

博士論文(要約)

腎同所性移植モデルを応用した腎がん悪性形質制御機構の解析

西田 純

論文の内容の要旨

論文題目 腎同所性移植モデルを応用した腎がん悪性形質制御機構の解析

氏名 西田 純

がん細胞は、転移を成立させるために複数の悪性形質を獲得する。がん転移は多段階の過程を経るが、その各過程において必要な悪性形質が存在する。悪性形質の例として、がん細胞が原発腫瘍ならびに転移先の臓器で増殖するために必要な腫瘍形成能や、組織内移動や血管内浸潤に必要な運動能が挙げられる。これらの悪性形質を持つがん細胞の発生や選択には、様々な細胞集団や細胞外マトリクスからなるがん微小環境も関与する。がん微小環境はがん細胞に、細胞間相互作用を経て新たに悪性形質を授ける。あるいは、がん微小環境には悪性形質を抑制する因子も存在するが、それらは悪性形質を有したがん細胞を選別する選択圧となり、やがて抑制因子に対する耐性を獲得したがん細胞が生み出される。がん微小環境はがん細胞と同様に治療標的となることが証明されており、血管新生阻害剤や免疫チェックポイント阻害剤はその最たる例である。

腎細胞がんは、世界において成人の罹患するがんのうち 2~3%を占める。主な組織型は淡明細胞型であり、肺、骨、脳あるいはリンパ節に転移する。淡明細胞型腎細胞がんの主な特徴として、*VHL* 遺伝子の機能消失と、それに引き続く *HIF* シグナルの活性化ならびに血管新生の亢進が挙げられる。治療に際しては外科的手術に加え、血管新生阻害剤が用いられる場合がある。また、一部の腎細胞がんはサイトカイン療法に感受性があり、近年では免疫チェックポイント阻害剤の使用も承認された。これらの薬剤の治療効果を踏まえると、腎細胞がんの進展の抑制にあたっては、がん微小環境を制御することは極めて有効な手段であると言える。腎細胞がんのがん微小環境と悪性化進展の関連性をより深く理解することで、新規治療法の創出につながると考えられた。

そこで本研究では、がん微小環境との関連性からがん細胞の悪性形質を探索し、その制御機構を明らかとすることを目的とした。そのためにがん微小環境と腎がん細胞の相互作用を実験的に模倣したモデルとして、腎同所性移植マウスモデルを応用した。また、腎細胞がんにおいてこれまで見出されなかった悪性形質とその制御機構に着目し、新規治療標的を見出すことを目的とした。

第1章

がん微小環境に存在する TGF- β は、がん発生初期においては腫瘍形成能を抑制する等、腫瘍抑制的に働くと考えられている。しかしながら、進行期のがんでは TGF- β は運動能を亢進させ、腫瘍促進的に働くと考えられる。多くのがんではその進展過程において TGF- β 受容体や Smad といった TGF- β シグナル伝達構成因子の発現低下が見られる。このような変化は、TGF- β による腫瘍抑制効果の喪失に繋がると考えられる。一方で、このような変化が運動能の低下を引き起こすという報告は非常に少なく、何らかの迂回経路が存在することが考えられた。腎細胞がんにおいては、一部の TGF- β 受容体の発現低下は報告されているものの、それに基づく悪性形質の詳細な制御機構は理解されていない。

本章では、腎細胞がんにおける TGF- β シグナル伝達構成因子の発現低下に着目し、腫瘍形成能ならびに運動能に対する作用を探索した。まず大規模データベースの解析より、腎細胞がんにおいて発現低下している TGF- β シグナル構成因子を探索した。その結果、腎がんの進行症例において TGF- β III 型受容体(TGFBR3, betaglycan)の発現が有意に低下していること、ならびに TGFBR3 の低発現は予後不良と相関することが見出された。続いて TGFBR3 の腫瘍抑制効果を腎同所性移植マウスモデルにて検討したところ、TGFBR3 の発現低下によって原発腫瘍形成と肺転移の両者を亢進させることが示された。そこで、TGFBR3 の発現低下が腫瘍形成能と運動能に与える影響に関して詳細に解析した。第一に腫瘍形成能に関する解析を行なった。腎細胞がん細胞は TGFBR3 低発現条件下では、TGF- β 2 シグナルの伝達活性が低下していることが確認された。また詳細な検討の結果、腎細胞がん中に存在する ALDH 陽性がん細胞が腫瘍形成能の高いがん始原細胞としての機能を持つこと、また TGFBR3 低発現条件下では TGF- β 2 による ALDH 陽性がん始原細胞の消失機構が遮断され、腫瘍形成能が維持されることが示唆された。第二に運動能に関する解析を行なった。TGF- β シグナルの遮断に伴い、細胞運動能の低下が見られることが推測されたが、予想に反し TGFBR3 ノックダウンによって間葉系マーカーの発現が増加し、細胞運動能が亢進した。またこの作用は、TGF- β シグナル非依存的であり、FAK-PI3K シグナルを介した葉状仮足形成に伴うものであった。

