞は、幹細胞マーカー (ALDH1、ABCG2) の発現の誘導が確認されなかった。一方、IL-6、HB-EGF、もしくは MFG-E8 タンパク質を処理した腫瘍細胞は、幹細胞マーカーの発現が誘導されていることがわかった。また、IL-6、HB-EGF および MFG-E8 を処理した腫瘍細胞の腫瘍形成能を調べた。その結果、IL-6、HB-EGF および MFG-E8 を処理した腫瘍細胞の腫瘍形成能は、処理していない腫瘍細胞のそれに比べて、明らかに高いことが分かった。

(3) 候補因子 (IL-6, HB-EGF, MFG-E8) で処理した腫瘍細胞を皮下移植して作製した腫瘍モデルマウスに対して、抗癌剤を処理した結果、候補因子を処理していない腫瘍細胞を皮下移植して作成した腫瘍モデルマウスに抗癌剤を処理したものに比べて、抗腫瘍効果が認められなかった。一方、候補因子 (IL-6, HB-EGF, MFG-E8) に対する中和抗体とともに抗癌剤 (ジェムシタビン) を処理した場合、明らかに抗腫瘍効果があることが認められた。これらの結果より、候補因子と抗癌剤との併用投与は、これまでの抗腫瘍効果を効果的に改善できることが示唆された。



**図2 Tim-3<sup>+</sup>TAMsで共培養した腫瘍細胞の腫瘍形成能**

Tim-3<sup>+</sup>TAMsおよびTim-3<sup>-</sup>TAMsと共培養したヒト乳がん細胞(MDA-MB-231細胞) (A)もしくはヒト膀胱癌細胞(PANC1細胞) (B)はBALB/c nu/nuマウスに皮下移植して、腫瘍形成能を調べた。\*: P<0.05



**図3 Tim-3<sup>+</sup>TAMsにおけるIL-6、HB-EGFおよびMFG-E8の発現**

Tim-3<sup>+</sup>TAMsおよびTim-3<sup>-</sup>TAMsにおけるIL-6、HB-EGFおよびMFG-E8 mRNAの発現は定量的PCRを用いて測定した。\*: P<0.05

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Akihiro Yoneda, Kaori Sakai-Sawada, Kenjiro Minomi, Yasuaki Tamura	4. 巻 18
2. 論文標題 Heat shock protein 47 maintains cancer cell growth by inhibiting the unfolded protein response transducer IRE1a	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 847-758
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-19-0673.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 米田明弘	4. 巻 1月号
2. 論文標題 腫瘍マクロファージによる腫瘍免疫抑制メカニズム	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 月刊細胞	6. 最初と最後の頁 45-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Akihiro Yoneda, Kenjiro Minomi, Yasuaki Tamura	4. 巻 39
2. 論文標題 HSP47 promotes metastasis of breast cancer by interacting myosin IIA via the unfolded protein response transducer IRE1a	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4519-4537
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-020-1311-7.	査読の有無 有
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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Akihiro Yoneda, Yasuaki Tamura
2. 発表標題 HSP47 confers chemoresistance on pancreatic cancer cells by suppressing excess release of calcium from the endoplasmic reticulum
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 米田明弘、田村保明
2. 発表標題 ヒト膀胱細胞の抗癌剤耐性能におけるHSP47の関与
3. 学会等名 第14回日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 米田明弘、田村保明
2. 発表標題 HSP47によるヒト膀胱細胞の抗がん剤耐性能獲得機序の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiro Yoneda, Norio Takei, Kaori Sakai-Sawada, Marina Kosaka, Tasuaki Tamura
2. 発表標題 HSP47 augments a metastatic potential of triple negative breast cancer
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 米田明弘、武井則雄、澤田香織、小坂まりな、田村保明
2. 発表標題 HSP47によるトリプルネガティブ乳癌の転移能獲得機序の解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

〔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
---------	---------