

令和 6 年 5 月 4 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07096

研究課題名(和文) Claudin9発現による癌免疫逃避機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of cancer immune escape by Claudin-9 expression.

研究代表者

三宅 亨 (Toru, Miyake)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：70581924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌とClaudin-9の関連は未だ不明である。今回、Claudin-9を過剰発現させたCT26細胞株(CT26-OE)を樹立したところ、CT26-OEでは、細胞増殖が有意に増加した。BALB/cマウスを用いて検討したところ、CT26-OEを投与したマウスは、がん移植後の全生存期間が低下し、CT26-OEを投与したマウスで広範な肺転移が確認された。CT26-OE投与マウスの肺では、炎症反応に關与する免疫応答が有意に低下し、CT26-OEの肺のCD3陽性細胞数はコントロールのCT26と比較して有意に減少していた。これらの結果からClaudin-9が癌免疫に抑制に關与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果としてCT26細胞にClaudin (CLDN) 9を過剰発現させることで、細胞の遊走と増殖が亢進した。また、CLDN9を過剰発現させたCT26を移植したマウスでは、静脈投与により、肺転移の数を増加させた。肺の組織では、CLDN9が過剰発現した腫瘍では、腫瘍浸潤T細胞の数が有意に減少していた。これらの所見は、大腸癌細胞におけるCLDN9の発現が、in vivoにおいて腫瘍微小環境に影響を与え、免疫系を抑制することを示唆していた。CLDN9は大腸癌の転移を促進し、T細胞浸潤を阻害することで予後に悪影響を及ぼすことから、癌の進行における重要な要素であり、治療の標的となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)： Claudin-9 is a membrane protein and an essential molecule for tight junctions. On the other hand, the association of Claudin-9 with the malignant potential of colorectal cancer and the tumour microenvironment remains unclear. A CT26 cell line overexpressing Claudin-9 (CT26-OE) was established. CT26-OE mice had significantly reduced overall survival after cancer transplantation compared to control CT26-treated mice. Histology showed more extensive lung metastases in CT26-OE-treated mice than in control CT26. Microarray analysis of total RNA from lung metastases revealed a significantly reduced immune response involved in the inflammatory response in the lungs of CT26-OE-treated mice. The number of CD3-positive cells in the lungs of CT26-OE was found to be significantly reduced compared to CT26 controls. These results suggest that Claudin-9 is involved in the suppression of cancer immunity.

研究分野：大腸癌

キーワード：Claudin-9

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は女性のがん死亡数の第1位であり、喫緊の対応が必要である。切除不能大腸癌は遺伝子変異に応じた分子標的薬の選択など、治療法の進歩により予後が3年にまで延長してきた。一方で、大腸癌ではPD-1など免疫治療が予後を延長せず、3次治療以降の化学療法は生存期間を数ヶ月の延長するのみであり、大腸癌の予後の改善には現在の治療法とは異なった新たな治療戦略が必要である。

我々はこれまでに大腸癌リンパ節転移に関する研究を継続して行っており、その研究の結果として線維化を悪化させる因子の一つとして Claudin が候補として抽出された。その結果に基づき、我々は細胞間結合蛋白質である Claudin に注目し、大腸癌における発現の意義について検討した。癌細胞における Claudin の発現意義を検討するため、Claudin9 高発現 CT26 大腸癌細胞株を作成した。肺組織を確認すると Claudin9 高発現群では肺転移が有意に増加した(図2)。この大腸癌モデルの特徴はマウスと同じ遺伝子背景の細胞株を用いているため、正常免疫を有した癌微小環境の細胞を検討することができる点である。

これらの結果から Claudin9 を高発現した大腸癌は肺転移が悪化すると考えられるが、詳細な機序については明らかではない。

2. 研究の目的

本研究は生体内において Claudin9 高発現癌細胞で肺転移が増加する機序について癌微小環境に着目し解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 生体内における Claudin9 高発現大腸癌が誘導する免疫抑制機能の解析
Claudin9 高発現 CT26 マウス大腸癌細胞株とコントロール CT26 細胞株を用いて癌免疫抑制機能について明らかにする。免疫を含めた癌微小環境の解析を in vivo で行うため、CT26 マウス大腸癌細胞株を同背景の Balb/c マウスに移植する。肺癌組織の cell sorting を用いて癌組織における免疫細胞を抽出し、免疫活性化メカニズムに及ぼす影響について解析を行った。

