

若手研究者助成金 実績報告書

令和 5年 3月 31日

日本大学学長 殿

氏 名：中西 祐輔

所属・資格：生物資源科学部・専任講師

実施研究所：生物資源科学部・生命科学研究所

下記のとおり報告いたします。

1 研究課題

和文表記 (40 字以内)

好中球細胞外トラップによる上皮間葉形質転換の誘導

英文表記

Relationship between neutrophils extracellular traps and epithelial-mesenchymal transition

2 研究期間

令和 4 年度

※令和 年度 ～ 令和 年度 (※特例措置により上記期間を変更している場合記入すること)

3 研究目的

がん治療を取り巻く環境は大きく変化している。分子標的薬を含む化学療法の発達、免疫療法の進歩などの恩恵は多くの患者に還元され、がんは不治の病ではなくなりつつある。一方で、がんは我が国の死亡原因 1 位という事実がある。この要因は、がん細胞の「転移」、特に化学療法耐性を獲得した後の「再発・転移」であることは疑う余地はない。

上皮-間葉形質転換 (Epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) は、腺癌細胞が細胞接着の機能を失い、間葉系細胞へと変化することによって遊走・浸潤能を獲得するプロセスを指す。近年、術後化学療法を想定したマウスモデルを解析した論文において、EMT は乳がんおよび膵管腺癌の肺転移および全身性播種の必要条件ではないものの、EMT を経た細胞は化学療法に対してより強い耐性を示し、再発性転移を構成する中心的な細胞群であることが報告されている (Nature, 2015)。これらの報告は、術後の化学療法に効果が表れない患者は EMT を経た転移が関与している可能性を強く示唆しており、EMT を標的とした治療戦略が転移・再発抑制効果を高められる可能性を示している。

化学療法耐性のがん細胞を生体から排除するためには、どのような方法が良いのであろうか？がん細胞の持つ特異的な性質を分子レベルで捉え、それを標的とする分子標的薬は比較的副作用の少ない治療法として一定の成果を挙げている。一方で、細胞の性質を変化させてしまう EMT のような現象には効果は懐疑的である。このようなケースには、幅広い抗原に対応しうることが可能ながん免疫応答を賦活することが有効だと考えられる。

腫瘍関連好中球 (Tumor associated neutrophil: TAN) は、腫瘍組織に浸潤・集積している好中球である。これらの細胞は、細胞外トラップ (Neutrophil extracellular traps: Nets) を放出することにより、原発巣においてキラーT細胞やNK細胞による抗腫瘍活性からの免疫逃避機構の確立に寄与していること、更には、肺への転移巣を構築するための微小環境を整える役割を果たしていることが知られている (*Immunity*,2020)。また、申請者の研究において、マウス転移性乳がん細胞株 4T1 で誘導した腫瘍内には多量の好中球が浸潤すること、およびその腫瘍内で Nets が引き起こされていることを明らかにしている (*BBRC*, 2022)。これらの事実から、TAN および Nets が EMT を介した転移・再発に深く関与しているのではないかと考えられた。よって、本申請課題では、EMT を介したがんの転移・再発メカニズムと TAN の関係性を明らかにし、TAN 側を標的とすることによる治療法の開発を目的とする。

4 研究概要

がんの「再発・転移」は今なお、がん治療における壁として立ちはだかっている。上皮-間葉形質転換 (Epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) はこの再発・転移に深く関わる生命現象と考えられているが、*in vivo* でのその細胞挙動を追跡することは難しく、また、臨床症状を模倣した再発・転移の実験は時間を有することからその詳細は明らかになっていない。本研究では、ゲノム編集技術を用いた EMT 標識細胞株と臨床症状を模倣したマウスモデルを用い、一部のがんにおいては、EMT の誘導に腫瘍微小環境に局在する好中球が関与しているという仮説の検証を目的とし、再発・転移の抑制に対する免疫治療の可能性を模索する。

5 研究結果

本研究では、臨床症状の転移・再発を反映させるため、ゲノム編集技術を用いた EMT 標識細胞株の樹立と乳がん細胞株の乳腺移植モデル (同所性移植モデル) を用いて、TAN と EMT の関連性を検討する。そのため、上皮系細胞の時は赤 (RFP+) に光り、EMT を起こし、間葉系細胞になると緑に光る (GFP+) カラースイッチ 4T1 細胞株を Crispr/Cas9 法を用いて樹立することを目指している。まず、Addgene より購入したプラスミドより loxp-DsRed-loxp の遺伝子配列を PCR で増幅した。この際、両末端に制限酵素サイトを付加しておいた。次に、PCR 産物を制限酵素サイトを用いて、GeneCopoeia 社の Mouse ROSA26 Safe Harbor Gene Knock-in Kits 中のクローニングベクターに挿入した。loxp-DsRed-loxp 配列を挿入されたベクターを大腸菌に形質転換することにより、ドナーDNA を取得する予定である。得られたドナーDNA と ROSA26 遺伝子に対する gRNA と CAS9 を発現するプラスミドを同時に 4T1 細胞にト

