

氏名・(本籍)	馬越 通信 (東京都)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1005 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 21 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Macrophage-mediated transfer of cancer-derived components to stromal cells contributes to establishment of a pro-tumor microenvironment. (マクロファージが媒介する腫瘍由来分子の間質細胞への伝搬機構は腫瘍促進微小環境の確立に寄与する)
論文審査委員	(主査) 飯島 克則 教授 (副査) 廣川 誠 教授      板東 良雄 教授

## 学位論文内容要旨

### 論文題目

Macrophage-mediated transfer of cancer-derived components to stromal cells contributes to establishment of a pro-tumor microenvironment.

(マクロファージが媒介する腫瘍由来分子の間質細胞への伝搬機構は腫瘍促進微小環境の確立に寄与する)

申請者氏名 馬越通信

### 研究目的

胃癌組織における腫瘍由来細胞外小胞(Tumor derived extracellular vesicles : 以下、TEV)の腫瘍局所における拡散機構と、間質ニッチの形成を明らかにする。

### 研究方法

1. ヒトスキルス胃癌細胞株(44As3)とCAF(癌関連線維芽細胞)からTEVを抽出し、マウス腹腔内マクロファージにTEVを添加する。TEVを取り込んだMφ(以下、TEV-Mφ)の形態変化をwild type Mφと顕微鏡的に比較検討する。
2. TEVを蛍光色素で標識し、Mφへのとりこみと再放出、さらに正常線維芽細胞(NF)、腹膜中皮細胞(PMC)へ伝搬されることを蛍光免疫染色で追跡する。
3. TEV-MφからNF/PMCへのTEV(内容物)の伝搬がどのような状況で、どのように起きるのかを共培養で調べる。TEV-MφからTEV分子を含む小胞が放出され、共培養した間質細胞に取り込まれる様子を経時的、三次元的に観察する。
4. TEV-Mφとwild type Mφそれぞれの、単独の浸潤能および癌細胞との共浸潤能、血管内皮に対する通過性をgel invasion assay、in vivoで比較検討する。
5. TEV-MφとPMCの共培養によるPMCの変化を形態観察、qPCR、Western-Blotting法で追跡する。
6. 上記でみられたPMCの変化に関わるTEV由来分子をWestern-Blotting法で検討する。
7. In vivoにおいてTEV-Mφが胃の漿膜中皮細胞に中皮間葉転換(MMT)を起こすことを確認する。またTEV-Mφを腹腔内に前投与することで腹腔内にpre-metastatic nicheを形成することを実証する。

## 研究成績

1. 胃癌細胞とCAFを共培養した培養液からTEVを超遠心法で分離した。通常の腹腔内Mφに対し、TEV-Mφは紡錘状の形態を示し部分的にpodosomeの形成が観察された。
2. 胃癌細胞のタンパク質、RNAをビオチンまたは5-EUで標識してその移動を調べると、TEVを取り込んだMφから共培養したNF、PMCへと伝搬される事が分かった。
3. TEV-MφはNFまたはPMCとの接触依存性に細胞膜ブレブを形成し、分泌することが確認された。同ブレブにはTEV分子が多く含まれており、放出されたブレブがNF/PMCに取り込まれる事で、TEV内分子が伝搬される事を確認した。これら間質細胞へのブレブ小胞の取り込みはmacropinocytosisやphagocytosisの阻害剤(EIPA, ANV)により抑制された。44As3(ヒト胃癌細胞)およびTEV-Mφ(マウス)から分泌された細胞外小胞(EV)内の分子をRNAシーケンスにより比較したところ、胃癌細胞から放出された小胞中の遺伝子の約17%がTEV-Mφの小胞中に再放出されていた。
4. TEV-Mφとwild Mφの浸潤能を比較検討したところ、単独および癌細胞との共培養下でのgel invasion assayでTEV-Mφのほうが高い浸潤能を有することが明らかになった。同様の結果がin vivoにおいても得られた。またTEV-Mφは血管内皮細胞に対してもwild Mφより高い通過性がみられた。
5. TEV-Mφと共培養したPMCは紡錘状、線維芽細胞様の形態変化がみられ、N-cadherin、vimentin、slug、 $\alpha$ SMA、FAPの発現が上昇した。PMCはTEV-Mφと共培養することでMMT(中皮間葉転換)に基づくCAF様の変化を起こしていると考えられた。このPMCのCAF様変化はTEV-Mφの培養液の添加ではみられず、細胞間の直接接触が重要であった。
6. TEV中にはMMTを誘導する分子(TGF $\beta$ 1, wnt3a, src,  $\beta$ catenin, HIF1 $\alpha$ )がWestern-blotting法で検出された。このうちTGF $\beta$ の発現上昇はTEV-Mφ内では観察されず、TEV中のTGF $\beta$ 蛋白質がMφを経て、再放出されてくる事が確認された。また、TEV-Mφの分泌するEVの内、癌由来蛋白質を多く含む小胞分画でMMT活性を強く認めた。
7. TEV-Mφをマウスの胃粘膜下層に注入するとTEV-Mφが広範囲に移動、浸潤し、TEV分子を線維芽細胞や中皮、内皮細胞など周囲組織へ散布、受け渡していると考えられる像がみられた。その結果、CAF様細胞の増生が観察され、TEV-Mφが腫瘍促進性の微小環境を形成していると考えられた。この変化はクロドロン酸投与で抑制された。また、TEV-Mφを腹腔内に前投与すると、その後心左室に注射した癌細胞は、腹腔内でTEV-Mφが集積した場所に好んで転移することが観察された。TEV-Mφが腹腔内でpre-metastatic nicheを形成した結果と考えられた。

