

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19451

研究課題名(和文) 固形がんにおけるゲノム異常のある微小環境-がん細胞ネットワークの同定

研究課題名(英文) Analysis of network between microenvironmental-cancer cell network in solid cancers

研究代表者

坂田 麻実子(柳元麻実子)(Sakata-Yanagimoto, Mamiko)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80451805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん患者において、「クローン性造血」に由来する「体細胞変異のある免疫細胞」はがん組織に浸潤し、がん細胞の生存や増殖に影響する腫瘍微小環境細胞として働くという仮説をたて、研究を行ってきた。本研究では、多様ながんゲノムをもつ腫瘍細胞と微小環境ではたらく「体細胞変異のある免疫細胞」の相互作用に着目した。異なる組み合わせの遺伝子変異をもつメラノーマ細胞株について「クローン性造血」モデルマウスあるいはコントロールマウスへ移植する実験系により、「クローン性造血」に由来するLy6C陽性ミエロイド細胞が増加すること、さらには網羅的遺伝子発現解析によりTNF α 経路のエンリッチメントを認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クローン性造血は健常者でも加齢とともに検出される頻度が増加すること、さらには、固形がん患者では健常高齢者よりも検出される頻度は高く、25-30%にみられることが報告されている。がん患者の発生頻度は約100万人であることから、クローン性造血は約25万-30万人にみられると推察される。がん細胞でみられるゲノム異常に基づいて治療を考えるがんゲノム医療の実装化がはじまっている。一方、クローン性造血、およびこれに由来する微小環境細胞によってがんの増殖や生存が明らかになれば、これを標的とする治療、あるいは層別化による精密医療が実現する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have hypothesized and conducted research on the hypothesis that "immune cells with somatic mutations," originating from "clonal hematopoiesis," infiltrate tumor tissues in cancer patients accompanying "clonal hematopoiesis" and function as tumor microenvironmental cells, influencing the survival and proliferation of cancer cells. This study focuses on the interaction between tumor cells with diverse cancer genomes and "immune cells with somatic mutations" functioning within the tumor microenvironments. When melanoma cell lines with different combinations of genetic mutations were transplanted into model mice of "clonal hematopoiesis," the increase of Ly6C positive cells, accompanying enrichment of TNF α pathway was observed.

研究分野：血液学

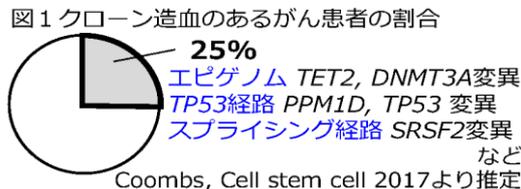
キーワード：クローン性造血 メラノーマ TET2

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

目的

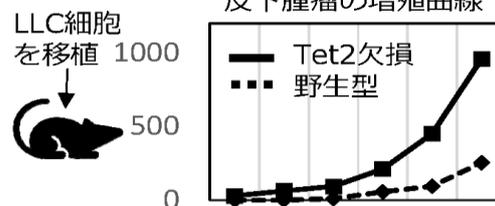
固形がんにおいて、造血幹細胞から分化した腫瘍関連マクロファージなどの炎症細胞はがん組織へ浸潤し、がん細胞の増殖や生存を促す微小環境細胞として働く (Gabriolovich, Cancer Immunology Research 2017)。一方、加齢に伴って、造血幹細胞は体細胞変異を獲得し、多様な造血細胞へと分化する「クローン造血」となることが報告された (Genovese, NEJM 2014; Jaiswal, NEJM 2014)。固形がん患者の約 25%にも「クローン造血」がみられ、エピゲノム経路や TP53 経路の変異頻度が高いことが報告された (Coombs, Cell stem cell 2017)。



そこで、申請者は、固形がん組織には「クローン造血」由来の体細胞変異のある炎症細胞が浸潤し、がん細胞を支持する微小環境細胞として働くという仮説をたてた (図 1)。これまでに、

