

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15522

研究課題名（和文）組織特異的な転移ニッチ形成における自己由来分子の役割解明

研究課題名（英文）The role of damage-associated molecules in organ-specific metastatic niche

研究代表者

衛藤 翔太郎（Shotaro, Eto）

東京大学・先端科学技術研究センター・特任研究員

研究者番号：50940087

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では転移がん細胞およびその周囲の転移ニッチ細胞の遺伝子発現解析を行い、組織特異的な転移ニッチ形成メカニズムを検討した。その結果、肺転移がん細胞では肝臓と比較してYAP/TAZシグナルの活性化が認められた。YAP/TAZを阻害すると、肺における腫瘍の成長が遅延し、腫瘍周囲CD8+T細胞が増加した。一方、肝転移ではミエロイド細胞がArg1を高発現していた。これはがん細胞由来液性因子と肝臓の低酸素環境によって相乗的に誘導される現象であることもわかった。またがん細胞周辺の肝実質細胞の遺伝子発現解析を行った結果、がん細胞周囲で肝実質再生応答が起こっている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、臓器特異的な遺伝子発現やシグナル経路を同定することができた。これらを阻害する薬剤は、肺転移および肝転移特異的な治療法になりうる。がんの種類に依らない、転移が存在する解剖学的な“位置”に特異的な新規治療法開発のための足がかりとなる結果を得ることができたと考えている。またがん細胞周囲の肝実質細胞についてはほとんど研究がなされておらず、今後これらの活性化の意義を明らかにすることで、肝転移に特異的な治療法の開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, gene expression analysis of metastatic tumour cells and metastatic niche cells was performed to investigate tissue-specific metastatic niche formation mechanisms.

YAP/TAZ signalling was activated in lung metastatic cancer cells compared to the liver metastatic tumour cells. Inhibition of YAP/TAZ delayed tumour growth in the lung and increased peri-tumour CD8+ T cells.

Myeloid cells in liver metastases expressed high levels of Arg1. This phenomenon was also found to be synergistically induced by tumour cell-derived humoral factors and the hypoxic environment of the liver. Gene expression analysis of liver parenchymal cells around tumour cells also showed that a liver parenchymal regenerative response may be occurring around tumour cells.

研究分野：がん微小環境

キーワード：がん微小環境 転移ニッチ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんの転移は未だ死因の多くを占める脅威であり、未だ有効な治療法は確立されていない。近年、免疫細胞や間質細胞などの非がん細胞によって構成される腫瘍免疫微小環境ががんの進行に大きな役割を果たすことが明らかになり、これらを構成する細胞集団や分子群を標的とした治療法の開発が進められている。一方、転移臓器においても腫瘍細胞の成長をサポートする微小環境(転移ニッチ)が構築されている。近年の解析から、転移ニッチは原発腫瘍の微小環境とは細胞集団や遺伝子発現が大きく異なっており、これが転移性腫瘍の治療抵抗性を生む要因の1つであることが明らかになってきた(Oliver, A. J. et al, *J. Thorac. Dis.* 2020)。さらに興味深いことに、転移ニッチは原発腫瘍の起源に関わらず、転移臓器ごとに共通した特徴を示すことが報告された。例えば、肺転移巣では多くの免疫細胞の浸潤が見られる「炎症性腫瘍 (Inflamed-tumor)」の特徴を有するのに対して、肝転移巣では免疫抑制シグナルが強く、抗腫瘍性 T 細胞が枯渇した「免疫砂漠 (Immune-desert)」の特徴を示す傾向が認められた (García-Mulero, S. et al. *J Immunother.* 2020)。これらの慢性炎症や免疫抑制環境は腫瘍細胞の成長を促進したり、治療反応性の違いなどを生み出したりすると考えられるが、こうした組織特異的な転移ニッチはどのように形成され、何がその差異を生み出すのだろうか？

