

転移性大腸癌においてプロテオームレベルの制御を受ける癌免疫逸脱機構の解析

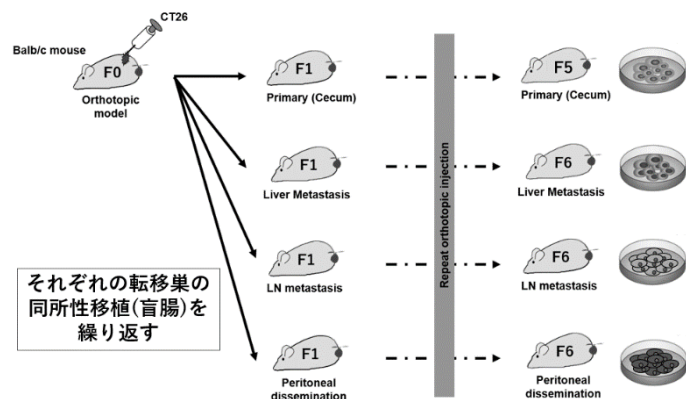
愛知県がんセンター研究所
分子診断トランスレーショナルリサーチ分野 主任研究員
阿部雄一

愛知県がんセンター研究所
分子診断トランスレーショナルリサーチ分野 分野長
田口歩

1. 研究の目的・背景

大腸癌では、遠隔転移巣も含めて完全切除が可能であれば外科的切除の適応となるが、肝転移切除後の再発は、残肝再発が約 49%、次いで肺転移が 20~30%と多く、大腸癌の生存率向上のためには、転移・再発の制御が極めて重要である。転移性大腸癌の分子生物学的知見はゲノム情報を中心に集積しつつあるが、いまだ有効な治療法の開発には至っていない。すなわち独創的なコンセプトに基づいて測定した分子プロファイルから大腸癌転移の克服に取り組む必要がある。

我々は免疫系の維持された環境下での大腸癌転移モデル構築を目指し、マウス大腸癌細胞株 CT26 を同系 Balb/c マウスに同所性(盲腸)移植した。その後、形成された原発巣と転移巣を採取して繰り返し同系同所性に移植する in vivo selection 法を用いて、肝転移、リンパ節転移、腹膜播種をそれぞれ高頻度に起こす亜株と、転移を起こしにくい亜株をそれぞれ樹立した(右図)。高転移性亜株は in vivo selection 法の過程で Balb/c マウスの持つ正常な免疫環境下にて転移性を獲得していることから、高転移性亜株には癌免疫からの逸脱を示す分子シグネチャが存在すると仮説を立て、RNA シーケンシ



グ、プロテオミクス解析を実施した。

プロテオーム特有に制御される癌免疫逸脱メカニズムを探索するために、RNA レベルとタンパク質レベルの間で、低転移性亜株に対する高転移性亜株の発現変動が著しく異なる遺伝子群を上位 5%で抽出し、Pathway 解析による機能的解釈を行った。その結果、腹膜播種高転移性亜株でのみ、タンパク質レベルの RIG-I を介した自然免疫シグナル抑制が明らかとなった ($p < 0.0033$)。RIG-I シグナル抑制は癌免疫逸脱を介して肺癌の転移を促進し (Ref1: J Clin Invest. 2009 Aug; 119(8):2399-411.)、かつ RIG-I アゴニスト投与はメラノーマに対する癌免疫活性化を誘導する (Ref2: J Exp Med. 2019 Dec 2;216(12):2854-2868.)。すなわち、癌免疫逸脱メカニズムにおける RIG-I を中心とした自然免疫シグナル機能を理解する事は、転移性大腸癌の制御に向けて極めて重要である。

同時に、RIG-I シグナルのタンパク質レベルでの抑制メカニズムとして、腹膜播種高転移性亜株にて Lysosome 関連遺伝子群のタンパク質発現亢進が有意に認められた ($p < 0.00084$)。RIG-I シグナルは Lysosome 関連遺伝子 (≒Autophagy) により分解・抑制されるため (Ref3: Autophagy. 2020 Mar; 16(3):408-418)、大腸癌腹膜播種の RIG-I シグナルも同じ制御を受けている場合、Autophagy 阻害による RIG-I を中心とした自然免疫シグナル再活性化を介した大腸癌転移制御が期待される。従って本研究では、①大腸癌腹膜播種の癌免疫逸脱における、自然免疫シグナルの機能的検証、②自然免疫シグナル抑制を引き起こす、Autophagy を中心としたタンパク質分解制御機構について重点的に検討した。

