

令和 5 年 5 月 1 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09048

研究課題名（和文）食道癌リンパ節転移を支配する決定的なRNA修飾（エピトランスクリプトーム）の解明

研究課題名（英文）RNA modification affecting lymph node metastasis in esophageal cancer

研究代表者

本山 悟（Motoyama, Satoru）

秋田大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：60292372

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：癌のリンパ節転移の分子機序は不明である。本研究は癌のリンパ節転移に重要な制御遺伝子を同定することを目的として行った。In vivo継代で作成した悪性度の高いNR-S1M転移株を用いてRNA-seq解析を行い、転移株ではサイトカインネットワークが破綻し、がん組織の一部の領域で抗腫瘍免疫細胞の割合が顕著に低下していることを発見した。遺伝子リストからGalectin分子に着目した。CRISPR-Cas9を用いてGalectin分子欠損株を作成しマウスに移植した結果、コントロール群に比べリンパ節転移が顕著に抑えられることが判明した。Galectin分子が特異的転移誘導因子であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNA-Seq及びVisium空間的トランスクリプトーム解析から見出したGalectin分子が癌リンパ節転移における重要な因子であることが示唆された。近年、がん抗原ワクチン療法、免疫チェックポイント阻害療法、CAR-T療法の開発など、癌治療において腫瘍免疫学は最も期待されている分野である。本研究におけるGalectin分子の免疫抑制分子機序の解明は、腫瘍免疫学分野からの新たなリンパ節転移治療法の開発につながる重要な基礎研究になる。

研究成果の概要（英文）：Lymph node (LN) metastasis predicts poor prognosis in esophageal cancer patients, whereas the underlying mechanisms remain. Using a syngeneic mouse squamous cell carcinoma (SCC) model of NR-S1M cells, we isolated metastasized NR-S1M cells from LNs in tumor-bearing mice and established metastatic NR-S1M cells in in vitro culture. RNA-seq analysis revealed that interferon gene signature was markedly downregulated in metastatic NR-S1M cells compared with parental cells, and in vivo NR-S1M tumors heterogeneously developed focal immunosuppressive areas featured by deficiency of anti-tumor immune cells. Spatial transcriptome analysis (Visium) for the NR-S1M tumors revealed that Galectin-7 was a novel metastasis-driving factor. Deletion of Galectin-7 in NR-S1M cells significantly suppressed LN metastasis without affecting primary tumor growth. Galectin-7 is a new crucial mediator LN metastasis.

研究分野：消化器外科

キーワード：リンパ節転移 Galectin 腫瘍免疫

## 1. 研究開始当初の背景

固形癌患者の予後を決める因子は「転移」であるが、研究開始時は「リンパ節転移」に関する研究成果は乏しい状況であった。臨床医にとって所属リンパ節転移は、いわゆる「初期の転移・まだ治せる転移」として治療の対象となり、「リンパ節転移を制するものが癌を制す」と言われ続けてきたこの半世紀で、リンパ節転移は外科手術がコントロールするべきものとされてきたが、その制御能は限定的であり、現在、根本的な治療法の確立が求められている。本研究課題では、「主病巣からのリンパ節転移を支配する決定的な遺伝子制御があるのか？」を解明することであった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は「固形癌のリンパ節転移を支配する決定的な遺伝子関与の存在を解明すること、および決定的な遺伝子関与があればその特定遺伝子を解明すること」である。

## 3. 研究の方法

in vivo passage 法により作成したリンパ節転移マウスモデル

腫瘍増殖速度とリンパ節転移頻度がともに上昇し、最終的にはほぼ 100%リンパ節転移を引き起こす「高頻度リンパ節転移がん細胞（高転移細胞）」と、起源は同じながら in vitro 継代で転移能を消失させた「低頻度リンパ節転移細胞（低転移細胞）」を単離した。さらにそれらの細胞株を皮下に移植して鼠径リンパ節転移を引き起こさせる「リンパ節転移マウスモデル」を作成して以下の実験を行った。

