

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06842

研究課題名(和文)がん微小環境における thymosin- β 4 の機能解析とその応用

研究課題名(英文)Functional analysis of thymosin-beta 4 in the tumor microenvironment and its applications

研究代表者

森田 強 (Tsuyoshi, Morita)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80403195

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)：膵癌組織の微小環境における T β 4 の役割を明らかにするため、T β 4 遺伝子改変マウスと膵癌モデルマウス(KPCマウス)を交配し T β 4 遺伝子改変 KPCマウス(T β 4-KPCマウス)を得た。KPCマウスと比較して T β 4-KPCマウスでは膵癌の発症や進展に遅れが見られ、横隔膜播種や肝臓への転移も抑制される傾向にあった。また、これらマウス由来の膵癌組織を用いて RNA-seq 解析を行った結果、T β 4-KPCマウス由来の膵癌組織において、好中球や B 細胞に特異的な遺伝子の発現量が顕著に少ないことが明らかとなった。以上の結果から、膵癌組織において T β 4 が好中球や B 細胞の浸潤を誘導している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞の増殖・転移には免疫細胞や筋線維芽細胞などの間質細胞との相互作用が重要であることが知られている。非常に予後不良な癌として知られる膵癌では、癌の進展に伴ってこれら間質細胞の浸潤や線維化などの間質反応が強く引き起こされ、これが癌の悪性度と密接に関係していることが知られている。本研究により、膵癌組織において高発現している T β 4 が、膵癌微小環境への免疫細胞の浸潤を誘導することで、癌の進展に寄与している可能性が示された。この結果により、T β 4 をターゲットとした膵癌治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：To clarify the role of T β 4 in the tumor microenvironment of pancreatic cancer, T β 4 gene-deficient KPC mice (T β 4-KPC mice) were obtained by crossing T β 4 KO mice with pancreatic ductal adenocarcinoma model mice (KPC mice). Compared with KPC mice, T β 4-KPC mice showed delayed onset and progression of pancreatic cancer. Diaphragmatic dissemination and metastasis to the liver also tended to be suppressed in T β 4-KPC mice. In addition, RNA-seq analysis of pancreatic cancer tissues derived from these mice revealed that the expression levels of genes specific for neutrophils and B cells were significantly lower in pancreatic cancer tissues from T β 4-KPC mice. These results suggest that T β 4 may induce neutrophil and B cell infiltration in pancreatic cancer tissue.

研究分野：がん免疫

キーワード：膵癌 間質細胞 がん免疫

1. 研究開始当初の背景

近年の研究により、癌細胞の増殖・転移には周辺の間質細胞との相互作用が重要である事が明らかになってきた。腫瘍周辺に形成される特殊な組織環境(がん微小環境)においては、リンパ球に加えて様々な癌特異的な間質細胞や細胞外マトリクスが集積しており、癌の進展に大きく関与している。特に、非常に予後不良な癌として知られる膵癌では、しばしば強い間質反応がみられ、癌の浸潤・転移と密接に関係していることから、これら間質細胞を標的とした治療法が注目を集めている。

2. 研究の目的

本研究で注目する thymosin-β4 (TB4) は、癌悪性化マーカーとして良く知られる遺伝子であるが、がん微小環境における機能は全く知られていなかった。しかし、最近私が独自に作成した TB4 遺伝子改変マウスを用いて解析を行ったところ、がん微小環境において間質細胞が産生する TB4 が、癌細胞の増殖や転移に大きな影響を与えていることが示唆された。そこで本研究では、TB4 遺伝子改変マウスと膵癌モデルマウスを用いて、膵癌組織の微小環境における TB4 の役割を明らかにするとともに、TB4 を標的とした新たな癌治療法の開発を目指す。

