

「Retinoblastoma inactivation induces a protumoral microenvironment via enhanced CCL2 secretion」

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-11-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Li, Fengkai メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00059999

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



【総説】

第18回 高安賞優秀論文賞受賞

論文 「Retinoblastoma inactivation induces a protumoral microenvironment via enhanced CCL2 secretion」

Cancer Res. 2019 Aug 1; 79 (15): 3903-3915. 令和元年8月掲載
Fengkai Li, Shunsuke Kitajima, Susumu Kohno, Akiyo Yoshida,
Shoichiro Tange, Soichiro Sasaki, Nobuhiro Okada,
Yuuki Nishimoto, Hayato Muranaka, Naoko Nagatani,
Misa Suzuki, Sayuri Masuda, Tran C. Thai, Takumi Nishiuchi,
Tomoaki Tanaka, David A. Barbie, Naofumi Mukaida,
and Chiaki Takahashi

「がん抑制遺伝子RB1の不活性化はCCL2を介してがんを促進する
微小環境を構築する」

李 鳳凱 (り ほうがい)

背 景

RB1は、小児がんの一種である網膜芽細胞腫の家系の連鎖解析に基づくポジショナルクローニングによって発見された。一義的には、細胞周期のG1期からS期の進行を制御することによって発がんを抑制するがん抑制遺伝子とされている。しかし、RB1の不活性化が発がんにつながるがんは、網膜芽細胞腫、小細胞肺がんなどに限定されており、大半のがんでは、がんが悪性化する過程においてRB1の不活性化が観察される。私の所属した研究グループを含む多数の研究グループが、さまざまな実験系を用いて、がんの悪性進展過程において頻繁に起こるRB1の不活性化が、がんの転移や浸潤、上皮間葉転換、未分化性(幹細胞性)獲得、薬剤耐性獲得等様々な悪性形質の発現に寄与することを明らかにしてきた。

RB1は、多様な上流シグナルによって多様な翻訳後修飾を受け、多様なエフェクター分子へと情報を伝達するアダプタ分子と考えられている。その翻訳後修飾は、有名なリン酸化に加え、アセチル化、脱アセチル化、SUMO化、ユビキチン化、カスパーによる切断等が知られる。脱アセチル化はSIRT1がその役を担い、リン酸化を行う蛋白質にはAMPKが含まれ、多様な栄養シグナルがRB1の機能修飾を行う事が示唆されている。G1前期には、14個あるCDK基質サイトのいずれか一つがリン酸化する状態(mono-phosphorylation)が維持され、それぞれのモノリン酸化蛋白質がそれぞれ特異的な機能を発揮することが予想されている。RB1と結合するとされる蛋白質は現在300種を越え、クローニングから30年を迎える今日でも、RB1機能は部分的にしか理解されていないと言ってよい¹⁾。

私は、RB1の不活性化によって、軟部肉腫の^{2,3,4)}、次いで、乳がんの悪性進展が起こるモデル^{3,4)}の開発に参画し、この悪性進展の分子的基盤を研究した。この結果、表記の結論に至った次第である。

結果と考察

本研究ではまず、がん抑制遺伝子p53をあらかじめ欠失させたマウスに生じた高分化型の軟部肉腫を用い、極めてマニピュレーション効率の高い細胞株を樹立した。さらに、この細胞株においてRb1の発現を低下させることによって、低分化度・高悪性度の軟部肉腫を誘導するモデル細胞系を確立した。このモデル細胞を同系マウス(免疫系は正常)の皮下に移植して腫瘍を形成させ、Rb1がある時とない時でどのような違いがあるかを調べた。その結果、Rb1がない時はある時に比べてより多くの血管が腫瘍内に入り込むことが判明した。血管が腫瘍内に入り込むことは、酸素の拡散を促進するため、腫瘍の増殖に有利な環境を創出する。この機構を詳しく調べていくと、Rb1がない時は、より多くの免疫細胞が腫瘍内に入り込み、それらの細胞が血管増殖因子(Vegf)を放出している可能性が示唆された。つまり、Rb1をなくした腫瘍を取り巻く環境つまり「腫瘍微小環境」は、Rb1があるときよりも劇的に変化する⁴⁾。このような免疫細胞は、腫瘍の増殖を直接助けたり、腫瘍を攻撃する免疫応答を鎮めたりする役割があるマクロファージや骨髄由来免疫抑制細胞(Myeloid-derived suppressor cells; MDSC)、抑制性T細胞(Treg)を含んでおり、これらの細胞の遊走を促進するケモカインやサイトカインが、Rb1がない腫瘍から大量に分泌されると予想した(図1)。