RNA-seq 解析

トータル RNA を抽出し DESeq2 アルゴリズムを使って遺伝子発現量の差異を調べた。

Visium空間的トランスクリプトーム解析

50 μm の解像度で位置情報を反映した約 5,000 スポットの遺伝子発現プロファイルを取得しクラスタリング解析を行った。

特定遺伝子の抽出

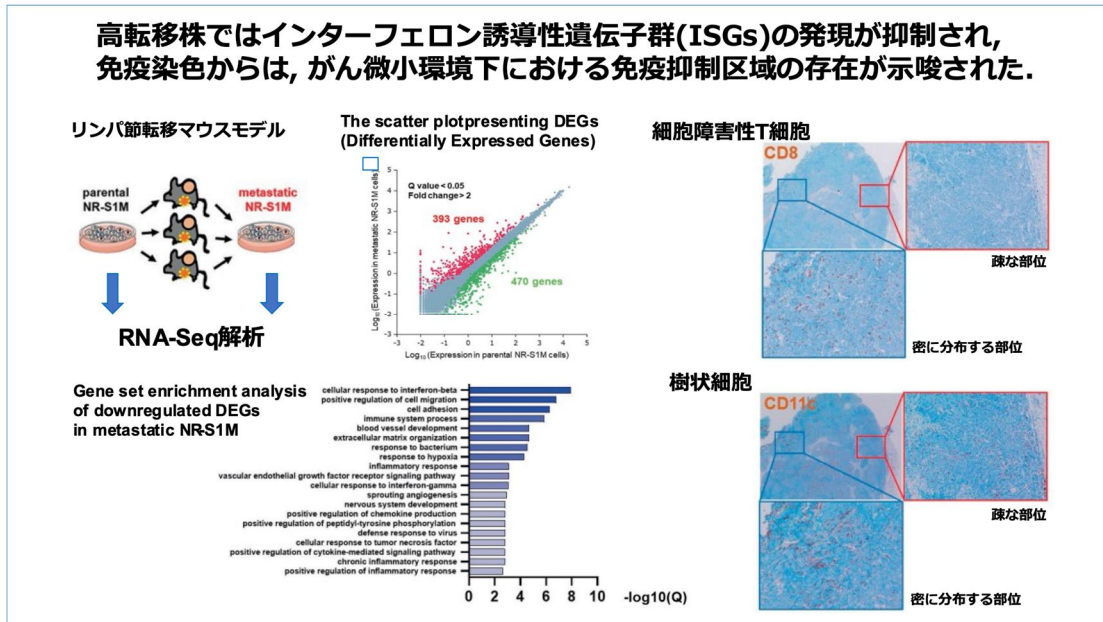
NRS1M腫瘍巣の免疫抑制領域及びNR-S1M転移株に共通して発現が上昇した遺伝子リストから特定遺伝子を抽出した。

## 4. 研究成果

RNA-seq 解析

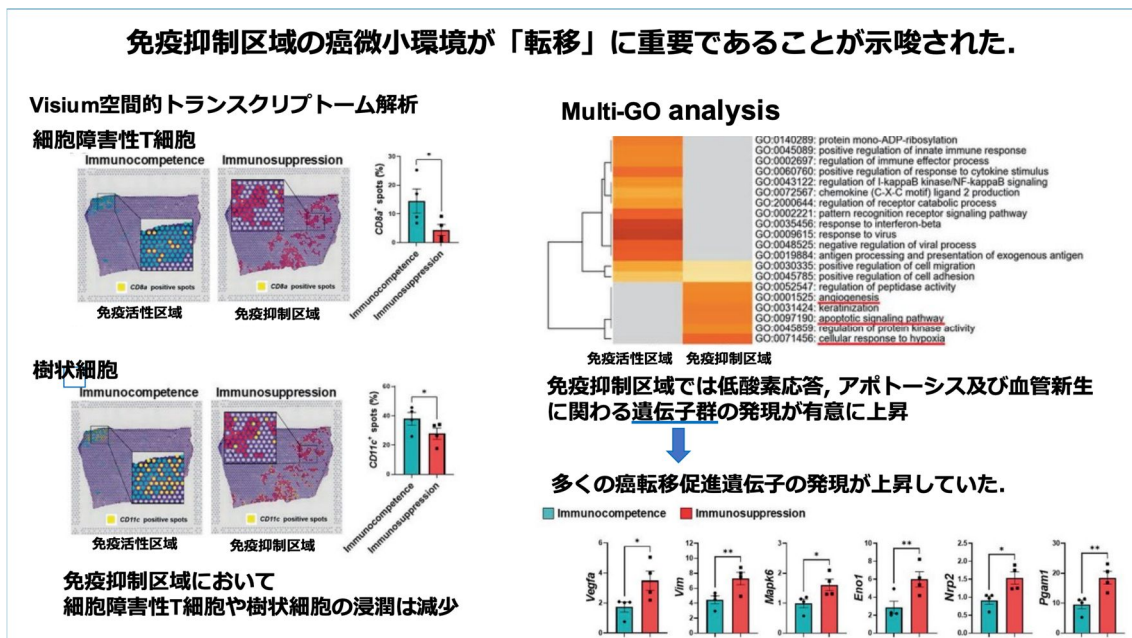
コントロールと比較し、NR-S1M 転移株ではサイトカインネットワークが大きく変動していた。サイトカインネットワークの破綻は免疫応答に影響を及ぼすことが考えられるため、次に NR-S1M 腫瘍巣における免疫応答を検討した。免疫染色の結果から CD8 陽性 T 細胞

