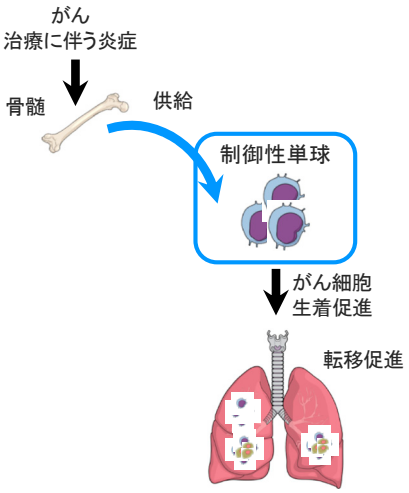
40　制御性単球によるがん転移促進機構の解明	田中　正人

【目的】がんの遠隔転移は、がん患者の予後を規定する最も重要な要素の一つであり、転移のメカニズムの解明とその制御法の開発は、がん治療における最重要課題である。がん転移の成立には、EMT などのがん細胞そのものの性質の変化に加えて、転移先の組織において、がん細胞の生着および増殖を可能にする局所の環境が整備されることが必要と考えられている。この環境は前転移ニッチ（premetastatic niche）と呼ばれ、免疫細胞や線維芽細胞等により形成される。これまでの研究により、この前転移ニッチの形成は炎症によって促進されることが明らかになっている。さらに、この炎症に伴う前転移ニッチ形成促進は、骨髄由来細胞、特に単球・マクロファージ系の細胞が重要な役割を担うことが報告されている。しかし、この炎症に伴う前転移ニッチ形成の鍵となる単球・マクロファージ系細胞の詳細は未解明であり、このことが、前転移ニッチ形成機構解明の大きな障壁となっている。本研究では、この前転移ニッチの形成における $Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球の関与を明らかにすることを目的とした。

【方法】がんの遠隔転移の評価には、B16 メラノーマ細胞株を用いた炎症誘発性血行性肺転移モデルを使用した。Ym1 発現細胞可視化マウスとして、Ym1-Venus マウスを用いた。また、Ym1 陽性細胞を選択的に消去する目的で Ym1-DTR マウスを用いた。炎症誘導には、LPS などの Toll-like receptor のリガンドを用いた。また、がん原発巣の治療として、外科切除あるいは放射線照射を行った。

【結果】本研究で我々は、$Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球が、炎症に伴う前転移ニッチの形成に重要な役割を担っていることを明らかにした。種々の TLR 刺激による炎症誘発性血行性肺転移モデルを用いた検討により、LPS 投与による炎症誘導により肺に前転移ニッチが形成され、がんの肺転移が促進されることが明らかとなった。Ym1 発現細胞可視化マウス（Ym1-Venus マウス）を用いた検討により、LPS 投与後に多数の $Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球が増産されること、および、$Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球を選択的に消去したマウス（Ym1-DTR マウス）では、この炎症に伴うがんの肺転移が著明に減少することが明らかとなった。さらに、LPS を投与したマウスの骨髄から $Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球を分取し、これを健常マウスに移入するだけで、肺に前転移ニッチが形成され、転移促進がみられることが分かった。これらの知見より、$Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球が、炎症により誘導される前転移ニッチ形成に必要十分な細胞であり、がん転移促進の鍵となる細胞であると結論づけた。さらに、がん原発巣に対する外科治療や放射線治療に伴う炎症によっても、$Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球の増加、および、肺転移促進が見られたことから、がん治療を契機としたがんの転移促進にも本細胞が関与している可能性が示された。

炎症に伴うがん転移促進機構



40. 制御性単球によるがん転移促進機構の解明

田中　正人

東京薬科大学 生命科学部 免疫制御学研究室

Key words：がん，転移，炎症，単球，マクロファージ

緒　言

がんの遠隔転移は、がん患者の予後を規定する最も重要な要素の一つであり、転移のメカニズムの解明とその制御法の開発は、がん治療における最重要課題である。がんの転移を促進する因子の一つとして、局所あるいは全身の炎症が挙げられる。がん患者では、外科療法、化学療法、放射線療法に伴って炎症が誘導され、これががんの転移促進や再発に関与することが報告されている。また、感染や喫煙によって誘導される炎症も、がんの再発や転移を促進すると考えられている。

