

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03495

研究課題名(和文) M プレブ小胞によるがん分子情報の新規伝達メカニズム

研究課題名(英文) Macrophage-mediated transfer of cancer-derived components to stromal cells creates a pro-tumor microenvironment

研究代表者

田中 正光 (Tanaka, Masamitsu)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20291396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍組織には癌促進的な働きを持つ多様な間質細胞が作られる。その新規機構として、マクロファージMは癌細胞の分泌する細胞外小胞(CEV)をとりこみ、組織内を移動して周辺細胞にその分子情報を再び小胞を媒体として伝搬する事を観察している。その際Mが産生する小胞を形態的特徴からプレブ小胞と捉え、そこに含まれ伝搬される癌細胞由来分子の機能解明を試みた。その中で癌細胞のガングリオシドGM3合成酵素は、小胞を介してMからリンパ球、中皮細胞などに連鎖的に腫瘍促進作用を生じさせる事が分かってきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌をサポートする様々な間質細胞が広範囲に作られる事は、腫瘍の進行を大きく助けている。癌細胞からマクロファージへ、さらに第三の間質細胞へ伝搬する分子特性を明らかにする事で、腫瘍内間質細胞の連鎖的な活性化の様式が見えてくる。今回ガングリオシド代謝酵素などが、その機構に関わる事が分かり、その遮断により腫瘍促進性の間質の拡大を抑制する新規分子治療に繋げてゆきたい。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells create heterogeneous pro-tumor stromal cells in microenvironments. We previously identified that macrophages (M) uptake cancer cell-derived extracellular vesicles (CEV), and transfer some contents to other stromal cells via release of membrane blebs. In this study, we identified that M s incorporated CEVs from GM3 synthase high cancer cells induced immune checkpoint molecules in T cells, thereby caused immunosuppression. In addition, these M s also transformed the peritoneal mesothelial cells, which accelerated peritoneal metastasis. These findings suggest a novel crosstalk of M and other stromal cells via transfer of CEV contents, and GM3 synthase may become a useful targeting molecule.

研究分野：腫瘍生物

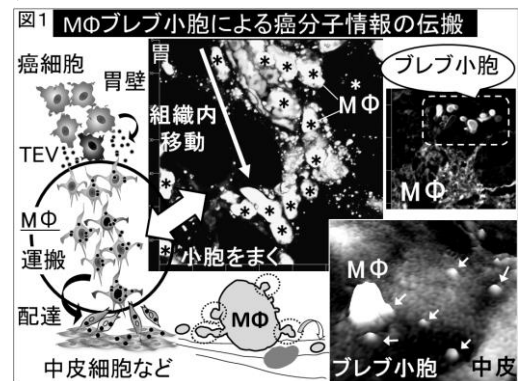
キーワード：がん間質 マクロファージ 中皮細胞 細胞外小胞 情報伝達

1. 研究開始当初の背景

マクロファージ(MΦ)ブレブ小胞によるがん分子情報の新規伝達メカニズム：

細胞間の情報伝達は大きく細胞外への分泌因子に依存するものと、細胞間の接触による直接的な伝達がある。そのうち前者には、サイトカインなどの液性因子と、細胞外小胞(EV)に媒介される伝達機構が存在する。癌の情報が詰まっているため注目される細胞外小胞(CEV: cancer cell-derived extracellular vesicles)は、間質応答の誘因として重要であるが、CEVが腫瘍組織内でどの範囲にどう受け渡されているのかは未解明の部分が多い。例えば線維化組織中でのCEVの拡散範囲は限局的で、既報告でも生体内では癌細胞周辺数十~100 μm程度で他細胞への伝搬を見ている。代表者らは血液などリキッド中で運搬される事は解明の進んでいるEVが、腫瘍局所では組織内でどのように拡散し、間質細胞に分子情報を伝達するのかを検討してきた。

