

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06974

研究課題名(和文) アクアポリン3が制御するがん悪性化の分子機構解明

研究課題名(英文) Involvement of aquaporin-3 in cancer progression

研究代表者

竹馬 真理子 (Chikuma, Mariko)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：40531736

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)：アクアポリン-3 (AQP3) は癌の進行に関与していることが報告されてきた。我々は、AQP3阻害抗体を用い、ガンに対するAQP3阻害の有効性を調べた。同種ガン移植モデルでは、AQP3抗体の投与は、腫瘍関連マクロファージを減少させ、活性型のCD8陽性T細胞を増加し、腫瘍の成長を抑制した。免疫不全マウスに多発性骨髄腫(MM)を移植したモデルマウスにおいても、AQP3抗体は腫瘍の増大を抑制した。AQP3阻害がMM細胞のミトコンドリア活性を制御することで細胞増殖を抑制することを示した。これらの結果は、AQP3抑制が、がん悪性化の有効な治療戦略となりうる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

網羅的遺伝子発現解析に基づいた分子標的薬の開発にも関わらず、依然としてがんは日本人の死亡原因の第一位である。本課題では、ガン進行過程でのAQP3の役割を検討し、AQP3阻害の有効性について調べた。特に、多発性骨髄腫(MM)ではAQP3発現が高く、AQP3阻害がMM細胞自身のミトコンドリアの呼吸能を低下させることで細胞増殖を抑制する効果を明らかにした。この発見は、AQP3阻害が新たな治療標的としての潜在性を持つことを示しており、治療選択肢の拡大に寄与する可能性がある。研究成果は、学術的には新しい生物学的メカニズムの解明を、社会的には難治性のがんに対する新たな治療法の開発への道を開くと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Aquaporin-3 (AQP3) has been reported to be involved in cancer progression. In this study, we investigated the efficacy of AQP3 inhibition in cancer progression using an AQP3 inhibitory antibody. In a syngeneic cancer transplantation model, administration of the AQP3 antibody reduced tumor-associated macrophages, increased activated CD8-positive T cells, and suppressed the tumor growth. In a model of immunodeficient mice transplanted with multiple myeloma (MM), the AQP3 antibody also suppressed tumor growth. We demonstrated that AQP3 inhibition reduced mitochondrial activity in MM cells, thereby inhibiting cell proliferation. These results suggest that AQP3 inhibition could be a viable therapeutic strategy for cancer malignancy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アクアポリン がん微小環境 腫瘍関連マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

がん検診受診率の上昇や、網羅的遺伝子発現解析に基づいた分子標的薬の開発にも関わらず、依然としてがんは日本人の死亡原因の第一位である。また分子標的薬の長期投与による薬剤耐性や、続発する遺伝子変異の出現が問題になっており、新たな治療戦略の開発が急務である。がん細胞と間質細胞(マクロファージ、線維芽細胞など)から構成されるがん微小環境が、がん進行と転移・再発、薬剤耐性や治療応答性に大きく影響することから、これら間質細胞を標的とした治療法の開発が進んでいる。例えば、腫瘍関連マクロファージ(TAM)は、抗腫瘍(M1 様タイプ)と腫瘍性(M2 様タイプ)マクロファージに分類され、主にサイトカインにより分化が支配されている。CSF1R や CCR2 阻害による TAM の減少や、CD40 阻害による M2 M1 のリプログラミング促進など、TAM を標的とした治療法が確立されている。一方で、種々の細胞が産生する ROS ( $H_2O_2$  を含む活性酸素) が微小環境の酸化ストレスの一因としてだけでなく、がん細胞・間質細胞の活性化や炎症惹起、遺伝子変異誘発の要因となり、がん悪性化に関与する可能性が示唆されているが、その制御機構は未だ不明な点が多く、治療法への応用も進んでいない。

