

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21535

研究課題名(和文)体細胞変異のある炎症細胞とがん細胞のクロストークの分子基盤の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanisms of crosstalk between inflammatory cells with somatic mutations and cancer cells

研究代表者

坂田 麻実子(柳元麻実子)(Sakata-Yanagimoto, Mamiko)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80451805

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):研究代表者は、がん細胞そのもののゲノム異常によって、微小環境に影響すると考え、変異のあるがん細胞と「クローン造血」に由来する変異のある炎症細胞の相互作用によって特異ながん微小環境が形成されるという仮説を立てて研究を行ってきた。これまでの研究では、「クローン造血」の代表として造血系統でTet2欠損マウスを用い、これにゲノム異常を2種類有するメラノーマ細胞とさらにゲノム異常が加わった4種類の異常を有するメラノーマ細胞を移植したところ、ゲノム異常を2種類有するメラノーマ細胞を移植した場合には腫瘍細胞の形成が促進される一方、4種類有する場合には有意差はみられなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健全にみえる場合であっても、造血システムは加齢と共に体細胞変異を獲得したクローン造血に置き換わることが報告された。固形がん患者では、健全な高齢者に比較して、「クローン造血」の頻度が高い。「クローン造血」のある場合には、がん組織に「クローン造血」から分化した体細胞変異のある炎症細胞が浸潤して、がん微小環境を形成する可能性と考えられ、がん微小環境に関する理解を大幅に変える研究分野に発展すると思われる。

研究成果の概要(英文):Applicants believe that genomic abnormalities in the cancer cells themselves affect the microenvironment, and the interaction between mutated cancer cells and mutated inflammatory cells derived from "cloned hematopoiesis" creates a unique cancer microenvironment. I have been conducting research with the hypothesis that it will be formed. In previous studies, Tet2-deficient mice were used in the hematopoietic line as a representative of "clonal hematopoiesis", and melanoma cells with two types of genomic abnormalities and two types of melanoma cells with additional genomic abnormalities were added. When melanoma cells having two types of genomic abnormalities were transplanted, the formation of tumor cells was promoted, but no significant difference was observed when four types of melanoma cells were transplanted.

研究分野：がん微小環境

キーワード：メラノーマ がん微小環境 クローン造血

1. 研究開始当初の背景

固形がん組織は、造血細胞に由来する tumor-associated macrophage (TAM) や myeloid derived suppressor cell (MDSC) などの炎症細胞が浸潤し、腫瘍細胞の増殖や治療抵抗性に関わることが報告されている (Gabriolovich, Cancer Immunology Research 2017, review)。固形がんにおける炎症細胞は、がん組織特有のストレス環境等の外的シグナルによって機能成熟すると考えられており、炎症細胞自体のゲノム異常という観点からは、ほとんど研究されていない。

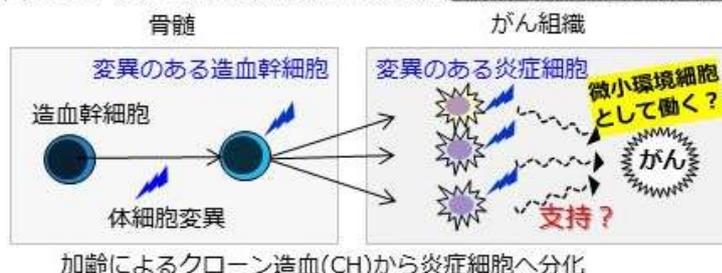
一方で、加齢とともに DNMT3A 変異、TET2 変異などの体細胞変異を獲得した「クローン造血」に次第に置き換わることが報告された (Genovese, NEJM 2014; Jaiswal, NEJM 2014)。固形がん患者の 25% にも「クローン造血」がみられ、がん組織にも「クローン造血」と同じ変異がわずかに検出される (Coombs, Cell stem cell 2017)。研究代表者は、血液がんにおける独自の研究成果 (後述) をもとに、固形がん組織には「クローン造血」に由来する体細胞変異のある炎症細胞が浸潤し、がん細胞を支持する微小環境細胞として働くという仮説 (図 1) を立て、研究を進めてきた。

