

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16841

研究課題名（和文）腫瘍リンパ管に関わる標的分子の探索と細胞治療への発展

研究課題名（英文）Investigation of target molecules involved in tumor lymphangiogenesis and their development towards cellular therapy.

研究代表者

前花 祥太郎（MAEHANA, Shotaro）

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：40803177

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者らが独自に進めてきた遺伝子改変細胞治療法を、腫瘍リンパ環境を標的として応用し、癌微小環境の制御と転移抑制に向けた網羅的分子の探索を行った。初めにレトロウイルスベクターを用いて高いsVEGFR-3蛋白質を産生する治療細胞並びに腫瘍細胞株を樹立した。これらの樹立細胞を用いて、生体外におけ腫瘍細胞に与える影響とマウスモデルにおけるリンパ行性転移の評価と網羅的解析により、腫瘍リンパ環境に、細胞外マトリックスや増殖因子、ケモカインを代謝するマトリックスメタロプロテアーゼが重要であることが示唆され、新たな治療分子候補となる可能性が期待されたため、今後の新たな細胞治療への応用を考えたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん患者の治療においては、外科手術や薬物治療などの直接的にアプローチする本体的治療とともに、がん治療において発生する副作用を軽減する支持療法が不可欠であり、全身投与による血小板減少・顆粒球減少・骨髄抑制など様々な副作用が生じる患者への負担を軽減する治療法が望まれる。本研究の細胞治療では、がん組織局所において薬剤濃度を高め、血中の治療物質濃度を高めないメリットがある。本研究により肺組織と周囲リンパ節への転移に関わるVEGF-Cの役割と新たな治療候補分子を解析することができたことから、がん患者の治療による負担軽減へつなげる治療法の開発へとつなげることを期待する。

研究成果の概要（英文）：The investigators conducted an exploration of comprehensive molecular components for controlling the cancer microenvironment and suppressing metastasis by applying a genetically modified cell therapy that they have independently developed, targeting the tumor lymphatic environment. Initially, therapeutic cells and tumor cell lines were established using retroviral vectors to produce high levels of sVEGFR-3 protein. Using these established cells, the effects on tumor cells in an extracellular environment and the evaluation and comprehensive analysis of lymphatic metastasis in mouse models were performed. The results suggested the importance of matrix metalloproteinases, which metabolize the extracellular matrix, growth factors, and chemokines in the tumor lymphatic environment. These findings indicated the potential of matrix metalloproteinases as novel therapeutic candidates, and therefore, the application of this knowledge to new cell therapies in the future is worth considering.

研究分野：細胞療法

キーワード：欠損ウイルスベクター 細胞療法

## 1. 研究開始当初の背景

細胞治療法は、幹細胞や iPS 細胞による再生医療や T 細胞による免疫療法などで注目されており、近年、再生医療や輸血、がん治療などにもその応用性が期待されている。申請者が独自に行う遺伝子改変細胞治療法は、レトロウイルスベクターを用いて治療分子を病巣局所に持続投与する治療法である。この治療法の利点は、細胞を投与した疾患部位に最も高い濃度で治療物質を作用させ、全身への副作用を低減できることであり、全身投与できないような様々な物質も利用できる (Int J Cancer Ther Oncol. 2016)。申請者はかねてよりこの遺伝子改変細胞治療法を用いて、がん間質に着目した研究を行ってきた。申請者は、遺伝子改変細胞治療を用いて脂質メディエーターの一つであるプロスタグランジン D 合成酵素 (PGDS) 産生細胞を用いて、PGD2 やその二次代謝産物が慢性炎症において抗炎症性に働くとともに、血管新生における血管リモデリングの促進にマクロファージや血管内皮増殖因子 Vascular endothelial growth factor (VEGF) が関与することを報告した。脈管形成に最も重要な因子の一つである VEGF ファミリーの中でも VEGF-C は主にリンパ管発生やリンパ管新生に関与する。申請者はこれまでに VEGF-A 及び VEGF-C の抑制分子として期待された可溶性 VEGFR-2 を用いた研究から、肺癌モデルマウスにおいて、VEGF-C のみを選択的に阻害することにより、リンパ節転移が抑制される成果を示した。腫瘍組織においては細胞外基質分解酵素などの分子が関与することが明らかとなり、がんのリンパ管新生にマクロファージが介在することが示唆された (Maehana et al. Biomed Pharmacother. 2016)。VEGF-C の働きは、リンパ管内皮細胞の増殖・遊走を介した病的リンパ管新生だけでなく、VEGFR-2 や VEGFR-3 を発現する間質細胞への作用や癌細胞自身に対しても働くことが示唆されたが、その詳しい機構はまだわかっていない。