細胞膜水チャネルであるアクアポリンファミリー遺伝子(AQPs, AQP0-12)は、水分子の他に、低分子化合物(グリセロール、 $H_2O_2$ )を輸送する。申請者はこれまでに、上皮細胞・免疫細胞に発現する AQP3 が、細胞内外の水分子と  $H_2O_2$  輸送を介して細胞シグナルや酸化ストレス制御に関与すること、また細胞・組織の炎症制御に関与することを報告してきた(後述)。最近の研究において、炎症性マクロファージが高い細胞内  $H_2O_2$ /ROS 濃度を示し、AQP3 を通して細胞外に大量の  $H_2O_2$  を分泌(輸送)することを見出した。このマクロファージと共培養した上皮細胞は、細胞内 ROS 濃度の上昇と、酸化ストレスの増加が示された。さらに、AQP3 欠損マクロファージでは、サイトカイン刺激による M1 および M2 タイプへの分化が抑制されており、AQP3 がマクロファージの炎症・分化に関与することを明らかにした(Hara-Chikuma et al., *Nature Commun.*, 2000)。

加えてマウスのがん移植モデルでは、AQP3 欠損マウスが野生型マウスと比較して、腫瘍形成の顕著な抑制を示すことと、腫瘍組織での酸化ストレスが軽減することを見出し、また同時に、TAM のプロファイル(M1, M2タイプ)の変動を認めた。さらに、申請者が樹立した抗 AQP3 モノクローナル抗体(2018, PCT 出願)の投与が、がん組織の成長を顕著に抑制することを確認している。これら一連の結果から、TAM に発現する AQP3 は、 $H_2O_2$  を含む分子化合物の輸送機能を介して、細胞自身の分化を調節するほか、細胞環境の酸化ストレスや炎症を制御し、がん悪性化に関与している可能性と、AQP3 阻害による新しいがん治療法の提案が可能であると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、がん微小環境の形成・維持における酸化ストレス・炎症制御機構を、マクロファージ特異的な AQP3 欠損マウスや、また AQP3 の機能的阻害抗体を用いて解析する。研究期間内に、がん微小環境マクロファージにおける ROS 産生・代謝・分泌制御機構を探索し、あわせて AQP3 の機能を解明する。AQP3 を介した ROS/ $H_2O_2$  輸送が、マクロファージ自身の分化制御に関与していることと、酸化ストレスや炎症を調節し、細胞環境形成に貢献しているという仮説を検証する。これまでに樹立した抗 AQP3 モノクローナル抗体のがん治療での有効性メカニズムを明確にし、新規な治療法を開発を進める。これらの研究を通して、微小環境で起こる酸化ストレス制御の破綻(遷延化)とがん悪性化の分子機構を明らかにし、未だブラックボックスとなっているがん悪性化機序の一端を解明することを目指し、新たな治療戦略の提案につなげることを試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス同種腫瘍移植モデル

CT26 または MC38 大腸癌細胞は、マウス(Balb マウス、C57BL6 マウス)の皮下に移植した。腫瘍が 50-60 mm<sup>3</sup>に達した時点で抗 AQP3 mAb または対照 IgG を 3~4 日ごとに投与し、腫瘍組織の成長を調べた。エンドポイントでは、腫瘍組織から単細胞を分離し、フローサイトメトリーで免疫細胞を解析した。

### (2) マウス由来マクロファージの調製

マウス骨髄から分離した単球は、M-CSF と培養しマクロファージへ分化させた。リポポリサッカライド (LPS) または IL-4 を用いて M1 または M2 マクロファージに分化させ、実験に供した。

### (3) 多発性骨髄腫 (MM) 細胞

4種類 (KMS-11、KMS-27、RPMI8226、U266) のヒト由来の MM 細胞株を用いた。AQP3 抗体あるいは AQP3 阻害剤 (DFP00173) と培養し、細胞の生存率、増殖、およびアポトーシスについて解析した。

### (4) 酸素消費率 (OCR) の測定

XF24 フラックスアナライザーを使用して OCR を測定した。細胞には、オリゴマイシン、FCCP、ロテノン / アンチマイシン A を順次添加して、ミトコンドリア呼吸能、ATP 産生量などを算出した。

