

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08571

研究課題名(和文) Formyl peptide receptor阻害の乳癌治療への応用

研究課題名(英文) Inhibition of formylpeptide receptors for treatment of breast cancer

研究代表者

吉村 禎造 (Yoshimura, Teizo)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・非常勤研究員

研究者番号：50174991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では非腫瘍細胞に発現する白血球遊走因子レセプターFprが乳癌の進展に果たす役割をマウス4T1乳癌移植モデルにて解析した。Fpr2欠損マウスでは移植局所での腫瘍の増殖に差は無かったが、肺転移が有意に減少した。肺転移に重要であると思われるMCP-1の血清濃度には差が無くMCP-1非依存性と考えられた。Fpr2欠損マウスの腫瘍では好中球の腫瘍内への浸潤が減少し、血管新生がWTに比べて弱く腫瘍組織の壊死が顕著であった。以上より、Fpr2陽性好中球が4T1乳癌の進展に何らかの役割を果たしていると考えられる。我々のFprに関する研究結果は乳癌治療の新しいターゲットの同定に貢献するものと期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍組織内への免疫抑制性好中球やマクロファージの浸潤、それに伴う腫瘍進展への影響に関しては主にケモカインやそのレセプターを焦点とした多くの研究が行われている。しかし、Fprなどの古典的な白血球遊走因子レセプターの役割に関する情報は限られている。本研究では、Fprの一つであるFpr2欠損マウスを使いFpr2の作用により浸潤した白血球が4T1乳癌の肺転移を促進していることを強く示唆する結果を見出し、このレセプターが今後乳癌の肺転移予防のためのターゲットになる可能性が示唆された。本研究の結果はFprの阻害が乳癌の肺転移を予防できる可能性を示すもので社会的意義が大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：Tumor infiltrating leukocytes play an important role in the progression of cancer. In this study, we examined the role of the classical chemoattractant receptor Fpr expressed by non-tumor cells in the progression of breast cancer using a transplantable 4T1 mouse breast cancer model. Tumors grew at a similar rate in both strains at the injected sites; however, lung metastases were significantly reduced in Fpr2-deficient mice independently of the chemokine MCP-1 because serum MCP-1 levels were similar between tumor-bearing WT and Fpr2-deficient mice. In tumors of Fpr2-deficient mice, the development of blood vessels was weaker and necrosis of tumor tissue was more apparent. Ly6G+ neutrophils were detected mainly in the peripheral area and did not infiltrate inside tumors. Thus, Fpr2+ neutrophils appear to play a role in the progression of 4T1 breast cancer. Studies focusing on Fprs may lead to the identification of new targets and a potential prevention of breast cancer metastasis.

研究分野：がんと炎症

キーワード：がん微小環境 ケモカイン 乳癌 マウスモデル マクロファージ 線維芽細胞 白血球遊走因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌組織は腫瘍細胞とその中に浸潤もしくは増殖した非腫瘍細胞により構成される。腫瘍細胞が癌治療の直接的ターゲットではあるが、腫瘍内に形成される癌微小環境が腫瘍促進に大きな役割を持つことが最近明らかとなり、この癌微小環境を変えることが癌治療に大切である。癌微小環境の形成には腫瘍細胞と非腫瘍細胞との間のクロストークにより産生されるサイトカインや増殖因子の影響が大きいと考えられる。

我々はケモカイン、特に monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2)が乳癌の進展にどのような役割を果たしているかに注目して研究を行ってきた。そしてマウス 4T1 乳癌モデルを用いて、1)腫瘍内の非腫瘍細胞により産生される MCP-1 が 4T1 細胞の肺転移を促進すること (Yoshimura et al., PLoS One, 8:e58791, 2013)、2)乳癌細胞が産生する Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)がマクロファージを強く活性化し MCP-1 の産生を促すことを明らかにした (Yoshimura et al., Front.Immunol.7:2.doi:10.3389/fimmu.2016.00002)。ケモカインの癌進展に果たす役割は我々をはじめ多くの研究者によってかなり深く調べられている。

一方、ケモカインの発見前より知られている Leukotrien B4(LTB4)、細菌由来の Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLF)などのいわゆる Classical chemoattractant (古典的な白血球遊走因子)が癌の進展に果たす役割に関しては、研究が遅れていた。FMLF のレセプターとしては2種類のレセプター、formylpeptide receptor (FPR)1と FPR α (マウスでは Fpr1と Fpr2) がクローニングされ、その後細菌由来のペプチドの他に細胞由来の種々の物質が FPR/Fpr のリガンドとして同定された。このように、FPR/Fpr は単に細菌由来のペプチドを認識するレセプターではなく非細菌感染性炎症反応における白血球の浸潤の制御にも重要な役割を果たすことが明らかになっている (Ye, et al., Pharmacol. Rev. 61:119-161, 2009)。実際、Classical chemoattractant とケモカインの連鎖が白血球の組織障害部位への正確な遊走に不可欠であることが報告されている。特に、壊死組織内への好中球浸潤には、壊死細胞から遊離される物質と FPR の interaction が不可欠である (McDonald et al., Science 330:362-366, 2010)。