その結果これまでに、腫瘍マクロファージはCEVを取り込み、組織中を広範囲に移動して遠方の間質細胞に癌由来分子を伝搬する事を見出した¹。その機構にはMΦが産生する新規細胞外小胞(ブレブ小胞)が大きく影響していた。そこで腫瘍マクロファージMΦが媒体となり、TEVを広範囲の間質細胞に伝搬する機構のメカニズムと、それにより伝搬される癌由来分子の特性を明らかにすることが重要となった。小胞の単純な拡散ではなく細胞を介した伝搬機構により、その影響はこれまで考えられてきたより広範囲に及ぶ。腫瘍促進性の微小環境が広がり続ける原因として確立できれば、その阻止による新規治療に繋がると考えた(図1)。



2. 研究の目的

腫瘍では様々な間質細胞が連携して癌の進行に有利な微小環境を作っている。MΦが産生する細胞外小胞の一系として、ブレブ小胞を媒体として分子情報を細胞間でリリースする伝達様式を解明する事を目指している。

- (1) 癌細胞由来の分子でMΦブレブ小胞中に伝搬される分子の機能を明らかにする。
- (2) ブレブ小胞が産生される分子機構を解明する。

意義：

癌細胞からMΦへ、さらに第三の間質細胞へ伝搬する分子特性を明らかにする事で、現在未解明の部分が多い、腫瘍を構成する間質細胞間の連携機構の解明に貢献できる。分子情報の伝搬を担うブレブ小胞の産生機構を解明することで、その遮断により腫瘍促進性の間質の拡大を抑制する新規分子治療に繋げることを目指す。

3. 研究の方法

胃癌細胞を主な解析対象として、そのEVを取り込んだMΦがさらに産生する細胞外小胞(ブレブ小胞)の分子(コンテンツ)から、胃癌細胞に由来する分子を抽出する。その特性の分析と個別分子の解析から、癌細胞由来分子がMΦを経てさらに他の間質細胞に与える影響を調べる。その一方で、ブレブ小胞を分泌する分子機序の解明を並行して進める。

・細胞 マクロファージはマウス腹腔から採取し、サイトカイン刺激により活性化(TAM変換)を適宜加えたものを使用した。マウス骨髄細胞は大腿骨・脛骨から採取した。腹膜中皮細胞は、ラット腸間膜から採取したものをを用いた。癌細胞は最も難治性の胃癌であるスキルス型胃癌細胞株を複数(共同研究体制で国立がん研究センターと大阪市立大学から分与されている)を用いた。その他、マウス癌細胞株はATCC細胞バンクより入手した。CAFはスキルス胃癌患者の外科手術サンプルから採集し樹立した細胞株を、同一検体の非癌部線維芽細胞(NF)とセットで複数ペアを大阪市立大学から供与された。また一部の実験では、細胞バンクから購入したヒト胎児由来正常線維芽細胞をNFとして使用した。

・網羅的分子解析

EVを媒介して癌細胞からMΦ、さらに他の間質細胞に伝搬される分子の探索のため、ヒト胃癌細胞株の分泌するEV、および同EVを取り込んだマクロファージ(MΦ:マウ

ス) が二次的に産生したブレブ小胞をそれぞれ回収し、RNA シークエンスを行った。ヒト由来遺伝子の比較解析から、MΦ を経て伝達される癌細胞の分子情報を抽出した。

・分子マーカー、ガングリオシドの発現検討

癌細胞および各種間質細胞の形質獲得や分化状態、GM3 他のガングリオシドは、フローサイトメーターで測定/解析を行った (BD FACS: Aria™ III, Melody; FlowJo software)。

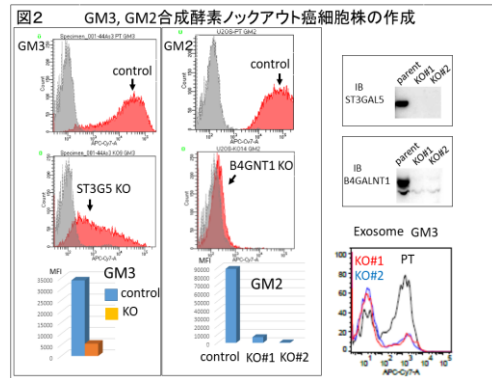
4. 研究成果

(1) MΦ ブレブ小胞中に伝搬される癌細胞由来分子の抽出と機能解析:

(i) MΦ ブレブ小胞内分子の同定と解析候補分子の抽出・遺伝子改変癌細胞の作成:

ヒト胃癌細胞のTEVを取り込ませたマウスMΦが産生するブレブ小胞を回収し、これらに含まれるヒト遺伝子をRNAシークエンス解析で同定し、MΦ 経由で伝搬される癌細胞由来遺伝子 (ヒト遺伝子) を抽出した。抽出分子は、オリジナルの胃癌細胞が直接分泌するEVのコンテンツに含まれている事を確認し、DAVID Bioinformatics Resources 6.8を用いてGO (Gene Ontology)分類を行った。その結果、スフィンゴ糖脂質 (GSL) 代謝分子を多数同定した。特にガングリオシドの合成酵素に着目して絞り込みを行った結果、GM3 合成酵素 (ST3GAL5) と GM2/GD2 合成酵素 (B4GALNT1) を抽出した。

これらのガングリオシド合成酵素分子について、CRSPR/Cas9による遺伝子ノックアウトと再導入により発現量を改変したスキルス胃癌細胞を作成した。遺伝子編集した癌細胞における対象ガングリオシドの発現量の変動は、FACS解析で確認できた。さらに、同分子の改変癌細胞の産生する細胞外小胞においても、GM3などの量的変化をFACSにより確認する事ができた。



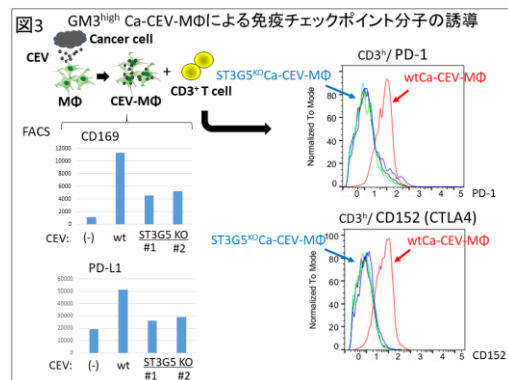
(図2)

(ii) ガングリオシド改変癌細胞のEVによる MΦ、免疫細胞の連鎖的变化について:

最初に、上記遺伝編集癌細胞の細胞外小胞 (CEV) を取り込んだMΦの機能変化について検討した。一般に癌細胞のEVを取り込んだMΦは、極性がシフトして腫瘍随伴マクロファージ (TAM) に移行するが、qRT-PCRによりM1/M2の極性を反映する分子マーカーの変動を検討したところCD206, IL-10などのM2マーカーの上昇が全体に検出されたが各ガングリオシドの改変癌細胞間では顕著な差は見られなかった。

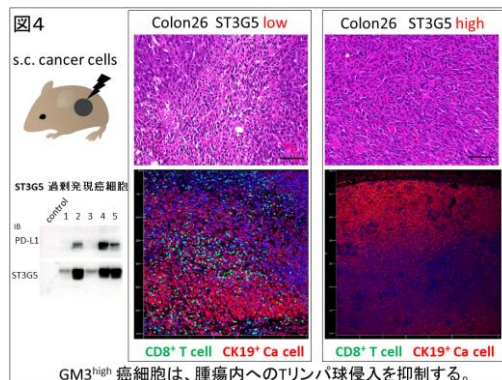
一方、免疫機能を反映する分子をFACSにより検討したところ、野生型癌細胞由来CEVはGM3合成酵素欠失癌細胞CEVに比較し、MΦにおいて免疫抑制性に働くPD-L1, CD169の上昇を強く誘導した。各CEVのMΦへの取り込み率は、ST3GAL5^{-/-}Ca-CEVは野生型Ca-CEVに比較して低かった。これはCEV表面のGM3量の違いに起因すると思われた。GM3はCD169と結合する事が報告されており、CD169陽性MΦへの取り込みを促進する²。野生型Ca-CEVの添加により腹腔MΦにおけるCD169の発現が上昇する事で、CEVの取り込みが加速したと考えられた。

