

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09817

研究課題名(和文) 抗腫瘍免疫を賦活化する新しい制癌シグナル分子の機能解明研究

研究課題名(英文) Functional analysis of a new anti-cancer molecule that promotes anti-tumor immune responses

研究代表者

兼松 隆 (Kanematsu, Takashi)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：10264053

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)：腫瘍免疫学の発展に伴い、腫瘍微小環境を構成する腫瘍随伴マクロファージ(TAM)を標的とした新しい癌治療法開発に注目が集まっている。TAMには、M1型(腫瘍細胞傷害性)とM2型(腫瘍増殖促進性)があり、癌免疫病態では、M1/M2バランスがM2型に傾くためTAMは癌悪性化に寄与する。TAMのM2型への極性化には、PI3K/AKTシグナルの亢進が重要である。本研究では、PI3K/AKTシグナルを負に制御するPRIPに着目して、PRIP発現の低下でM2型TAMが増加し癌の悪性化が加速すること、PRIPでPI3K/AKTシグナルを抑制するとTAMのM1型への分極化で抗腫瘍作用を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞とTAMによるがん悪性化機構にPI3K/AKTシグナリングが関与することから、悪性度の高いがんでは、TAMのPRIP発現が低下するとM2型TAMへの誘導が亢進し、がん細胞にとって都合が良い腫瘍微小環境の成立が促進されることが、がん悪性化の一端であることが明らかとなった。よって、TAMでのPRIP発現を調節することが新たな制がん戦略となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Developments in tumor immunology have focused attention on the development of new cancer therapies that target tumor-associated macrophages (TAMs), which comprise the tumor microenvironment. TAMs are classified into M1 (tumor cytotoxic) and M2 (tumor growth-promoting) types. In cancer immunopathology, the M1/M2 balance tilts toward the M2 type, and TAMs contribute to cancer malignant transformation. Enhanced PI3K/AKT signaling is important for polarization of TAMs to M2 type. In this study, focusing on the function of PRIP, which negatively regulates PI3K/AKT signaling, we found that decreased PRIP expression in TAMs increases M2 polarization of TAMs and promotes malignant transformation of cancer, but the suppression of PI3K/AKT signaling in M2-type TAMs by PRIP has antitumor effects through repolarization to M1-type TAMs. These results suggest that the suppression of PI3K/AKT signaling in M2 TAMs by PRIP has an antitumor effect by repolarizing M1 TAMs.

研究分野：薬理学

キーワード：がん 腫瘍免疫 AKTシグナリング PRIP

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌は日本人の死因の第1位であり、近い将来日本人の約半数が癌により死亡すると推測されており、癌研究の推進は重要テーマの1つである。腫瘍組織は、癌細胞の他に50%以上の正常細胞と構造を支持する細胞外基質から構成されるが、その中で豊富に存在する1つはマクロファージである。マクロファージは、血液中から腫瘍組織中に誘導された直後は炎症促進性・腫瘍抑制性のM1マクロファージに近いと考えられている。しかし、癌細胞の影響を受けると炎症抑制性・腫瘍促進性に変化し、癌細胞の増殖や浸潤、転移を促進することが知られる。この腫瘍内のマクロファージ(TAM)は機能的にはM2マクロファージに近く、癌の新たな治療標的として着目されている。一方、PI3K-AKT-mTORC1経路は細胞外からの様々な増殖因子刺激により膜リン脂質を介して活性化される細胞内シグナル伝達系で、この経路の変化が腫瘍形成の一因であることはよく知られているが、我々が発見し検討を重ねてきた分子PLC-L(phospholipase C-like protein; ラットやマウスでは phospholipase C-related catalytically inactive protein, PRIP と我々が命名)は、この経路を抑制することで抗癌活性を示す。