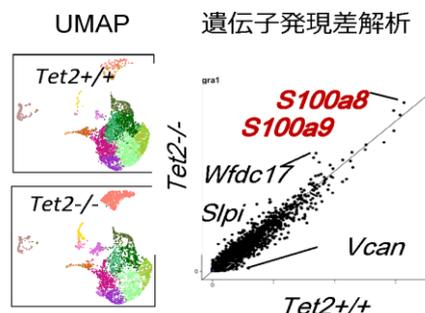
肺がんモデルを用いて仮説の検証を進めてきた。クローン造血モデルマウスである血液細胞特異的 *Tet2* コンディショナルノックアウトマウス (*Tet2cKO*) へ肺がん細胞株 LLC を移植したところ、がんの増殖は亢進した (図 2)。さらには、炎症細胞に *Tet2* 欠損があることによる微小環境の変化を網羅的に調べるため、10xGenomics 社の Chromium を用いてシングルセル解析を行い、東大医科研のスーパーコンピューター *SHIROKANE* を用いて解析した。*Tet2cKO* のがん組織では、特異

図2 *Tet2*欠損炎症細胞は肺がん腫瘍促進皮下腫瘍の増殖曲線



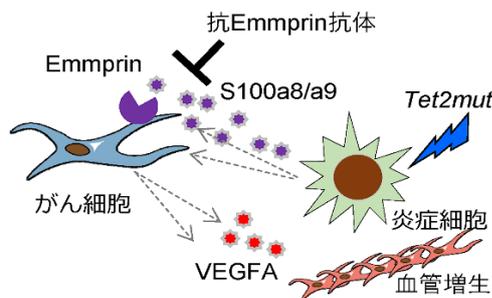
な炎症細胞の分布を認めるとともに、メディエーター S100a8/S100a9 の発現が亢進し (図 3)、肺がん細胞上の Emmprin 受容体を刺激することでがん細胞から Vegfa の産生および分泌を介して、腫瘍血管新生を促すことでがんの増殖を促すことを明らかにした (図 4, Cancer Science 2021)。これらの成果は、*Tet2*欠損のある炎症細胞はがん微小環境細胞として働くという申請者の仮説を支持する。

図3 肺がん組織のシングルセル解析



一方、がん組織においては、がん細胞側にも体細胞変異が加わっている。がん細胞側のシングルセル解析により、がん細胞の体細胞変異のパターンによって「増殖型」、「免疫調節型」に分類される (第 80 回日本癌学会で発表予定)。「免疫調節型」変異プロファイルをもつがん細胞は自らの生存に有利な免疫環境を作り出すと想定されるが、この点は明らかではない。

図4 *Tet2*欠損炎症細胞は肺がんの腫瘍血管を促す



2. 研究の目的

本研究では「多様な体細胞変異をもつがん細胞」と「体細胞変異のある炎症細胞」の空間的クロストークという観点から、がん微小環境を明らかにする。

3. 研究の方法

I. 体細胞変異のある炎症細胞が異なった体細胞変異のある腫瘍の増殖の影響への解析

・ヒトメラノーマで高頻度にみられる様々な変異を組み合わせた細胞株を利用する (YUMM4. 1,

Pten^{-/-}, *Cdkn2*^{-/-}; YUMM1.G1, *Braf*^{V600E/wt}, *Pten*^{-/-}, *Cdkn2*^{-/-}, *Mc1r*^{e/e}; YUMM1.7, *Braf*^{V600E/wt}, *Pten*^{-/-}, *Cdkn2*^{-/-}). これらをクローン造血モデルマウスに移植することにより、独自のがん-微小細胞の組み合わせを持った新たながんモデルを作製し、腫瘍形成能を比較する。

・クローン造血モデルとしては *Tet2* コンディショナルノックアウトマウスを用いた。*Tet2**flox/flox* マウスと *Vav1-Cre* マウスを交配させ、*Vav1-Cre* × *Tet2**flox/flox* (*Tet2* *VAV1*^{-/-}) マウスを得た。*Tet2* *VAV1*^{-/-} では、すべての造血細胞において *Tet2* 遺伝子が破壊されている。

・メラノーマ細胞株については遠心分離によって回収した後、上清（培養液）を捨て、PBS (-) でピペティングしながら 2 回洗浄後、冷たい PBS (-) で希釈し、細胞懸濁液 (2x10⁵ 細胞/100 μl) を作製した。6~8 週齢の *Tet2*cK0 あるいはコントロールマウスの背毛を注射の前日に剃り、皮膚を露出させた。直前にマウスを麻酔し、細胞懸濁液を背部の左側と右側の 2 箇所の皮下に片側 100 μl、2x10⁵ 細胞ずつ注入した。注射後 7 日目から 2 日ごとにキャリパーを用いて測定し、長さ × 幅 × 幅 × 0.52 の式で皮下腫瘍の体積を算出した。