さらにCEV含有MΦとTリンパ球を共培養し、T細胞機能について評価した。野生型癌細胞CEV含有MΦ (wtCa-CEV-MΦ) では、共培養したTリンパ球にCD152 (CTLA4), PD-1の発現上昇を認める一方、ST3GAL5^{-/-}Ca-TEV含有MΦ (ST3G5^{KO}Ca-CEV-MΦ) ではTリンパ球に対して、それらの免疫チェックポイント分子の発現誘導を示さなかった (図3)。Tリンパ球におけるCD152, PD-1の発現上昇は、wtCa-CEVを直接リンパ球に作用させた場合は明瞭でなかった事から、CEV-MΦとの相互作用に依存していた。またその原因として、GM3自体による直接作用以外に、ST3GAL5の改変によるガングリオシド組成の変化に基づく他の分子修飾の結果であると推察された。



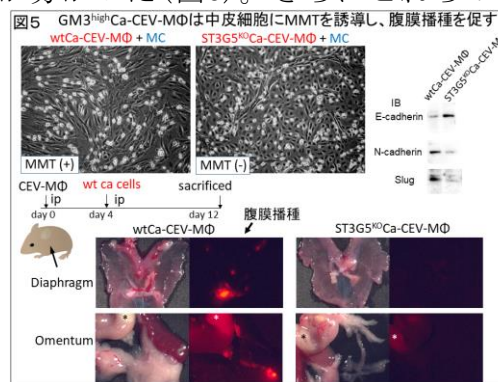
ST3GAL5の高発現するマウス大腸癌細胞株 (colon26) でも同様にノックアウト細胞を作

成し、同系統のマウス皮下にallograft腫瘍を作成した。その結果、ST3GAL5^{-/-}癌細胞では腫瘍中心部付近までNFAT陽性CD8T細胞の侵入が見られる一方で、野生型癌細胞の腫瘍ではCD8T細胞は腫瘍辺縁部にほぼ限局しており、腫瘍内T細胞は少数であった(図4)。以上の結果から、癌細胞におけるST3GAL5の発現は、分泌するCEVのMΦへの取り込みを促進させ、さらにCEV-MΦはT細胞に免疫チェックポイント分子を賦活し、免疫活性を抑制する事で腫瘍内への侵入を阻害する事が分かった。



(iii) ガングリオシド改変癌細胞EVによる MΦ、中皮細胞の連鎖的变化:

次に上記の野生型またはST3GAL5改変胃癌細胞のCEVを取り込んだCEV-MΦが、腹膜中皮細胞に与える影響について調べた。中皮細胞は、癌関連線維芽細胞(CAF)様に転換する事で(中皮-間葉転換:MMT)、がんの浸潤を助ける事が知られている。最初に私達は、CEV-MΦがブレブ小胞の伝搬を介して中皮細胞のMMTを誘導する事を見出した¹。この事は胃癌組織においては、CEV-MΦが胃外壁の漿膜中皮細胞のMMTを誘導し、癌細胞の深部浸潤に先行して好環境なニッチを漿膜下組織に準備する現象にも関わっていた³。そこで、この中皮細胞のMMTに対して、起因となる癌細胞のST3GAL5/GM3が重要であるかを検討した。In vitro: 中皮細胞とwtまたはST3G5^{KO}Ca-CEV-MΦを共培養し、中皮細胞のMMTを形態学的、およびMMT関連分子マーカーの発現により比較した。その結果、ST3G5^{KO}Ca-CEV-MΦはMMTの誘導能が弱化する事が分かった(図5)。さらにこれらのCEV-MΦが分泌した小胞(ブレブ小胞)を採取し、単独培養の中皮細胞に添加してMMT比較を行った場合でも同様の結果が得られた。In vivo: ノードマウス腹腔にwtまたはST3G5^{KO}Ca-CEV-MΦのブレブ小胞を先行投与し、数日後に同数のwt癌細胞を腹腔注射して腹膜播種を比較した。その結果、予想通りにST3G5^{KO}Ca-CEV-MΦ由来小胞では腹膜播種が弱かった(図5)。これは先行投与したブレブ小胞による、腹膜中皮細胞のMMTの程度差に依存していた。