### (5) 異種腫瘍移植マウスモデル

免疫不全 SCID マウスに RPMI8226 または KMS-11 細胞を皮下移植した。腫瘍が 50 ~ 60 mm<sup>3</sup> に達した時点で抗 AQP3 mAb または対照 IgG を 3 ~ 4 日ごとに腹腔内投与し、腫瘍の成長への影響を調べた。

## 4. 研究成果

### がん微小環境マクロファージにおける AQP3 の機能解明

腫瘍組織マクロファージに発現する AQP3 のがん悪性化における機能を解明することを目的として、マクロファージ特異的な AQP3 欠損コンディショナルマウスを樹立した。このマウスをがん移植モデルに供し、移植がん細胞の進行過程を比較したところ、マクロファージ特異的な AQP3 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して腫瘍の成長が抑制された。マクロファージに発現する AQP3 が腫瘍の進行に関与していることが確認できた。

### 抗 AQP3 モノクローナル抗体によるがん治療実験

これまでに樹立した抗 AQP3 モノクローナル抗体は、AQP3 依存的な水、グリセロール、過酸化水素の細胞への輸送を阻害することを確認できている。MC38 細胞 (C57BL/6 マウス由来大腸がん細胞) および CT26 細胞 (BALB/c マウス由来大腸がん細胞) のがん細胞同種移植マウスへ AQP3 抗体を投与し、腫瘍の成長を比較した。AQP3 抗体投与は、コントロール抗体投与群と比較して、腫瘍の成長を有意に抑制した (図1)。腫瘍に浸潤した免疫細胞を FACS にて解析したところ、マクロファージの中でも、M2型の腫瘍関連マクロファージ (TAM) の割合が AQP3 抗体投与群では減少しており、これに伴い抗腫瘍性マクロファージ (M1 型マクロファージ) が増加していた (図2)。また、AQP3 抗体投与群では、活性型の CD8 陽性 T 細胞が増加しており、総じて、AQP3 抗体は抗腫瘍性免疫作用の高いがん微小環境を作り出していることを示した。野生型マウスにクロロロン酸を投薬してマクロファージを除去したマウスでは、AQP3 抗体による腫瘍抑制作用が减弱したことから、AQP3 抗体はマクロファージを介して抗腫瘍作用を有すると考えられた。