### 2. 研究の目的

本研究では、癌組織におけるマクロファージの分極におけるPLC-Lの役割や癌の悪性化との関係を解析する。本研究成果によって、癌の悪性度診断や予後予測において、新たにPLC-Lという分子を提案できれば、この分子を標的とした治療法を開発する臨床応用研究への道を切り拓くことが可能となる。

### 3. 研究の方法

九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会の研究承認(番号:2020-747)を得て、ヒト腎細胞癌組織検体を用い、遠隔転移の有無と腫瘍組織(腫瘍部と非腫瘍部)のPLC-L発現について検討した。遠隔転移の有無には臨床データを用い、PLC-L発現比較はPLC-L1/PLC-L2免疫組織染色後の染色強度測定により検討した。

Kidney renal clear cell carcinoma (TCGA, PanCancer Atlas)のバルクRNA-seqデータを用い、生存情報が利用可能な508症例について、腫瘍組織におけるPLC-L1およびPLC-L2発現と予後の関係を解析した。

野生型(WT)マウスまたは*Prip1/Prip2*(ヒトのPLC-L1/PLC-L2に対応)欠損(KO)マウスの骨髄細胞をマクロファージへ分化させ、M1誘導因子であるLPS、IFN- $\gamma$ で刺激した際のM1マーカー発現およびM2誘導因子であるIL-4、IL-13で刺激した際のM2マーカー発現について、リアルタイムPCR法とウエスタンブロッティング法で検討した。

WTマウスまたはKOマウスの骨髄細胞をマクロファージへ分化させ、2種類のヒト腎細胞癌由来癌細胞(Caki-1; 転移情報なし症例由来腎癌細胞、OS-RC-2; 転移情報あり症例由来腎癌細胞)と共培養した際のM2マーカー発現について、リアルタイムPCR法とウエスタンブロッティング法で検討した。

腎細胞癌組織検体を用いて免疫蛍光染色を行い、遠隔転移の有無におけるPLC-L1/PLC-L2陽性M2タイプTAM(CD68; マクロファージマーカー、CD163/CD206; M2マーカー、PLCL1/PLCL2のすべてが陽性の細胞)の割合を比較した。細胞数の計測にはStrataQuest 7.0ソフトウェア(TissueGnostics)を使用した。

### 4. 研究成果

腫瘍部の腫瘍組織における PLC-L1 発現は、遠隔転移症例では、非腫瘍部と比較し低下していた。一方、転移なし症例では、非腫瘍部と比較した腫瘍部の発現低下は軽度であった。これらの結果は PLC-L2 発現についても同様であった。

RNA-seq データの解析から、腎癌組織における PLC-L1 発現が高い患者は予後が良いという結果を得た。PLC-L2 発現についても同様であった。また、この解析においても正常組織よりも腫瘍組織で PLC-L1/PLC-L2 の発現は低く、遠隔転移がある場合はさらに発現が低くなるという結果を得た。