周知のように腫瘍組織内には壊死巣が見られ、そこから遊離される物質が腫瘍内に浸潤した Tumor-associated macrophages (TAM)細胞表面に発現する TLR2/4 をはじめとする種々のレセプターを刺激することにより炎症性サイトカインの産生が起こると推察される。更に FPR/Fpr を介して好中球・単球の浸潤が起こることにより抗腫瘍活性が亢進すると考えられるが、抗腫瘍効果の増強には至っていない。逆に、腫瘍内に浸潤した白血球の中には免疫抑制性の M2 マクロファージ、myeloid-derived suppressor cells (MDSC)が含まれており、壊死組織由来の FPR/Fpr リガンドによる FPR/Fpr の活性化が腫瘍の増殖・進展を促進している可能性があり、FPR/Fpr の役割を明らかにすることが今後の乳癌治療または肺転移の予防のために重要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は主に好中球やマクロファージなどの白血球細胞表面に発現する2種の FPR (FPR1 と FPR2)が癌の進展にどのように影響しているのかを遺伝子改変マウスを用いて生物学的、また分子学的に検討し、FPR が癌治療の新しい標的となりうるかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

マウス 4T1 乳癌細胞は BALB/c マウスに自然発生した Triple negative 乳癌由来の細胞で複数

のクローンからなる。正常のメス BALB/c マウスの乳腺脂肪組織へ移植すると肺へ自然転移を起こし臨床的に非常に有用なモデルである。我々は C57BL/6 遺伝子背景 Fpr1 knockout (KO)、Fpr2 KO、Fpr1/2 double KO (DKO) の 3 種の KO マウスを Wild type (WT) BALB/c マウスと 10 世代交配した。そして 1×10^5 個の 4T1 細胞を乳腺脂肪組織に移植し局所での腫瘍の形成・増大・肺転移を観察し WT マウスと比較した。腫瘍内への白血球浸潤を Flow cytometry や免疫組織化学を用いて解析した。腫瘍内でのサイトカイン遺伝子発現は Realtime RT-PCR で解析した。

4. 研究成果

まず、最初に BALB/c WT マウスとの 10 世代の継代が完了した Fpr2 KO マウスを用いて研究を始めた。WT マウスと Fpr2 KO マウスの乳腺脂肪組織に 4T1 細胞を移植してマウスの生存率、局所での腫瘍の増殖及び肺への転移に違いがあるかを検討した。図 1 A に示すように、移植局所での腫瘍の増殖には Fpr2 KO マウスと WT マウス

の間に全く差は見られなかった。しかし、WT マウスに比べ Fpr2 KO マウスでは肺への腫瘍細胞の転移が有意に低く、生存率も有意に高かった。図 1 A に示した結果は、以前 4T1 細胞を MCP-1 KO マウスに移植した時の結果に類似していたため、Fpr2 KO マウスでは腫瘍内での MCP-1 の産生が減少しているのではないかと推測された。そこで、4T1 細胞移植後 2 週間での血清 MCP-1 値を測定したところ、Fpr2 KO マウスと WT マウスの間に有意な差は

なかった。さらに、Fpr2 KO マウスを BALB/c 遺伝子背景をもった MCP-1 KO マウスと交配して Fpr2/MCP-1 DKO マウスを作成した後、4T1 細胞の肺への自然転移を調べたところ、Fpr2 KO マウスに比べて肺転移がさらに有意に減少していた(図 1 B)。以上の結果より、Fpr2 KO マウスに見られた肺転移の減少は MCP-1 の産生とは別のメカニズムによるものと考えられた。

上述したように Fpr は白血球の遊走に関するレセプターである。そこで、Fpr2 KO マウスでは腫瘍内への白血球動員が減少しているのでは考えられた。しかし、Flow cytometry による解析では腫瘍内の総白血球数・各白血球 subset の比率において WT マウスの腫瘍と有意な差が無かった。そこで、免疫組織化学により白血球の腫瘍内分布を調べたところ Fpr2 KO マウスの腫瘍では好中球とマクロファージが腫瘍辺縁に多く見られ腫瘍内部への浸潤が減少している傾向が見られた。