がん転移の成立には、EMT などのがん細胞そのものの性質の変化に加えて、転移先の組織において、がん細胞の生着および増殖を可能にする局所の環境が整備されることが必要と考えられている。この環境は前転移ニッチ（premetastatic niche）と呼ばれ、その形成は炎症により促進されることが明らかになっている。さらに、この炎症に伴う前転移ニッチ形成促進は、骨髄由来細胞、特に単球・マクロファージ系の細胞が重要な役割を担うことが報告されていることから、当該細胞は、前転移ニッチ形成阻害の重要な治療標的と考えられる。しかし、この炎症に伴う前転移ニッチ形成の鍵となる単球・マクロファージ系細胞の詳細は未解明であり、このことが、前転移ニッチ形成機構解明の大きな障壁となっている。

我々はこれまでに傷害組織に集積する単球由来マクロファージの解析を端緒として、組織傷害の修復期に骨髄で増産されるマウス単球の新規サブセット（$Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球）を同定した［1］。$Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球は、健常時には骨髄および末梢血中の Ly6C 陽性単球のわずか 5%程度しか存在しない一方で、DSS 誘導腸炎を起こすと、DSS 投与終了後の修復期に急激に増加する。骨髄でも同様に$Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球の増加が見られることから、本細胞は組織傷害の修復期に骨髄で増産されることが分かった。傷害組織に浸潤した$Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球は、$Ym1^{-}Ly6C^{+}$炎症性単球に比べて、炎症制御性サイトカインの発現が高く、また、炎症の回復や組織修復に重要な *Slpi* 発現が高いことから、炎症抑制および組織修復に関与すると考えられた。実際、$Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球を誘導的に消去できるマウス（Ym1-DTR マウス）を用いて、腸炎の回復期に同単球を消去すると、腸炎の回復が有意に遅延することが分かった。これらの結果から、$Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球は、修復期に傷害組織に浸潤し、炎症抑制および組織修復に関与することが明らかとなった。

本研究で我々は、傷害部位の組織修復とがんの進展の類似性に着目し、がん転移における$Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球の役割を明らかにしたので報告する。

尚、本研究成果は、参考文献［2］として発表済みであり、結果に示す図は、同文献の図を改変したものである。

方　法

がんの遠隔転移の評価には、B16 メラノーマ細胞株を用いた炎症誘発性血行性肺転移モデルを使用した。Ym1 発現細胞可視化マウスとして、Ym1-Venus マウスを用いた。また、Ym1 陽性細胞を選択的に消去する目的で Ym1-DTR マウスを用いた。炎症誘導には、LPS などの Toll-like receptor のリガンドを用いた。また、がん原発巣の治療として、外科切除あるいは放射線照射を行った。

結果および考察

1. 炎症により誘導されるがん転移における免疫細胞の関与

我々は、炎症に伴う前転移ニッチの形成における免疫細胞の関与を検討した。最初に、種々の TLR 刺激による炎症誘発によって、血行性肺転移が促進されるか検討したところ、CpG や Poly（I:C）の投与では、肺転移が促進されない一方で、LPS による炎症により、肺に前転移ニッチが形成され、がんの肺転移が促進されることが明らかとなった（図 1a、b）。免疫細胞の除去作用を有する抗体の投与結果より、この LPS 投与における前転移ニッチの形成には、好中球は関与せず、単球が関与していることが明らかとなった（図 1c、d）。また、CD204 を発現する単球を誘導的に消去できる遺伝子改変マウス（CD204-DTR マウス）を用いた解析によっても、前転移ニッチの形成への単球の関与が示唆された（図 1e）。さらに、LPS 投与により誘導される単球を健常状態のマウスに移入するだけで、前転移ニッチが形成されることが明らかとなった（図 1f、g）ことから、炎症により誘導されるがん転移促進に単球が重要な役割を担っていることが示された。