## 2. 研究の目的

申請者が独自に行う遺伝子改変細胞治療法は、細胞を投与した疾患部位に最も高い濃度で治療物質を作用させることで、全身への副作用を低減でき、全身投与できないような様々な物質も利用できる。本研究の目的は、この遺伝子改変細胞治療法を介して、組織移行性や半減期が低いなど物質の特性上アプローチできなかった治療を施行し、これまで明らかにできなかった病態の解析を行うことである。本申請では、未だ治療法の確率されていない腫瘍リンパ管を標的とした遺伝子改変細胞治療を用いることにより、分子生物学的解析やショットガンプロテオミクス解析の網羅的なアプローチから、リンパ管を中心としたネットワークに関わる分子メカニズムを明らかにするとともに、臨床応用に向けた基礎研究基盤を確立する。

## 3. 研究の方法

遺伝子改変細胞治療により微小リンパ管の制御を行うため、標的分子のクローニングと、レトロウイルスベクターを用いた細胞株を樹立する。可溶性 VEGFR-3 は内因性の VEGF-C 抑制因子である VEGFR-3 遺伝子のイムノグロブリン様 1~3 ドメインに Fc レセプターを結合した分子である。この遺伝子をレトロウイルスベクター pDON-5 Neo に組み込み、一回限りの感染性を持つ組換えウイルスを作成した。マウスモデルにおける治療細胞としてマウス線維芽細胞 C57 に感染させ、遺伝子改変細胞 (C57-sVEGFR-3) を作成した。遺伝子改変細胞より DNA, RNA, 蛋白質を抽出し、PCR, RT-PCR, western blotting 法にてそれぞれ sVEGFR3 遺伝子、転写物、産物を確認し、VEGF-C との結合能は、リコンビナント VEGF-C を用いた binding ELISA を用いて解析した。細胞療法の実験となる C57 細胞には、安全性を向上させるため自殺遺伝子 HSV-tk 及びレポーター遺伝子 EGFP をそれぞれ pLHCX ベクター及び pLEGFP ベクターを用いて導入し細胞を樹立した。新たに同定された新規治療物質も同様の手法を用いて遺伝子改変細胞株として樹立する。また腫瘍細胞に対して sVEGFR-3 遺伝子導入することにより、腫瘍細胞の周囲の間質組織に対して、持続的に VEGF-C 阻害効果をもたらす細胞株を樹立し、マウス肺同所移植モデルへと移入し、肺組織並びに周辺リンパ節への転移の解析、並びに網羅的解析による新規治療標的分子の探索を行った。

## 4. 研究成果

### (1) Soluble VEGFR-3 遺伝子のクローニング (図 1)

Human sVEGFR-3-Fc 遺伝子は、ヘルシンキ大学より譲渡を受けた pAd-CMV-hVEGFR-3 から、Hind III/Xho I により切断し、pBlueScript II SK へサブクローニングした (pBlueScript-sVEGFR-3)。さらに pBlueScript-sVEGFR-3 を Apa I/Not I により切断し、pDON-5 Neo の制限酵素にクローニングした (pDON-sVEGFR-3)。クローニングした sVEGFR-3 遺伝子は、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いて塩基配列の確認を行った。

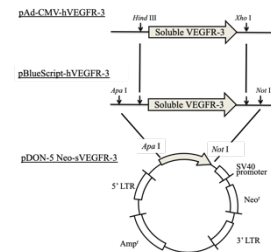


図1 sVEGFR-3遺伝子のクローニング

## (2) レトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入

pDON-sVEGFR-3はウイルス粒子構成遺伝子 gag, pol, env を欠損しているため、これらの構成蛋白を産生するパッケージング細胞 PT67 に導入されたときの一過性の感染性を有するウイルスを産生する。欠損レトロウイルスベクターを  $5 \times 10^4$  個/well の条件下で PT67 にトランスフェクションし、Geneticin 添加培地中でセクションを行い、一過性の感染性を有する組換えレトロウイルス DON-5 Neo を産生する細胞を選択した (PT67-DON-5 Neo)。組換えレトロウイルスの感染価を測定するために細胞培養上清をフィルター濾過し、組換えレトロウイルス DON-5 Neo を含むウイルス液を回収し、NIH/3T3 細胞に感染させることで、産生されたウイルス (DON-sVEGFR-3) の感染力価を測定した (図 2)。感染価は、Retroviral Gene Transfer and Expression User Manual (Clontech) に従い求めた結果、約  $10^3$  cfu/ml であったことから、培養細胞へ DON-sVEGFR-3 を  $MOI=10^{-4}$  の 1 細胞につきウイルスが 2 つ以上感染しない条件下で感染させ、G418 添加培地を用いてセクションを行った。コントロールは pDON-5 Neo 空ベクター (empty vector : EV) を用いて、上記と同様の方法にて、一過性の感染性を有するウイルス (DON-EV) を作成し、培養細胞へ感染させ、G418 によりセクションを行い作成した。

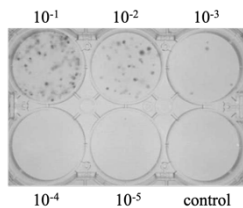


図2 一度限りに感染性を持つ欠損組換えレトロウイルスの感染力価

## (3) 樹立した細胞の遺伝子発現と分泌された VEGF-C への結合性

作成した細胞は real time RT-PCR により sVEGFR-3 mRNA の発現を、Western blotting により sVEGFR-3 蛋白質の発現を確認した (図 3A)。細胞より産生された sVEGFR-3 と VEGF-C との結合を確認するため、VEGF-C リコンビナントを固相化した binding ELISA を構築し、その結合性を検出したところ、sVEGFR-3 細胞培養上清で、対照である C57-EV 細胞上清と比較し、吸光度が有意に上昇した (図 3B)。