2. 研究の対象ならびに方法

①大腸癌腹膜播種の癌免疫逸脱における、自然免疫シグナルの機能的検証

大腸癌転移の癌免疫逸脱における自然免疫シグナルの機能的検証を、肝転移、リンパ節転移、腹膜播種をそれぞれ高頻度に起こす亜株と、転移を起こしにくい亜株を用いて進める。低転移性亜株に自然免疫シグナル因子の shRNA を導入し、同系 Balb/c マウスに移植した時の転移能が亢進するかについて検討する。同時に、自然免疫シグナル因子を過剰発現させた腹膜播種高転移性亜株を同系 Balb/c マウスに移植し、転移能が減少するか観察する。また癌免疫環境への影響を比較するため、各種免疫細胞のマーカーである CD4(ヘルパーT細胞)/CD8(キラーT細胞)/CD163(マクロファージ)抗体による組織染色を実施し、リンパ球/マクロファージの癌組織への浸潤量について検討する。また、アゴニストが存在する場合はその投与による自然免疫シグナル活性化が転移性・癌免疫環境に与える影響を、高転移性亜株を移植した同系 Balb/c マウスにて検討する。

②自然免疫シグナル抑制を引き起こす、Autophagy を中心としたタンパク質分解制御機構

タンパク質レベルにおける、自然免疫シグナルの抑制メカニズムを明らかにするため、自然免疫シグナル関連分子の Proteasome/Autophagy を介した分解についてそれぞれ検討する。

Proteasome/Autophagy 阻害薬を肝転移、リンパ節転移、腹膜播種をそれぞれ高頻度に起こす亜株と、転移を起こしにくい亜株に処理し、各条件での自然免疫シグナル関連分子の RNA/タンパク質発現レベルを比較する。RNA/タンパク質発現量の比較は、qRT-PCR および Western Blotting により実施する。培養細胞にて Proteasome/Autophagy 阻害による自然免疫シグナル活性化が認められた場合は、動物モデルでの検討に移る。低転移性亜株/高転移性亜株を移植した同系 Balb/c マウスに Proteasome/Autophagy 阻害薬を投与し、大腸癌増殖・転移に与える影響を比較する。更に、癌免疫環境への影響を比較するため、CD4/CD8/CD163 抗体による組織染色に基づいてリンパ球/マクロファージの癌組織への浸潤量について検討する。

阻害薬の動物モデルへの効果が認められた場合は、低転移性亜株/高転移性亜株における Pulse-SILAC 法(Ref4: Nature. 2008 Sep 4;455(7209):58-63)によるタンパク質代謝プロテオミクス解析を実施する。阻害薬処理下でのタンパク質ホメオスタシスへの影響を、低転移性亜株/高転移性亜株間で比較する事で、癌免疫逸脱メカニズムにおけるそれら阻害薬の薬理作用を明らかにする。

3. 研究結果

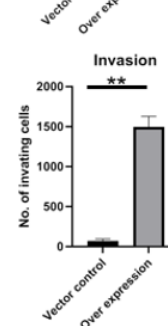
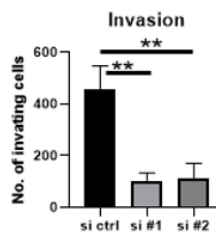
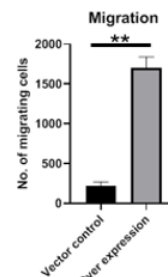
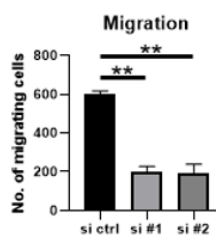
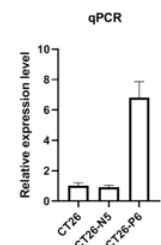
現在までに、低転移性亜株に対する腹膜播種高転移性亜株の発現変動が著しく異なる遺伝子群からいくつかの遺伝子について機能解析した結果、消化管粘膜免疫を制御する Tufts 細胞のマーカー分子 A が、腹膜播種の転移メカニズムを制御することを明らかにした。