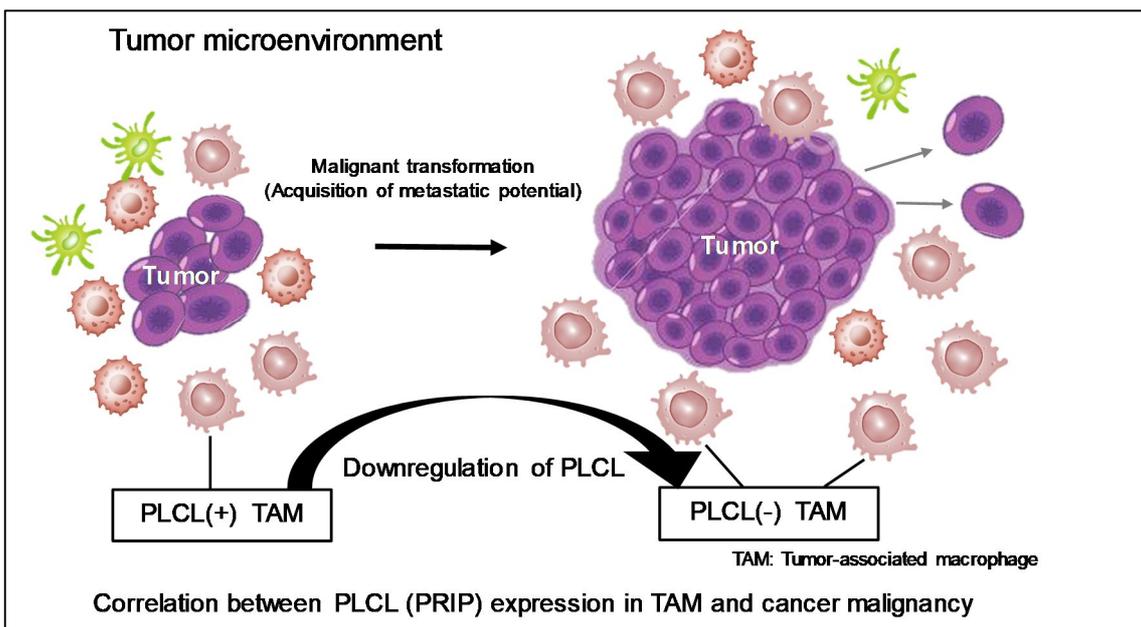
マウス骨髄細胞から誘導した M1 および M2 の特徴は WT マウスと KO マウスで異なるものであった。KO マウス骨髄細胞由来マクロファージでは WT マウス骨髄細胞由来マクロファージと比較し、M1 への分極 (M1 マーカーの発現) は抑制し M2 への分極 (M2 マーカーの発現) は亢進した。これらの結果は遺伝子レベルでもタンパク質レベルでもみられた。

OS-RC-2 細胞は Caki-1 細胞と比較し PLC-L1 発現および PLC-L2 発現がどちらも有意に低下していた。また、これらの細胞とマウス骨髄細胞由来マクロファージを共培養すると、OS-RC-2 細胞と共培養した KO マウス骨髄細胞由来マクロファージが最も M2 への分極が亢進した。

腫瘍微小環境における PLC-L 陽性 M2 型 TAM の割合は遠隔転移症例で転移なし症例と比較し有意に高かった。

以上、PLC-L (PRIP) 欠損は M2 マクロファージの極性化を促進し、腫瘍の増殖と転移能力を高めている可能性がある。我々は、本研究において kidney renal clear cell carcinoma (KIRC) における PLC-L1/PLC-L2 の発現低下が腫瘍の悪性を媒介し、TAM における PLC-L1/PLC-L2 発現の低下が腫瘍微小環境を悪化させ、腫瘍の進行と悪性を引き起こすことを示した。したがって、PLC-L 発現を増強する薬剤は、KIRC に対する効果的な新しい癌治療法となる可能性がある。