クローン造血のモデルマウスである血液細胞特異的 Tet2 コンディショナルノックアウトマウス (Tet2cKO) にマウス肺がん細胞株 LLC を移植したところ、コントロールマウスより、がんの増殖は亢進した。さらには、炎症細胞に Tet2 欠損があることによる微小環境の変化を網羅的に調べるため、10xGenomics 社のシングルセル 3' RNA シーケンス解析を行い、東大医科研のスーパーコンピューター SHIROKANE を用いて解析した。肺がんにおいては、Tet2 欠損炎症細胞は S100a8/a9 分泌を介して肺がん細胞上の Emmprin 受容体を刺激して Vegfa 産生と分泌を促し、腫瘍血管新生を促進することで肺がん増殖を促すこと、抗 Emmprin 阻害抗体により肺がんの増殖抑制がみられることを明らかにした (Nguyen YTM et al. *Cancer Sci.* 2021)。そこで、Emmprin シグナル阻害は、

TET2 変異のあるクローン造血のある肺がん患者の標的治療として有望である (図 1)。肺がんの予後不良に関わることが知られるメデイエーターの発現が亢進していた。これらの結果から、実際に Tet2 欠損のある炎症細胞ががんの発症や維持に影響を与えることが示唆される。

さらには、がん細胞におけるドライバー変異そのものが炎症性メデイエーターの産生および分泌を介して、炎症細胞の浸潤を促すという知見が報告された (Kortlever, Cell 2017)。

図1 クローン造血のあるがん患者における“体細胞変異のある炎症細胞”



2. 研究の目的

本研究では、免疫原性の強いメラノーマモデルについて、①がん細胞と微小環境細胞の体細胞変異の組み合わせによるがん微小環境分子ネットワークの変化、さらには②がん細胞-微小環境細胞のクロストークを標的とする治療コンセプトを樹立する。

3. 研究の方法

Genotype が異なったがん細胞と体細胞変異のある炎症細胞の腫瘍発症能に及ぼす影響を解析するために以下の研究を行った。メラノーマの細胞株について、ヒトメラノーマで高頻度に変異がみられる遺伝子変異を複数のパターンで有する細胞を入手した。これらはすでにマウスにおいて腫瘍を形成することが確認されていた。

※利用した細胞種

異なる遺伝子変異プロファイルをもつ YUMM 細胞株は American Type Culture Condition (ATCC) から購入し、いずれも雌マウス由来である。

YUMM4.1 細胞株は *Pten*^{-/-}*Cdkn2*^{-/-} および *Braf*^{V600E/wt} から樹立され、YUMM1.G1 細胞株は *Pten*^{-/-}*Cdkn2*^{-/-}*Mc1r*^{e/e} から樹立された。

※利用したマウス

VAV1-Cre-Tet2 マウス：全血液細胞で *Tet2* 遺伝子を欠損するマウス

LysM-Cre-Tet2 マウス：ミエロイド系で *Tet2* 遺伝子を欠損するマウス

※細胞の移植系

各細胞株は ATCC の推奨に従って培養し、3 回継代後、細胞を回収し、*VAV1-Cre-Tet2* マウスおよび *LysM-Cre-Tet2* マウスに皮下注射した。

腫瘍の大きさは、注射の 1 週間後から、1 日おきに調べた。

VAV1-Cre-Tet2マウスでは、各細胞株の 5×10^5 細胞を 2 回注射した。
 LysM-Cre-Tet2マウスでは、各細胞株の 2×10^5 細胞を 1 回注射した。

※腫瘍組織の解析系

I. 免疫組織学的染色

上記の細胞株を移植後の 3 週間後にマウスを解析した。腫瘍組織を 10%ホルマリンに入れ、パラフィンブロックを作製後、厚さ 2um の切片を作製、脱パラフィンし、処理してヘマトキシリンエオジン(HE)染色、抗 Cd11b 抗体、抗 Ly6C 抗体、抗 Ly6G 抗体、抗 F4 / 80 抗体、抗 Cd8 抗体、抗 Cd19 抗体で染色した。各抗体と濃度を次の表に示す。染色シグナルは DAB によって検出した。

