

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24614007

研究課題名(和文)がん細胞 腫瘍関連マクロファージ間相互作用におけるセリンの重要性と制御法の開発

研究課題名(英文)Significance of L-serine in intercellular communication between cancer cells and tumor-associated macrophages

研究代表者

小川 拓哉 (Ogawa, Takuya)

国際医療福祉大学・薬学部・講師

研究者番号：30457147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍関連マクロファージ(TAM)は、固形がん組織におけるがんの増悪に深く関与する。我々は過去に、マクロファージの機能は細胞外からのセリンの供給に依存することを見出した。そこで本研究では腫瘍細胞がセリンの産生を介してTAMと細胞間コミュニケーションを行っている可能性について検討し、その制御法開発の基盤とすることを目指した。

セリン合成系酵素Phgdh等のノックダウンによりセリン合成能や輸送能を変化させた腫瘍細胞をマウスに移植し、腫瘍形成やTAMの遊走・極性等について解析を行った。解析の結果、セリン合成・輸送の抑制は腫瘍細胞自身の増殖を抑制したが、TAMに対する影響は特に認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Tumor-associated macrophages (TAMs) play important roles in tumor development. Previously, we revealed the importance of serine from the extracellular milieu for the differentiation of bone marrow macrophages. In this study, we evaluated the contribution of serine for recruitment and tumor supporting function of TAMs. Suppression of serine biosynthesis or serine transport in mouse tumor cells by microRNA introduction decreased the proliferation of tumor cells in vitro as well as in vivo. Although neither infiltration nor polarization of TAMs were affected by the alteration of production and supply of serine from tumor cells, serine biosynthesis as well as neutral amino acid transporters can be a valid therapeutic targets for the treatment of cancers.

研究分野：細胞生物学

キーワード：セリン Phgdh 腫瘍 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

がん組織はがん細胞以外にも様々な細胞から構成され、がん細胞由来のサイトカインや増殖因子の作用により、がんの成長・浸潤に適した環境を形成している。腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophages : TAM) は、多くの固形がんの炎症浸出液中に多く見られる主要なミエロイド系の白血球細胞であり、その集積と治療の予後には相関が知られる。TAM は組織の修復や繊維化に関わる M2 型マクロファージ様の活性化様式を示し、IL-10、CCL17、CCL22 などの抗炎症性サイトカインや、VEGF、PlGF、MMP9 などの血管新生・組織修復を促進する因子を産生し、がん細胞の免疫からの回避や血管新生、浸潤に重要な役割を果たす。ビスホスホネート系製剤等による TAM の除去や、TAM の活性化状態を炎症性の M1 型へと誘導する方法などにより、がん組織の縮退や抗がん剤への応答性改善、血管組織の正常化などが見られることが報告されており、近年、がん治療における標的細胞の一つとして注目されている。近年、悪性度の高いがん細胞において *de novo* セリン合成に関わる *Phgdh* 遺伝子の発現が亢進しているとの報告が相次いでおり、がんの増殖や骨転移能とセリン合成能の関係について注目が集まっている。がん細胞における *Phgdh* の発現亢進の意義としては、セリンの合成過程で生じる α -ケトグルタル酸を TCA 回路に補充することで、がん細胞自身の高いエネルギー需要を満たすことが主な役割とされている。

多くの細胞において、セリンは通常、解糖系中間代謝産物から *de novo* 合成により供給可能なため、栄養学的には非必須アミノ酸に分類される。一方、応募者はこれまでに、骨髄マクロファージでは *Phgdh* の発現が低く、セリン非存在下ではその増殖や破骨細胞への分化が強く抑制されることを明らかにした。また、別のマクロファージ系細胞であるミクログリアも *Phgdh* の発現レベルが低く、脳内での免疫応答には細胞外からのセリン供給が必須であることが知られている。これらのマクロファージが示すセリン要求性は、マクロファージ系細胞全般に共通した特徴である可能性が考えられる。一方、*in vivo* において骨髄マクロファージ近傍の骨芽細胞やミクログリアの周辺に存在するアストロサイトでは、逆に *Phgdh* の発現が高く、これらマクロファージ系細胞への重要なセリン供給源である可能性がある。このことから、腫瘍組織においても同様に、TAM の増殖や活性化にはがん細胞で産生される豊富なセリンが重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、がんの増悪におけるがん細胞と TAM の細胞間相互作用へのセリンの

寄与について調べ、腫瘍細胞が産生するセリンが腫瘍組織内の他の細胞との細胞間コミュニケーションに寄与している可能性について検証することで、セリン供給源・アミノ酸トランスポーター・アミノ酸飢餓ストレス応答経路を標的とした、新規がん治療法開発の基盤とすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) セリン合成能を亢進・抑制した腫瘍細胞の構築と腫瘍細胞の増殖への影響

