

令和 2 年 4 月 22 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年

受付番号 201860420

氏 名 笠島 裕明

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： サンディエゴ（国名： 米国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

PKC ζ に着目した癌微小環境における線維芽細胞の機能解析と新規治療法の確立

3. 派遣期間：平成 30 年 4 月 1 日 ～ 令和 2 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関：バーナム研究所

受入部局名：癌代謝シグナル経路プログラム

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意

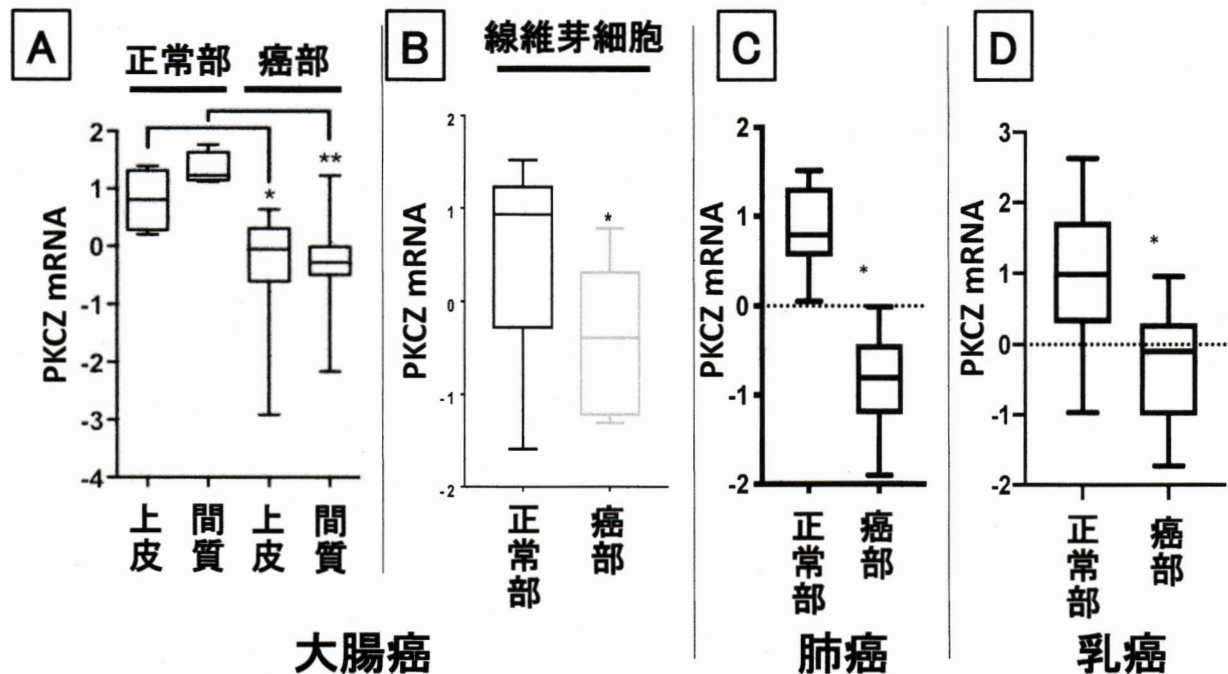
書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

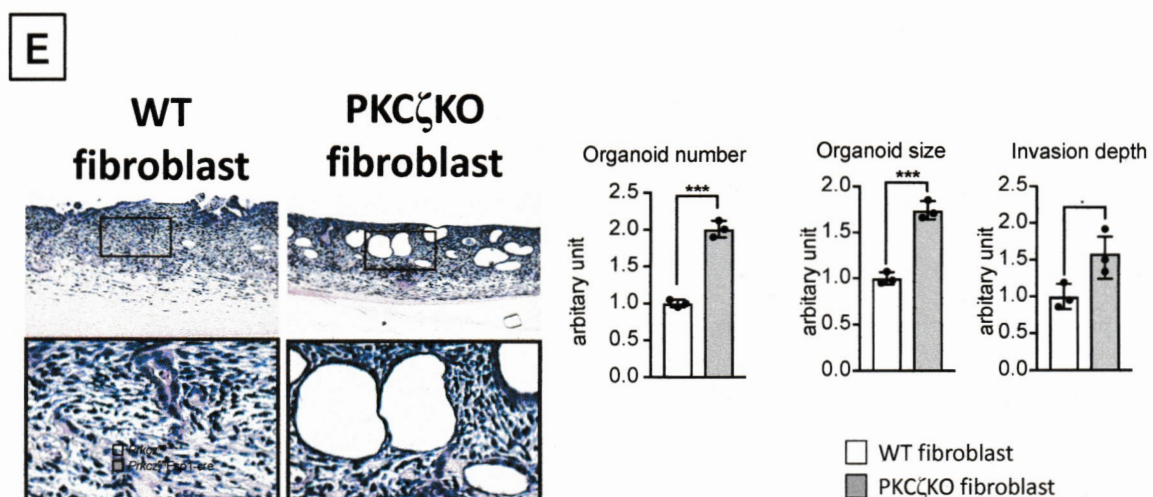
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

