

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07592

研究課題名（和文）抗腫瘍獲得免疫・NK細胞非依存の新規がん転移抑制ニッチの解明および治療応用

研究課題名（英文）Elucidation and therapeutic application of a novel metastasis-suppressing niche independent of anti-tumor immunity and NK cells

研究代表者

弓本 佳苗（Yumimoto, Kanae）

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：30596838

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：われわれはがん細胞を予め移植したマウスでは、従来よく知られているがん転移促進ニッチとは異なり、転移先にはがん転移抑制ニッチが形成されることを発見した。これらは3種類のがん細胞（B16F10, LLC, E0771）の移植いずれも共通して検出される現象であった。がんニッチ細胞のFACS解析やsingle RNA seq解析から、がん転移抑制ニッチに集積する細胞群や減少する細胞群を発見した。また、肺や末梢血のELISA解析により、がん細胞移植依存的に増加・減少する液性因子を発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
がん患者の死因の大半は転移であり、転移を抑制できればがん患者の予後改善につながる我々の発見はがんの存在により転移が抑制されるというものだが、手術後等、がんの非存在下でも転移抑制環境を構築できれば、予後改善につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：We found that, a cancer metastasis-suppressing niche is formed at the metastatic site in mice pre-implanted with cancer cells, in contrast to the well-known cancer metastasis-promoting niche. These phenomena were commonly detected in all three types of transplanted cancer cells (B16F10, LLC, and E0771). Based on FACS and single RNA seq analyses of cancer niche cells, we found groups of cells that accumulated in the metastasis suppression niche and groups of cells that decreased in the niche. In addition, ELISA analysis of lung and peripheral blood revealed liquid factors that increase or decrease in a cancer cell transplantation-dependent manner.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん転移は癌患者の最大の死因であり、転移の分子機構の解明は治療戦略に重要な知見をもたらす。近年、がん転移は癌細胞の遺伝的変化だけではなく、宿主環境との関係性が注目されるようになった。特に骨髄由来細胞が腫瘍の周りに集積してニッチを形成し、原発腫瘍の成長を促進するのみならず異なる臓器への転移拡散を促進すること、また転移先の臓器においても転移ニッチが形成され転移を促進することが明らかになってきた。さらに、がん原発から産生された液性因子が、血流等を介して全身に影響し、がん細胞が転移する前に“前転移(促進)ニッチ”を形成することも報告されていた。

2. 研究の目的

われわれは“前転移(促進)ニッチ”のさらなる理解のため、がん細胞(原発がん)を予め皮下や乳腺脂肪体等に移植したマウスに、尾静脈より別のがん細胞(転移がん)を移植する実験を行った。定説によると、この実験系では原発がんが転移がんの増殖を促進するとされてきたが、[Hiratsuka et al., Nat. Cell Biol. (2006)]、われわれが同様の実験を行ったところ、原発がんの存在は転移がんの増殖を促進せず、むしろ尾静脈から移植したがんの肺転移を劇的に抑制していることが判明した。本研究課題の目的は、われわれが発見したこの“前転移抑制ニッチ”が、どのような分子・細胞メカニズムで形成されるかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

蛍光標識した B16F10, LLC E0771 がん細胞(原発がん)を予め皮下や乳腺脂肪体等に移植した B6 マウスを作製し、がんの生着を確認した後、尾静脈より別の色で蛍光標識をしたがん細胞(転移がん)を移植する実験系を確立した。この系の種々の段階で肺を摘出し、FACS 解析や single-cell RNA-seq 解析をおこなって、どのような細胞が転移抑制ニッチに集積しているかを検証した。また、肺や末梢血の ELISA 解析をおこない、どのような液性因子が変動しているかを検証した。さらに、候補となった細胞群や液性因子に関して、マウスへの投与実験をおこない、真にがん転移の抑制に関与しているかどうかを検証した。

4. 研究成果

1) “前転移抑制ニッチ”細胞の詳細な解析

先に述べた通り、我々の実験系では、がん細胞を予め皮下もしくは乳腺脂肪体等に移植したマウスにおいては、尾静脈から移植した別のがん細胞の肺への転移が減少する。この原因を探るため、尾静脈移植するタイミングの肺に関して種々の解析をおこなった。

