

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830077

研究課題名(和文) Rbによるサイトカインを介したがん悪性化制御機構の解明

研究課題名(英文) CCL2 induced by RB inactivation contributes to the formation of tumor-promoting inflammatory microenvironment

研究代表者

北嶋 俊輔 (KITAJIMA, Shunsuke)

金沢大学・がん進展制御研究所・特任助教

研究者番号：90566465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：がん抑制遺伝子RBの不活性化は、がんの悪性進展過程において頻繁に観察される。私達はこれまでに、特定のがん細胞において、RBの追加的不活性化によりサイトカイン分泌亢進依存的にがん幹細胞様性質が誘導されることを明らかにした。本研究では、特にCCL2の発現亢進に着目し、その分子機構として、RB不活性化に伴う酸化ストレス増大、それに続くJNK活性化が関与することを明らかにした。さらに、CCR2(CCL2受容体)欠損マウスへの腫瘍移植実験およびRB欠損依存的乳がんマウスモデルの解析を行い、RB不活性化によるCCL2発現亢進が、特にGr-1陽性血球細胞のがん微小環境中への遊走に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Inactivation of RB gene is frequently found during tumor progression and correlated with drug resistance or undifferentiated state in some kinds of cancer. We previously found that RB inactivation contributes to the acquisition of stem cell-like activity via activation of inflammatory signaling. But the receptors of some cytokines induced by RB inactivation such as CCL2 were not expressed in tumor cells themselves. Up-regulation of CCL2 secretion was dependent on ROS accumulation and subsequent JNK activation caused by RB inactivation. RB inactivated myofibrosarcoma cells highly expressed CCL2. And these cells showed higher tumorigenic activity in wild type mice but not in CCR2 knockout mice. Angiogenesis and infiltration of Gr-1 positive cells into tumor microenvironment were decreased in CCR2 knockout mice compared with wild type mice. Here we state that CCL2 induced by RB inactivation contributes to the formation of tumor-promoting inflammatory microenvironment.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：RB CCL2 CCR2 Tumor microenvironment

## 1. 研究開始当初の背景

がん抑制遺伝子 RB (Retinoblastoma) は、主に細胞周期における G1/S 期の進行を抑制する細胞周期制御機構の中心分子である。RAS 経路の活性化や p16 の不活性化等に起因する RB の過剰リン酸化は、非常に多くのヒトがん細胞で観察される。しかし RB 遺伝子自身の変異や欠失は、網膜芽細胞腫など一部の例を除くと、発がん過程ではなく悪性進展過程において集中して観察され、進行がんにおける RB 不活性化と薬剤耐性獲得等との相関が報告されている。これらの現象は、RB による細胞周期の制御だけでは十分に説明がつかず、詳細な分子機構は未解明である。

私達はこれまでに、p53 欠損マウス由来の筋繊維芽腫細胞において RB を追加的に不活性化することによって、がん幹細胞様の未分化状態 (幹細胞様スフィア形成活性陽性・胚性幹細胞特異的遺伝子発現陽性) を安定的に誘導することに成功した。この細胞の培養上清を、元の p53 欠損腫瘍細胞に作用させたところ、スフィア形成活性が陽性化した。つまり、RB 依存的に未分化性を誘導する因子は細胞外に放出されていることになる。そこで、スフィア形成活性陽性・陰性細胞の全 RNA シーケンス解析を行ったところ、IL-6、CCL2 等のサイトカイン群の発現が陽性細胞において特異的に亢進していた。特に、IL-6 投与はスフィア形成陰性細胞の陽転誘導に十分であり、IL-6 の下流シグナルとして STAT3 が活性化し、未分化性の誘導に寄与することを明らかにした。逆に、培養上清によるスフィア形成誘導および STAT3 活性化は、抗 IL-6 抗体の添加によって阻害された。これらの結果を踏まえ、様々な腫瘍における IL-6 分泌を測定したところ、乳がんでは、未分化/高悪性度なものほど IL-6 分泌が亢進することが判明した。さらに、高分化型の乳がん細胞においては、RB 不活性化に伴い IL-6 の分泌が亢進し、乳がん幹細胞様細胞の誘導に寄与することを明らかにした。

## 2. 研究の目的

がん抑制遺伝子 RB が哺乳類細胞周期制御機構の中心分子であることに疑いはない。しかし、哺乳類と類似したサイクリン群等の細胞周期制御因子を持つ酵母がこの遺伝子を持たず、植物も含め多細胞生物への進化とともにこの RB 遺伝子が出現した事実には、おそらく深い理由がある。私達は、がんの悪性進展過程において、RB 不活性化が種々のサイトカイン・ケモカインの分泌を促進し、隣り合う細胞や細胞外の環境への活発な働きかけを誘導する可能性を明らかにした。