A. PKC ζ の欠失した活性化線維芽細胞が誘導する腫瘍原性および上皮幹細胞能への影響の検討

申請者は、申請時にヒト遺伝子発現情報データベースを用いた大腸癌の解析で、**癌部における PRKCZ mRNA の発現は上皮細胞・間質細胞ともに抑制されていた**ことを報告したが(図 A, B), さらに**肺癌・乳癌**の解析においても**癌部におけるPRKCZ mRNAの発現が間質細胞で抑制されている**ことを確認した(図 C, D).

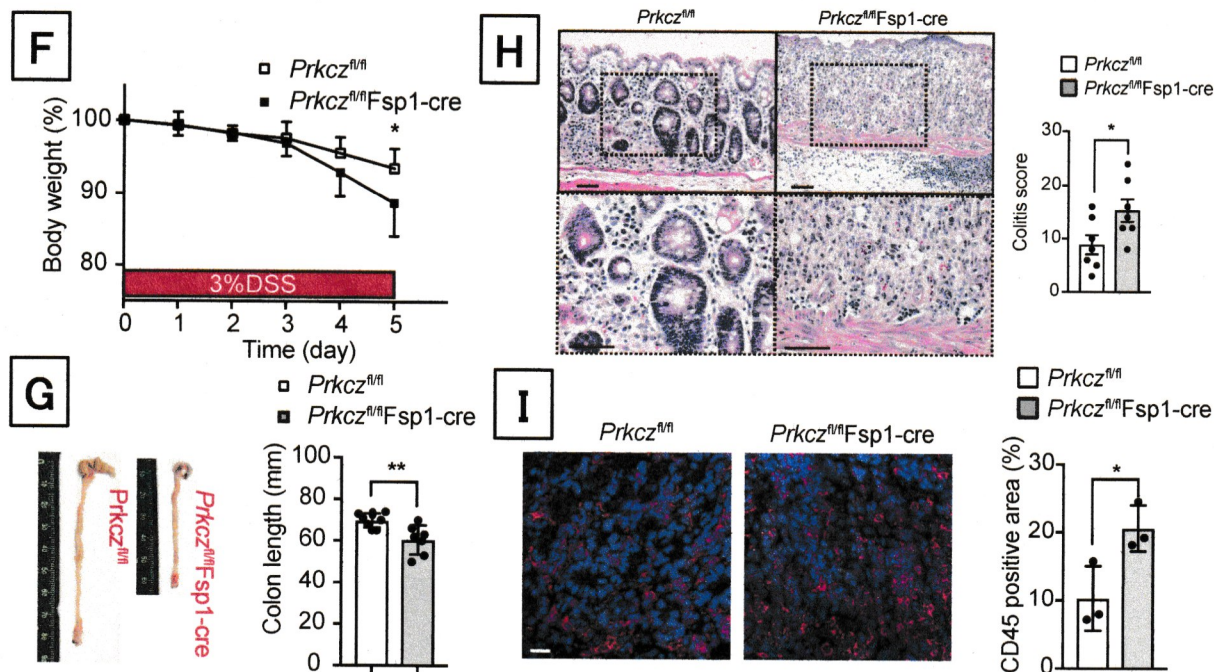


続いて、WT マウス、PKC ζ ノックアウトマウスの大腸から線維芽細胞を樹立し、大腸癌細胞と線維芽細胞を基底膜マトリックス上で共培養する3D 培養システムを用いて in vitro での浸潤能を検討したところ、PKC ζ ノックアウトマウスから樹立した線維芽細胞は、WT マウスから樹立した線維芽細胞に比較し、**大腸癌細胞の浸潤能を亢進**させたことを報告したが、申請者はさらに *Lgr5eGFP-creERT2 Apcfl/fl*, *KrasLSL-G12D*, *Tgfr2fl/fl* and *Trp53fl/fl* マウスに発生した腸管腫瘍から樹立したマウス腫瘍オルガノイド(MTO) (Daniele VFT, Natur, 2018)を用いて線維芽細胞と共培養する3D 培養システムを開発し、PKC ζ ノックアウトマウスから樹立した線維芽細胞が、WT マウスから樹立した線維芽細胞に比較し、**MTO の増殖能および浸潤能を亢進**させることを明らかにした (図 E)。



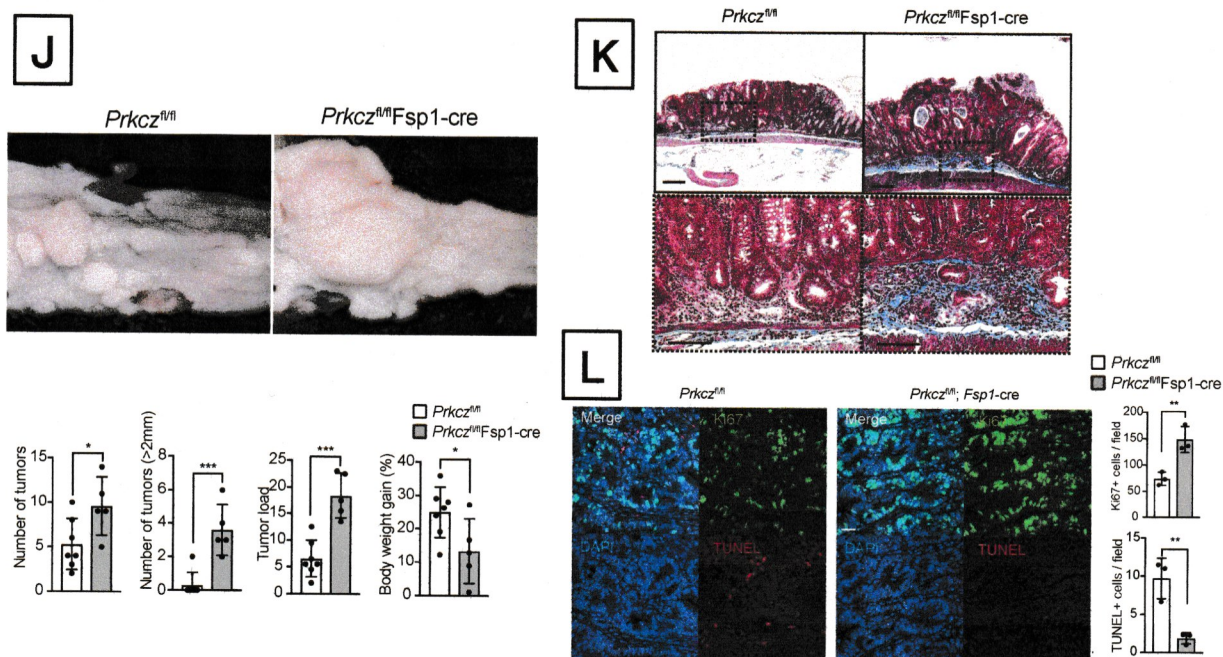
大腸癌発生過程における線維芽細胞の PKC ζ が果たす役割を検討するため、派遣先機関の所有する PKC ζ -floxed マウスと FSP-1-Cre マウスを交配させ、**線維芽細胞の PKCZ を細胞特異的にノックアウトしたマウスモデル**を作成した。デキストラン硫酸ナトリウム(プロ炎症剤, DSS)を投与し、惹起した炎症の程度を in vivo で評価したところ、PKC ζ ノックアウト群において**体重は有意に減少**し(図 F), **腸管長は有意に**

短縮した(図 G)。また PKC ζ ノックアウト群において組織学的に炎症の程度は有意に亢進しており(図 H), CD 45 陽性炎症細胞浸潤が有意に強く認められた(図 I)。