近年のオミクス解析技術の進歩により、各組織に常在する免疫細胞や上皮細胞などの実質細胞によって構成される臓器特異的な免疫系(Organ-specific immunity)への理解が飛躍的に進んでいる(Krausgruber, T. et al. *Nature.* 2020)。申請者はこうした各臓器における免疫系の特徴が、転移ニッチ形成時にも反映されているのではないかと考えた。例えば、外来病原体に対して免疫応答や炎症反応が誘導されやすい肺では免疫細胞が多く浸潤する転移ニッチが形成されやすく、免疫寛容が誘導されやすい肝臓では免疫抑制傾向の強い転移ニッチが形成されやすいといった可能性が考えられる。

免疫系ががん細胞を認識するメカニズムとして、死滅した腫瘍細胞から放出されるダメージ関連分子パターン (DAMPs)に着目した。腫瘍組織では低酸素や低栄養環境、機械的ストレスなどによって大量の細胞死が起こっており、死滅した腫瘍細胞からはタンパクや核酸、メタボライトなど様々な自己由来分子群(DAMPs)が放出される。DAMPs は本来、免疫応答のトリガーとして組織損傷の存在を免疫システムに警告する役割を担うが、腫瘍組織では慢性炎症の誘導や抗腫瘍免疫の抑制などを介して、がんの進展に寄与していることが明らかになってきた(Jang, G.-Y. et al. *Exp. Mol. Med.* 2020)。しかし、転移ニッチ形成における DAMPs の役割については検討されていなかった。

2. 研究の目的

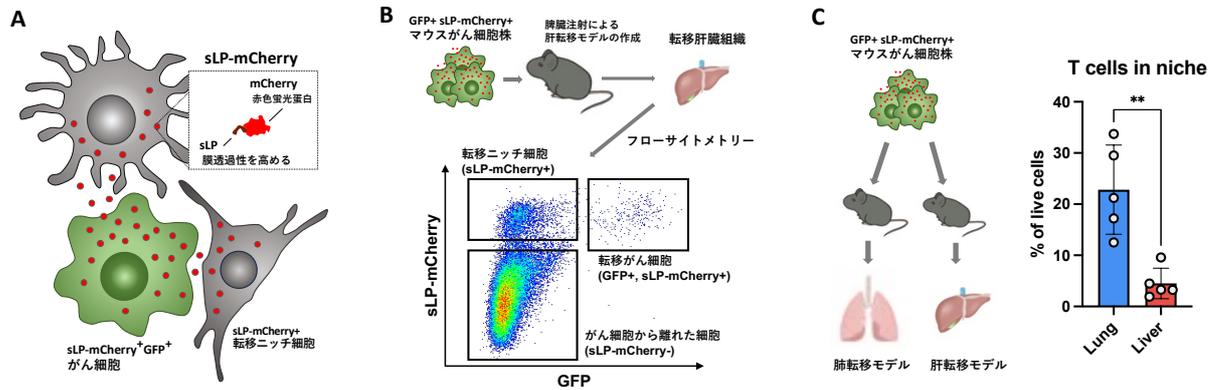
本研究では主要な転移臓器である肺と肝臓に同一の腫瘍細胞株クローンを移植し、これらに対する免疫応答や組織特異的な転移ニッチの特徴を明らかにする。さらにそこにおける DAMP の役割を解明する。臓器ごとにがん細胞を認識する免疫系が異なるため、転移巣ごとに優位に働く DAMPs 分子も異なる可能性があり、各臓器で優位に働く新規 DAMPs 分子の同定を試みる。これにより転移がん患者に対する新規治療法の開発に向けた分子基盤の構築を目指す。