及び CD11c 陽性樹状細胞の腫瘍組織への動員が確認されたが、一部の領域ではこれら抗腫瘍免疫細胞の割合が顕著に低下しており、がん微小環境下における免疫抑制区域の存在が示唆された。



### Visium空間的トランスクリプトーム解析

抗原提示やインターフェロン応答及び炎症応答が低下している免疫抑制区域の同定に成功した。当領域では低酸素応答、アポトーシス及び血管新生に関わる遺伝子群の発現が有意に上昇しており、当遺伝子群の中から多くの転移促進因子が確認された。



### Galectin分子の抽出

NRS1M腫瘍巣の免疫抑制区域及びNR-S1M転移株に共通して発現が上昇した遺伝子リストから Galectin分子を抽出した。CRISPR-Cas9を用いてGalectin分子欠損株を作成し、これをマウスに移植した結果、原発腫瘍の進展には差異が見られなかったが、リンパ節転移が顕著に抑えられ

た。以上より、Galectin分子は癌リンパ節転移における重要な因子であることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Fujita H, Motoyama S, An J, Nagakai Y, Yamaguchi T, Koyota S, Sato Y, Wakita A, Imai K, Kuba K, Minamiya Y.	4. 巻 171
2. 論文標題 Peritumoral CD16b positive-neutrophil accumulation strongly correlates with regional lymph node metastasis in thoracic esophageal squamous cell cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 1535-1542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.surg.2021.11.022	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 Nagaki Y, Motoyama S, Yamaguchi T, Hoshizaki M, Sato Y, Sato T, Koizumi Y, Wakita A, Kawakita Y, Imai K, Nanjo H, Watanabe H, Imai Y, Minamiya Y, Kuba K	4. 巻 25
2. 論文標題 m 6 A demethylase ALKBH5 promotes proliferation of esophageal squamous cell carcinoma associated with poor prognosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 547-561
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12792	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 198.Motoyama S, Hosaka M, Kamei T, Ueno M, Watanabe M, Ohkura Y, Mine S, Tanabe S, Toyokawa T, Wakita A, Nishikawa K, Ninomiya I, Fujita K, Kanda M, Hirai M, Hoshi M, Chiu SW, Takata M, Yamaguchi T, Miura M	4. 巻 42
2. 論文標題 A multi-institutional study to diagnose the risk of lymph node metastasis using a CRP genetic polymorphism test kit in pT1, cN0 thoracic esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 6105-6112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.16123	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 199.An J, Nagaki Y, Motoyama S, Kuze Y, Hoshizaki M, Kemuriyama K, Yamaguchi T, Minamiya Y, Suzuki Y, Imai Y, Ebihara T, Kuba K	4. 巻 41
2. 論文標題 Identification of Galectin-7 as a crucial metastatic enhancer of squamous cell carcinoma associated with immunosuppression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5319-5330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-022-02525-1	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 -

〔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
研究 分 担 者	久場 敬司  (Kuba Keiji)  (10451915)	秋田大学・医学系研究科・非常勤講師     (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
---------	---------