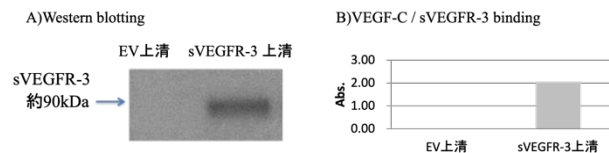


図3 sVEGFR-3蛋白質発現とVEGF-Cへの結合性

## (4) sVEGFR-3 が与える腫瘍細胞への直接的影響

腫瘍細胞の中には、自ら血管内皮増殖因子を産生し、自身の細胞分裂を促進するものが報告されている。このことから、樹立した細胞にける細胞増殖性に違いがあるかを細胞増殖アッセイにて検討したところ、有意な差を認めなかったことから、sVEGFR-3 は腫瘍細胞に対して直接的な増殖抑制を示さないことが明らかとなった。

## (5) がん転移関連分子

腫瘍細胞を C57BL/6 マウスおよび BALB/c-nu/nu マウスに移植し、担癌マウスモデルを作成し、リンパ行性転移実験を実施した。C57BL/6 マウスを用いた肺同所移植モデルでは、肺実質への生着および増殖を確認し、リンパ行性に転移した所属リンパ節から腫瘍細胞を初代培養することに成功した。BALB/c-nu/nu マウスを用いたヒト腫瘍細胞株の担癌モデルでは、肺実質への生着と増殖が確認されたものの、所属リンパ節への転移は確認されなかったため、肺実質腫瘍および胸腔播種した腫瘍細胞を再培養し、再度肺実質からリンパ節への転移をチャレンジすることで転移性腫瘍の獲得を目指して繰り返し実験を行なっている。これらのことは、リンパ行性転

移は腫瘍細胞のみの性状によって決まるのではなく、腫瘍形成過程における炎症反応と宿主に由来する浸潤細胞が腫瘍細胞の転移に影響を与えているものと考えられた。網羅的な遺伝子解析からは、腫瘍組織におけるリンパ管新生に関わる遺伝子の著しい変動を認めなかった。一方組織細胞間の細胞外マトリックスや増殖因子、ケモカインを分解・代謝する MMP 遺伝子ではその差を見ることができた。特に MMP-2 や MMP-9 遺伝子は基底膜 IV 型コラーゲンの分解酵素であり、内皮管腔への浸潤や組織増殖因子の組織内遊離が転移を促進する可能性が示されていることから、がん転移関連分子としてのターゲットとなる可能性が考えられた。MMP 遺伝子には Tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) がその制御に働いている。このことから、これらの MMP に対して可溶性 TIMPs などを開発することにより、細胞治療による局所的な機能抑制と、リンパ管などを会した周囲組織への転移の抑制に働く作用を期待できると考えた。

#### (6) 安全性を向上した治療細胞の作成

本研究の細胞治療は遺伝子組換え技術を用いて、治療物質を高度に産生する治療細胞を作成し、病変部へと移植することで、局所治療並びに濃度勾配に従った周辺組織へ治療物質が作用する。治療細胞は生体内に一時的に定着し、一回の投与により、比較的長期間かつ持続して治療効果を期待できることがメリットの1つである。しかしながら、その反面で必要期間以上の生体への正着やがん化は、本研究の治療細胞に限らず、ES 細胞や iPS 細胞由来の細胞を生体に移植する際には常に配慮を払う必要のある問題である。そこで本研究では、治療終了後の細胞除去とより安全な細胞治療の確立のため、自殺遺伝子を組込んだ治療細胞を作成した。自殺遺伝子には HSV-tk 遺伝子を用い、ガンシクロビル投与により細胞のプログラム死を誘導できるよう設計した。EGFP 遺伝子とともに導入し、作成した C57/tk/EGFP 細胞は、ガンシクロビル添加培地中にて速やかに反応し、約 48 時間時点から細胞死が見られ、その 1 週間培養を継続しても細胞の再増殖は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 MAEHANA Shotaro, MATSUMOTO Yuta, KOJIMA Fumiaki, KITASATO Hidero	4. 巻 39
2. 論文標題 Interleukin-24 Transduction Modulates Human Prostate Cancer Malignancy Mediated by Regulation of Anchorage Dependence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3719 ~ 3725
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13520	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 Shinya Harada, Hayato Kawada, Shotaro Maehana, Hidehito Matsui, Makoto Kubo, Fumiaki Kojima, Hidero Kitasato, Masato Katagiri	4. 巻 21
2. 論文標題 Panton-Valentine leukocidin induces cytokine release and cytotoxicity mediated by the C5a receptor on rabbit alveolar macrophages.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 352-358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7883/yoken.JJID.2020.657	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
---------------------------	-----------------------	----

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