表 1 免疫組織染色に用いた抗体と条件

anti body	Clone	company	antigen retrieval	1st antibody	2nd antibody
Cd11b	EPR1344	Abcam (ab133357)	0.01M citrate buffer pH 6 boiled by microwave 10min	dilute in (1:500) incubate 60 min at RT	Goat anti-rabbit IgG polymer reagent (ImmPress kit) 30 min at RT
Ly6C	ER-MP20	Abcam (ab15627)	proteinase K 10 min at RT	dilute in (1:200) incubate 30min at RT	Max PO anti-rat IgG for 30 min at RT
Ly6G	Rb6-8C5	eBioscience	proteinase K 10 min at RT	dilute in (1:100) incubate 30min at RT	Max PO anti-rat IgG for 30 min at RT
F4/80	Polyclonal	Abcam (ab100790)	Tris-EDTA PH8 boiled by microwave 10min	dilute in (1:50) incubate 60 min at RT	Goat anti-rabbit IgG polymer reagent (ImmPress kit) 30 min at RT
Cd8	EPR19514	Abcam (ab183685)	Tris-EDTA PH9 40min at RT	dilute in (1:100) incubate 60min at RT	Goat anti-rabbit IgG polymer reagent (ImmPress kit) 30 min

					at RT
Cd19	polyclonal	Abcam (ab227019)	Tris-EDTA PH9 boiled by microwave 10min	dilute in (1:200) incubate 30min at RT	Goat anti-rabbit IgG polymer reagent (ImmPress kit) 30 min at RT

II. フローサイトメトリー

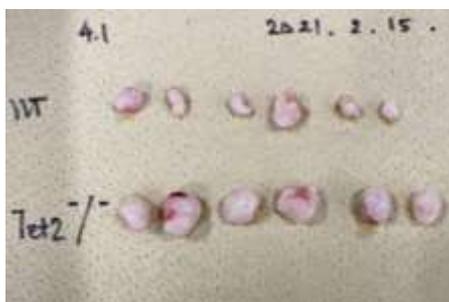
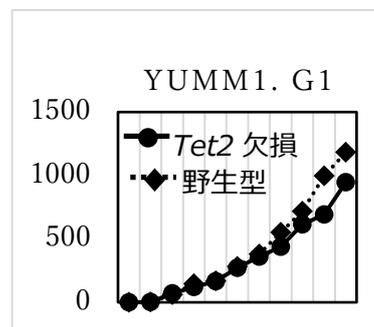
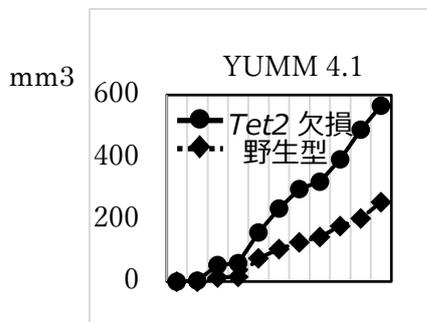
腫瘍組織を切除後、シングルセル細胞懸濁液にし、FACS Aria II (BD Biosciences)により解析した。

4. 研究成果

*VAV1-Cre-Tet2*あるいは *LysM-Cre-Tet2*マウスに genotype の異なったメラノーマ細胞 YUMM4. 1, YUMMG. 1 細胞株を移植した。YUMM 4. 1: Pten^{-/-} Cdkn2^{-/-} YUMM1 G1: Braf^{V600E/wt} Pten^{-/-} Cdkn2^{-/-}

VAV1-Cre-Tet2 細胞株へ移植した場合、YUMM4. 2 細胞株ではノックアウトマウスに移植したほうがコントロールマウスに移植した場合より腫瘍組織は増大した。しかしながら、YUMM1. G1 細胞株では、コントロールマウスへ移植した場合の方が増大傾向にあるものの有意差はなかった。すなわち、メラノーマ細胞株の遺伝子型によって、腫瘍組織環境中の Tet2 遺伝子欠損がある場合とない場合での反応性が異なっていた。

図 2 腫瘍組織毎の成長曲線



次に免疫組織学的染色の結果について、代表的なサンプルのデータを示す (図 3)。これまで調べた抗体群については、腫瘍側、またホストとなる Tet2 欠損あるいは野生型マウスの組み合わせの間で明らかな差を認めていない。そこで、図 2 で示す両者の組み合わせが異なることにより腫瘍組織毎の成長曲線が異なるというデータを説明する下流メカニズムを明らかにするには、シングルセル解析など新たな手法を取り入れ、メディエーターなどについても探索的に行う必要があると考えられた。

図 3 腫瘍組織毎の組織学的解析

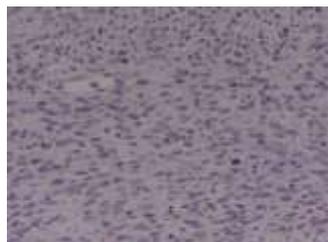
YUMM4.1

ヘマトキシリンエオジン (HE)