抗腫瘍療法には、腫瘍細胞に直接作用するものと、抗腫瘍免疫の活性化や腫瘍微小環境の修飾など間接的に腫瘍抑制効果を発揮することを目的とするものがある。M2 タイプ TAM は、細胞増殖因子の産生、新しい血管の誘導、抗腫瘍免疫の抑制を通じて腫瘍の増殖を促進すると考えられている。したがって、マクロファージの M2 活性化を抑制することで、間接的な抑制効果が期待できる。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Li Rongzhi, Sano Tomomi, Mizokami Akiko, Fukuda Takao, Shinjo Takanori, Iwashita Misaki, Yamashita Akiko, Sanui Terukazu, Nakatsu Yusuke, Sotomaru Yusuke, Asano Tomoichiro, Kanematsu Takashi, Nishimura Fusanori	4. 巻 734
2. 論文標題 miR-582-5p targets Skp1 and regulates NF- B signaling-mediated inflammation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109501 ~ 109501
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2022.109501	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 Kawabata Yuko, Takai Shingo, Sanematsu Keisuke, Iwata Shusuke, Kawabata Fuminori, Kanematsu Takashi, Jimi Eijiro, Shigemura Noriatsu	4. 巻 597
2. 論文標題 The G protein coupled receptor GPRC5C is a saccharide sensor with a novel 'off' response	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 2006 ~ 2016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14695	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 Yamawaki Yosuke, So Hiroki, Oue Kana, Asano Satoshi, Furusho Hisako, Miyauchi Mutsumi, Tanimoto Kotaro, Kanematsu Takashi	4. 巻 634
2. 論文標題 Imipramine prevents Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-induced microglial neurotoxicity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 92 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.09.109	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 Asano Satoshi, Maetani Yuka, Ago Yukio, Kanematsu Takashi	4. 巻 933
2. 論文標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein enhances cisplatin-induced apoptotic cell death	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 175273 ~ 175273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2022.175273	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 Mori Kayo, Mizokami Akiko, Sano Tomomi, Mukai Satoru, Hiura Fumitaka, Ayukawa Yasunori, Koyano Kiyoshi, Kanematsu Takashi, Jimi Eijiro	4. 巻 254
2. 論文標題 RANKL elevation activates the NIK/NF- B pathway, inducing obesity in ovariectomized mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 27 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-21-0424	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 Hayashi Chikako, Fukuda Takao, Kawakami Kentaro, Toyoda Masaaki, Nakao Yuki, Watanabe Yukari, Shinjo Takanori, Sano Tomomi, Iwashita Misaki, Yotsumoto Karen, Shida Miyu, Taketomi Takaharu, Sanui Terukazu, Uchiumi Takeshi, Kanematsu Takashi, Nishimura Fusanori	4. 巻 10
2. 論文標題 miR-1260b inhibits periodontal bone loss by targeting ATF6 mediated regulation of ER stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.1061216	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 Gao Jing, Mizokami Akiko, Takeuchi Hiroshi, Li Aonan, Huang Fei, Nagano Haruki, Kanematsu Takashi, Jimi Eijiro, Hirata Masato	4. 巻 135
2. 論文標題 Phospholipase C-related but catalytically inactive protein acts as a positive regulator of insulin signalling in adipocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.258584	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 Yuka Maetani, Satoshi Asano, Akiko Mizokami, Yosuke Yamawaki, Tomomi Sano, Masato Hirata, Masahiro Irifune, Takashi Kanematsu	4. 巻 552
2. 論文標題 Expression of PRIP, a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate binding protein, attenuates PI3K/AKT signaling and suppresses tumor growth in a xenograft mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and biophysical research communications	6. 最初と最後の頁 106-113
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.045	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 Hashimoto Kouichi, Yamawaki Yosuke, Yamaoka Kenji, Yoshida Takayuki, Okada Kana, Tan Wanqin, Yamasaki Miwako, Matsumoto-Makidono Yoshiko, Kubo Reika, Nakayama Hisako, Kataoka Tsutomu, Kanematsu Takashi, Watanabe Masahiko, Okamoto Yasumasa, Morinobu Shigeru, Aizawa Hidenori, Yamawaki Shigeto	4. 巻 3
