

令和 3 年 8 月 13 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 年度

受付番号 201860634

氏 名 内藤 寛

(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: The Francis Crick Institute (国名: 英国)

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。

エクソソームを介した変異型 p53 の水平伝搬による癌微小環境への影響

3. 派遣期間: 平成 30 年 11 月 1 日 ~ 令和 3 年 7 月 18 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名: The Francis Crick Institute

部局名: Tumour Cell Biology Laboratory

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。

【研究・調査実施状況】

【研究背景】癌細胞の進展には、癌細胞自体が持つ特性のみならず、腫瘍内組織における癌細胞周囲周囲の微小環境が注目されている。特に、がん間質の主要な構成成分の一つである線維芽細胞、いわゆる癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts: CAF) は、細胞外基質の形成に関連する分子群、増殖因子などを介して癌細胞の増殖、浸潤、転移に寄与している。この観点から、近年 CAF を標的とした治療開発が試みられている [Nat. Rev. Cancer, 2006, Cancer Res., 2013 他]。しかしながら、これまでに CAF の産生を制御する因子として、多くの癌細胞由来の液性因子が報告されているが、CAF の起源となる細胞やその細胞の CAF への変化のメカニズム、そして CAF の性質の全容は明らかになっていない。さらに CAF は不均一な細胞集団であり、それぞれが癌細胞に対して異なる機能を有することが報告されており、これが CAF を標的とした治療の妨げとなっていると考えられている。

一方、p53 は著名な癌抑制遺伝子であり、大腸癌を含む多くの癌で遺伝子欠損や突然変異が見つかっている。興味深いことに、癌細胞周囲の CAF においても p53 の変異が見つかっており、p53 の機能不全が線維芽細胞の老化の抑制、CAF の性質に寄与していることが報告されている [Cell 2005, Trends in Genet. 2008, Nat. Cell Biol. 2015 他]。さらに、過去に癌遺伝子のコードされた DNA 断片やタンパク質分子がエクソソームを介して癌細胞より分泌されること、癌微小環境の構築に寄与してい

ること、間質の線維芽細胞にこれらエクソソーム内の分子が効率良く取り込まれることが報告されている [PNAS 2012, Oncotarget 2016 他]。以上の観点から、CAF 内部の p53 の変異が癌細胞由来のエクソソームによって引き起こされており、癌の進展や CAF の不均一性に寄与していると推測した。本年度は、1) 癌細胞由来のエクソソーム内に変異型 p53 タンパク質または変異型 p53 遺伝子をコードした DNA の存在が確認されるかどうか、2) これらが線維芽細胞に受け渡され CAF を誘導するかどうかについて解析した。また上記の他に、3) CAF の不均一性を生み出す癌細胞由来のエクソソームの存在を示唆する興味深い結果に加え、4) CAF の起源細胞を追跡し CAF の不均一性を空間的に検証するマウスモデルの構築に成功し、5) 異なる遺伝子変異を有する癌細胞との直接的、間接的相互作用による CAF の不均一性誘導のメカニズムについても興味深い結果が得られており、これらについても報告する。

【研究成果】

1) 癌細胞由来のエクソソーム内に変異型 p53 タンパク質または変異型 p53 遺伝子をコードした DNA の存在の確認

大腸癌細胞由来のエクソソーム内部に p53 タンパク質が含まれるかどうかについて検討を行うため、p53 WT である HCT116 細胞株ならびに p53 mutant (R273H, P309S) である SW480 細胞株を用いてエクソソームの単離を行った。各細胞株を無血清培地にて培養し、2 日後の培養上清を回収後、超遠心法を行い、得られた沈殿物をエクソソームフラクションとして解析した。Western blot 法によりエクソソームの conventional marker である CD9, 63, 81 の発現を確認し、エクソソームが培地中に分泌されているかどうか確認した。両癌細胞ともにエクソソームの存在が示唆されたものの、その分泌量については大きな違いは認められなかった。続いて、p53 タンパク質が各エクソソームに含まれているかどうかについて Western blot による検討を行った。しかしながら、これらエクソソーム内部に p53 タンパク質の存在は認められなかった。次に、PCR 法による検討を行い、癌細胞由来エクソソーム内部に p53 ゲノム DNA が認められるかどうかについて検討を行った。しかしながら、こちらについても同定することができなかった。一方、近年 Cell Reports 誌に同様のコンセプトの研究成果が報告されており (Cell Reports 2021, 34(6): 108726.)、エクソソーム内部に変異型 p53 タンパク質が内包されていることが示唆されている。当該研究の結果がこの論文の報告の結果と一致しないことから、より詳細な原因究明を行う必要があると思われる。

