

氏名 (生年月日) まつい とうま
松井 透磨 (1995年5月6日)

学位の種類 博士 (薬学)

学位記番号 博薬 第238号

学位授与の日付 2024年3月16日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 pH Low Insertion Peptide による酸性化肺前転移ニッチの特性解析と
転移治療への応用に向けた基礎的検討

論文審査委員 (主査) 教授 芦原 英司

(副査) 教授 高田 和幸

(副査) 教授 藤室 雅弘

論文内容の要旨

序章 (はじめに)

がんの転移とは、がん細胞が腫瘍原発巣から離脱した後、他臓器に到達して腫瘍を再び形成することである。転移性腫瘍は既存の治療に抵抗性を示すことが多い。また、転移性腫瘍の有無が患者の予後に大きな影響を与える。よって、転移を未然に防ぐ診断や治療法の確立に向けたがん転移病態の理解が重要である。腫瘍原発巣からは様々な液性因子が分泌されており、がん細胞不在の遠隔臓器において転移性腫瘍の形成に適した微小環境 (前転移ニッチ) を構築する。前転移ニッチの分子的または機能的な特性は様々に同定されている。しかし、前転移ニッチと健常組織を区別し、治療するための技術開発は十分でない。腫瘍組織内では過剰な乳酸産生などにより酸性微小環境が形成され、がん細胞の転移を促す要因となっている。本研究では、このような組織酸性化が前転移ニッチで生じる可能性について、低 pH 組織に貯留する pH Low Insertion Peptide (pHLIP) を用いて検討した。またその結果明らかとなった、肺前転移ニッチにおける組織酸性化について、肺転移形成への関与や酸性化メカニズムならびに転移治療への応用について検証した。

第1章 肺前転移ニッチにおける組織酸性化と転移巣形成への関与

転移前段階の組織 pH 変化を評価するために、6-thioguanine 耐性を示す転移性マウス乳がん細胞株 (4T1.2 細胞) に luciferase 改変遺伝子 (*Luc2*) を過剰発現させ、当該株を同種同所性に移植した。移植 21 日後において、移植細胞由来の生体発光は腫瘍原発巣のみに観察された。生体発光では検出できない微小転移の有無を評価するため、移植 21 日後に肺から単離した細胞を 6-thioguanine 含有培地で選択培養したが、4T1.2 由来コロニーは形成されなかった。

次に、移植 20 日後に蛍光標識 pHLIP を処置し、24 時間後の臓器分布を評価した。その結

果、摘出肺における pHLIP 由来蛍光強度 (Total Radiant Efficiency [p/s]/[μ W/cm²]: TRE) が移植群において有意に高かった (対照群: $5.46 \pm 1.18 \times 10^8$ TRE、移植群: $8.77 \pm 2.61 \times 10^8$ TRE)。同肺サンプルを比色法による乳酸測定系で解析したところ、移植群で組織乳酸量 (μ mol/g) が増加していた (対照群: 2.72 ± 0.549 μ mol/g、移植群: 3.59 ± 0.294 μ mol/g)。また肺組織サンプルを用いた western blot の結果から、移植群における lactate dehydrogenase A (LDHA)、monocarboxylate transporter (MCT) 4、ならびに hexokinase 2 (HK2) の発現上昇が確認された。これらの現象は、4T1.2 細胞の培養上清 (4T1.2-CM) を 21 日間連続で腹腔内に処置したマウス肺において再現された。一方、4T1.2 細胞に比して転移能が低い亜株 (66cl4 細胞) の移植や培養上清を投与した場合、上述した 4T1.2 細胞での実験結果とは異なる傾向であった。以上より、4T1.2 細胞の分泌因子により作られた肺前転移ニッチは酸性化していることが示唆された。

組織酸性化における肺転移形成への関与を検証するため、乳酸産生酵素阻害剤を 4T1.2-CM と併せて処置し、pHLIP の集積 (組織酸性化の発生) を抑えた。続いて、*Luc2* を強制発現した肺組織構成細胞に対して酸性化を誘導しない 66cl4 (66cl4-Luc2) 細胞を尾静脈から注入し、肺に生着させた。その結果 4T1.2-CM 単独処置群と比して、併用処置群では肺転移形成が遅延した。また、当該マウスにおけるがん細胞注入からの生存日数 (中央値) は有意に延長した (単独処置群: 24 日、併用処置群: 33 日)。以上より、4T1.2 細胞は液性因子を介して肺組織酸性化を誘導し、引き続き転移性腫瘍の形成に寄与することが示唆された。

第 2 章 肺組織酸性化における発生機序の解明

第 1 章にて明らかにした肺組織酸性化に関与する細胞集団を同定するために、組織酸性化が発生した肺から II 型肺胞上皮 (AT2; CD326⁺) 細胞、成熟血球系 (CD45⁺Lineage⁺) 細胞、ならびにその他の (CD45⁺CD31⁺CD326⁻) 細胞をそれぞれセルソーターで単離し、組織酸性化に寄与する解糖系関連タンパク質の発現を western blot にて対照肺由来のものと比較した。その結果、AT2 細胞および成熟血球系細胞における LDHA、MCT4、MCT1、ならびに HK2 の発現上昇が確認された。また免疫組織学的解析の結果から、酸性化肺において pHLIP が AT2 細胞と一部の血球系 (CD45⁺) 細胞に局在することが示唆された。