マウス *Phgdh*、および *Phgdh* に対する miRNA を発現するレトロウイルスベクターを構築した。調製した組換えレトロウイルスをマウス由来の腫瘍細胞に感染させ、セリン合成能を亢進、または抑制されたマウス腫瘍細胞を樹立した。セリン合成能の変化が腫瘍細胞自身の増殖に与える影響について、*in vitro*、*in vivo* において検討した。*in vivo* における検討の際は、親株である腫瘍細胞と同じ系統のマウスを用いた同系移植モデルにより実験を行った。

(2) TAM の生存・集積・極性に対する腫瘍細胞由来セリンの寄与についての検討

セリン合成能が亢進・抑制された腫瘍細胞をマウスに同系移植し、形成された腫瘍組織における TAM の集積を調べた。TAM は、抗 F4/80 抗体を付加した磁気ビーズによるポジティブセレクションにより調製を行った。調製した TAM の遺伝子発現について調べ、腫瘍細胞が産生するセリンが TAM の極性に与える影響についても解析を行った。ここで、M1 マクロファージには *Il-1b*、*Il-6*、*Mhc11* の発現を、M2 マクロファージには *Arg1*、*Fizz1*、*Il-10*、*Mgl1*、*Mgl2*、*Mrc1*、*Vegfa*、*Ym1* の発現を指標とし、解析を行った。

(3) TAM のセリン取り込み・応答経路の阻害による腫瘍組織への影響の解析

腫瘍細胞-TAM 間のセリンを介した細胞間コミュニケーションを遮断するため、TAM のセリン取り込み経路を抑制する方法について模索し、がんに対する抑制効果について検討を行った。

4. 研究成果

まずはじめに、C57/BL6 マウスに由来する非小細胞肺癌 3LL、メラノーマ B16F10、Tリンパ腫 EL4 について、*Phgdh* の発現レベルを調べた。また、非腫瘍細胞である繊維芽細胞 NIH3T3 および前駆骨芽細胞 MC3T3-E1 を比較対照のために用いたところ、いずれの細胞も NIH3T3 に比べて *Phgdh* の発現亢進がみられた。ただし、EL4 を除いてその差はそれほど顕著ではなかった。また、非腫瘍細胞である MC3T3-E1 も *Phgdh* の発現レベルは比較的高かった。

各細胞を C57BL/6 マウス皮下に同系移

植し、形成された腫瘍組織より F4/80 の発現を指標に TAM を調製したところ、3LL 細胞移植時に体積あたりの TAM の集積が最も多かった。そこで、以下の実験は 3LL を中心に用いることとした。

3LL に対して Phgdh-HA 発現ベクター、または Phgdh に対する miRNA の発現ベクターを導入し、セリン合成活性を亢進または抑制した細胞を樹立した。miRNA は 5 箇所の標的部位に対して設計を行ったが、いずれの配列も高いノックダウン効率を示した。得られた細胞のセリン合成能については、HPLC を用いたアミノ酸定量により確認を行った。WST-8 アッセイにより樹立した細胞の *in vitro* での増殖を調べ、Phgdh 発現レベル変化の影響とセリン依存性について検討したところ、3LL 細胞は Phgdh の発現抑制によりある程度増殖が抑制されることが分かった。またセリン飢餓条件下では、ノックダウン細胞における増殖抑制はより顕著であった。

各細胞を C57BL/6 マウスの皮下に同系移植し、形成される腫瘍組織のサイズを計測して *in vivo* での増殖を評価したところ、*in vitro* での増殖能と同様にノックダウン細胞では腫瘍の成長に抑制がみられた。形成された腫瘍組織より TAM を調製し、Phgdh の発現レベルの違いによる TAM の遊走・集積への影響を調べたが、特に影響は見られなかった。TAM より cDNA を調製し、リアルタイム PCR によりマクロファージの極性を調べた。その結果、TAM では Arg1、Mrc1、Vegfa 等の発現が高い M2 様の極性を示した。また、腫瘍細胞における Phgdh 過剰発現、または Phgdh ノックダウンの影響を調べたが、特にマクロファージに極性に変化は見られなかった。

また、腫瘍細胞と TAM のセリンを介した細胞間コミュニケーションの遮断により、腫瘍形成を抑制することが可能かどうかを検証するため、3LL、TAM の中性アミノ酸トランスポーターの発現について比較を行ったところ、3LL、TAM はともに Slc1a5 を発現していた。Slc1a5 はセリンの取り込み・排出の双方に関わると考えられたことから、Slc1a5 をノックダウンした 3LL を作製し、マウスへの移植実験を行った。Slc1a5 ノックダウン細胞では腫瘍形成の抑制が認められたものの、TAM の遊走や極性には影響が見られなかった。