4. 研究成果

(1) CT26 細胞における Claudin9 の過剰発現は、細胞の移動と増殖を促進する

癌細胞における Claudin9 の生物学的機能を解析するために C Claudin9 を過剰発現した CT26 細胞 (CT26-OE) とコントロール (CT26-NC) を用いた。

従来の (2次元) 増殖アッセイと3次元の多細胞スフェロイド増殖アッセイの2つの増殖アッセイ

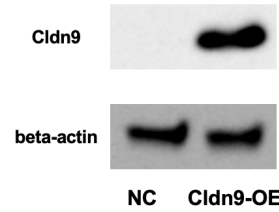


図1: Claudin9 高発現株の樹立
Claudin9 の高発現を確認した

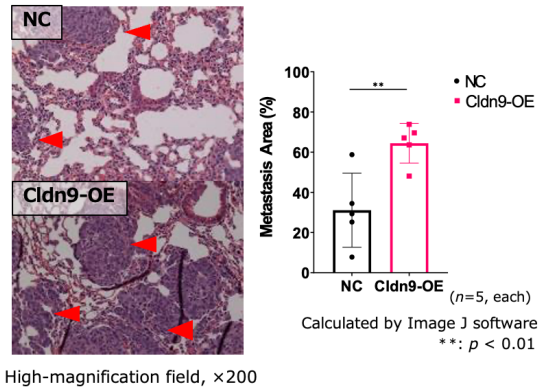


図2: Claudin9 高発現株の肺転移
Claudin9 の高発現群は肺転移が増加した。

図 3a

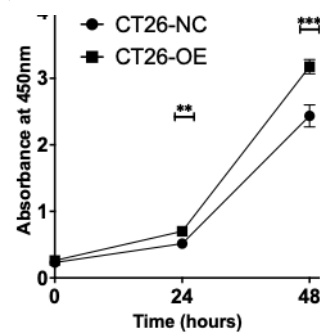


図 3b

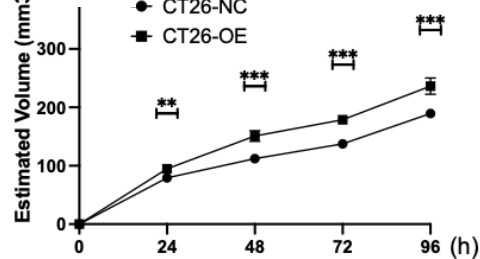


図 3a: 2次元増殖アッセイ
図 3b 3次元の多細胞スフェロイド増殖アッセイ

を行った。いずれの増殖アッセイにおいても、CT26-OE 細胞の細胞増殖は CT26-NC 細胞よりも有意に高かった (図 3a、3b)。

Claudin9 の過剰発現が遠隔臓器へのがん転移に与える影響について調べるため BALB/c マウスの尾静脈から静脈投与を行った。投与 12 日後にマウスの肺を採取し、肺の質量を検討したところ、摘出した肺の重量は CT26-OE 群で有意に重く、HE 染色での組織学的評価にて、CT26-OE マウスでは CT26-NC マウスに比べて有意に肺転移面積が大きかった (図 2)。さらに、CT26-NC マウスの肺標本では、CT26-OE マウスの肺標本よりも Cleaved-caspase3 陽性の癌細胞数を多く認めた。

(2)CT26 細胞における Claudin9 の過剰発現は、がん微小環境における T 細胞の浸潤を抑制する

肺転移亢進のメカニズムを調べるため、CT26-NC および CT26-OE 細胞を尾静脈から静脈内投与したマウスの肺転移巣の RNA を用いて、バイオインフォマティクス解析を行った。OE-CT26 細胞の RNA では、CT26-NC 細胞の RNA と比較して、2089 個の発現上昇遺伝子と 2506 個の発現低下遺伝子が同定された ($|FC| \geq 1.5$, $P < 0.05$)。遺伝子セット濃縮解析 (GSEA) を行い、遺伝子オンロジー濃縮とパスウェイ解析を行った。GSEA の結果、免疫応答の減弱、特にインターフェロン- γ 関連経路の減弱が明らかになった (図 5)。qPCR を用いると、CT26-OE マウスの肺転移巣では、CT26-NC マウスと比較して、インターフェロン- γ とインターロイキン-1b (IL-1b) の mRNA 発現が有意に低下していた。 (図 6)