本研究では、RB 不活性化によりサイトカインが誘導される分子メカニズムの解明、およびこれらサイトカインの分泌亢進が、実際に炎症性微小環境の形成を介して、がん悪性進展に与える影響を解析することを目的とした。特に本研究では CCL2 の分泌亢進に着

目した。CCL2 は RB 不活性化により誘導されるが、がん細胞自身に CCR2 (CCL2 受容体) はほとんど発現していないため、誘導された CCL2 はがん細胞自身ではなく、がん微小環境を構成する周辺組織に対して作用していると考えた。本研究の完成により、RB の非細胞自律的な機能とその分子機構を解明することによって、がん微小環境研究に新展開をもたらす、新規かつ汎用性のある制がん標的分子を提案する。

## 3. 研究の方法

がんの転移・再発に代表されるがん悪性進展には、がん細胞の微小環境形成が重要なステップであることが明らかになっているが、その成立機構は明確ではない。本研究では、私達が有する p53 欠損マウス由来がん細胞初代培養系と乳がんマウスモデルを基盤に、RB の不活性化により誘導されるサイトカイン群が、直接的に腫瘍組織内の炎症性微小環境形成と転移能亢進に寄与する分子機構を解明した。

(1) RB 不活性化によりサイトカインが誘導される分子メカニズムの解明

RB 不活性化によるサイトカイン発現亢進の分子メカニズムを解明するために、阻害剤スクリーニングを行った。ポジティブコントロールとして、サイトカイン発現の上流として知られる STAT3 および NF- $\kappa$ B 経路に対する阻害剤を用いた。また DNA マイクロアレイ解析を行い、RB 不活性化により細胞内で活性化される細胞内シグナルを網羅的に解析した。

(2) RB 不活性化ががん微小環境形成に与える影響を解析

RB 不活性化により誘導されるサイトカイン群の分泌亢進と STAT3 活性化が、腫瘍形成部位における炎症性微小環境の形成および転移能に促進的に作用するか否かを明らかにする。まず、p53 欠損マウス由来の筋繊維芽腫細胞において、RB 不活性化により誘導したがん幹細胞様細胞を、CCR2 欠損マウスを始めとするサイトカイン受容体欠損マウスおよび野生型マウスに接種し腫瘍形成能や転移能の比較によって、RB 不活性化によるがん悪性化が、レシピエントマウスの遺伝背景に依存するか否かを明らかにする。次に、免疫染色法とフローサイトメトリーにより、これらの腫瘍形成部位へ遊走する免疫担当細胞、線維芽細胞等の数と種類を比較、RB 不活性化に伴うサイトカイン群の分泌亢進ががん微小環境の形成および転移能に与える影響を詳細に解析した。

(3) 乳がんマウスモデルを用いた解析

これまでに *in vitro* モデルを用いた解析結果から、高分化型の乳がん細胞においても、RB 不活性化により CCL2 の分泌が亢進することを明らかにした。そこで、p53 欠損背景に

において RB 遺伝子欠損に依存して乳がんを形成するモデルマウス (MMTV-Cre;Rb<sup>fllox</sup>;p53<sup>-/-</sup>) と CCR2 欠損マウスを掛け合わせた複合変異マウスを作製した。誘導される腫瘍の大きさやマウスの生存曲線、病理組織学的観察による腫瘍内微小環境の解析を行うことで、RB 遺伝子欠損に依存して生じる乳がん、CCL2 の分泌亢進に伴う炎症性微小環境の形成が寄与するかを検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 阻害剤スクリーニング、および DNA マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現解析の結果、RB 不活性化により CCL2 が誘導される分子メカニズムとして、RB によるミトコンドリア代謝制御を介した酸化ストレス経路および JNK 経路の制御が重要であることを見出した。

(2) p53 欠損マウス由来筋線維芽肉腫細胞を野生型マウス皮下に同種同系移植したところ、コントロール群と比較して RB 不活性化細胞では、がん組織中における免疫担当細胞の遊走および血管新生の亢進を免疫染色により確認した。

(3) p53 欠損マウス由来筋線維芽肉腫細胞を用いて、CCR2 欠損マウスを宿主として同種同系移植を行ったところ、野生型マウスを宿主とした場合と比較して、特に GR-1 陽性血球細胞の遊走および腫瘍形成が顕著に抑制された。これらの結果から、RB 不活性化により CCL2 発現誘導が、炎症性微小環境の形成を促進し、がん悪性化に寄与することが示唆された。

(4) TCGA データベース解析、ヒトがん細胞株スクリーニング等を行った結果、p53 欠損マウス由来筋線維芽肉腫細胞のみならず、ヒト乳癌細胞株においても、RB 不活性化により CCL2 が誘導されることが明らかになった。そこで、p53 欠損背景下で乳腺特異的に RB を欠損することにより乳癌を形成する MMTV-Cre; Rb<sup>fllox</sup>;p53K0 マウスを作製し、さらに CCR2 欠損マウスとの交配を完了した。今後、乳癌形成あるいは悪性進展過程における RB 不活性化依存的な CCL2 発現亢進の役割を In vivo で解析予定である。

