

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19470

研究課題名(和文) 良性腫瘍を良性とする微小環境の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying microenvironment-regulated tumor malignant progression

研究代表者

山梨 裕司 (Yamanashi, Yuji)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：40202387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍(癌)と良性腫瘍の根本的な違いは浸潤能の有無にある。浸潤能の多くは癌遺伝子・癌抑制遺伝子の異常の蓄積により賦与されると考えられているが、当該遺伝子異常の蓄積は腫瘍細胞自身の挙動を変化させるだけでなく、腫瘍細胞を取り巻く微小環境をも変化させることで悪性を促進させることが明らかになりつつある。本研究では独自に見出した腫瘍悪性を促進する微小環境に着目し、その分子機構の解明を進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、これまでに報告のない形式の微小環境による浸潤促進機構の解明に取り組むことで、腫瘍悪性の新たなメカニズムを理解するための手掛かりを得た点、また、これまでにない視点での微小環境を標的とする治療法開発へ向けた基礎的な知見を得た点において意義深い。

研究成果の概要(英文)：The fundamental difference between malignant and benign tumors is the presence or absence of invasive phenotype, which is believed to be conferred by accumulation of genetic alterations in oncogenes and tumor suppressor genes. Emerging evidence suggests that these mutations induce tumor invasion not only by tumor cell-intrinsic mechanisms but also by generation of microenvironment that may synergistically accelerate malignant progression. To elucidate the novel mechanisms underlying malignant progression, we studied microenvironment-regulated tumor invasion.

研究分野：癌生物学

キーワード：腫瘍悪性化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

良性腫瘍は浸潤能を獲得することで悪性腫瘍となり、局所への浸潤、脈管内への侵入、脈管内の移動、脈管外への遊出を経て遠隔組織に転移巣を形成する。腫瘍は原発巣に留まる限り、その致死性は低く、実際に、癌による死亡原因の90%は浸潤・転移と考えられている。したがって、浸潤・転移の制御は癌治療の中核的な課題であり、浸潤・転移を標的とする治療法の開発には、その分子機構の理解が重要となる。

癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常の蓄積により良性腫瘍に悪性形質が賦与されるとする「多段階発癌説」が広く受け入れられており、実際に、癌遺伝子及び癌抑制遺伝子変異を導入した複合遺伝子変異マウスを用いた解析から、遺伝子変異数の増加に伴い悪性腫瘍率(腫瘍総数に対する悪性腫瘍数の割合)が増加することが報告されている。以上の点から、良性腫瘍が悪性化するために必要な腫瘍細胞自身の変化に着目した研究が精力的におこなわれ、例えば、Tgf- β 経路の不活性化や Notch 経路の活性化が良性腫瘍に浸潤能を与える悪性化の要因であることが報告されている。一方で、腫瘍細胞自身の変化によって誘導される腫瘍の悪性化は、腫瘍細胞とそれらを取り巻く微小環境との相互作用によって促進されることが明らかにされつつある。腫瘍組織は腫瘍細胞及び当該細胞により誘引される間質細胞(線維芽細胞、血管内皮細胞、リンパ管細胞、マクロファージや好中球などの血球系細胞など)等からなる微小環境で構成されており、近年の研究から、腫瘍随伴マクロファージ(TAM: tumor-associated macrophage)による悪性化促進の重要性が報告されている。しかしながら、腫瘍の悪性化促進における微小環境の役割には未解明の点が多い。そこで、本研究では、腫瘍悪性化の素過程である浸潤に焦点を絞り、腫瘍の浸潤制御における微小環境の役割を解明する。

2. 研究の目的

本研究代表者らはこれまでに腫瘍の悪性化と微小環境に関する研究の基盤となるべき、独自の知見を得ることに成功している。具体的には、これまでに研究が進んでいる腫瘍細胞自身の変化による悪性化制御とは異なる形式で腫瘍の悪性化を促進する X 遺伝子欠損マウス(浸潤促進マウス)を発見し、その促進効果に造血系細胞が重要であることを明らかにしている。そこで本研究では、当該促進効果を担う微小環境側の責任細胞を同定し、当該細胞による浸潤促進の分子機構を明らかにすることで、腫瘍の悪性化を促進する新たな微小環境異常の解明を目指す。

3. 研究の方法

1) 微小環境による腫瘍悪性化の促進に重要な細胞種の同定

リンパ球欠損マウスを用いた検討

Rag1 遺伝子欠損による B 細胞、T 細胞、及び NKT 細胞の欠損により、浸潤促進マウスにおける悪性腫瘍率が減少したことから、リンパ球が腫瘍悪性化を制御する可能性が考えられた。そこで、腫瘍悪性化の促進に重要なリンパ球の絞り込みを目的として、Igh6 遺伝子欠損、Cd4 遺伝子欠損、Cd8 遺伝子欠損、または Traj18 遺伝子欠損の各遺伝子欠損を浸潤促進マウスに導入し、それぞれ B 細胞、CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、または NKT 細胞を欠損するマウスを樹立した。それらのマウスにおける腫瘍の悪性度をコントロールの浸潤促進マウスと比較し、各種リンパ球の欠損による腫瘍悪性化の促進に対する影響について検討した。具体的には、直径2mm以上の全腫瘍を対象とする病理学的解析を実施し、悪性度については個々の腫瘍の浸潤の有無及び浸潤深度により評価した。