続いて、同様のマウスモデルにアゾキシメタン(マウス遺伝毒性物質, AOM)とデキストラン硫酸ナトリウム(プロ炎症剤, DSS)を投与し、発生した腸管腫瘍の数やサイズを in vivo で評価したところ、PKC ζ ノックアウト群において有意に腸管腫瘍数は多く、腫瘍サイズは大きかった(図 J)。

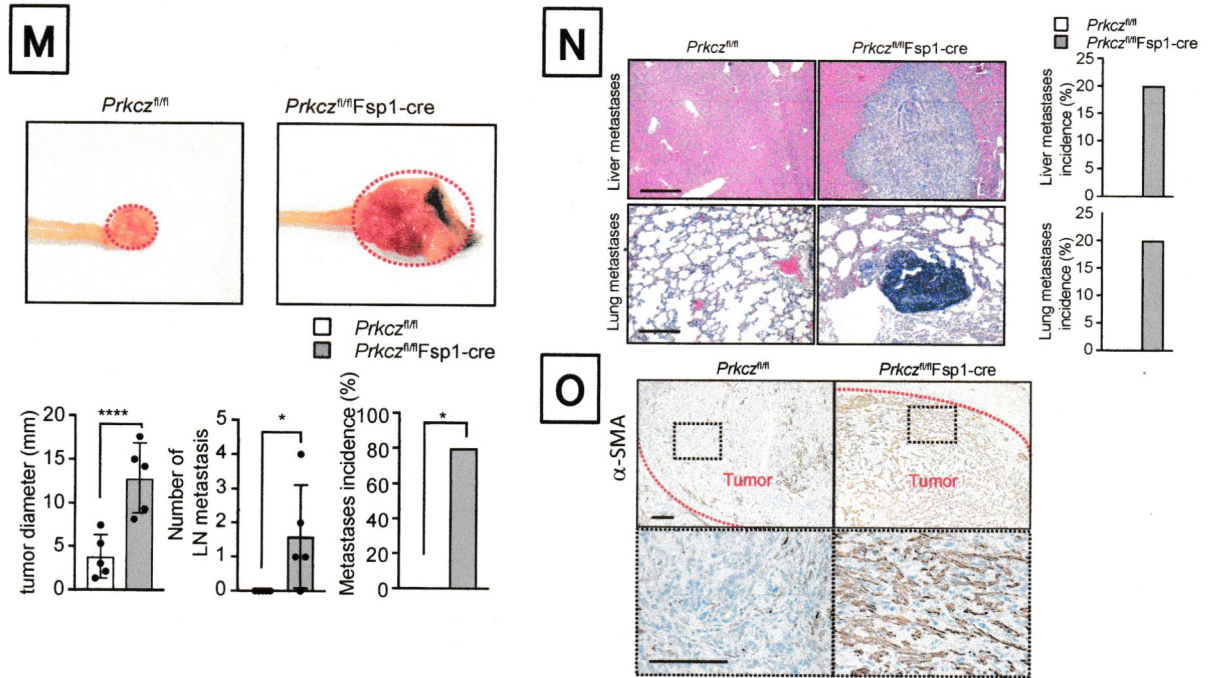
また Masson Trichrome 染色を行ったところ、PKC ζ ノックアウト群の腫瘍部では膠原繊維が強く発現しており、線維芽細胞特異的 PKC ζ の欠失により間質部分の活性化が誘導されていることが示唆された。



さらに Ki67 染色および TUNEL 染色を行い解析したところ、PKC ζ ノックアウト群の腫瘍部では Ki67 陽性細胞が有意に多く、TUNEL 陽性細胞が有意に減少していた(図 L)。線維芽細胞特異的 PKC ζ の欠失により誘導された腫瘍は WT 群に比較し増殖能が亢進しており、アポトーシスが減弱していることが示唆された。