II. 免疫組織学的染色を用いた微小環境プロファイルの解析

・1. で得られた腫瘍組織のホルマリン固定パラフィン包埋標本 (formalin-fixed paraffin-embedded : FFPE) 標本からマイクロトームにより薄切を作成し、免疫細胞を認識する各種抗体で免疫組織学的染色を行い、免疫細胞の分布を調べた。

・具体的には、脱パラフィン処理後、一次抗体 (抗 CD11B 抗体、抗 Ly6C 抗体、抗 Ly6G 抗体、抗 F4/80 抗体、抗 CD19 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体) とインキュベート後 3 回洗浄し、さらに二次抗体とインキュベート、内在性ペルオキシダーゼ阻害処理を行った後、DAB を用いて発色した。

III. 全トランスクリプトーム解析を用いた網羅的な微小環境プロファイルの同定

・1. で得られた腫瘍組織の FFPE 標本から薄切を作成し、RNAstom™ FFPE RNA Isolation Kit for FFPE Tissue Samples (CELLDATA) を用いて RNA を抽出した。Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent Technologies) を用いて、Agilent 2100 Bioanalyzer instrument により RNA の質を調べた。Smarter® Stranded Total RNA-Seq Kit v2 -Pico Input Mammalian (634411, Takara) を用いてシーケンス用ライブラリを作製後した。シーケンサー-NextSeq using High Output Kit 75 (Illumina) を用いてデータを取得した。CLC genomics work bench ver. 11 (Qiagen) を用いてデータのインポート、トリミング、クオリティーコントロール、mm10 へのマッピングを行った。パスウェイ解析としては Gene sets from Molecular Signatures Database (MSigDB 7.1) を用いて、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行った。

4. 研究成果

4-1. *Tet2* 欠損微小環境とメラノーマ腫瘍の増大

異なるゲノム異常のある腫瘍細胞とゲノム異常のある微小環境細胞細胞の相互作用の影響を調べるため、2 種類のメラノーマ細胞株 YUMM4.1 あるいは YUMM1.G1 を *Tet2* *Vav1*^{-/-} およびコントロールマウスの皮下に移植し、腫瘍のサイズを経時的に調べた。なお、本皮下移植モデルでは、実験条件によってはしばしば自然消退してしまうことから、習熟を要するとともに、繰り返し実験を行った。

YUMM4.1 では *Tet2* 欠損群ではコントロール群よりも腫瘍の増大が促進されることが確認された。一方で、YUMM1.G1 では *Tet2* 欠損群はコントロール群より腫瘍の増殖は抑制される傾向はあるものの、有意差はなかった。そこで、メラノーマ細胞株のゲノム異常の種類によって、*Tet2* 欠損微小環境からの影響が異なる可能性が考えられた。すなわち、Yum4.1 では *Tet2* 欠