2) エクソソームによる癌関連線維芽細胞の誘導

HCT116 細胞株ならびに SW480 細胞株由来のエクソソームを処理した際の線維芽細胞が CAF 様の性質を有するかどうかについて検討を行うため、線維芽細胞に対し各癌細胞由来のエクソソームの処理を行った。エクソソーム処理後 3 日後に線維芽細胞より RNA を抽出し、qRT-PCR にて CAF マーカーの発現 (alpha-SMA, FAP, S100A4, PDGFR-alpha, PDGFR-beta) について検討を行った。その結果、両癌細胞由来のエクソソームにより、CAF マーカー発現の上昇が認められた。しかしながら、HCT116 由来のエクソソームを処理した場合に、線維芽細胞内部のマーカー発現により強く影響が認められた。これは、現在のモデルでは、p53 変異状態以外の別の細胞由来の因子の影響が排除できないことを示唆しており、当初の起動仮説を検証することが困難であることが明らかとなった。そのため、HCT116 細胞をベースとして p53 の変異株の作成を行い、p53 野生型 (wt) および変異型 (mut) の間で線維芽細胞内部での各 CAF マーカー発現などに影響が出るかどうかについて検討を行う予定であった。細胞株

は樹立ができたものの、上述の（１）の結果が芳しくないこと、現時点ではエクソソーム内部の p53 との直接的な関連が示せない可能性が高いこと、派遣終了日が近いことから、本研究は日本に持ち帰り引き続き検討することとした。

3) CAF の不均一性を生み出す癌細胞由来のエクソソーム

転移能や増殖能などの癌細胞の性質の違いがCAFの不均一性に影響を与えることが報告されている（Nat Commun, 2018; Cancer Cell, 2018）が、癌細胞由来のどのような因子が起因となりCAFの不均一性を生み出すのかについては不明な点が多い。そこで、線維芽細胞（NF）を高い腹膜播種転移能を有する癌細胞株、および腹膜播種転移能が低い癌細胞株と共培養し、NFに対してどのような影響を与えるかについて検討した。さらに、この線維芽細胞の形質変化を誘導する因子としてエクソソームに着目し、同様に検討した。以下に箇条書きで成果を報告する。

- 1) 高い腹膜播種転移能を有する癌細胞株、および腹膜播種転移能が低い癌細胞株を用いて非癌部線維芽細胞（NF）と共培養を行い、NF内部の遺伝子発現プロファイルに与える影響の違いについて検討を行った。マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析の結果、転移能の高い癌細胞株は、低転移株と比較して線維芽細胞内部の遺伝子発現プロファイルを大きく変えることがわかった。特に、これら線維芽細胞内で発現が変化した遺伝子には、これまでにCAFの性質と関連するケモカイン遺伝子、 α -SMA遺伝子およびコラーゲン遺伝子などが含まれていた。このことから、高い転移能をもつ癌細胞はより強く周囲のNFに作用し、CAFとしての性質を誘導する能力が高いことが示唆された。
- 2) 細胞染色を用いて、共培養環境下におけるケモカイン遺伝子、およびCAFのマーカーである α -SMAの発現について検討を行った。その結果、マイクロアレイの結果と一致して、低転移株と共培養したNFと比較して、高転移株と共培養したNFにおいて高いケモカイン産生、ならびに α -SMA発現が認められた。興味深いことに、両分子の発現は同一の細胞で発現しておらず、それぞれ異なる細胞で発現しており、癌細胞に教育を受けたNFがケモカイン発現と α -SMA発現によって不均一な集団を形成している結果となった。さらに、実際の患者組織サンプルを用いた免疫染色についてもケモカインまたは α -SMAを発現するCAFの不均一な集団が認められた。つまり、高転移性の癌細胞は、自身が進展しやすいように周囲のNFを教育し、癌細胞に有利な形質をもつCAFを生み出すことが示唆された。
- 3) 癌細胞由来のエクソソームがCAF不均一性に及ぼす影響を検証するため、高転移株および低転移株の培養上清から、超遠心法をもちいてそれぞれエクソソームを単離し、NFへの処理を行った。その結果、高転移株由来のエクソソームのみが、NFにおけるケモカイン遺伝子の発現を選択的に誘導していることが分かった。つまり、これまで明らかとされていなかったCAFの不均一性の形成に、エクソソームが関わっている可能性が示唆された。高転移株由来のエクソソームがNFにおけるケモカイン産生を誘導するメカニズムについて検討するため、各癌細胞由来のエクソソームを対象に、miRNA マイクロアレイ解析を行い、エクソソーム内部に含まれているmiRNAの発現について調べた。その結果、ケモカイン発現誘導に関わる複数のmiRNAを同定した。同定されたmiRNA mimicをNFに処理し、ケモカイン産生についてqRT-PCRおよびELISA法にて検討したところ、miR-193bがNFのケモカイン産生に寄与し、CAFの不均一性を生み出す一因となっていることを明らかとした。
- 4) 患者組織サンプルを用いた免疫染色により、癌細胞周囲のCAFにおけるケモカイン発現が患者予後不良と有意に相関しており、CAFにおけるケモカイン産生が、癌患者の予後予測マーカー