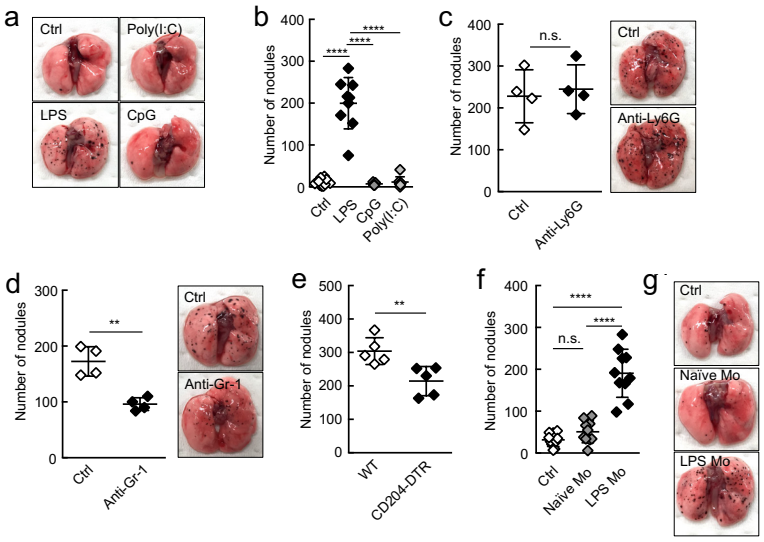


図 1. 炎症により誘導されるがん転移促進現象

a, b）LPS 投与による肺へのがん転移促進。

c）抗 Ly-6G 抗体による好中球の除去は、がん転移促進に影響しない。

d）抗 Gr-1 抗体による単球および好中球の除去は、がん転移を抑制する。

e）CD204 陽性細胞の除去は、肺へのがん転移を抑制する。

f, g）LPS 投与マウス由来 $Ly6C^{hi}$ 単球（LPS Mo）の移入は、肺へのがん転移を促進する。

Average values are shown with SD. One-way ANOVA（b）or unpaired two-tailed t-test（c、d、e、and f）. $^{**}P<0.01$, $^{****}P<0.001$, n.s.: not significant.

2. がん転移促進における $Ym1^{+}Ly6C^{+}$単球の関与

次に我々は、がん転移促進に関与する単球サブセットの解析を試みた。Ym1 発現細胞可視化マウス（Ym1-Venus マウス）を用いた検討により、LPS 投与後に多数の $Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球が、末梢血中に出現することが明らかになった（図 2a、b）。そこで、$Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球を誘導的に消去できるマウス（Ym1-DTR マウス）を用いて解析したところ、同単球の消去により、炎症に伴うがんの肺転移が有意に減少することが明らかとなった（図 2c）。さらに、LPS を投与したマウスの骨髄から $Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球を分取し、これを健常マウスに移入するだけで、肺に前転移ニッチが形成され、転移促進がみられることが分かった（図 2d）。これらの知見より、$Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球が、炎症により誘導される前転移ニッチ形成に必要十分な細胞であり、がん転移促進の鍵となる細胞であると結論づけた。

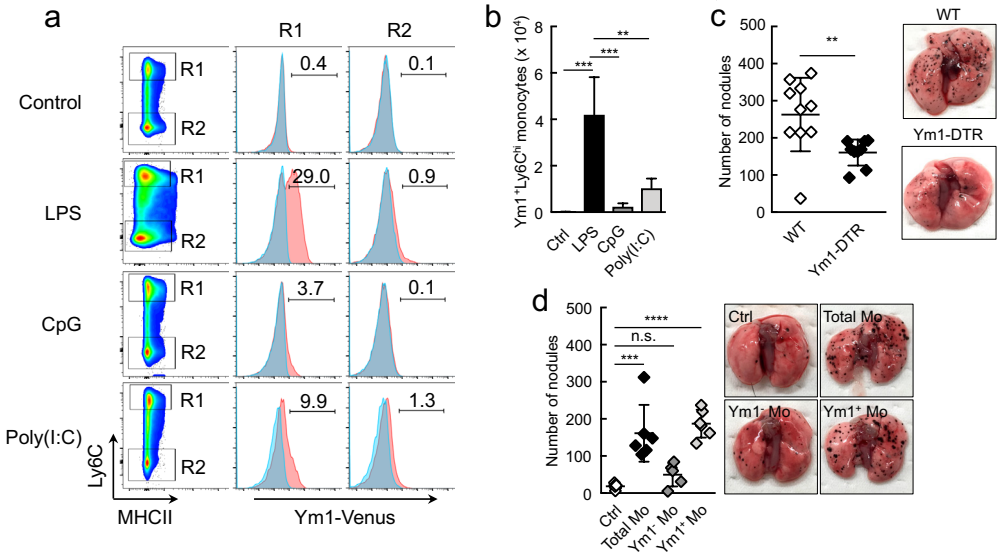


図 2. がん転移促進における Ym1^{+}Ly6C^{+}単球の関与

a) TLR リガンド投与後の末梢血における Ym1^{+}Ly6C^{hi} 単球または Ym1^{+}Ly6C$^{low/-}$単球の出現率。

b) TLR リガンド投与後の末梢血における Ym1^{+}Ly6C^{hi} 単球の数。

c) Ym1 陽性細胞の除去により炎症による肺へのがん転移促進が抑制される。

d) Ym1^{+}Ly6C^{hi} 単球の移入により肺へのがん転移が促進される。

Average values are shown with SD. One-way ANOVA (b, d) or unpaired two-tailed t-test (c).