次に、免疫細胞をRb1欠損腫瘍に引き寄せる分子機構

を探索するため、Rb1をなくした腫瘍細胞において発現が上昇する遺伝子群を、RNAシーケンス法を用いて調べた。すると、Ccl2というケモカインの発現が特に高くなることが分かり、上記の予想と合致した。そこで、Ccl2を全身で欠くマウスに腫瘍を移植し、腫瘍から分泌されるCcl2のみの血中濃度を測定すると、Rb1をなくした腫瘍からはより高濃度のCcl2が分泌されることが確認できた。また、CRISPR-CAS9技術を用いてRb1をなくした腫瘍においてCcl2の分泌を人為的に止めると、腫瘍の形成能が低下し、腫瘍がさまざまな免疫細胞を集めて血管を

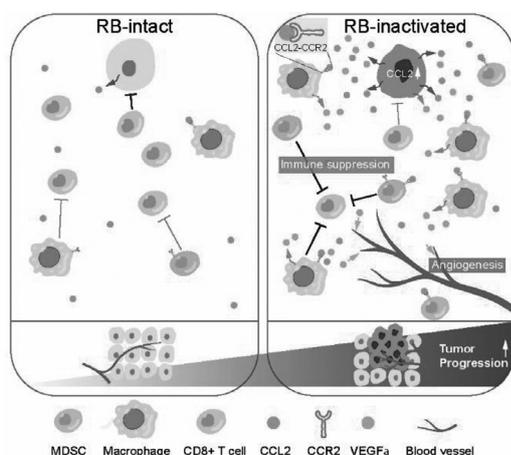


図1. RB1不活性化が腫瘍微小環境を改編する機構
Kitajima S, Li F, Takahashi C. Tumor Milieu Controlled by RB Tumor Suppressor. *Int J Mol Sci.*, 20 20 Apr;21 (7) より

呼び込む能力も顕著に拮抗されることも判明した。さらに、Ccl2の受容体であるCcr2を全身で欠くマウス、すなわち免疫細胞がCcl2に反応しなくなっているマウスにRb1をなくした腫瘍を移植すると、Rb1をなくしたことの効果が有意に打ち消されることも判明した⁴⁾(図2)。以上のことは、Rb1がCcl2の発現を制御することにより、Ccr2を持つ免疫細胞に働きかけ、腫瘍を取り巻く微小環境を改編することを示した。

さらに、ヒトのがん細胞株をもちいた実験により、RB1とCCL2の関係は、肉腫だけでなく、乳がんにおいても成り立つことが分かった。RB1が保たれているさまざまな乳がんにおいてRB1の発現を低下させると、CCL2の発現が亢進した。MMTV-Cre; Rb1^{flx/flx}乳がんモデルマウスを用いてマウスの乳腺上皮においてRb1を欠失させると、過形成という前がん病変ができ、この病変部位にはマクロファージが集積する。しかし、この前がん病変を示すマウスにおいてCcl2を欠失させると、マクロファージが集まらないだけでなく、この過形成が全く起こらなくなることが分かった⁴⁾(図2)。

最後に、RB1がCCL2の発現を制御する分子メカニズムを探索した。まず、RB1をなくすと、代謝制御を司るタンパク質AMPKのリン酸化が亢進し、活性化することが分かった。また、このリン酸化したAMPKが、脂肪酸酸化を押さえるタンパク質Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) をリン酸化することによって不活性化することで、脂肪酸酸化が亢進することが分かった⁴⁾(図3)。脂肪