FACS 解析

肺をコラゲナーゼでバラバラにした後、血球細胞(CD45+)を種々のマーカー抗体で染色し、どのような細胞が変動しているかを解析した。その結果、大半の細胞は変化していないか、もしくは変動が移植した3種の細胞で異なっていたが、とある特殊な細胞群 A は3つの細胞で同じ変動を示した。この細胞群 A はヒト非小細胞肺癌の single-cell RNA-seq データを解析したところ、ヒト肺にも同様にがん部位に集積していることがわかった。現在は、この細胞群を移植することにより、がん転移に影響があるかどうか検証をおこなおうとしている。また、E0771 細胞を移植したマウスにおいては、マクロファージの一群 B が減少していることを見出した。薬剤によりこの細胞を欠損させたマウスにおいては、CD4+細胞が上昇しており、がん転移が抑制された。

さらに、転移量と最も相関する細胞群として、細胞群 C を同定した。この細胞群をマウスより単離して B16F10 細胞と共培養した後、B16F10 細胞を尾静脈より移植すると、他の細胞群との共培養およびコントロールと比較してがん転移が亢進することがわかった。

single-cell RNA-seq 解析

E0771 細胞を移植したマウスにおいては、CD4+細胞が優位に上昇していた。そこで E0771 細胞を移植したマウスから CD4+細胞を回収し、single-cell RNA-seq 解析をおこなって、がん細胞を移植していないマウスと比較して CD4+細胞の中のどのようなサブクラスターが変動しているかの解析をおこなった。その結果、Cluster 5 についてはがん移植マウスに集積しており、Cluster 6 についてはがん移植マウスで減少していることを見出した。Cluster 6 については細胞表面にマーカーとなるタンパク質を発現しており、FACS 解析においても、がん移植マウスで Cluster 6 細胞群が減少していることを確認した。現在はこのマーカー遺伝子を T 細胞特異的にノックアウトすることによりがん転移が抑制可能かの検証をおこなおうとしている。

2) “前転移抑制ニッチ”を形成する液性因子の解析

尾静脈移植するタイミングの肺や末梢血の ELISA 解析をおこない、どのような液性因子が変動しているかを検証した。その結果、3種のがん細胞移植マウスに共通して上昇する液性因子 D および減少する液性因子 E を発見した。この液性因子 E ががん転移抑制に関与しているかを検証

するため、がん細胞移植マウスに液性因子 E 組み換えタンパク質を投与すると、肺への細胞群 A の蓄積がキャンセルされた。このことより、液性因子 E は細胞群 A の肺への集積の減少に関与していることが示唆された。

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 1件）

1. 著者名 Yumimoto Kanae, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 67
2. 論文標題 Recent insight into the role of FBXW7 as a tumor suppressor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Seminars in Cancer Biology	6. 最初と最後の頁 1~15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.semcancer.2020.02.017	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 Yumimoto Kanae, Yamauchi Yuhei, Nakayama Keiichi I.	4. 巻 12
2. 論文標題 F-Box Proteins and Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1249~1249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12051249	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 杉山成明、弓本佳苗、久保田晋平、高橋恵生、宮園浩平、中山敬一
2. 発表標題 原発腫瘍によって誘導される転移抑制的な微小環境の解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 弓本佳苗、高橋大輔、中山敬一
2. 発表標題 Keap1のコピキチン化活性の「減弱」は動物の陸上進出に必要な分子進化である
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yumimoto K., Sugiyama S., Takahashi D., Nakayama K.I.
2. 発表標題 Molecular evolution of Keap1 was essential for adaptation of vertebrates to terrestrial life
3. 学会等名 The 31st Hot Spring Harbor International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉山成明、弓本佳苗、久保田晋平、高橋恵生、宮園浩平、中山敬一
2. 発表標題 原発腫瘍が転移巣の微小環境に及ぼす抑制的作用の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 弓本佳苗、高橋大輔、中山敬一
2. 発表標題 Keap1の分子進化は生命の陸上生活への適応に必須である
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 本村早麗、弓本佳苗、中山敬一
2. 発表標題 Fbxw7に非依存的な新規c-MYC分解機構の発見
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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
---------	---------