以上より、Phgdh の発現レベルの違いによる腫瘍の成長の差は、腫瘍細胞自身の増殖速度の差に依存しており、TAM の遊走や極性変化に起因するものではないと考えられる。ただし、Phgdh や Slc1a5 の発現抑制により、腫瘍の形成に抑制効果が見られたことから、これらの分子を標的とした腫瘍抑制法の有効性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文](計 5 件)

- (1) Sayano T, Kawano Y, Kusada W, Arimoto Y, Esaki K, Hamano M, Udono M, Katakura Y, Ogawa T, Kato H, Hirabayashi Y, Furuya S. Adaptive response to l-serine deficiency is mediated by p38 MAPK activation via 1-deoxysphinganine in normal fibroblasts. *FEBS Open Bio.* 2016;6(4):303-16. doi: 10.1002/2211-5463.12038. (査読有)
- (2) Esaki K, Sayano T, Sonoda C, Akagi T, Suzuki T, Ogawa T, Okamoto M, Yoshikawa T, Hirabayashi Y, Furuya S. L-Serine Deficiency Elicits Intracellular Accumulation of Cytotoxic Deoxysphingolipids and Lipid Body Formation. *J Biol Chem.* 2015;290(23):14595-609. doi: 10.1074/jbc.M114.603860. (査読有)
- (3) Ikeda A, Iizuka T, Maekubo N, Aono R, Kikuchi J, Akiyama M, Konishi T, Ogawa T, Ishida-Kitagawa N, Tatebe H, Shiozaki K. Cyclodextrin complexed [60]fullerene derivatives with high levels of photodynamic activity by long wavelength excitation. *ACS Med Chem Lett.* 2013;4(8):752-6. doi: 10.1021/ml4001535. (査読有)
- (4) Nitta M, Imamura M, Inoue Y, Kunitomo Y, Lin ZY, Ogawa T, Yogo K, Ishida-Kitagawa N, Fukunaga N, Okano H, Sato E, Takeya T, Miyoshi J. Aberrant gene expression and sexually incompatible genomic imprinting in oocytes derived from XY mouse embryonic stem cells *in vitro*. *PLoS One.* 2013;8(3):e58555. doi: 10.1371/journal.pone.0058555. (査読有)
- (5) Ishida-Kitagawa N, Tanaka K, Bao X, Kimura T, Miura T, Kitaoka Y, Hayashi K, Sato M, Maruoka M, Ogawa T, Miyoshi J, Takeya T. Siglec-15 protein regulates formation of functional osteoclasts in concert with DNAX-activating protein of 12 kDa (DAP12). *J Biol Chem.* 2012;287(21):17493-502. doi: 10.1074/jbc.M111.324194. (査読有)

[学会発表](計 5 件)

濱野桃子、佐矢野智子、有本八潮、川野裕輝、鶴殿美弥子、片倉喜範、小川拓哉、加藤久典、平林義雄、古屋茂樹 細胞内 *de novo* セリン合成系欠損による酸化ストレス脆弱性惹起と炎症関連遺伝子発現誘導 日本農芸化学会 2016 年度大会 2016 年 3 月 28 日 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

小川拓哉 マクロファージの細胞外セリンの取り込みに関わるアミノ酸トランスポーターの同定 第 5 回国際医療福祉大学学会 2015 年 8 月 30 日 国際医療福祉大学大田原キャンパス(栃木県・大田原市)

小川拓哉 骨吸収抑制活性を有するアミノ酸アナログ体の骨指向性の向上 第 4 回国際医療福祉大学学会 2014 年 8 月 30 日 国際医療福祉大学大田原キャンパス (栃木県・大田原市)

小川拓哉 破骨細胞分化におけるセリン要求性とセリン供給細胞としての骨芽細胞の同定 第 3 回国際医療福祉大学学会 2013 年 8 月 31 日 国際医療福祉大学大田原キャンパス (栃木県・大田原市)

北川(石田)教弘、小川拓哉 破骨細胞における新規 DAP12 会合受容体 Siglec-15 の機能解析 第 30 回日本骨代謝学会学術集会 2012 年 7 月 21 日 京王プラザホテル (東京都・新宿区)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者
小川拓哉 (Takuya Ogawa)
国際医療福祉大学・薬学部薬学科・講師
研究者番号：
30457147

(2)研究分担者
北川教弘 (Norihiro Kitagawa)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教
研究者番号：
30294284

(3)連携研究者
なし ()
研究者番号：