〔5 研究結果 (つづき)〕

ランスフェクションすることにより ROSA26 遺伝子配列に loxp 配列を持つ DsRed 蛍光 4T1 細胞株の樹立を目指していく。次に、Cre を挿入する EMT 関連遺伝子を決定するため、4T1 細胞株を EMT を誘導する代表的な誘導因子である TGF- β で刺激して、EMT 関連遺伝子の発現挙動を定量 PCR により測定した。その結果、カドヘリン遺伝子のリプレッサー因子である Snail の発現が最も強く誘導されていること、この発現はタンパクレベルでも誘導されていることが明らかとなった (図 1)。よって、Snail の下流に Cre の遺伝子を挿入することが、EMT カラースイッチ細胞を作るうえで有効であることが示唆された。

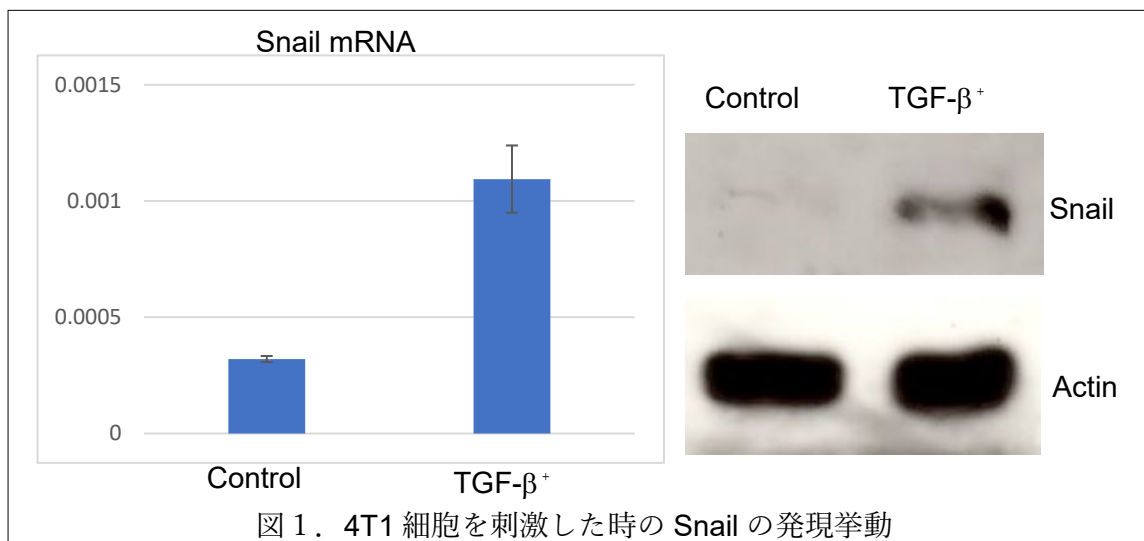


図 1. 4T1 細胞を刺激した時の Snail の発現挙動

最後に、臨床症状を反映させた転移モデルにおいて、Nets が関与しているかどうかを検討した。転移性乳がん細胞株 4T1 をマウスの乳房脂肪パッドに移植して原発巣を誘導した後、外科的手術により摘出した。その結果、乳がん細胞株を乳房脂肪パッドに移植する同所性移植モデルにおいても、腫瘍内への好中球の浸潤および Nets の産生が認められた。また、原発巣を除去した後、転移を起こした肺組織においても Nets の放出が認められた。よって、臨床症状を模倣した転移モデルにおいても Nets が関与している可能性が強く示唆された。今後、EMT カラースイッチ細胞および Nets を誘導するうえで必須の転写因子 PAD4 の遺伝子欠損マウス (Padi4 欠損マウス) を利用して転移・EMT・Nets の関係性を明らかにし、がんの再発・転移における新規の免疫療法の可能性について検証を進めていく予定である。

6 将来獲得を目指す学内外の競争的資金の種類 (※研究計画書に記載したものを記入すること)
 基盤研究 B、基盤研究 A、日本大学学術助成金

7 本研究をもとに申請した外部研究資金及びその獲得状況

氏名	申請年度	研究種目	研究課題	採・否

8 学会発表等

要旨集の抜き刷り、発表原稿のコピー等及び発表したことがわかるものを添付してください。

発表者名	学会、発表会名等	発表テーマ	発表年月

9 著書・雑誌論文

著書、雑誌、抜き刷り等を添付してください。コピーの場合は掲載されたことが客観的にわかるものを添付してください。

著者・執筆者	著書名・雑誌名／論文名	巻・号	年月	出版社・発行所
Mukai H , et.al.	Pannexin1 channel-dependent secretome from apoptotic tumor cells shapes immune- escape microenviroment/BBRC	628・5	2022	エルゼビア

10 本研究課題に関するその他の発表（新聞、一般雑誌掲載等）

1 1 他の研究への発展

1 2 その他の成果

1 3 本研究課題による発明届の提出及び知的財産権の出願・取得状況

名 称	知的財産の種類	発 明 者 (考案者・創作者)	権 利 者	出願・登録番号	出願年月日	取得年月日

※ホームページ等での公開 (可・否) いずれかをチェックしてください。
否の場合は、理由書を別途添付のこと。