2. 論文標題 Spike firing attenuation of serotonin neurons in learned helplessness rats is reversed by ketamine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/braincomms/fcab285	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 Mukai Satoru, Mizokami Akiko, Otani Takahito, Sano Tomomi, Matsuda Miho, Chishaki Sakura, Gao Jing, Kawakubo-Yasukochi Tomoyo, Tang Ronghao, Kanematsu Takashi, Takeuchi Hiroshi, Jimi Eijiro, Hirata Masato	4. 巻 296
2. 論文標題 Adipocyte-specific GPRC6A ablation promotes diet-induced obesity by inhibiting lipolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100274 ~ 100274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100274	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14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 兼松隆
2. 発表標題 リン脂質代謝変調による細胞の癌化機構
3. 学会等名 第96回 日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐野朋美、Malaz Elsheikh、溝上顕子、清島保、兼松隆
2. 発表標題 PRIPがM1 / M2マクロファージの分極化に与える影響についての検討
3. 学会等名 第65回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 袁美群、佐野朋美、溝上顕子、高靖、兼松隆
2. 発表標題 PRIP, a regulatory molecule for AKT signaling, negatively modulates renal fibrosis progression
3. 学会等名 第65回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐野朋美、Malaz Elsheikh、溝上顕子、兼松隆
2. 発表標題 腫瘍関連マクロファージにおけるPLCL欠失は腫瘍微小環境を制御し癌の悪性化に關与する
3. 学会等名 第96回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐野朋美、溝上顕子、兼松隆
2. 発表標題 RAW264.7においてmiR-15b-5pはCcr7を標的とし、M1マクロファージへの分化を抑制する
3. 学会等名 第76回 日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐野朋美、杜海、溝上顕子、兼松隆
2. 発表標題 腫瘍微小環境における腫瘍随伴マクロファージの制御機構
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Malaz Elsheikh, Tomomi Sano, Akiko Mizokami, Takashi Kanematsu
2. 発表標題 Identification and characterization of a microRNA regulating adipocyte inflammation
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 溝上 颯子, 佐野 朋美, 山脇 洋輔, 自見 英治郎, 兼松 隆
2. 発表標題 ミクログリアにおけるmiRNA発現の性差
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川端 由子, 尾池 麻未, 高井 信吾, 岩田 周介, 實松 敬介, 重村 憲徳, 兼松 隆, 自見 英治郎
2. 発表標題 閉経後骨粗鬆症モデルマウスの味覚行動の変化
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haiyan Du, Akiko Mizokami, Tomomi Sano, Yosuke Yamawaki, Takashi Kanematsu
2. 発表標題 Testosterone signaling enhances autophagic activity in microglia
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野朋美、李栄智、溝上顕子、西村英紀、兼松隆
2. 発表標題 An anti-inflammatory miRNA, miR-582-5p targets Skp1 and regulates NF- B signaling-mediated inflammation
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会/第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅野 智志、吾郷 由希夫、兼松 隆
2. 発表標題 PLC様タンパク質PRIP1のPH domain内包リボソームはシスプラチン耐性乳ガン細胞のアポトーシス細胞死を促進する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会/第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大植香菜, 山脇洋輔, 兼松隆
2. 発表標題 肥満病態下における歯周病感染が引き起こす認知機能障害の機序の検討
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐野朋美, Elsheikh Malaz, 溝上顕子, 兼松隆
2. 発表標題 脂肪組織炎症でCCL19-CCR7経路が制御するmicroRNA の同定
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 鈴木 邦明、戸苅 彰史、青木 和広、兼松 隆、筑波 隆幸、八田 光世	4. 発行年 2024年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 416
3. 書名 現代歯科薬理学 第7版	

1. 著者名 笠原正貴 兼松 隆 三枝 禎 十川紀夫 高橋俊介 八田光世	4. 発行年 2023年
2. 出版社 永末書店	5. 総ページ数 184
3. 書名 ポイントがよくわかるシンプル歯科薬理学	

1. 著者名 一般社団法人全国歯科衛生士教育協議会、鈴木 邦明、眞木 吉信、升井 一朗、山田 小枝子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 232
3. 書名 歯科衛生学シリーズ 疾病の成り立ち及び回復過程の促進3 薬理学	

〔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	松田 美穂  (Matsuda Miho)  (40291520)	九州大学・歯学研究院・准教授   (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	佐野 朋美  (Sano Tomomi)  (50782075)	九州大学・歯学研究院・助教    (17102)	
研究分担者	溝上 顕子  (Mizokami Akiko)  (70722487)	九州大学・歯学研究院・准教授    (17102)	

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