本研究は、RB 不活性化により誘導されるサイトカインが、炎症性微小環境の形成という非細胞自律的な作用を介して、がん悪性化を促進するという、これまでの RB 研究の枠を超えた革新的な内容である。さらに、がん細胞自身のがん抑制遺伝子変異が直接的に炎症性微小環境形成に寄与する、という新しい概念を提案した。(図 1)

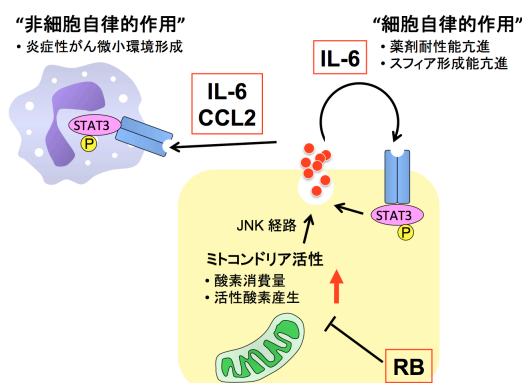


図 1. RB によるサイトカインを介したがん悪性化制御機構

#### 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 3 件)

① N. Okahashi, S. Kohno, S. Kitajima, F. Matsuda, C. Takahashi and H. Shimizu.

Metabolic characterization of cultured mammalian cells by mass balance analysis, tracer labeling experiments and computer-aided simulations. Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, Epub ahead of print (doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.04.003.), 2015

② S. Kitajima, S. Kohno, A. Kondoh, N. Sasaki, Y. Nishimoto, F. Li, S.A. Mohammed, H. Muranaka, N. Nagatani, M. Suzuki, M. Kido and C. Takahashi.

Undifferentiated state induced by Rb-p53 double inactivation in mouse thyroid neuroendocrine cells and embryonic fibroblasts. Stem Cells, 査読有, Epub ahead of print (doi: 10.1002/stem.1971.), 2015

③ A. Shamma, M. Suzuki, N. Hayashi, M. Kobayashi, N. Sasaki, T. Nishiuchi, Y. Doki, T. Okamoto, S. Kohno, H. Muranaka, S. Kitajima, K. Yamamoto and C. Takahashi

ATM mediates pRB function to control DNMT1 protein stability and DNA methylation. Molecular and Cellular Biology, 査読有, 33(16): 3113-3124, 2013.

[学会発表] (計 7 件)

① 北嶋俊輔, 高橋智聡 Undifferentiated state induced by Rb inactivation associated with enhanced inflammatory signaling. 第 73 回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜 (神奈川・横浜), 2014 年 9 月 26 日

② 北嶋俊輔, 高橋智聡 がん幹細胞仮説とが

ん化シグナル, 日本生化学会北陸支部第3  
2回大会、富山大学(富山・富山), 2014年  
5月24日

③ 北嶋俊輔, 高橋智聡 Undifferentiated  
state induced by Rb inactivation  
associated with enhanced inflammatory  
signaling. がん研究分野の特性等を踏まえ  
た支援活動公開シンポジウム, 一橋講堂(東  
京), 2014年1月30日~31日

④ 北嶋俊輔, 高橋智聡 Undifferentiated  
state induced by Rb inactivation  
associated with enhanced inflammatory  
signaling. International Symposium on  
Tumor Biology in Kanazawa & Symposium on  
Drug Discovery in Academics, 金沢エクセ  
ルホテル東急(石川・金沢), 2014年1月  
23日~24日

⑤ 北嶋俊輔, 高橋智聡 Undifferentiated  
state induced by Rb inactivation  
associated with enhanced inflammatory  
signaling. 第36回日本分子生物学会年会,  
神戸ポートアイランド(兵庫・神戸), 2013  
年12月4日

⑥ 北嶋俊輔, 高橋智聡 Undifferentiated  
state induced by Rb inactivation  
associated with enhanced inflammatory  
signaling. Third International RB meeting,  
Monterey(USA), 2013年10月8日

⑦ 北嶋俊輔, 高橋智聡 Undifferentiated  
state induced by Rb inactivation  
associated with enhanced inflammatory  
signaling. 第72回日本癌学会学術総会,  
パシフィコ横浜(神奈川・横浜), 2013年  
10月4日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北嶋 俊輔 (KITAJIMA Shunsuke)  
金沢大学・がん進展制御研究所  
特任助教  
研究者番号: 90566465

### (2) 研究分担者

該当無し

### (3) 連携研究者

該当無し