(2) MΦブレブ小胞の形成に関わる分子メカニズム:

先行研究において、CEV-MΦのブレブ小胞の産生は(i)線維芽細胞や中皮細胞など他の間質細胞との接触により増強する事、(ii)ブレブ小胞形成には局所的なRhoA-ROCKの活性化が重要である事を観察していた¹。近年、癌細胞の産生する大型の細胞膜小胞(Large Oncosome: LO)が報告されており、形態的にMΦブレブ小胞に類似している⁴。癌細胞LOの産生においても、Rho-ROCK経路の活性化によるミオシン軽鎖リン酸化(pMLC)が報告されている⁴。そこでCEV-MΦにおいて調べると、線維芽細胞や中皮細胞との接触によりCEV-MΦでpMLCの亢進が認められ、ミオシン軽鎖のリン酸化酵素であるMLCKの阻害薬(ML-7)により、CEV-MΦのブレブ小胞産生が抑制された。

さらにCEV-MΦにおいてRhoA-ROCK-MLCK-pMLC経路のトリガーとして働く、細胞間接触で活性化される細胞膜蛋白質の同定を試みた。その中で、Eph受容体とそのリガンド ephrinに着目した。Eph/ephrinは共に1型細胞膜貫通蛋白質であり、其々Eph発現細胞と ephrin発現細胞間の直接接触により双方が活性化される。代表者らは先行研究で、Eph/ephrinの活性化によりRhoA-ROCK経路が賦活化される事を見出しており⁵、また他グループから最近同ファミリーがCAFなど微小環境中の間質細胞でも重要な役割をもつ事が報告されている。CEV-MΦと線維芽細胞との接触によるブレブ小胞産生における、Eph/ephrinファミリー分子の発現検討、候補分子のノックダウンによるブレブ小胞産生の阻害効果の評価を行った。CEV-MΦではephrin-Bの発現を認め、またCAFやNFにおいてはEphB3, 4などの発現が確認された。MΦにおいてephrin-B1, 2をノックダウンしたところ、CAF/NF線維芽細胞との共培養でブレブ小胞形成の抑制が認められた。また、この過程でephrin-Bを発現する癌細胞を用いて線維芽細胞との接

触による L0 の産生も検討してみたところ、同様に ephrin-B の発現抑制により L0 産生の低下を認め、一部の癌細胞における Large Oncosome の形成と CEV-MΦ のブレブ小胞形成は類似した機構である事が示唆された。以上から、ブレブ小胞形成機序の 1 つとして ephrin-B/RhoA/ROCK/pMLC 経路の活性化が重要であると考えられた。(論文投稿準備中)

CEV-MΦ によるブレブ小胞形成は広範囲に癌細胞に対する反応性のニッチを形成し、癌の進展を増悪させる一因になる事が予想される。今後、GM3 合成酵素などを軸にその連鎖を遮断する治療法の開発に繋がりたい。

