

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：32650

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23119

研究課題名（和文）癌関連線維芽細胞(CAFs)におけるRUNX3の役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of RUNX3 in cancer-associated fibroblasts (CAFs)

研究代表者

小山 侑 (Koyama, Yu)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80875691

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：癌関連線維芽細胞(CAFs)は近傍の癌細胞との相互作用により腫瘍の進行に影響を与えることが知られている。また、CAFsには様々な表現型があることが明らかになりつつあるが、本研究ではCAFsで発現が上昇しているRUNX3が表現型に影響を与えるかを調査した。RUNX3の発現をsh-RNAを用いて抑制し表現型の変化を調査したところ、筋線維芽細胞性および炎症細胞性の表現型が変化することを予期していたものの、本研究からは明らかな変化は認めなかった。しかし、同細胞を用いたRNAシーケンスによりいくつかの遺伝子群の発現変化が認められたため、今後それらの遺伝子群の変化がCAFsに与える影響を探索する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌組織は腫瘍細胞と間質細胞から構成され、それぞれの細胞たちが複雑な相互作用を形成することで癌微小環境を形成している。本研究は微小環境の間質細胞を構成している癌関連線維芽細胞(carcinoma associated fibroblasts; CAFs)に関する研究である。本研究によってCAFsで上昇しているRUNX3がCAFsにどのような影響を与えるかを探索することによって、将来的なCAFsを標的とした治療開発や診断や予後予測のマーカーの確立の一助となることを期待する。

研究成果の概要（英文）：Cancer-associated fibroblasts (CAFs) influence tumor progression by interacting with neighboring cancer cells. Moreover, it is becoming evident that CAFs exhibit a variety of phenotypes. We investigated whether RUNX3, whose expression is upregulated in CAFs, affects the phenotype of CAFs. When RUNX3 expression in CAFs was suppressed using sh-RNA, phenotypic changes were expected in myofibroblastic and inflammatory phenotypes. However, no apparent changes were observed. On the contrary, RNA sequencing of the same cells revealed changes in the expression of several genes; we will explore the impact of these changes on CAFs in further studies.

研究分野：癌微小環境

キーワード：癌関連線維芽細胞 RUNX3 癌微小環境

1. 研究開始当初の背景

腫瘍間質に多く存在するがん関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblasts: CAFs) は近傍の癌細胞に作用し、分化や増殖などの癌細胞の様々な特性に影響を与えていることが知られている。近年、 α -smooth muscle actin (α -SMA) 陽性の筋線維芽細胞性 (mCAF state) や炎症性サイトカインを高発現した炎症性 (iCAF state) を代表とした複数の CAF サブタイプの存在が同一腫瘍内で報告されている。しかしながら、このような異なる CAF サブタイプの存在がどのようにして生じるのか？ また CAF サブタイプとがんの増殖や進展との関連は明らかでない。

申請者は先行研究にて、ヒト乳癌由来 CAFs において RUNX3 が高発現していることを見出した。また、CAFs の RUNX3 の発現を抑制することで α -SMA の発現が低下し、炎症性サイトカインの発現が上昇することが示唆される結果を得た。これらの知見から申請者は CAFs における RUNX3 の発現は CAFs のサブタイプの形成に関与する因子なのではないかと考えた。

2. 研究の目的

CAFs に関する多くの研究の中で様々な腫瘍への影響が明らかになっている中で中には腫瘍の進行を抑制する CAFs に関しても報告されていることからサブタイプの解明は重要な研究課題である。これまでに CAFs サブタイプの表現型の switching をコントロールする因子はあまり知られていない。また、CAFs における RUNX3 の機能に関して言及した報告はない。本研究の目的は CAFs の異なるサブタイプへの分化様式を明らかにすることで腫瘍促進性 CAFs への分化機構を解明し、腫瘍促進性 CAFs を同定することである。本研究によって標的治療の開発および間質をターゲットにした予後不良マーカーの確立への一助になることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) CAFs における RUNX3 の発現上昇の確認及びサブタイプへの関与に関する再現性の確認