分子 A は、RNA シーケンス解析、全細胞プロテオミクス解析とともに腹膜播種高転移性亜株に特異的な発現を示しており、qPCR による検証実験でもその発現増加が確かめられた。分子 A に対する siRNA 処理を行ったところ、細胞増殖には影響を示さなかった一方で、癌細胞の遊走能と、浸潤能

結果1

Expression and Identification Ratio of Molecular A in CT26-N5 and CT26-P6

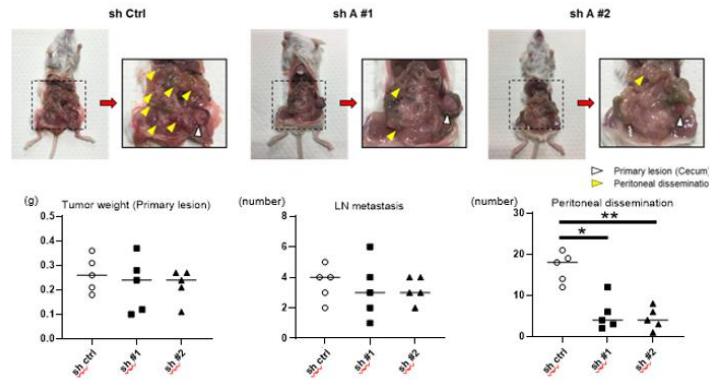
Gene Name or Protein Name	Data source	CT26-P6 vs CT26-N5
Gene A	RNA sequence	12.9
Molecule A	Proteomics (Whole cell lysate)	2.5



とが、有意に低下することを明らかにした。また分子 A の過剰発現によって、逆に癌細胞の遊走能と、浸潤能とが、有意に亢進することも確かめられた (結果 1)

次に、分子 A の In Vivo モデルにおける転移制御について、コントロール shRNA もしくは分子 A を標的とする shRNA 発現腹膜播種高転移性亜株を、同系 Balb/c マウスに移植して検討した。その結果、分子 A ノックダウンは、癌増殖やリンパ節転移に有意な変化を示さないものの、腹膜播種転移を有意

結果2

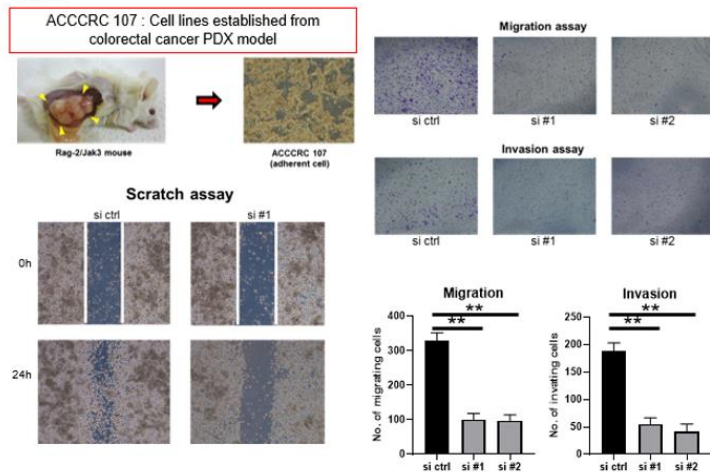


に抑制することが明らかとなった。以上の結果から、分子 A が、腹膜播種の転移メカニズムに特有の制御因子として機能していることが、In Vivo 環境でも確かめられた (結果 2)。

分子 A の転移における影響を、ヒト大腸がん PDX マウスから樹立した PDC 株 (ACCCRC-107) でも検討した。その結果、ヒト臨床をより反映していると考えられる PDC 株でも、分子 A ノックダウン時に癌細胞の遊走能・転移能が有意に低下することを確認した (結果 3)。

次に、分子 A の発現制御メカニズムの解明を目指した。低転移性亜株に対する腹膜播種高転移性亜株の発現変動が著しく異なる遺伝子群をもちいて Pathway 解析 (Gene Set Enrichment analysis) を実施したところ、IFN 関連シグナルが腹膜播種高転移性亜株で有意に亢進していることが判明した。