以前 MCP-1 KO マウスの腫瘍でも同じような所見を報告したが、Fpr2 KO マウスの腫瘍の肉眼的特徴の一つは腫瘍表面における顕著な壊死であり Fpr2 の欠損により血管新生が低下しているのではないかと推測された。そこで腫瘍内血管の増生を調べるために血管内皮細胞に特異的な転写因子 ERG の発現を免疫組織化学で調べたところ、一視野あたりの ERG 陽性細胞(血管内皮細胞)数が Fpr2 KO マウス腫瘍では有意に減少していた。また、腫瘍内の血管内皮細胞について抗 CD34 抗体を用いて同様な方法で検討したところ CD34 陽性細胞数が減少していた。Realtime RT-PCR では腫瘍での vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA の発現が減少していた。好中球やマクロファージは VEGF などの血管増生に関わる物質を産生し癌における血管新生を促進することが知られている。以上より、これらの白血球の腫瘍内部への浸潤が Fpr2 の欠損により阻害され血管新生が減少し 4T1 細胞への転移が抑制されたのではないかと推測される。4T1 細

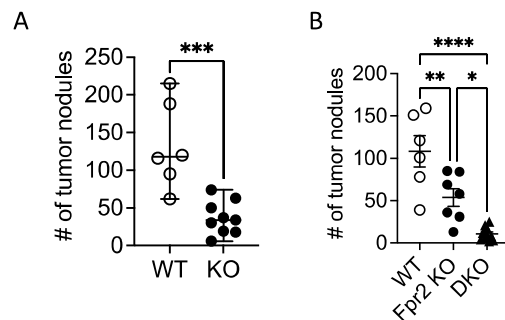


図 1. Fpr2欠損により4T1細胞の肺転移が減少する。A. WTとFpr2 KOマウス肺表面の転移巣の数。B. WT、Fpr2 KO、Fpr2/MCP-1 DKOマウスの比較。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.00001$ 。

胞から遊離される Fpr2 リガンドの一つである catherin-related antimicrobial peptide (CRAMP)がこれらの白血球の腫瘍内への浸潤を担っているのではないかと考えたが、4T1 細胞による CRAMP の産生は Western blotting で認めなかった。現在のところ関わっている Fpr2 リガンドは同定されていない。

次に BALB/c 遺伝子背景に変換した Fpr1 KO マウスの乳腺脂肪組織内に 4T1 細胞を移植し 4T1 細胞の肺転移を WT マウスと比較した。図 2 に示すように Fpr2 KO マウスの場合と同じように 4T1 細胞の肺転移が有意に減少していた。更に免疫組織化学によって好中球の浸潤を検討したところ Fpr2 KO マウスの腫瘍と異なり好中球浸潤が全体的に減少していた。このように、Fpr1 と Fpr2 はともに好中球の遊走を制御するレセプターであるが、in vivo での好中球浸潤に関しては異なる働きがあるのではないかと考えられる。

以上のように Fpr1 KO と Fpr2 KO マウスを用いた実験の結果から、古典的な白血球遊走因子のレセプターである Fpr1 と Fpr2 が 4T1 乳癌モデルにおいて腫瘍内への好中球・マクロファージの浸潤、その後の血管新生・肺転移に重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、予備実験の段階であるが Fpr1/Fpr2 DKO マウスでは一部のマウスで 4T1 細胞が拒絶されるという非常に興味のある結果も得ている。これらの遺伝子欠損マウスを用いて今後更に研究を続けることにより今まで分かっていなかった Fpr1 と Fpr2 を介した新しい乳癌肺転移の機序が解明されるものと期待される。また、これらのレセプターの阻害剤により新しい乳癌治療または転移の予防が出来るかどうか更なる成果が待たれる。

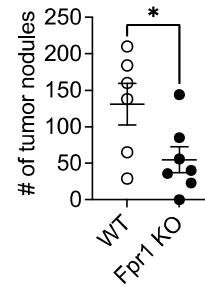


図 2. Fpr1欠損により4T1細胞の肺転移が減少する。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yoshimura, T., Nakamura, K., Li, Chunning, Fujisawa, M, Shiina, T, Imamura, M., Li, T., Mukaida, N., Matsukawa, A.	4. 巻 20
2. 論文標題 Cancer cell-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor 1s dispensable for the progression of 4T1 murine breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Science	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20246342	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉村 禎造
2. 発表標題 Formylpeptide receptor 2 (Fpr2)-deficiency in Non-tumor Cells Decreases Lung Metastasis of 4T1 Murine Breast Cancer Cells
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2019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
研究分担者	松川 昭博 (Matsukawa Akihiro) (90264283)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	

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
---------	---------