CAFs の発現上昇が再現性を有するかを調べるためにヒト乳腺線維芽細胞由来の実験的 CAFs (exp-CAF) を用いて RUNX3 の発現が上昇しているかを qRT-PCR と Western blotting で複数のコントロール線維芽細胞と比較した。また、先行研究とは異なる遺伝子配列の sh-RNA を用いて RUNX3 の発現をノックダウンし α -SMA と炎症性サイトカインの発現を検討した。

(2) exp-CAF-shRUNX3 細胞を用いた RNA シークエンス

RUNX3 の抑制による遺伝子発現の変化を網羅的に解析するために、安定して発現抑制することを確認できた sh-RNA 配列を用いて exp-CAF に導入し RNA シークエンスを行った。

(3) exp-CAF-shRUNX3 と腫瘍細胞のマウスへの共移植実験

CAFs の腫瘍促進性と RUNX3 が腫瘍の進行に与える影響を評価するためにヒト乳がん由来細胞と exp-CAF-shRUNX3 を共移植し、腫瘍径と腫瘍重量を評価した。

4. 研究成果

(1) exp-CAF(544)において、コントロール線維芽細胞(522, 218TG, 533, 881L, 547R, 542M)と比較し、RUNX3 が発現上昇していることを Western blotting, qRT-PCR、蛍光免疫染色で評価した。その結果 Exp-CAF において RUNX3 と α -SMA の発現が上昇していることが確認できた(図 1)。また、RUNX3 を shRNA を安定して発現抑制できる配列を探索し、exp-CAF に導入し、Western blotting と qRT-PCR で発現抑制していることを確認した(図 2)。

しかし、これらの expCAF-shRUNX3 細胞を用いて α -SMA と炎症性サイトカインの発現を比較したところ、当初想定していた RUNX3 の抑制による α -SMA と発現低下と炎症性サイトカインの発現上昇といった結果の再現性は確認できなかった。

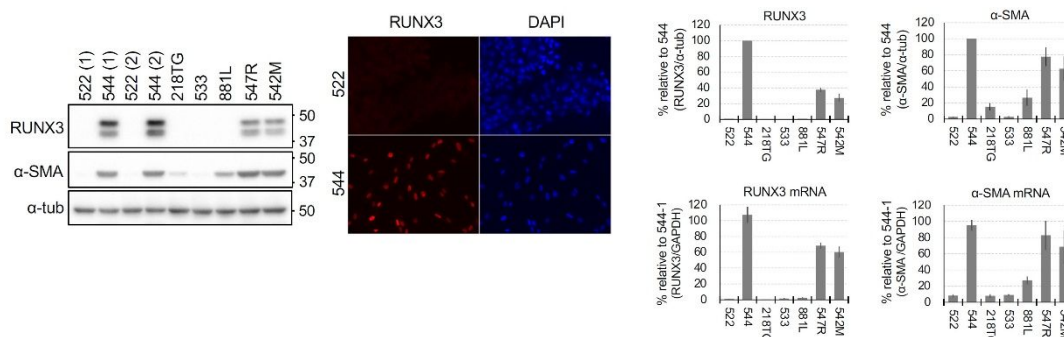


図 1 exp-CAF における RUNX3 の発現評価

(2) exp-CAFs-shRUNX3 と -sh control 細胞から抽出した RNA より RNA シークエンスを施行し、大きく差があった遺伝子群を抽出した(図 3)。その結果 RUNX3 の発現抑制によって炎症性サイトカインに關する遺伝子群の発現上昇が示唆される結果となった。

(3) ヒト乳がん細胞と exp-CAFs-shRUNX3 および -sh control 細胞をマウスの皮下に共移植を行い、経時的な腫瘍径の測定による腫瘍退席の測定およびエンドポイントでの腫瘍重量の測定を行った。コントロール線維芽細胞との共移植群と比較し、すべての exp-CAFs 移植群において腫瘍体積、腫瘍重量は上昇していた。また、sh control 群と比較し shRUNX3 群で腫瘍径、重量ともに減少していた(図 4)。以上より、shRUNX3 の抑制によって腫瘍進行が抑制されたことから RUNX3 は腫瘍の増大に關与していることが示唆された。