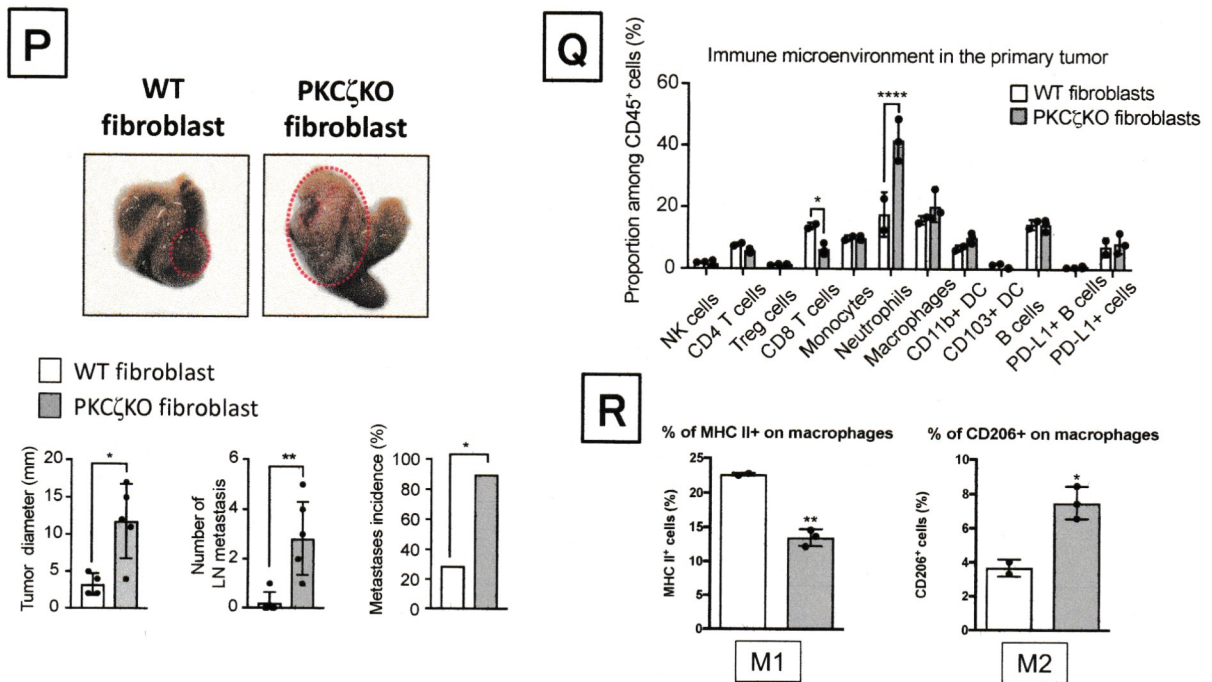
続いて、上述のマウスに対し MTO を用いた大腸癌同所移植モデルを作成し、大腸癌進展過程において線維芽細胞の PKC ζ 欠損が及ぼす、線維芽細胞の腫瘍促進効果について解析した。MTO を直腸に同所移植したところ、PKC ζ ノックアウト群において有意に腫瘍サイズは大きく、リンパ節、肝臓および肺転移が多く認められた(図 M, N)。また α -SMA 染色を行ったところ、PKC ζ ノックアウト群において腫瘍間質部に