#1 *Oncogene* 38, 2162-2176, 2019. #2 *Nat Commun* 5, 4136, 2014. #3 *Cancer Research* 77 (3), 684-695, 2017. #4 *Cytokine & growth factor reviews* 51, 69, 2020. #5 *EMBO J* 22, 847, 2003.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tanaka M	4. 巻 72
2. 論文標題 Crosstalk of tumor stromal cells orchestrates invasion and spreading of gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathol Int	6. 最初と最後の頁 219-233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1878-0261.13077	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 -
1. 著者名 Takagane K, Umakoshi M, Itoh G, Kuriyama S, Goto A, Tanaka M	4. 巻 41
2. 論文標題 SKAP2 suppresses inflammation-mediated tumorigenesis by regulating SHP-1 and SHP-2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 1087-1099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-021-02153-1	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 Umakoshi M, Takahashi S, Itoh G, Kuriyama S, Sasaki Y, Yanagihara K, Yashiro M, Maeda D, Goto A, Tanaka M	4. 巻 38
2. 論文標題 Macrophage-mediated transfer of cancer-derived components to stromal cells contributes to establishment of a pro-tumor microenvironment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2162-2176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-018-0564-x.	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 Itoh G, Takagane K, Fukushi Y, Kuriyama S, Umakoshi M, Goto A, Yanagihara K, Yashiro M, Tanaka M	4. 巻 16
2. 論文標題 Cancer-associated fibroblasts educate normal fibroblasts to facilitate cancer cell spreading and T cell suppression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Oncol	6. 最初と最後の頁 166-187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1878-0261.13077	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 Kuriyama S, Tanaka G, Takagane K, Itoh G, Tanaka M	4. 巻 12
2. 論文標題 Pigment Epithelium Derived Factor is involved in the late phase of osteosarcoma metastasis by increasing extravasation and cell-cell adhesion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Oncol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2022.818182	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 -

1. 著者名 Sasaki Y, Takagane K, Konno T, Itoh G, Kuriyama S, Yanagihara K, Yashiro M, Yamada S, Murakami S, Tanaka M	4. 巻 112
2. 論文標題 Expression of Asporin reprograms cancer cell to acquire resistance to oxidative stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1251-1261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14794.	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17件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田中正光
2. 発表標題 Cancer associated fibroblasts educate norml fibroblasts to facilitate cancer cell dissemination
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 栗山 正、田中正光
2. 発表標題 PEDF overexpression in osteosarcoma cell line increases the endothelial permeability and promotes metastasis
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 伊藤 剛、田中正光
2. 発表標題 Proliferation and invasion-geometry of giant cancer cells cooperating with stromal cells
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 高橋 壮、田中正光
2. 発表標題 CCDC85A is regulated by miR-224 and alters migration and proliferation of pancreatic cancer cells
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 田中正光
2. 発表標題 Contribution of Giant and/or multinucleated cancer cells to tumor progression
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 剛、田中正光
2. 発表標題 マクロファージ、CAF、癌細胞が強調したMMP9産生と活性化および、癌への関与
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中正光
2. 発表標題 スキルス胃癌における間質細胞ネットワークの解析
3. 学会等名 第66回日本病理学会秋期特別総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中正光
2. 発表標題 がんサポート線維芽細胞CEFの産生機構
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中正光
2. 発表標題 CAFにより教育された線維芽細胞の特性変化
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 栗山 正、田中正光
2. 発表標題 PEDF is required for extravasation and mesenchymal to epithelial like transition of osteosarcoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤 剛、田中正光
2. 発表標題 Dynamics of giant cancer cells cooperating with CAF
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中正光
2. 発表標題 Expansion of heterogenous pro-tumor stromal cells in scirrhou gastric cancer
3. 学会等名 第93回日本胃癌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中正光
2. 発表標題 Asporinによる癌細胞の酸化ストレス抵抗性獲得と免疫抑制作用
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中正光
2. 発表標題 Asporin reprograms cancer cells to acquire resistance to oxidative stress and immunosuppression
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 栗山 正、田中正光
2. 発表標題 PEDF-lamR signaling increases extravasation and organization of tumor tissues
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤 剛、田中正光
2. 発表標題 Dynamics of giant cancer cells in tumor microenvironment
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高金くらら、田中正光
2. 発表標題 SKAP2 suppresses inflammation mediated carcinogenesis by recruitment of SHP-1 and SHP-2 to TLR4
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>秋田大学大学院医学系研究科 分子生化学講座HP http://www.med.akita-u.ac.jp/~seika2/Akita_Univ._Dept._Molecular_Biochemistry/youkoso.html</p>

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	栗山 正 (kuriyama sei) (30398226)	秋田大学・医学系研究科・准教授 (11401)	
研究分担者	伊藤 剛 (Itoh Go) (60607563)	秋田大学・医学系研究科・助教 (11401)	

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