4T1.2-CM 含有成分から組織酸性化を引き起こす因子を明らかにするために、前転移ニッチ形成の関与が様々ながん種で報告されている細胞外小胞 (EV) に着目した。4T1.2-CM から超遠心法により精製した EV (4T1.2-EV) を 21 日間連続でマウス腹腔内に処置すると、肺における LDHA、MCT4、MCT1、ならびに HK2 の発現亢進と組織酸性化が生じた。また 4T1.2-EV における LDHA および MCT4 の発現が確認された。以上の結果より、肺組織酸性化の発生に係る解糖系関連タンパク質の発現亢進機序として、解糖系関連タンパク質が 4T1.2-EV を介して AT2 細胞または一部の血球系細胞に伝達される可能性が推察された。

第 3 章 pHLIP 修飾薬物による前転移ニッチ治療の検討

最後に、第 1 章で示した pHLIP の肺前転移ニッチへの集積性を利用して、薬物を効率的に作用させ肺転移を抑えられないかと考えた。炎症組織において組織酸性化が生じること、ならびに前転移ニッチにおける炎症性サイトカインが転移促進因子であることを踏まえ、酸性

化肺における炎症性サイトカインの発現を解析した。その結果、培養上清投与により組織酸性化が生じた肺では対照群と比較して interleukine-6 と tumor necrosis factor- α の発現がそれぞれ 2.08 ± 0.483 倍、 2.04 ± 0.725 倍に上昇していた。pHLIP 修飾型 dexamethasone (pHLIP-Dex) は、肺前転移ニッチにおいて上昇した両炎症性サイトカインの発現をそれぞれ $44.9 \pm 2.24\%$ 、 $48.9 \pm 16.5\%$ に抑制した。本炎症応答の抑制は、pHLIP-Dex 処置に引き続いて移植した 66cl4-Luc2 細胞による転移巣形成を阻害した。以上の結果より、pHLIP を修飾することで薬物を前転移ニッチへ効果的に作用させ、転移を抑制できることが示唆された。

総括

本研究では、肺前転移ニッチにおける pHLIP の有意な集積と、それを利用した前転移ニッチの機能制御による転移抑制の可能性を見出した。肺組織酸性化に対する非侵襲的検出などの課題は残るが、がん転移の予測診断および予防的治療の社会実装に向けた基盤形成の一助となることが期待される。また、pH 環境の観点から肺前転移ニッチの新規特性を示したことは、転移成立に関する病態の理解を深める上で有意義と考えられる。

審査の結果の要旨

＜＜緒言＞＞

がんの転移は悪性腫瘍の病態を特徴づける現象であり、固形がん患者における主要な死因になっている。腫瘍原発巣と末梢臓器との分泌因子を介した相互作用の結果として、転移に適した微小環境が作られる (前転移ニッチ)。本研究では前転移ニッチにおける pH 環境を明らかにするため、マウス乳がん前転移ニッチモデルにおけるペプチド性 pH プローブ (pHLIP) の臓器分布を解析した。さらに、肺前転移ニッチにおける組織酸性化の肺転移形成への関与、酸性化メカニズム、ならびに転移治療への応用を検証した。

＜＜審査結果＞＞

第 1 章では、まず転移前段階の組織 pH 変化を評価するために、転移性マウス乳がん 4T1.2 細胞を同種同所性に移植し、移植 21 日後においてがん細胞が存在しない前転移肺モデルを確立した。当該モデルの前転移肺において、蛍光標識 pHLIP の有意な蓄積 (肺組織酸性化) と乳酸産生系の亢進がみられた。4T1.2 培養上清 (4T1.2-CM) の処置や他の乳がん細胞株を用いた実験結果より、4T1.2 細胞特有の分泌因子が上記の現象を引き起こすことが示唆された。さらに、肺組織酸性化が経脈管肺転移モデルにおける転移性腫瘍の形成に寄与することが示唆された。

第 2 章では、肺組織酸性化の発生メカニズムを探索した。酸性化肺において、解糖系関連

タンパク質の発現が上昇した AT2 細胞および成熟血球系細胞を同定し、これらの細胞群に pHLIP の標的細胞の一部が含まれることを明らかにした。4T1.2-CM から精製した細胞外小胞 (EV) を肺組織酸性化のトリガー因子の一つとして見出し、当該 EV を介して解糖系関連タンパク質が伝達される可能性を示唆した。

第 3 章では、薬物修飾型 pHLIP による肺前転移ニッチの機能制御を検証した。前転移ニッチを含む酸性化肺において、炎症性サイトカインの発現上昇が示唆された。pHLIP を修飾した dexamethasone (pHLIP-Dex) は炎症性サイトカインの発現を抑制し、肺転移巣形成を阻害することを示した。このことから、pHLIP は酸性化肺前転移ニッチへの効果的な薬理的制御を可能にする、新規薬物担体としての有用性が示唆された。

《審査の結論》

本研究では、前転移ニッチの有無による pHLIP の集積変化から肺組織酸性化を見出すとともに、当該現象の転移病態における意義や発生メカニズムを明らかにした。さらに見出した新規病態現象に基づいて、薬物による前転移ニッチの機能阻害効果を最大化する新規手法を示した。本研究における成果は、がん転移の未然防止を実現する方策についての有用な基礎的知見を提供するものと考えられる。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。