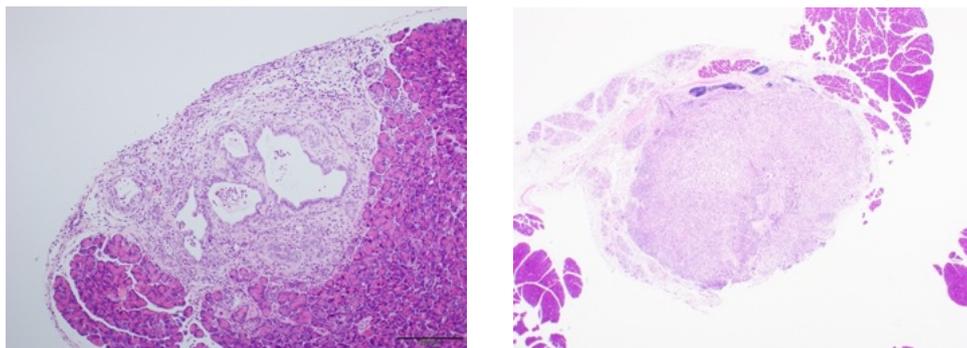
3. 研究の方法

膵癌を自然発症するモデルマウスとして、Kras および p53 に変異を持つ KPC マウスが知られている。このマウスでは 6-8 週齢で膵癌を発症し、ヒト膵癌と類似した経過をたどりながら他臓器への浸潤・転移が引き起こされる。そこで、私が樹立した TB4 遺伝子改変マウスを KPC マウスと交配し、膵癌の進展に TB4/Ac-SDKP がどのように関与するのかを詳細に解析する。発癌、腫瘍サイズ、他臓器への転移の有無に加えて、癌組織に浸潤した間質細胞や血管新生、リンパ管新生などの間質反応を組織病理学的に解析する。

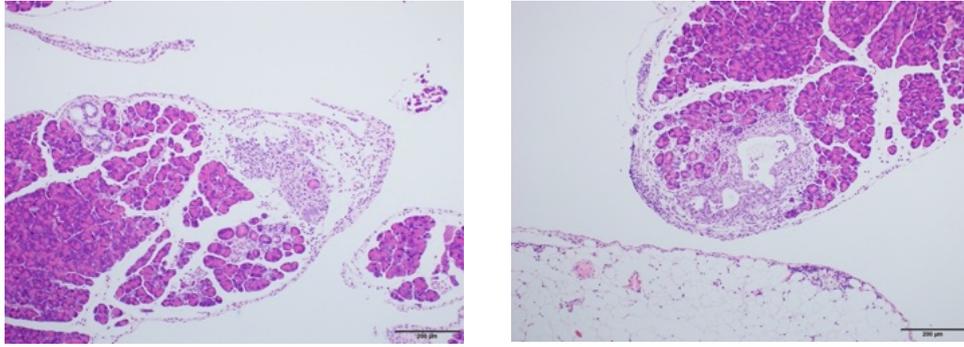
4. 研究成果

TB4 は非常に多機能なタンパク質であるが、その機能は主に、細胞内におけるアクチン細胞骨格に依存した機能と、細胞外における生理活性ペプチドとしての機能とに分けて考えることができる。タンパク質中央部に存在する WH2 ドメインにより単量体アクチンと結合する一方で、N 末端から 4 番目までのアミノ酸は細胞外で切り離されて生理活性ペプチド Ac-SDKP として機能する。そこで私は、N 末端の 2 つのアミノ酸 Ser-Asp を Ala 置換した遺伝子改変マウス (SD マウス) と TB4 ノックアウトマウス (KO マウス) の 2 系統の TB4 遺伝子改変マウスを作製した。SD 変異を導入した TB4 タンパク質は単量体アクチンと正常に結合することが報告されており、SD マウスでは Ac-SDKP の産生のみが失われていると期待される。これらのマウスに膵癌自然発症モデルである KPC マウスを交配した。KPC マウスでは、恒常的活性型 Kras の発現および p53 遺伝子の欠失がタモキシフェン誘導型 Cre-loxP 系により制御されている。交配により得られたマウスは TB4, Kras, p53, Cre の 4 箇所遺伝子座に変異が導入されているが、Kras 変異に関しては劣勢致死であるためにヘテロで系統維持を行った。原因は不明であるが、P0-P1 で死亡する個体が多く、実験用に個体数を確保することが困難であったが、P2 以降は比較的問題なく成長するようである。一部の雌マウスにおいて直腸炎を伴う直腸脱や皮膚炎が認められ、これらの個体では脾腫が見られたが、多くの個体では目立った異常は認められなかった。

そこで、直腸脱等が見られない雌の KPC マウスおよび TB4 遺伝子欠損 KPC マウス (KO-KPC) 各 4 匹にタモキシフェンを 5 日間腹腔内投与することで膵癌の発症を誘導し、10 週後に解剖を行った。KPC マウスに関しては、3 匹において長径 1-4mm ほどの浸潤性膵管癌が認められ、残り 1 匹では異型膵管上皮細胞が確認されるものの明らかな間質浸潤は認められなかった(膵上皮内腫瘍病変:PanIN)。一方、KO-KPC マウスでは、1 匹で軽度な浸潤性膵管癌病変が、2 匹で PanIN 相当の病変が認められたが、残り 1 匹では膵管上皮細胞の異形化は確認されなかった。