3. 研究の方法

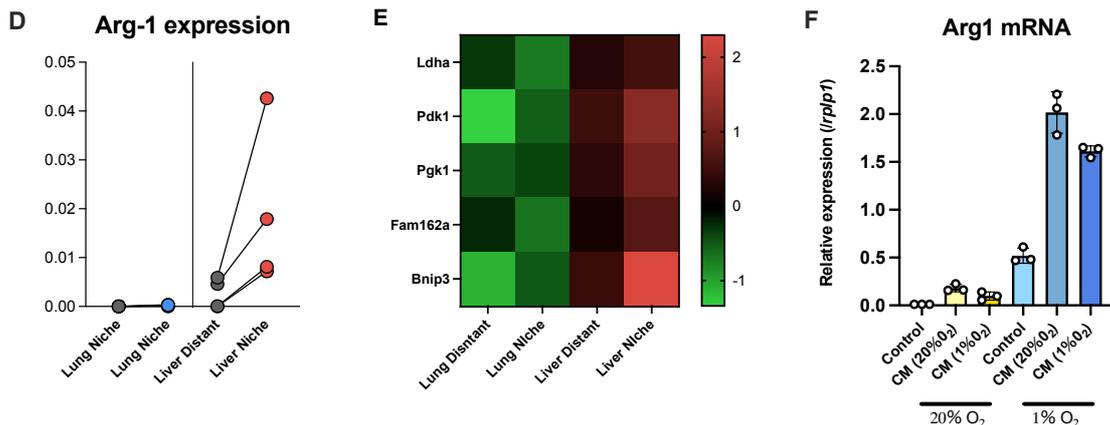
上記の目標を達成するために、転移ニッチラベリングシステム(sLP-mCherry 発現系)を導入した。同一腫瘍細胞株を肺および肝臓に移植し、転移ニッチにおける免疫細胞の割合や遺伝子発現を比較した。これらによって見出した遺伝子発現やシグナル経路の誘導における DAMP 分子の寄与や分子の同定を試みる。

4. 研究成果

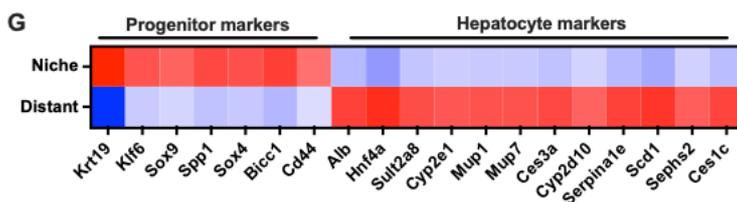
まず ombrato らが開発した近接細胞ラベリング蛍光タンパク (sLP-mCherry) を採用した(図 A, Ombrato, L. et al. *Nature.* 2019)。sLP-mCherry は赤色蛍光タンパクである mCherry に膜透過性を高める sLP が付加されているため、細胞外に分泌された後、周囲の細胞に取り込まれる。この sLP-mCherry および緑色蛍光タンパク GFP を発現するマウスがん細胞株を肝臓に移植すると、sLP-mCherry 単陽性の肝転移ニッチ細胞をセルソーターで分取することができる(図 B)。申請者はこのシステムを用いて、まずマウス悪性黒色腫細胞株 YUMMER1.7 の肺転移ニッチと肝転移ニッチを比較した。その結果、肝転移ニッチでは、肺転移ニッチと比較して T 細胞浸潤が少ないことが判明した(図 C)。これは肝転移の方が、免疫抑制傾向が強いことを示している。



次に Myeloid 細胞に着目し、セルソーターで分離した後、RNA-seq で解析を行った。その結果、肝転移におけるマクロファージやミエロイド DC などでは、Arginase1 の発現が顕著に高まっていることが明らかになった (図 D)。また肝転移ミエロイド細胞では、肺転移ミエロイド細胞と比較して、低酸素応答が誘導されていることが判明した (図 E)。肝臓は他の臓器と比較して酸素分圧が低いことが知られていたため、がん細胞によるリプログラムと肝臓の低酸素環境の組み合わせによって、Arg1 の高発現が誘導されるのではないかと考え、in vitro で検証したところ、興味深いことに 1%酸素下で、がん細胞上清 (CM) を添加したマクロファージで最も高い Arg1 発現を示した (図 F)。また、がん細胞由来液性因子は 20%および 1%O₂ の双方で上清中に含まれており、酸素濃度に関係なく分泌される分子であることも判明した。今後は Arginase1 阻害剤の有効性や Arginase1 誘導分子の同定を進めることで、肝転移特異的な治療法の開発につながると考えられる。