## 結論

TEVを取り込んだMφは通常のMφよりも高い浸潤能、血管透過能を獲得し、この高い移動能を持ったTEV-Mφが主病変から周囲組織へ広範囲に浸潤し、線維芽細胞、中皮細胞、血管内皮細胞などに癌細胞およびMφ由来の分子を伝達し、両者は協調して受け手間質細胞のCAFへの変化を誘導する。その結果、主病変周囲に腫瘍促進性の間質ニッチを形成し、腫瘍の浸入を促す。このサイクルを繰り返すことで腫瘍浸潤を促進していると考えられた。また、TEV-Mφの腹腔内播種は腹腔内のpre-metastatic nicheを形成し、遠隔転移、播種にも関わる可能性が示唆された。

## 学位(博士一甲) 論文審査結果の要旨

主査：飯島 克則

申請者：馬越 通信

論文題名：Macrophage-mediated transfer of cancer-derived components to stromal cells contributes to establishment of a pro-tumor microenvironment マクロファージが媒介する腫瘍由来分子の間質細胞への伝搬機構は腫瘍促進微小環境の確立に寄与する

### 要旨

癌由来の細胞外小胞 (Tumor derived extracellular vesicles : 以下、TEV) は既存のマクロファージや線維芽細胞に作用することで腫瘍関連マクロファージ (tumor associated macrophage : TAM) や癌関連線維芽細胞 (cancer associated fibroblasts : CAF) に誘導し、腫瘍促進性の機能を引き起こすことや、遠隔臓器においては炎症性の転移促進性の niche を形成することが知られている。しかし、TEV の局所における動態は明らかにされていなかった。申請者らは TEV もしくは TEV 由来の癌細胞を蛍光抗体などで標識し、TEV を取り込ませたマクロファージ (TEV-Mφ) と線維芽細胞や腹膜中皮細胞など間葉系細胞と共培養することで、TEV のマクロファージを介した間葉系細胞への輸送、伝搬の存在を立証した。さらに TEV を受け取ったマクロファージは、正常のマクロファージと比べて高い浸潤能・移動能を有することを示し、TEV-Mφ から TEV を受け取った間葉系細胞は癌関連線維芽細胞 (CAF) 様の変化を起こすことを示した。また、マウスを使った *in vitro* のモデルを用いて、TEV を取り込んだマクロファージが局所において高い移動能・浸潤能を示し、腫瘍促進微小環境の形成、拡大に重要な役割を担っていることを示した。

#### 1) 斬新さ

本研究は局所における TEV の動態、マクロファージの関与を示した研究であり、局所における TEV の動態を組織学的、分子生化学的に詳細に追究した前例はない。TEV のマクロファージによる伝搬という側面から腫瘍の局所進展のメカニズムを追究、一端を明らかにした点は斬新なものである。

#### 2) 重要性

マクロファージや線維芽細胞は重要な腫瘍の構成要素であり、それらが腫瘍促進微小環境を形成することは癌細胞の進展に重要な役割を担っていることは多くの研究で明らかにされている。逆にマクロファージや線維芽細胞による腫瘍促進微小環境が乏しい状態であれば、ある種の癌細胞は進展、増殖が大きく抑制されることが分かっている。本研究は、腫瘍の重要な構成要素であるマクロファージの腫瘍促進性機能、腫瘍促進微小環境形成のメカニズムの一端を明らかにしたといえる。これらのメカニズムの解明は従来の腫瘍細胞に焦点をあてた治療法とは異

なる治療法につながりうるものであり、今後の癌治療においてその重要性は非常に大きいといえる。

#### 3) 実験方法の正確性

申請者らは TEV のマクロファージを介した伝播を、蛍光免疫染色法による観察、RNA sequence による TEV-Mφ の腫瘍由来の分子の再放出、TEV の伝搬の経時的・三次元観察などにより複数の側面から立証している。また、マクロファージの浸潤能を計測するための gel invasion assay や、間葉系細胞が CAF 様の変化を起こしたことを確認するための qPCR 法、Western-blotting 法は十分に確立された方法であり、手技としても十分に習熟されたものと判断する。最後にマウスによる実験においても、「TEV をとりこんだマクロファージが移動、間葉系細胞へ伝搬し、腫瘍促進微小環境を形成する」ということが確認されており、本研究の結果は高い信頼性を持つものと判断される。

#### 4) 表現の明瞭さ

本研究は①癌細胞から放出された TEV が一度マクロファージに取り込まれ、②マクロファージが移動し、③間葉系細胞へ伝播、④間葉系細胞が CAF 様の変化を起こすという比較的、複雑なメカニズムの追究であるが、研究目的、方法、結果、考察が理解しやすいように記載されている。また図表も明瞭であり、その意味するところが明確となっている。

以上から、本論分は学位を授与するに十分値する研究と判定された。