損微小環境細胞は腫瘍の増大を支持する方向に働くが、YUMM1.G1 では Tet2 欠損微小環境細胞の影響は明らかではなかった。

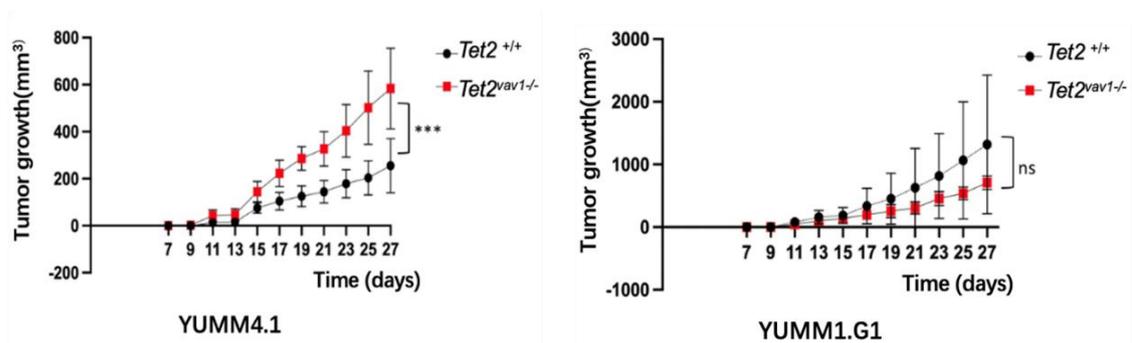


図5 メラノーマ腫瘍の増大と Tet2 微小環境

左 YUMM4.1 における腫瘍サイズの測定。Tet2^{+/+}, n = 3 ; Tet2 Vav1^{-/-}, n = 3。

右 YUMM1.G1 における腫瘍サイズの測定。Tet2^{+/+}, n = 3 ; Tet2 Vav1^{-/-}, n = 3。

4-2. Tet2 欠損微小環境における免疫細胞プロファイル

異なるゲノム異常のある腫瘍細胞とゲノム異常のある微小環境細胞細胞の相互作用による免疫細胞プロファイルへの影響を調べるため、4-1. において2種類のメラノーマ細胞株 YUMM4.1 を移植した Tet2 VAV1^{-/-} およびコントロールマウスの皮下腫瘍から FFPE ブロックを作製して薄切し、免疫組織学的染色を行った (図6)。

定量的に陽性細胞を評価することにより、Tet2 欠損群ではコントロール群よりも Ly6C 陽性細胞は有意に増加することが明らかとなった。しかしながら、解析したその他の項目については変化がなかった。そこで、YUMM4.1 の増殖促進に働く Tet2 欠損微小環境細胞のうち、Ly6C 陽性ミエロイド細胞が重要であることが示唆された(図6)。

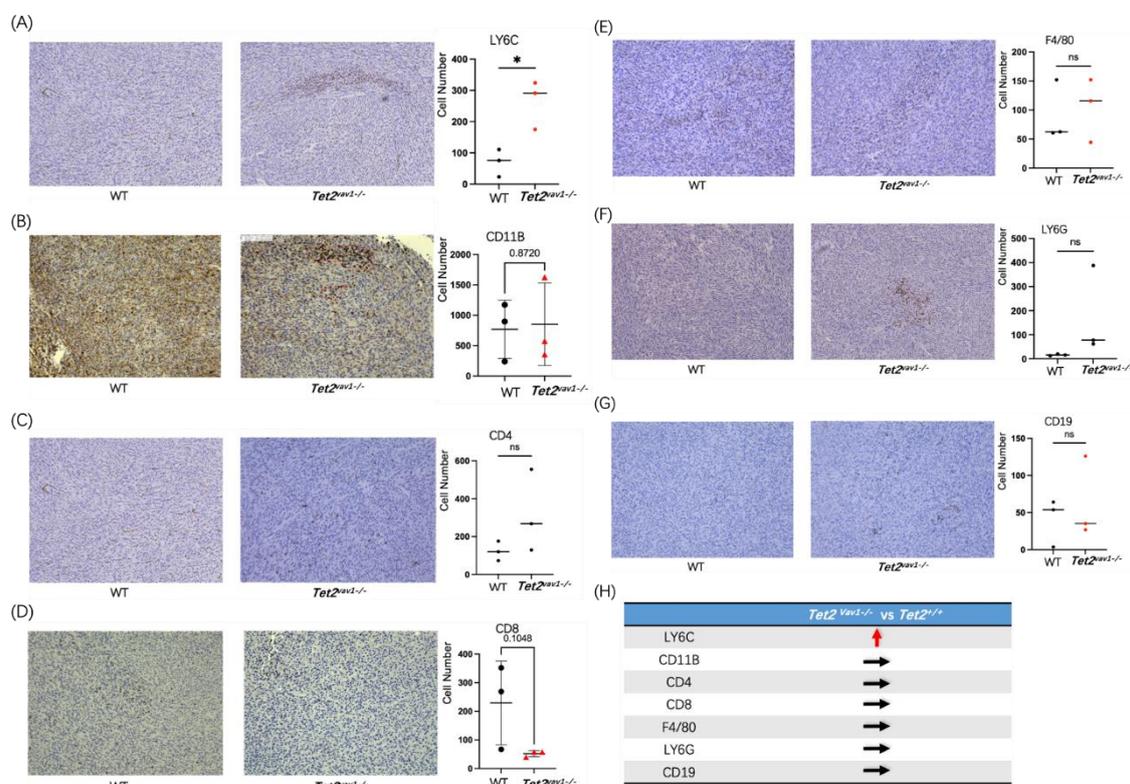


図6 YUMM4.1 メラノーマ細胞株を移植した Tet2 欠損あるいはコントロール微小環境における免疫細胞プロファイル

腫瘍切片の IHC 染色写真は 20x 倍率で撮影

4-3. Tet2 欠損微小環境における遺伝子発現変化 (図 7)