WT



Tet2 KO

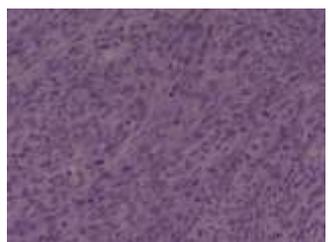


α F4/80



YUMMG.1

WT



Tet2 KO



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 Makishima Kenichi, Suehara Yasuhito, Abe Yoshiaki, Hattori Keiichiro, Kusakabe Manabu, Matsuoka Ryota, Chiba Shigeru, Sakata Yanagimoto Mamiko	4. 巻 113
2. 論文標題 Intratumor heterogeneity of lymphoma identified by multiregion sequencing of autopsy samples	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 362 ~ 364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15178	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 Nguyen Yen T. M., Fujisawa Manabu, Nguyen Tran B., Suehara Yasuhito, Sakamoto Tatsuhiro, Matsuoka Ryota, Abe Yoshiaki, Fukumoto Kota, Hattori Keiichiro, Noguchi Masayuki, Matsubara Daisuke, Chiba Shigeru, Sakata Yanagimoto Mamiko	4. 巻 112
2. 論文標題 <i>Tet2</i> deficiency in immune cells exacerbates tumor progression by increasing angiogenesis in a lung cancer model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4931 ~ 4943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15165	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8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 福本浩太, 坂田 (柳元) 麻実子, 藤澤 学, 坂本竜弘, Tran B. Nguyen, 須摩桜子, 三好寛明, 大島孝一, 片岡圭亮, 小川誠司, 千葉 滋
2. 発表標題 VAV1 mutations Contributes to the Development of T-cell Malignancies in Mice.
3. 学会等名 第60回 日本リンパ網内系学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福本浩太, 坂田 (柳元) 麻実子, 藤澤 学, 三好寛明, 末原泰人, Tran B. Nguyen, 白石友一, 千葉健一, 片岡圭亮, 小川誠司, 大島孝一, 千葉 滋
2. 発表標題 VAV1変異トランスジェニックマウスにおけるT細胞性腫瘍の発生.
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 Kenichi Makishima, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Yasuhito Suehara, Yoshiaki Abe, Keiichiro Hattori, Yasuhisa Yokoyama, Hideki Makishima, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Genetic landscape of subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma.
3. 学会等名 第82回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kota Fukumoto, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Manabu Fujisawa, Tatsuhiro Sakamoto, Hiroaki Miyoshi, Yasuhito Suehara, Nguyen Tran, Sakurako Suma, Yuichi Shiraishi, Kenichi Chiba, Keisuke Kataoka, Seishi Ogawa, Koichi Ohshima, Shigeru Chiba
2. 発表標題 VAV1 mutations contribute to development of T-cell neoplasms in mice.
3. 学会等名 第82回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuhiro Sakamoto, Naoshi Obara, Yasuhito Nannya, Manabu Kusakabe, Takayasu Kato, Naoki Kurita, Yasuhisa Yokoyama, Hidekazu Nishikii, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Yuichi Hasegawa, Seishi Ogawa, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Somatic mutations of the BM in aplastic anemia patients during TPO-RA treatment.
3. 学会等名 第82回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Manabu Kusakabe, Daisuke Kaji, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Yasuhito Suehara, Keiichiro Hattori, Yasunori Ota, Mitsuhiro Yuasa, Kosei Kageyama, Yuki Taya, Shinsuke Takagi, Hisashi Yamamoto, Yuki Mori, Naoyuki Uchida, Atsushi Wake, Shuichi Taniguchi, Go Yamamoto, Shigeru Chiba
2. 発表標題 The prognosis for OIIA-LPD was favorable regardless of response to immunosuppressant withdrawal.
3. 学会等名 第82回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yen Nguyentm
2. 発表標題 Tet2-deficient inflammatory cells exacerbates lung cancer progression through promoting tumor angiogenesis
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会 (シンポジウム)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yen Nguyentm
2. 発表標題 S100a8/S100a9-Emmprin-Vegfa Axis Initiated By Tet2-Deficient Immune Cells Exacerbates Lung Cancer Progression through Promotion of Angiogenesis
3. 学会等名 63rd ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究 分担者	野口 雅之 (Noguchi Masayuki) (00198582)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究 分担者	服部 圭一郎 (Hattori Keiichiro) (10832024)	筑波大学・医学医療系・客員研究員 (12102)	

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