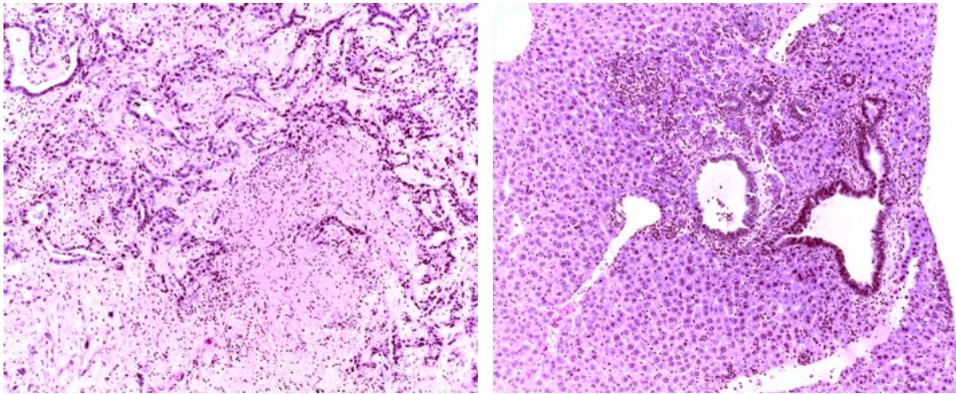


KPC マウスにおける浸潤性膵管癌病変の例

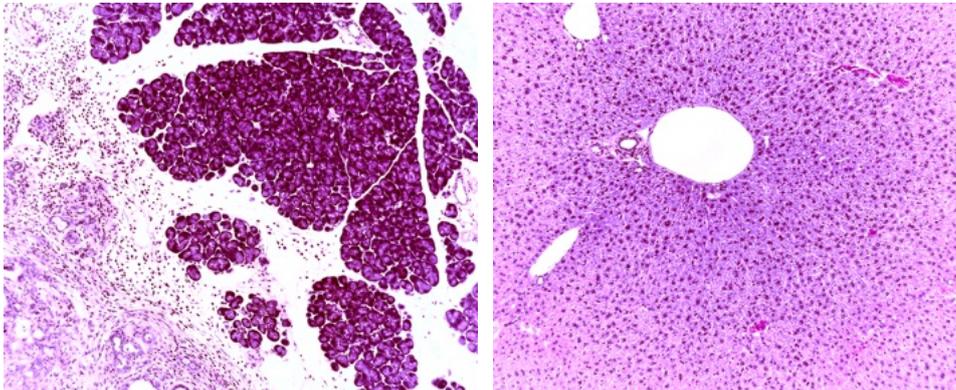


KO-KPC マウスにおける PanIN 病変の例

次に、各 2 匹ずつの KPC マウスおよび SD-KPC マウスにタモキシフェンを投与し、その後の経過を観察した。それらのうち 1 匹の KPC マウスが 11 週目で死亡し死後解剖により膵癌の発症が確認されたため、他の 3 匹は 12 週目で解剖を行った。全ての KPC および SD-KPC マウスで浸潤性膵管癌病変が確認されたが、KPC マウスにおける病変が最も進行しており、唯一肝転移が確認された。



KPC マウスにおける浸潤性膵管癌病変(左)および肝転移像(右)

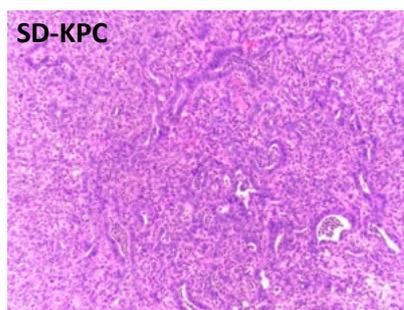
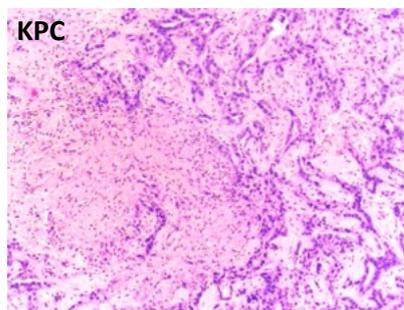