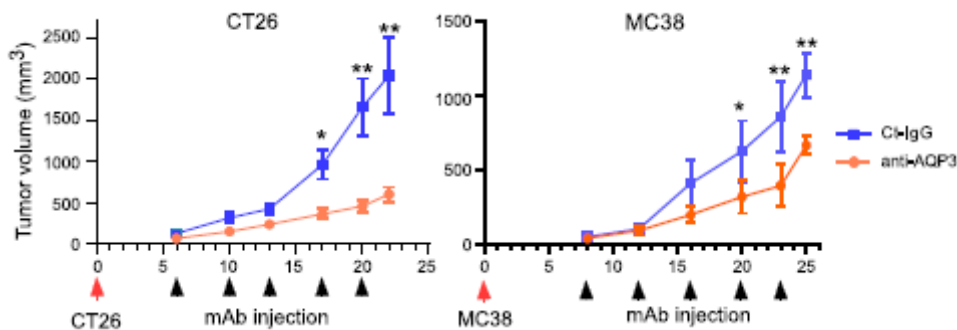


図1. 同種腫瘍モデルマウスにおける AQP3 抗体の有効性

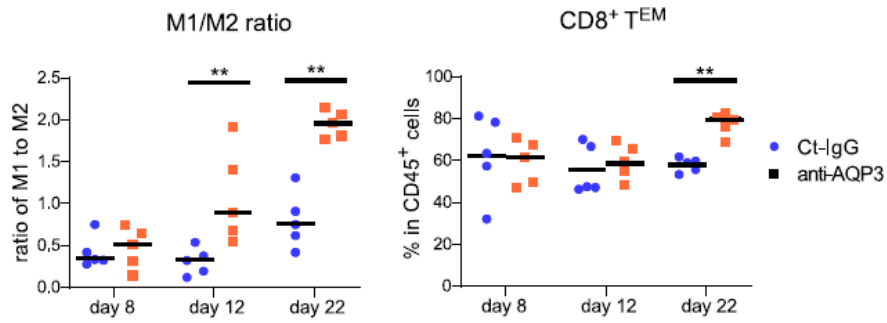


図2. 腫瘍組織のマクロファージ(M1/M2 タイプ比率)とCD8 陽性エフェクターメモリーT 細胞の比率

### AQP3 阻害による多発性骨髄腫への有効性評価

多発性骨髄腫(MM)は、B 細胞から分化した形質細胞がガン化した腫瘍であり、治療困難なことから新しい治療法の開発が望まれている。公的データベースを解析したところ、MM では AQP3 発現が高いことが示された。MM 細胞を、AQP3 抗体あるいは AQP3 害剤(DFP00173)と共培養すると、細胞成長、ミトコンドリアの呼吸率、電子伝達系複合体 I の活性を低下させた。また MM 細胞を移植した免疫不全マウスに AQP3 抗体を投与したところ、腫瘍成長が有意に抑制された(図3)。これらの結果は、AQP3 阻害が MM の有効な治療戦略である可能性を示した。

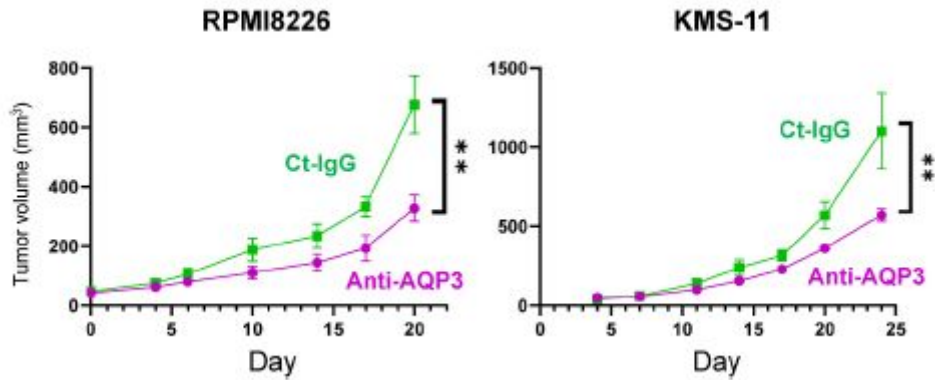


図3. 異種腫瘍モデルマウスにおける AQP3 抗体の有効性

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 3件）

1. 著者名 Tanaka Manami, Yasui Masato, Hara-Chikuma Mariko	4. 巻 676
2. 論文標題 Aquaporin 3 inhibition suppresses the mitochondrial respiration rate and viability of multiple myeloma cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 158 ~ 164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.07.053	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 Tanaka M, Ito A, Shiozawa S, Hara-Chikuma M	4. 巻 24
2. 論文標題 Anti-tumor effect of aquaporin 3 monoclonal antibody on syngeneic mouse tumor model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101498-101508
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tranon.2022.101498	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 Shi Y, Yasui M, Hara-Chikuma M	4. 巻 31
2. 論文標題 AQP9 transports lactate in tumor-associated macrophages to stimulate an M2-like polarization that promotes colon cancer progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Rep	6. 最初と最後の頁 101317-101321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2022.101317	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 洪 鈴嘉、田中 愛美、安井 正人、竹馬 真理子
2. 発表標題 Inhibition of Tumor-Associated Macrophage Differentiation by HSP90 Inhibitors: A Potential Therapeutic Strategy for Breast Cancer
3. 学会等名 第97回日本薬理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 洪 鈴嘉、田中 愛美、安井 正人、竹馬 真理子
2. 発表標題 Macrophage differentiation and molecular mechanism in tumor microenvironment
3. 学会等名 第95回日本薬理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹馬 真理子、田中 愛美
2. 発表標題 Aquaporin 3-targeted cancer therapy using monoclonal antibodies
3. 学会等名 第95回日本薬理学会
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