となり得ることが示唆された。

上記成果は国際学術雑誌であるOncogeneに掲載（研究発表(1)-2）され、国際細胞外小胞学会（ISEV）にて成果報告を行った。

4) CAFの起源細胞を追跡するマウスモデルの構築

近年、CAFの機能的・性質的不均一性が注目されており、この不均一性がCAFを標的とした癌治療の障害となっていると考えられている。これまでにCAFの起源細胞として、癌細胞周囲の線維芽細胞や血管内皮細胞、周皮細胞、脂肪細胞、骨髄由来間葉系幹細胞など様々な細胞が報告されている（Nat Rev Cancer, 2006）。一方で、同じ起源細胞から異なる性質を持つCAFを生み出すことも報告されている（Cancer Cell, 2018; Nat Med, 2018）。しかし、このように多様なCAFの起源細胞の報告がなされているにもかかわらず、癌細胞が進展していく過程の中で各起源細胞からCAFがどのように生み出され、機能的・性質的多様性を獲得しているのか、CAFの系統的な追跡を行った報告はない。また、これまでの報告は各起源細胞と癌細胞のみをin vitro環境下で検討したものが主であり、in vivoモデル内部でのCAFの不均一性を構築する各起源細胞同士の関係性についても不明である。腫瘍進展過程内において、特定のCAFの系統の遺伝的・形質的特異性が明らかとなれば、これを標的とした治療が可能となる。現在の研究計画では、癌細胞側からの因子の同定に主眼を置いていることから、背景組織の起源細胞の多様性については検討が困難である。そこで、癌細胞側の因子および背景組織の起源細胞の両面からCAFの不均一性の全体像を把握するため、CAFの系統追跡が可能なマウスモデルの構築についても遂行した。研究成果について、以下に箇条書きにて報告する。

- 1) CAFの系統追跡が可能なモデルの構築のため、本研究室で利用可能な2種類のマウスを選択した。1つは、CAFのマーカーのひとつであることが知られているPDGFR α のプロモーター制御下で、ヒストンタンパクH2Bと蛍光タンパク質GFPの融合タンパク質(H2B-eGFP)を発現するマウス(PDGFR α H2B-EGFP mouse)である。もう1つは、Creリコンビナーゼ誘導環境下においてランダムに4種類の蛍光タンパク質を細胞内部に発現させることができるマウス (Confetti mouse)を利用する。これらマウスに対し、p53変異型のマウス癌細胞を尾静脈注射にて接種し、マウス肺組織に腫瘍組織を形成させる。
- 2) PDGFR α は、正常肺においては線維芽細胞、周皮細胞および血管平滑筋細胞にのみ局在する。PDGFR α H2B-EGFP mouseは、PDGFR α 発現を有する細胞の核に緑色蛍光(H2B-eGFP)を呈することから、腫瘍形成中のCAF起源細胞の追跡が可能となる。まず、これらGFP陽性細胞が α SMAなどのCAFマーカー発現を呈するかどうかについて検討を行った。その結果、PDGFR α 発現を呈する細胞集団は、腫瘍組織内部にて α SMAなどのCAFマーカーを強く発現すること、各GFP陽性細胞それぞれでマーカー発現の強弱が存在すること、つまり性質的不均一性が存在することが分かった。正常組織では、血管周囲の一部細胞にて α SMA発現が認められたものの、大部分のGFP陽性細胞でCAFマーカーの発現は見られなかった。興味深いことに、主要周辺の正常組織と比較して、腫瘍組織内部に存在するGFP陽性細胞は、GFPそのものの発現強度が低くなる傾向にあることが分かった。これは腫瘍組織内部に存在するCAF起源細胞は、PDGFR α 発現が低下することを示唆している。
- 3) 上述のConfetti mouseは、Tamoxifen処理を行うことでCreリコンビナーゼを発現し、各細胞集団にランダムに蛍光タンパクが発現するようになる。しかしながら、現在のモデルでは全ての体細胞に蛍光タンパク質が発現してしまい、系統追跡が困難となる。この問題に対し、ある程度の細胞集団のみ蛍光タンパク質の発現を誘導することができるTamoxifenの濃度条件ならび