肺の腫瘍微小環境を解析するために免疫組織化学 (IHC) 解析を行った。CT26-OE マウスの肺では、CT26-NC マウスの肺に比べて CD3 陽性細胞の数が有意に少なかった (図 7)。FACS 解析の結果、CT26-OE マウスの肺では CD8 陽性細胞と CD4 陽性 T 細胞が減少していた。一方、Treg 細胞数は CT26-OE マウスで減少した。

本研究の結果として CT26 細胞に Claudin9 を過剰発現させることで、細胞の遊走と増殖が亢進した。また、Claudin9 を過剰発現させた CT26 を移植したマウスでは、静脈投与により、肺転移の数を増加させた。肺の組織では、Claudin9 が過剰発現した腫瘍では、腫瘍浸潤 T 細胞の数が有意に減少していた。これらの所見は、大腸癌細胞における Claudin9 の発現が、in vivo において腫瘍微小環境に影響を与え、免疫系を抑制することを示唆していた。Claudin9 は大腸癌の転移を促進し、T 細胞浸潤を阻害することで予後に悪影響を及ぼすことから、癌の進行における重要な要素であり、治療の標的となりうると思われた。

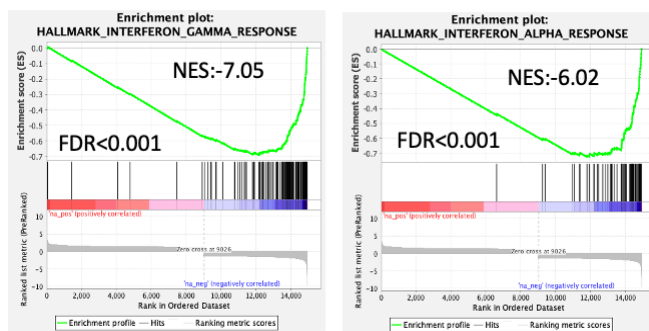


図 5 CT26-OE 細胞を静脈内移植したマウスの肺での遺伝子発現を用いた GSEA 解析

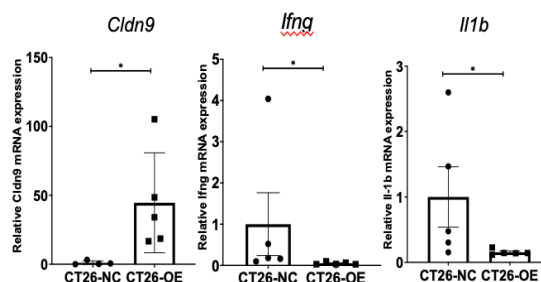


図 6:CT26-NC (黒丸) と CT26-OE (黒正方形) の肺における *Cldn9*, *Ifng*, *Il1b* の qPCR 解析。

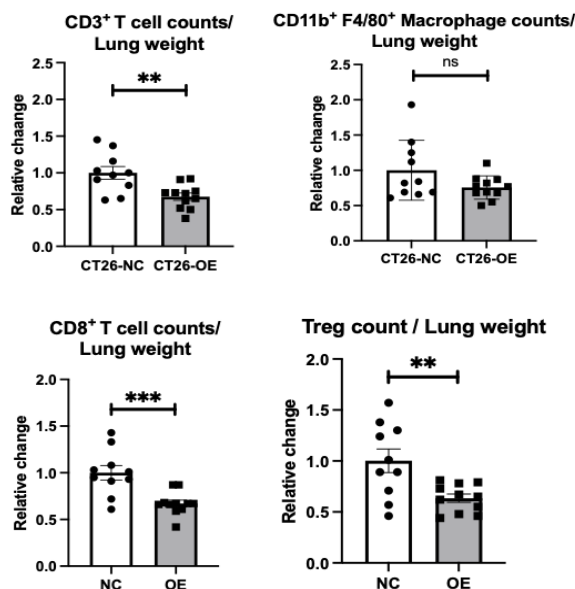


図 7:FACS を用いた肺における免疫細胞の解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三宅 亨, 安川 大貴, 生田 大二, 前川 毅, 全 有美, 向所 賢一, 谷 眞至
2. 発表標題 癌細胞におけるClaudin9の発現はT細胞浸潤を抑制し肺転移を増加させる
3. 学会等名 日本癌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三宅亨、安川大貴、前川毅、森治樹、新田信人、松永隆史、仁科勇佑、全有美、谷 眞至
2. 発表標題 大腸癌肺転移におけるClaudin9発現の役割と免疫への影響
3. 学会等名 第43回 癌免疫外科研究会
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
研究分担者	谷 眞至 (Tani Masaji) (60236677)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	

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