α -SMA 陽性細胞が多く認められ(図 O), 間質に存在する線維芽細胞の活性化が示唆された。



B. PKC ζ 欠損が及ぼす免疫応答への影響の解明

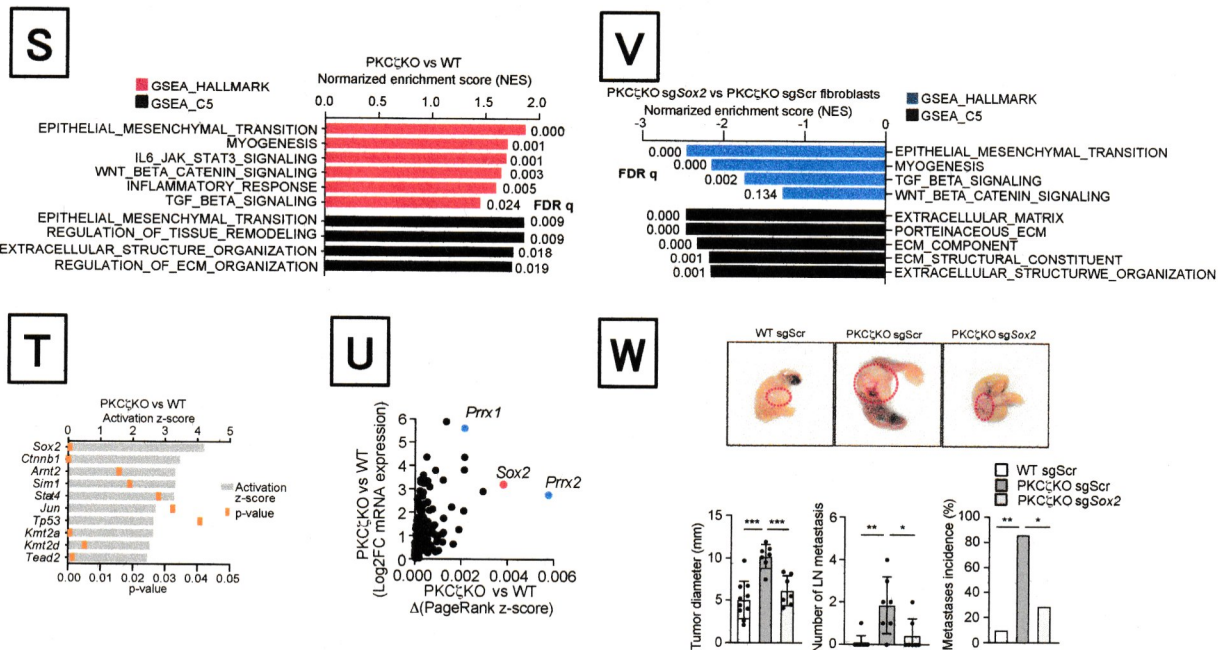
MTO および樹立した線維芽細胞を用いた大腸癌同所移植モデルを作成し, 大腸癌進展過程において線維芽細胞の PKC ζ 欠損が及ぼす腫瘍における免疫応答への影響を解析した。



盲腸漿膜下に MTO と樹立した WT および PKC ζ ノックアウトマウスから樹立した線維芽細胞を混注する大腸癌同所移植モデルを用いた結果, PKC ζ ノックアウト群において有意に腫瘍サイズは大きく, 転移が多く認められた(図 P). さらに腫瘍を免疫細胞に注目した FACS sorting した結果, PKC ζ ノックアウト群において CD8 陽性細胞は有意に減少しており, 腫瘍関連好中球は有意に増加していた。またマクロファージに関しては, M1 マクロファージの割合が減少し, 腫瘍関連 M2 マクロファージは増加していた(図 Q, R)。

C. PKC ζ 欠損が及ぼす線維芽細胞活性化機序の解明

上述の結果にもとづき, WT および PKC ζ ノックアウトマウスから樹立した線維芽細胞 (WT, PKC ζ KO fibroblast)を用いて, RNA sequencing および ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing)を行った。



RNA sequencingをGene Set Enrichment Analysis (GSEA)で解析した結果、PKCζ KO fibroblastにおいて線維芽細胞活性化に關与する遺伝子群 (EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION, TGF_BETA_SIGNALING など)がWT fibroblastに比較し、高発現していた(図 S)。これらの遺伝子発現を制御する上流遺伝子を同定する目的で、ATAC-seqの結果をIngenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN)を用いて解析した結果、**Sox2がUpstream regulator geneとして同定された**(図 T)。さらに、RNA sequencingとATAC-seqによって得られた転写活性およびopen chromatin accessibilityのデータを、TaijiソフトウェアによるPageRank algorithmで統合した結果、やはり**Sox2がkey driver transcriptional factorとして同定された**(図 U)。以上の結果より、PKCζ KOによる線維芽細胞活性化はSox2が重要な役割を果たすことが示唆されたため、続いてPKCζ KO fibroblastにおけるSox2をCRISPR-Cas9システムを用いてノックアウトした (PKCζ KO sgSox2 fibroblast)。得られた細胞にRNA sequencingを行い、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)で解析した結果、PKCζ KO fibroblastにおいて認められた線維芽細胞活性化に關与する遺伝子群の亢進が、**Sox2ノックアウトにより抑制された**(図 V)。この結果より、PKCζ KO fibroblastにおけるSox2ノックアウトが、PKCζ KO fibroblastによる腫瘍促進効果を抑制する可能性が示唆されたため、盲腸漿膜下にMTOと線維芽細胞を混注する大腸癌同所移植モデルを行なった。その結果、PKCζ KO fibroblastによって認められた腫瘍増大効果、転移促進効果は、PKCζ KO sgSox2 fibroblastによって抑制された(図 W)。

上述の結果は、論文として投稿済みであり、追加実験に関して現在査読中である。