SD-KPC マウスにおける浸潤性膵管癌病変(左)および肝臓(右)

以上の結果から、KPC マウスと比較して KO-KPC および SD-KPC マウスの両者では、膵管上皮細胞の異型化や PanIN 病変から浸潤性膵管癌病変への進行が遅延していることが確認された。これらの結果は、膵癌微小環境における TB4 の発現上昇が、膵癌の発症や進行を促進している可能性を強く示唆している。

次に、上述の KPC および SD-KPC マウスを用いた膵癌発症実験において形成された膵癌組織から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。KPC マウス由来の膵癌は長径 10mm 程で、肝転移が見られた個体のものを使用し、SD-KPC マウス由来の膵癌は、長径 6mm 程度で肝転移は見られなかった。HE 染色像では、どちらも異型膵管上皮細胞の浸潤性増殖が強くみられたが、KPC マウス由来の膵癌病変においてより強い線維化が認められた。RNA-seq 解析の結果、Col1a1, Col3a1, Fn1 などの細胞外マトリクス遺伝子に関しては、KPC マウスと比較して SD-KPC マウスにおいて発現量の低下が認められたが、HE 像ほどの大きな違いは見られなかった。一方、好中球特異的な遺

伝子である Ctsg, Elane, Mpo, Prtn, Ly6g などの発現量は SD-KPC マウスにおいて非常に顕著に低下していた。また、B 細胞特異的な遺伝子である Cd19, Cd22, CD79a, Ighg1 などの発現量も SD-KPC マウスにおいて有意に低下しており、TB4 の遺伝子変異がこれら免疫細胞の浸潤に影響を与えている可能性が示唆された。



gene	WT_TPM	SD_TPM	Fold
neutrophils			
Ctsg	1.414008294	0	0
Elane	3.170042652	0.062489721	0.019712581
Mpo	2.254045481	0.022580732	0.010017869
Prtn	7.646312887	2.839039183	0.371295188
Ly6g	0.714263336	0.187062506	0.261895713
B cells			
Cd19	2.611711071	0.767470847	0.293857485
Cd22	3.341090722	1.45936454	0.43679285
CD79a	9.01352672	2.868789593	0.31827604
Ighg1	40.94106183	1.125743255	0.027496679
ECM			
Col1a1	306.8028082	215.0417781	0.700912027
Col3a1	287.5791296	186.4619603	0.648384883
Fn1	409.0396648	221.463173	0.541422243

以上の結果から、膵癌微小環境において、TB4 は好中球や B 細胞の浸潤を誘導することで、膵癌の進展や転移を促進する増悪因子である可能性が示された。この結果は、ヒトの膵癌組織において TB4 の発現が多いほど予後不良であるという事実と一致する。RNA-seq 解析の結果から、SD-KPC マウス由来の膵癌組織では好中球の浸潤が顕著に抑制されており、さらに好中球細胞外トラップの形成に関わる Elane や Mpo 遺伝子の発現量が著しく低いことが示された。最近、好中球細胞外トラップが膵癌の肝転移を促進することが報告されており、TB4 がこの経路を介して膵癌肝転移を促進している可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Morita Tsuyoshi、Hayashi Ken'ichiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Actin related protein 5 suppresses the cooperative activation of cardiac gene transcription by myocardin and MEF2	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 363 ~ 379
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.13549	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 Morita Tsuyoshi、Hayashi Ken'ichiro	4. 巻 657
2. 論文標題 Regulation of Arp5 expression by alternative splicing coupled to nonsense-mediated RNA decay	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 50 ~ 58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.03.047	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 Morita Tsuyoshi、Hayashi Ken'ichiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Actin-related protein 5 functions as a novel modulator of MyoD and MyoG in skeletal muscle and in rhabdomyosarcoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e77746
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.77746	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森田強、林謙一郎
2. 発表標題 横紋筋肉腫におけるApr5によるmyogenic regulatory factorの活性抑制機構の解明
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田強
2. 発表標題 Arp5によるMyoD/MyoG機能抑制を介した 骨格筋分化の制御機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田強、林謙一郎
2. 発表標題 ARP5はMYOCDとMEF2による心筋遺伝子発現の協調的活性化を抑制する
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.wakayama-med.ac.jp/med/lasbiology1/morita/research.html

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	橋本 真一 (Hashimoto Shinich) (00313099)	和歌山県立医科大学・先端医学研究所・教授 (24701)	

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