に接種のタイミングを特定し、この問題を解決した。また、本マウスの肺腫瘍組織を観察したところ、特定の傾向タンパク質の発現を有する紡錘形の線維芽細胞様の細胞集団が確認された。今後、これら細胞集団についてもCAFマーカー発現や各細胞系統マーカーの発現を検討する予定である。

5) 異なる遺伝子変異を有する癌細胞との直接的、間接的相互作用によるCAFの不均一性誘導のメカニズム

肺癌を含む多くの固形癌は進展過程の中で遺伝子の動的変化がもたらされ、遺伝的な不均一性が生じ、同一腫瘍内に多様なサブクローンが形成される。その結果、誘導される間質反応や誘導される形質も異なると考えられるが、このような遺伝的背景が異なる癌細胞間でどのような間質反応が誘導されるか、また誘導された間質細胞の形質がどのように変化または維持されるか、これらの空間的關係性については未だ不明な点が多い。そこで、遺伝的背景が異なる癌細胞とCAFを同じフラスコ内で培養し、直接的な細胞間相互作用を可能にした培養条件（直接的共培養）と、トランスウェルチャンバーを用いて液体因子のみの細胞間相互作用が可能な培養条件（間接的共培養）で遺伝子発現解析を行い、各培養法で変化する遺伝子群、特定の遺伝子変異背景をもつ癌細胞と共培養した場合で誘導される遺伝子群について解析を行った。以下に箇条書きで成果を報告する。

- 1) 異なる遺伝子背景を持った2種類の肺癌細胞株を、ヒト肺腺癌組織由来のCAFと直接的共培養を行い、RNA-seqによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、共培養する癌細胞の種類に応じて、炎症性サイトカイン遺伝子発現が亢進するCAFのsubtype、細胞外マトリックスのリモデリングやTGF β シグナルに関わる遺伝子群が亢進するCAFのsubtypeのそれぞれが誘導されることを示唆する結果が得られた。
- 2) qRT-PCRを用いたvalidation studyにより、それぞれの癌細胞に依存して誘導されるCAFのsubtypeに特異的に発現する分子マーカーを同定した。
- 3) 直接的・間接的共培養を行い、各共培養条件におけるCAF subtypeマーカー遺伝子群の発現を比較検討した。その結果、各癌細胞がそれぞれ直接的・間接的な細胞接触に依存してCAF側の遺伝子発現を制御すること、この制御機構は癌細胞に依存して変化する可能性が示唆された。

現在、これらのCAF subtypeがどのように誘導されるのかについて解析するため、シグナリング阻害剤やsiRNAなどを用いた検討を行い、特定のシグナル経路を阻害した場合の各マーカー発現について検討している。さらに、CAF subtypeの頑健性について検討するため、それぞれのCAF subtypeを誘導後、異なる遺伝子背景をもつ癌細胞と共培養した際の影響についても同様に検討を行う予定である。この研究成果についても、日本帰国後にFrancis Crick Instituteとのコラボレーションワークとして継続する予定である。

【成果発表・関連学会への参加状況】

2019年4月24～28日に京都で行われたInternational Society for Extracellular Vesicles (ISEV) 2019 Annual Meetingにて、主に上述の研究成果(3)に関する成果発表を行った。本発表はシンポジストとしての登壇であり、CAFの不均一性に関わるエクソソームの重要性について発表を行った。また、本学会ではポスター発表および口頭発表の座長としても参加し、エクソソーム研究および癌研究の発展に関して積極的に議論、意見交換を行った。また、同時期に国立がん研究センター研究所にて、山本 雄介

先生と上述のエクソソーム研究モデルに関する打ち合わせおよび意見交換を行った。しかしながら、2 年目に関して、コロナウイルスの世界的流行に伴う影響により、思うように研究ならびに研究成果報告を行う学会への参加が困難となり、国内外の学会での研究成果報告を行えていない。海外学振の派遣期間終了後となるが、今年の日本文科大学医学会（9 月）ならびに日本分子生物学会（12 月）にて、この度の研究成果報告を行う予定である。