$^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.005$, $^{****}P<0.001$, n.s.: not significant.

3. Ym1^{+}Ly6C^{+}制御性単球によるがん転移促進に関与する分子の同定

Ym1^{+}Ly6C^{+}制御性単球によるがん転移促進の分子機構を明らかにする目的で、炎症時に肺に浸潤する Ym1^{+}Ly6C^{+}制御性単球と Ym1^{-}Ly6C^{+}単球を分取し、RNA sequence により遺伝子発現を比較した。その結果、Ym1^{+}Ly6C^{+}制御性単球では、転移関連遺伝子として報告されているマトリックスメタロプロテアーゼ 9（MMP-9）およびリポカリン 2（LCN2）の発現が高いことがわかった。この MMP-9 のタンパクレベルでの産生増加は、ゼラチンザイモグラフィーで確認された（図 3a）。炎症に伴うがん転移促進は、MMP-9 阻害剤で抑制されることから、MMP-9 が、がん転移促進に関与していることが明らかになった（図 3b）。LCN2 は、MMP-9 を安定化させることにより MMP-9 活性を亢進することが報告されている。実際、LCN2$^{-/-}$LPS Mo の MMP-9 のタンパクレベルは、LCN2$^{+/-}$LPS Mo のタンパクレベルよりも低いことを確認した（図 3c）。さらに、LCN2$^{-/-}$LPS Mo 移入による肺のがん転移は、LCN2$^{+/-}$LPS Mo の場合と比較して減少することがわかった（図 3d）。以上の結果より、制御性単球由来 MMP-9 および LCN2 が肺転移の促進に必須であり、がん進展抑制の有力な治療標的であることが明らかになった。

4. がん原発巣に対する治療に伴う Ym1^{+}Ly6C^{+}制御性単球の増加と転移促進

我々はさらに、がん原発巣に対する外科治療や放射線治療に伴う炎症よっても、Ym1^{+}Ly6C^{+}制御性単球の増加および、肺転移促進が見られるか検討した。マウスに B16 細胞を皮下接種し腫瘍を形成した後に、外科的に切除を行うと、末梢血中で Ym1^{+}Ly6C^{+}制御性単球が有意に増加することが明らかとなった（図 4a、b）。同様に腫瘍に対する放射線療法後にも Ym1^{+}Ly6C^{+}制御性単球が有意に増加することが明らかとなり、腫瘍細胞死を誘導する様々な治療によって惹起される炎症刺激によって、Ym1^{+}Ly6C^{+}制御性単球が増産されることが明らかとなった。さらに、この原発巣に対する治療後には血行性肺転移が有意に促進されること（図 4c）、ならびにこの肺転移促進に単球が関与していることが判明した。これらの結果より、がん治療を契機としたがんの転移促進にも Ym1^{+}Ly6C^{+}制御性単球が関与している可能性が示され、本細胞ががん転移阻害の有力標的細胞であることが示唆された。

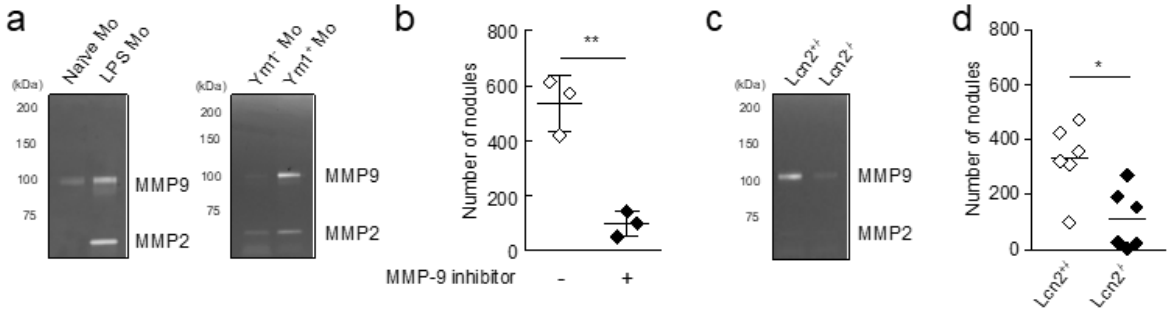


図 3. $Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球によるがん転移促進に関与する分子の同定

a) $Ym1^{+}Ly6C^{hi}$ 単球における MMP-9 の発現。

b) MMP-9 阻害剤は LPS による肺へのがん転移促進を阻害する。

c) LPS 投与マウス由来 $Lcn2^{-/+}Ly6C^{hi}$ 単球における MMP-9 の発現。

d) $Lcn2^{-/-}$マウスでは、LPS による肺へのがん転移促進が抑制される。

Average values are shown with SD. Unpaired two-tailed t-test（b、d）.