細胞種特異的 X 遺伝子欠損マウスを用いた検討

上記のとおり、Rag1 遺伝子欠損によるリンパ球の欠損により、浸潤促進マウスにおける悪性腫瘍率は減弱した。一方で、リンパ球非存在化においてもなお腫瘍悪性化の促進が観察されたことから、当該促進効果に対するリンパ球以外の血球系細胞の関与が示唆された。また、上記のリンパ球欠損マウスの結果は浸潤促進マウスにおける腫瘍悪性化促進の責任細胞の同定に十分とは言えない。そこで Cre-loxP システムによる条件付き遺伝子欠損マウスの作出を試みた。すなわち、浸潤促進マウスで欠損している X 遺伝子の両側に loxP 配列を有する flox マウスを EUCOMM より導入し、各種 Cre 発現マウスとの交配をおこなった。細胞種特異的に Cre を発現するマウスとして、Vav-Cre (血球系細胞特異的)、Mb1-Cre (B 細胞特異的)、Lck-Cre (T 細胞特異的)、Csf1r-Cre (骨髄球系細胞特異的)の各種マウスを使用した。得られた各種マウスの腫瘍において、上記と同様の浸潤解析を実施した。

2) 微小環境による新たな腫瘍悪性化促進機構の解明

微小環境による新たな腫瘍悪性化促進の分子機構を理解するためのツールとして、腫瘍組織由来の腫瘍細胞を用いた in vitro 浸潤能評価系を確立した。具体的には、マトリゲルをコーティングした孔径 8 μ m のメンブレンでボイデンチャンパーの上室と下室を隔て、上室に腫瘍細胞(腫瘍組織由来の3次元培養細胞)を播種し、一定時間後の下室への浸潤を HE 染色により評価する系である。上記項目-1の解析から、微小環境による腫瘍悪性化の促進に重要であると考えられた候補細胞をセルソーターにより分取し、腫瘍細胞と共にチャンパーの上室へ播種または上室に腫瘍細胞を播種したチャンパーの下室へ播種することにより、腫瘍細胞との直接または間接共培養をおこない、腫瘍細胞の浸潤能に対する影響を前述の in vitro 浸潤能評価系を用い

て検討した。また、項目-1において絞り込んだ候補細胞に対するサイトカインアレイ解析を実施し、腫瘍悪性化の促進に關与する候補因子（サイトカイン）の同定を試みた。

4. 研究成果

1) 微小環境による腫瘍悪性化の促進に重要な細胞種の同定

リンパ球欠損マウスを用いた検討

浸潤促進マウスにおける各リンパ球の欠損（B細胞欠損、CD4陽性細胞欠損、CD8陽性細胞欠損、またはNKT細胞欠損）は、いずれも腫瘍形成（腫瘍数及び腫瘍径）には影響を与えなかった。一方で、CD4陽性細胞の欠損、及びCD8陽性細胞の欠損は浸潤促進マウスの悪性腫瘍率を低下させた。これらの結果から、CD4陽性及びCD8陽性T細胞は腫瘍の浸潤促進において重要な役割を担うと考えられた。他方、B細胞の欠損やNKT細胞の欠損は悪性腫瘍率に大きな影響を与えなかった。

細胞種特異的X遺伝子欠損マウスを用いた検討

独自に発見したX遺伝子欠損マウス（浸潤促進マウス）における悪性化促進効果には血球系細胞が重要であることを、先行研究の結果明らかにしていた。実際に、新たに作出した血球系細胞特異的X遺伝子欠損マウスにおいて悪性腫瘍率の上昇を認めた。ただし、Csf1r-Creによる骨髓球系細胞特異的X遺伝子欠損マウスは、当該マウスの樹立へ向けた交配を現在継続中であり、解析は未了である。また、Lck-CreによるT細胞特異的X遺伝子欠損マウスは何らかの原因で出生しなかった。そこでCD4-Cre（T細胞特異的Cre）によるT細胞特異的遺伝子欠損マウスの樹立を急いでいる。なお、上記の通りB細胞の欠損は浸潤促進マウスの悪性腫瘍率に大きな影響を与えなかったことから、B細胞特異的X遺伝子欠損マウスの解析は本研究期間中の実施を見送った。

2) 微小環境による新たな腫瘍悪性化促進機構の解明

項目-1の で述べたとおり、CD4陽性及びCD8陽性T細胞が腫瘍悪性化の促進に重要であることが判明した。そこで、新たに確立した腫瘍組織由来の腫瘍細胞を用いた *in vitro* 浸潤能評価系において、浸潤促進マウスの腫瘍から分取したT細胞による腫瘍細胞の浸潤能への影響を検討した。しかしながら、T細胞は腫瘍の浸潤能に影響を与えなかった。また、当該T細胞について、サイトカイン111種類の発現をサイトカインアレイにて解析したが、コントロールのT細胞に比して発現が有意に変動するサイトカインは認められなかった。今後はRNA-seqなどの網羅的な解析により腫瘍促進に重要な候補因子の同定を進める。さらに、T細胞が他の血球系細胞との協調により腫瘍悪性化を促進する可能性を考え、現在、X遺伝子を高く発現するマクロファージに着目し、T細胞との共培養による腫瘍浸潤への影響について検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----