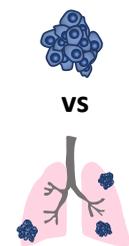
さらに、肝転移ニッチにおける肝実質細胞 (肝細胞; Hepatocyte) の遺伝子発現解析も行った。その結果、がん細胞周囲の肝実質細胞は progenitor マーカーの発現亢進と、肝細胞マーカーのダウンレギュレーションが認められ、脱分化を起こしていることが判明した (図 G)。肝臓が傷害を受けると、肝実質細胞は脱分化し、幹細胞様細胞として、肝臓実質再生に関わることが知られている。そのため、この結果はがん細胞の浸潤に伴う正常肝組織の破壊によって、肝実質の再生応答が起こっている可能性を示している。がんは「治らない傷」と例えられるように、創傷治癒との類似性から、線維芽細胞や血管新生などを含む腫瘍間質が治療標的として注目を集めている。肝臓のような再生能力の高い臓器では、実質の再生応答もまた、がんの進展に関与しているのかもしれない。がんにおける「実質の活性化」の意義を明らかにすることで、肝転移特異的な治療法の開発だけでなく、がん生物学にも新たな視点をもたらすと考えられた。



一方、肺転移ではがん細胞における遺伝子発現を解析し、がん細胞の転移臓器環境への適応メカニズムを検討した。興味深いことに、肺転移がん細胞では原発腫瘍や肝転移がん細胞と比較して、YAP/TAZ シグナルの活性化を示唆するデータが得られた。そこで、YAP/TAZ のノックダウン細胞

株を作成し、肺における腫瘍増殖を検討したところ、増殖が遅延し、ECM発現が低下し、T細胞浸潤が増加した(下図参照)。YAP/TAZは機械刺激によって活性化するシグナルパスウェイとして知られているため、肺の呼吸による伸展による機械刺激によってがん細胞がリプログラミングされている可能性を考え、現在さらなる検討を進めている。

原発腫瘍

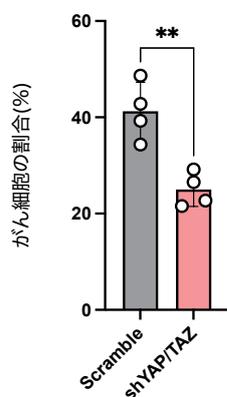


VS

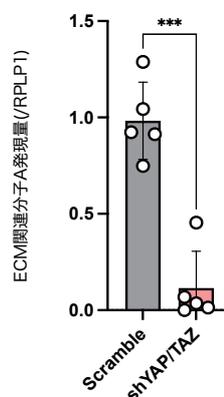
肺転移腫瘍

- YAP/TAZシグナル↑
- Piezo1/2 ↑
- ECM関連分子↑

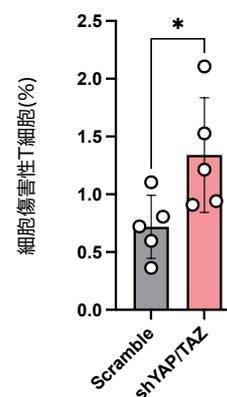
腫瘍増殖



ECM発現



T細胞浸潤



▲: 肺転移腫瘍ではYAP/TAZシグナルの活性化やPiezo1/2、ECM関連分子の発現上昇が認められた。またYAP/TAZノックダウンにより、腫瘍増殖の抑制やECM関連分子の発現低下、細胞傷害性T細胞の浸潤増加が観察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inoue Asuka, Chiba Shiho, Eto Shotaro, Taniguchi Tadatsugu, Yanai Hideyuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Potential of HMGB-inhibitory oligodeoxynucleotide ISM ODN to neutrophil recruitment in mouse model of hepatitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 202 ~ 210
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13002	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 -

〔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
---------	---------