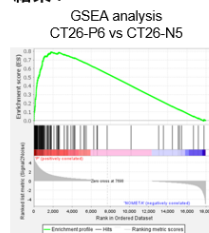
結果3



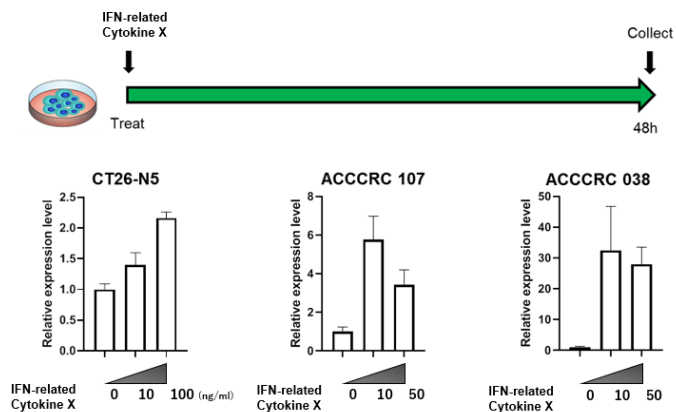
更に、培養上清に放出されているサイトカインの比較解析のため、低転移性亜株、腹膜播種高転移性亜株の培養上清を用い、分泌プロテオミクス解析を実施した。その結果、IFN 関連シグナル受容体 X が、腹膜播種高転移性亜株の培養上清で著しく増加していることが明らかとなった。IFN 関連シグナル受容体を介したシグナル伝達が、分子 A の発現を制御しているかどうか検討するため、IFN 関連シグナル受容体 X のリガンドにあたるサイトカインを培養中に添加し、分子 A の発現が変化するかを検討した。その結果、マウス大腸が

ん低転移性亜株、ヒト大腸がん PDX マウスから樹立した PDC 株 (ACCCRC-107, 038) いずれにおいても分子 A が、IFN 関連シグナル受容体 X のリガンドにあたるサイトカインの発現誘導を機能していることを確かめた (結果 4) まとめると、我々は分子 A が大腸がん腹膜播種における転移能を制御していることを明らかにした。また、その上流の制御メカニズムとして、IFN 関連シグナル受容体 X の関連を示すことができた。

結果 4



Protein Name	Data source	CT26-P6 vs CT26-N5
IFN-related Receptor X	Proteomics (Secretome)	245.7



4. 考察

ここまでの結果から、分子 A の大腸がん腹膜播種における転移能の制御、あるいは上流の制御メカニズムの一旦を明らかにした。一方で、プロテオミクス・RNA シーケンスデータの統合解析で明らかとなった、タンパク質翻訳・代謝による自然免疫の制御機構については未だ腹膜播種モデルでは検討できていない。

2021年11月に所属研究室に大型の質量分析計が導入され、現在、Pulse-SILAC法を元にしたタンパク質・分解のハイスループット解析 mPDP法 (Ref5: Cell. 2018 Mar 22;173(1):260-274. e25) の立ち上げ中である。新しい質量分析計および気相分離システム (Exploris240+FAIMS) を用いてタンパク質 Lysate、血漿サンプルの解析パラメーターの最適化を進めている。血漿プロテオミクスでは、新しく導入された気相分離システムで既存法のタンパク質同定数を1.4倍超伸ばすことに成功している。今後は、これらのシステムをマイクロスケールペプチド分離プロトコル StageTip と組み合わせることで、タンパク質産生・分解の網羅的解析ハイスループット化と、タンパク質同定数の向上を目指す。また mPDP法で得られたデータからタンパク質同定するためのアルゴリズムを、研究室で使っているタンパク質同定ソフトウェア (MaxQuant) へ導入中である。

今後の展開として、プロテオミクス階層で制御される自然免疫シグナル分子メカニズムを、腹膜播種高転異株モデルのタンパク質産生・分解の網羅的解析から明らかにすることを目指す。特に、分子 A や IFN 関連シグナルサイトカインの有無によってタンパク質産

生・分解がどのような影響を受けるかについて焦点をあて研究を進める。

同時に、自然免疫シグナル因子を過剰発現させた腹膜播種高転移性亜株を同系 Balb/c マウスに移植し、癌免疫環境への影響を、組織染色による比較から検討する。

5. 文献

Ref1: J Clin Invest. 2009 Aug; 119(8):2399-411.

Ref2: J Exp Med. 2019 Dec 2;216(12):2854-2868.

Ref3: Autophagy. 2020 Mar; 16(3):408-418

Ref4: Nature. 2008 Sep 4;455(7209):58-63

Ref5: Cell. 2018 Mar 22;173(1):260-274. e25

6. 論文発表

特になし