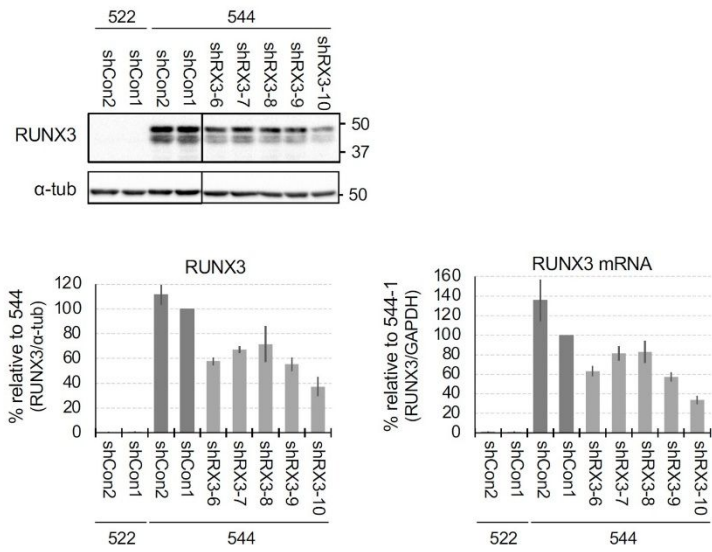


図 2 shRUNX3 によるノックダウン効率の確認

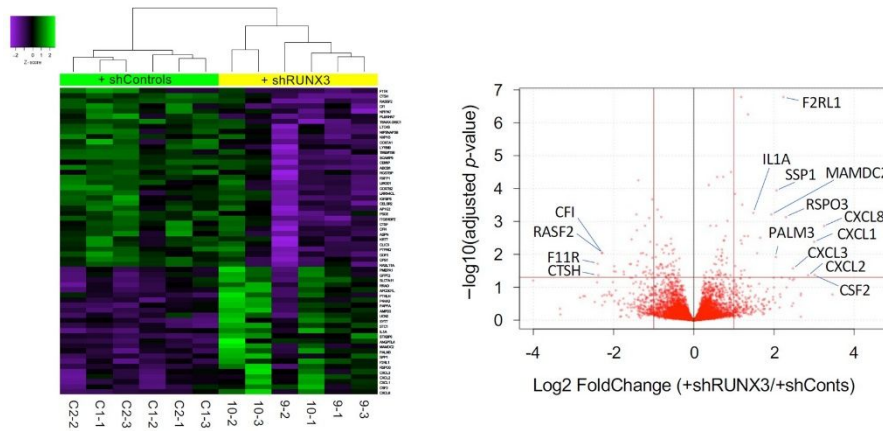


図 3 RNA シークエンスによる発現上昇・低下遺伝子群の探索

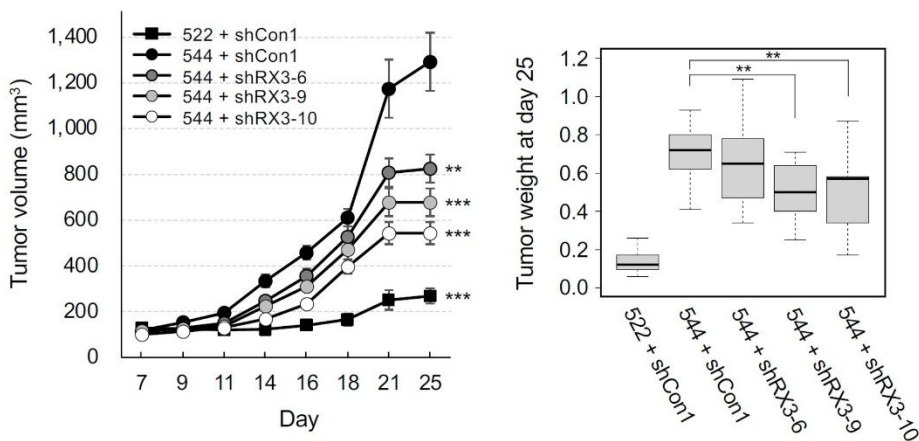


図 4 共移植実験における腫瘍径と腫瘍重量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------