以上より本研究では、腎がん細胞における TGFBR3 発現の低下は TGF- β シグナル依存的、非依存的な複数経路を変動させることで、腫瘍形成能と細胞運動能を亢進させることが示唆された。

第2章

続いて、がん微小環境へ長期曝露されることによって腎がん細胞で生じる悪性形質に着目し、その制御機構を解析することで、新規の治療標的因子を探索した。本章では腎がん細胞の悪性形質としてその役割が明らかでなかった腫瘍内在性炎症に着目した。腫瘍内在性炎症とは、がん細胞がサイトカインやケモカインなどの炎症関連因子を放出することによって生じる腫瘍促進的な炎症のことである。炎症関連因子によって遊走あるいは活性化した免疫細胞は、原発腫瘍あるいは遠隔臓器においてがん細胞の増殖や転移を促進する。また、これらの免疫細胞は化学療法抵抗性などにも関与するとされる。腫瘍内在性炎症の制御機構に関しては、これまでがん発生初期のドライバー遺伝子変異が関与することが知られてきた。しかしながら、がん細胞とがん微小環境の相互作用による、がん細胞のエピゲノム変化等、がん進行期に生じる事象が腫瘍内在性炎症の増幅に関与するかは明らかではなかった。

そこで本章では腎同所性移植マウスモデルを用いて、がん微小環境に十分曝露された腎細胞がん亜株を樹立した。これらを解析することで、腎細胞がんにおいて腫瘍内在性炎症が生じるか検討し、その制御機構と新規治療標的因子を探索した。新たに樹立した亜株は親株と比較し、腎同所性移植されたマウスの生存期間を有意に短縮させ、原発腫瘍と肺転移性腫瘍の進展を有意に亢進させたことから、高悪性株であることが確認された。また高悪性株由来の原発腫瘍ならびに転移性肺腫瘍では、親株由来の腫瘍と比較して CD11b 陽性 Ly-6G 陽性好中球の浸潤が有意に亢進しており、腫瘍内在性炎症の亢進が唆された。また、高悪性株において好中球が自然肺転移に寄与していることが確認されたが、一方で、この現象は親株では観察されなかった。つまり好中球依存的な肺転移促進機構は、がん微小環境における教育で初めて生じる表現型であることが確認された。好中球の詳細な作用点に関しては、原発腫瘍中での血管新生への関与、ならびに高悪性原発腫瘍によって活性化した好中球の肺転移生着過程への関与、の二点が考えられた。続いて高悪性株と親株の遺伝子発現を比較し、この表現型の制御機構を探索した。高悪性株においては、好中球動態関連遺伝子として CXCL1、CXCL2、CXCL5、CXCL8 の発現が上昇していることが確認された。続いてこれらの遺伝子発現の変動にエピゲノム変化が関与している可能性を考え、H3K27 アセチル化を指標として活性化エンハンサーの変動を評価した。その結果、高悪性株における CXCL1、CXCL8 の遺伝子コード領域近傍に、スーパーエンハンサーと思われるエンハンサーが高度に活性化した領域が見られた。高悪性株ではこの領域に一致して、アセチル化ヒストンのリーダータンパクである BRD4 の高度な結合も見られた。そこで BRD4 の機能を BET 阻害剤で阻害したところ、CXCL1、CXCL2、CXCL5、CXCL8 の発現が低下した。また、高悪性株の腎同所性移植マウスモデルにて BET 阻害剤による治療実験を行なったところ、原発腫瘍中の好中球比率の減少、ならびに血管新生の減弱、肺転移の抑制が確認された。

以上の結果より、腎細胞がん細胞内ではがん微小環境との相互作用によって好中球動態関連遺伝子にエピゲノム変化が生じ、腫瘍内在性炎症を誘導することで、好中球依存的に肺転移することが示唆された。また腎細胞がんにおいては、BET 阻害剤を用いることで、腫瘍内在性炎症が抑制され、肺転移が阻害されることが示唆された。

本研究では腎同所性移植マウスモデルを用いることで、腫瘍抑制的な因子として働く TGF- β に対する耐性機構と、それに伴う複数の悪性形質の制御機構を明らかとした。また、腎細胞がんでこれまで見出されなかった悪性形質として腫瘍内在性炎症に着目し、その好中球を介した機能とエピゲノム制御機構を明らかとした。特に BET 阻害剤に関しては腫瘍内在性炎症の抑制効果から、今後の検討によって、他の分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害剤との相加相乗的な効果が期待される。