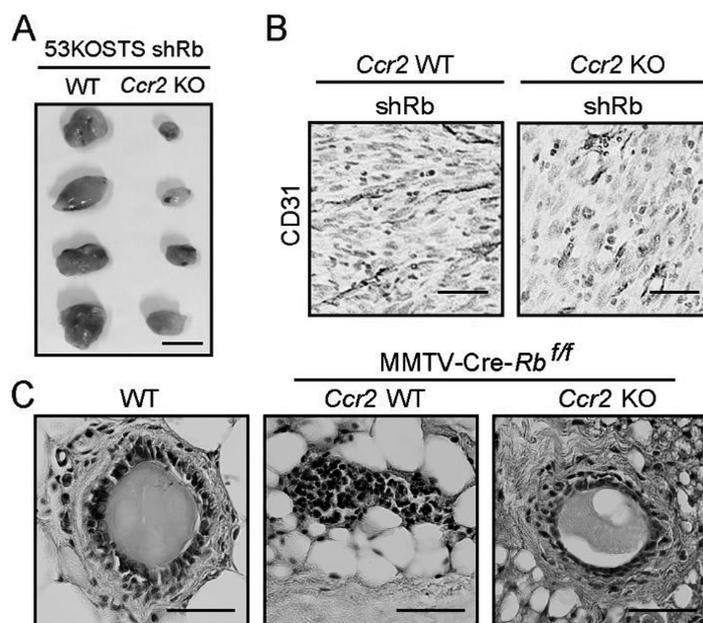


図2. A Ccl2の受容体であるCcr2を欠失するマウスでは、Rb1欠損細胞の腫瘍形成能が抑制された。

B Ccr2を欠失するマウスでは、Rb1欠損細胞の血管新生誘導能が抑制された。

C Ccr2を欠失するマウスでは、Rb1の不活性化による乳腺過形成が抑制された。

Li F, Kitajima S, Kohno S, Yoshida A, Tange S, Sasaki S, Okada N, Nishimoto Y, Muranaka H, Nagatani N, Suzuki M, Masuda S, Thai TC, Nishiuchi T, Tanaka T, Barbie D A, Mukaida N and Takahashi C. RB inactivation induces a protumoral microenvironment via enhanced CCL2 secretion. *Cancer Research*, 79:3903-3915, 2019 より

酸化が亢進すると、ミトコンドリアから産生される活性酸素の量が増え、シグナル伝達タンパク質JNKが活性化する。活性化したJNKは、CCL2を始め種々の生理活性タンパク質やサイトカイン、ケモカインの発現レベルを上昇させることが分かっている。以上より、RB1の不活性化がAMPKのリン酸化を上昇させ、脂肪酸酸化を亢進することによってミトコンドリアから産生される活性酸素量を増加させ、シグナル伝達タンパク質であるJNKの働きによってCCL2の発現を亢進させるという経路が明らかになった(図4)。

結 論

本研究により、がんの悪性進展の過程でRB1の働きがなくなると、CCL2の分泌が上昇し、CCR2を持つさまざまな

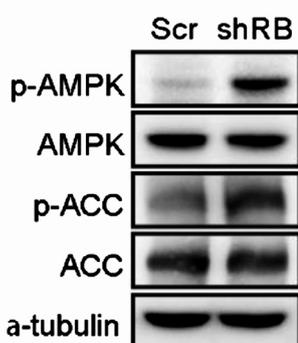


図3. RB1不活性化によるAMPKリン酸化の亢進

Li F, Kitajima S, Kohno S, Yoshida A, Tange S, Sasaki S, Okada N, Nishimoto Y, Muranaka H, Nagatani N, Suzuki M, Masuda S, Thai TC, Nishiuchi T, Tanaka T, Barbie D A, Mukaida N and Takahashi C. RB inactivation induces a protumoral microenvironment via enhanced CCL2 secretion. *Cancer Research*, 79:3903-3915, 2019 より