$*P<0.05$; $**P<0.01$.

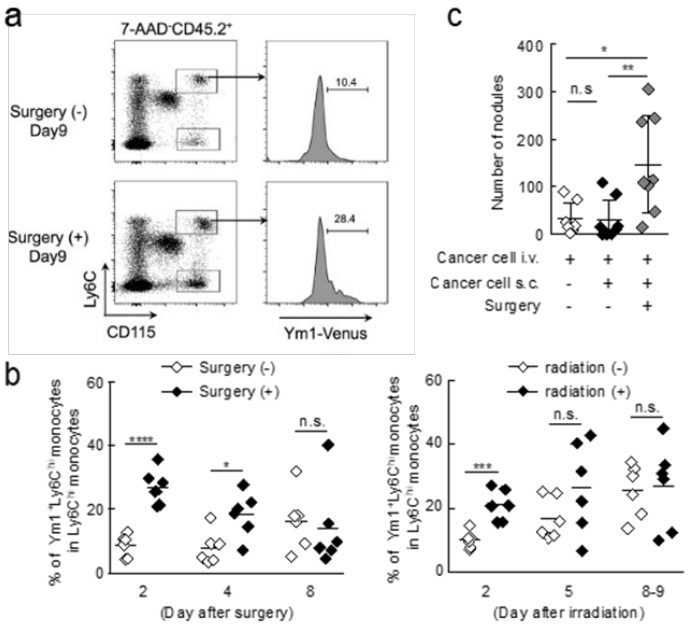


図 4. がん原発巣に対する治療に伴う $Ym1^{+}Ly6C^{+}$制御性単球の増加と転移促進

a) 腫瘍の外科的切除による $Ym1^{+}Ly6C^{hi}$ 単球の増加。

b) 腫瘍の外科的切除または放射線照射後の末梢血における制御性単球の割合の経時変化。

c) 腫瘍の外科的切除により肺へのがん転移が促進する。

Average values are shown with SD. Unpaired two-tailed t-test（b）or one-way ANOVA（c）. $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.005$, $****P<0.001$, n.s.：not significant.

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、以下の通りです。ご協力に深く感謝の意を表します。東京薬科大学生命科学部免疫制御学研究室の澁谷拓未、神山麻美、澤田寛隆、菊池健太、丸山真優、澤渡力慧、池田直輝、浅野謙一、四元聡志、東京薬科大学命科学部 ノム病態医科学研究室の米田敦子、東京薬科大学薬学部薬学基礎実習教育センターの今田啓介、横浜市立大学大学院医学研究科免疫学教室の黒滝大翼、田村智彦、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体環境応答学講座免疫アレルギー学分野の佐藤荘、大阪大学免疫学フロンティア研究センター自然免疫学研究室の審良静男。

文　献

1） Ikeda N, Asano K, Kikuchi K, Uchida Y, Ikegami H, Takagi R, Yotsumoto S, Shibuya T, Makino-Okamura C, Fukuyama H, Watanabe T, Ohmuraya M, Araki K, Nishitai G, Tanaka M. Emergence of immunoregulatory Ym1(+)Ly6C(hi) monocytes during recovery phase of tissue injury. *Sci Immunol.* 2018;3(28):eaat0207. doi: 10.1126/sciimmunol.aat0207. PubMed PMID: 30291130.

2） Shibuya T, Kamiyama A, Sawada H, Kikuchi K, Maruyama M, Sawado R, Ikeda N, Asano K, Kurotaki D, Tamura T, Yoneda A, Imada K, Satoh T, Akira S, Tanaka M, Yotsumoto S. Immunoregulatory Monocyte Subset Promotes Metastasis Associated With Therapeutic Intervention for Primary Tumor. *Front Immunol.* 2021;12:663115. Epub 2021/06/25. doi: 10.3389/fimmu.2021.663115. PubMed PMID: 34163472; PubMed Central PMCID: PMC8215602.