さらに、Tet2 欠損微小環境細胞プロファイルについて明らかにするため、各群の FFPE 切片についての腫瘍組織のホルマリン固定パラフィン包埋標本から切片を作成し、全 RNA シーケンス解析を行った。クオリティーコントロール後、differentially expressed gene (DEG)、およびこれらの gene ontology (GO) 解析を行った。DEG 解析により 347 個の遺伝子が有意に異なり ($p < 0.05$)、116 個の遺伝子が上方制御され、231 個の遺伝子が下方制御された。DEG の GO をメタスケープにより解析したところ、Tet2 欠損群ではコントロール群に比較して、血管新生等に関わる経路が多数エンリッチしていた。さらには、GSEA を用いたパスウェイ解析を行ったところ、Tet2 欠損群では TNF α 経路がエンリッチしていた (図 7)

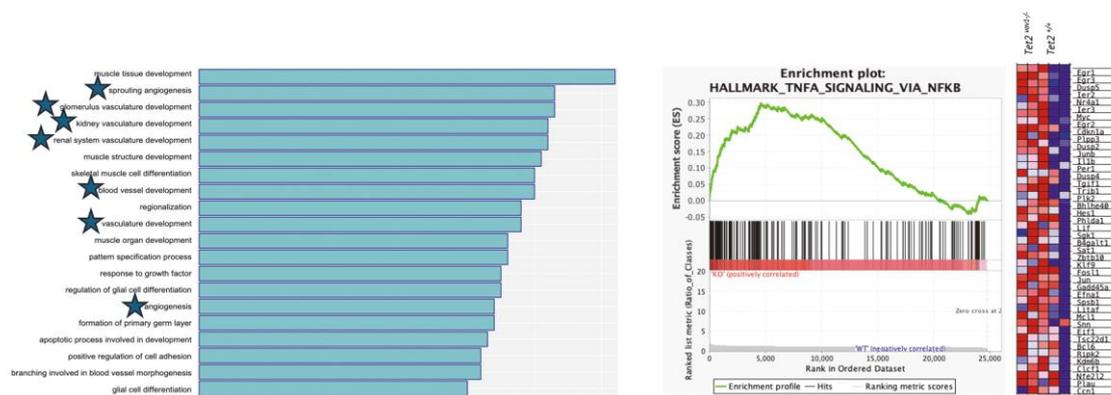


図 7 Tet2 欠損微小環境における遺伝子発現変化

左 メタスケープによる GO 解析

星印は血管新生に関わる経路を示す

右 GSEA 解析

TNF α 経路が Tet2 欠損群でエンリッチしている

4-4. 考察

一連の研究において、メラノーマモデルを用いて Tet2 欠損微小環境の影響を調べたところ、ゲノム異常によって、腫瘍の増大への影響は異なることが明らかとなった。Tet2 欠損微小環境による腫瘍増大の促進がみられる場合については、腫瘍細胞の増殖や生存に対する直接の支持、抗アポトーシス作用、あるいは免疫応答の抑制、腫瘍血管新生の促進などが考えられる。全トランスクリプトーム解析では、血管新生に関する経路が多数エンリッチしていることから、腫瘍血管新生の促進を介する可能性が示唆される。今後は組織学的検討をさらに詳細に進めるとともに、一細胞解像度の RNA シーケンス解析や多重組織染色解析により、この点が明らかになると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ai Nhan Le Thi, et al. Sakata-Yanagimoto M
2. 発表標題 Elucidating The Roles of Immune Cells Arising From Clonal Hematopoiesis In Colon Cancer Metastasis.
3. 学会等名 第52回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 坂田（柳元）麻実子
2. 発表標題 クローン性造血とそれに基因するリウマチ性疾患：VEXAS 症候群。
3. 学会等名 第33回日本リウマチ学会関東支部学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sakata-Yanagimoto M
2. 発表標題 Immune cells derived from clonal hematopoiesis function as a niche for cancer cells
3. 学会等名 2nd JCA-AACR Precision Cancer Medicine International Conference（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sakata-Yanagimoto M
2. 発表標題 Immune cells derived from clonal hematopoiesis affect cancer progression
3. 学会等名 第82回 日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2023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	鈴木 絢子 (Suzuki Ayako) (00770348)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授 (12601)	
研究 分担者	NGUYEN THI・MINH・ YEN (Nguyen Thiminhyen) (20968010)	筑波大学・附属病院・研究員 (12102)	

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