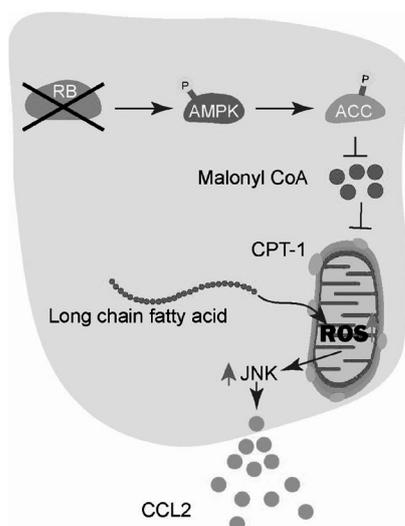


図4. RB1不活性化がCCL2分泌を亢進させる分子機構

Kitajima S, Li F, Takahashi C. Tumor Milieu Controlled by RB Tumor Suppressor. *Int J Mol Sci.*, 2020 Apr1;21 (7) より

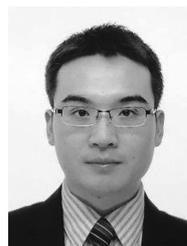
な免疫細胞に働きかけ、腫瘍を取り巻く環境「腫瘍微小環境」を腫瘍の増殖に有利な方向に改編することが解明された。さらに、CCL2あるいはその受容体であるCCR2の働きを止めることによって、RB1の働きが失われることによるがんの悪性化の相当部分が抑制されることも明らかになった。今後、CCL2あるいはCCR2の阻害剤をRB1の働きを失ったがんの治療に使用するための研究が進展することが期待される⁵⁾。

文 献

- 1) Kohno S, Kitajima S, Sasaki N and Takahashi C. RB tumor suppressor functions shared by stem cell and cancer cell strategies. *World J Stem Cells*, 8: 170-184, 2016.
- 2) Kitajima S, Kohno S, Kondoh A, Sasaki N, Nishimoto Y, Li F, Mohammed SA, Muranaka H, Nagatani N, Suzuki M, Kido Y and Takahashi C. Undifferentiated state induced by Rb-p53 double inactivation in mouse thyroid neuroendocrine cells and embryonic fibroblasts. *Stem Cells*, 33: 1657-1669, 2015.
- 3) Kitajima S, Yoshida A, Kohno S, Li F, Suzuki S, Nagatani N, Nishimoto Y, Sasaki N, Muranaka H, Wan Y, Thai T C, Okahashi N, Matsuda F, Shimizu H, Nishiuchi T, Suzuki Y, Tominaga K, Gotoh N, Suzuki M, Ewen M E, Barbie D A, Hirose O, Tanaka T and Takahashi C. The RB-IL-6 axis controls self-renewal and endocrine therapy resistance by fine-tuning mitochondrial activity. *Oncogene* 36: 5145-5157, 2017.
- 4) Li F, Kitajima S, Kohno S, Yoshida A, Tange S, Sasaki S, Okada N, Nishimoto Y, Muranaka H, Nagatani N, Suzuki M, Masuda S, Thai TC, Nishiuchi T, Tanaka T, Barbie D A, Mukaida M and Takahashi C. RB inactivation induces a protumoral microenvironment via enhanced CCL2 secretion. *Cancer Research*, 79: 3903-3915, 2019.
- 5) Kitajima S, Li F, Takahashi C. Tumor Milieu Controlled by RB Tumor Suppressor. *Int J Mol Sci.*, 2020 Apr1; 21 (7).

謝 辞

本研究を行うにあたりご指導してくださいました金沢大学がん進展制御研究所腫瘍分子生物学研究分野高橋智聡教授、ハーバード大学ダナ・ファーバー癌研究所(現、がん研究会がん研究所)の北嶋俊輔博士、金沢大学がん進展制御研究所分子生体応答研究分野向田直史先生、同分子病態研究分野後藤典子先生、千葉大学医学部田中知明先生および関係各位に、この場をおかりして心より御礼申し上げます。



Profile

2010. 07 河南大学生命科学院生物技術
学士課程卒業(中国)
2010. 07-2011. 07 Takara Biomedical
Technology (Beijing) Co., Ltd.
2016. 03 金沢大学医薬保健学総合研究科
医科学専攻 修士課程卒業
2020. 03 金沢大学医薬保健学総合研究科
医学専攻 博士課程卒業
2020. 06~ 復旦大学がん研究所
博士研究員(中国)
趣味 園芸 撮影 電気修理