

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

2023 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】病態生理学分野

松井 透磨

課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程 : 薬学専攻・博士課程
氏名 (英字名) : 松井透磨 (Toma Matsui)
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

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]/[$\mu\text{W}/\text{cm}^2$]: 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 ($\mu\text{mol}/\text{g}$) が増加していた (対照群: 2.72 ± 0.549 $\mu\text{mol}/\text{g}$ 、移植群: 3.59 ± 0.294 $\mu\text{mol}/\text{g}$)。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。

目次

略語一覧

序論.....	1
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.....	3
1. 緒言.....	3
2. 実験方法.....	5
3. 実験結果.....	10
4. 考察.....	22
5. 小括.....	26
第2章 組織酸性化における発生機序の解明.....	27
1. 緒言.....	27
2. 実験方法.....	28
3. 実験結果.....	34
4. 考察.....	45
5. 小括.....	49
第3章 pHLIP 修飾薬物による前転移ニッチ治療の検討.....	50
1. 緒言.....	50
2. 実験方法.....	52
3. 実験結果.....	54
4. 考察.....	60
5. 小括.....	62
総括.....	63
謝辞.....	65
引用文献.....	66

略語一覽

AF	Alexa Fluor
AFM	atomic force microscopy
Alix	programmed cell death 6 interacting protein
APC	allophycocyanin
AT1	alveolar type 1
AT2	alveolar type 2
BMDC	bone marrow-derived cell
CBA	cytokine bead array
DLS	dynamic laser scattering
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
ECM	extracellular matrix
EV	extracellular vesicle
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein
FSC	forward scatter
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HMGB1	high mobility group box 1
HK2	hexokinase 2
HRP	horseradish peroxidase
IL	interleukin
LDHA	lactate dehydrogenase A
MCT	monocarboxylate transporter
MDSC	myeloid-derived suppressor cell
MEM- α	Minimum Essential Medium α
miRNA	micro RNA
MMP	matrix metalloproteinase
MST	median survival time
NETs	neutrophil extracellular traps
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
NK	natural killer
PB	sodium phosphate buffer
PBS	Ca ²⁺ , Mg ²⁺ -free phosphate buffered saline
PD-L1	programmed cell death 1 ligand 1
PE	phycoerythrin
PFA	paraformaldehyde
pHLIP	pH low insertion peptide

PI	propidium iodide
PVDF	polyvinylidene difluoride
RANK	TNF receptor superfamily member 11a
RANKL	RANK ligand
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS- PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SP-C	surfactant protein C
SSC	side scatter
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TNBC	triple negative breast cancer
TRE	Total Radiant Efficiency
TSG101	tumor susceptibility gene 101

序論

正常組織において、細胞の増殖や運動などは外部環境により厳密に制御されている。一方腫瘍組織ではこのような制御機構が乱れている。がん細胞は無秩序な増殖を続けると共に、周囲の組織に浸潤して血管やリンパ管に辿り着く。全身循環に入ったがん細胞は末梢臓器に到達し、そこで増殖を再開して新たな(転移性)腫瘍を形成する(転移)。Metastasis(転移)はJean Claude Recamierによって1829年に造られた言葉であり、悪性腫瘍の病態を特徴づける現象である(1)。また固形がん患者における主要な死因でもあり、がん転移に奏功する治療が十分に備わっていない現状を物語っている。転移したがん細胞は既存治療に広く抵抗性を示し、特定の治療によって転移が促される可能性も示唆されている(2)。これまでの基礎研究の積み重ねにより、がん転移のメカニズムが徐々に明らかにされ、転移に特化した治療法の開発が行われている(3-5)。

がん転移の生物学的な理解においては、がん細胞の動的な振る舞いに加えて、宿主組織との相互作用の重要性が説かれている。その発端は1889年にStephen Pagetが提唱したseed and soil theory(種と土壌仮説)に遡る(図1)(6)。彼は735名の乳がん患者の剖検記録から、脾臓のような血流が豊富であっても転移頻度は高くない臓器例を見出した。転移の発生場所に対する当時の考え方として、がん細胞が解剖学的な位置関係や血流に従って行き着いた場所で生じる、塞栓症の発生に類似した理論が先行しており、Pagetの知見を説明できるものではなかった。宿主臓器が浸潤したがん細胞に対して、何ら反応することもなく受容するはずはないと考え、種と土壌仮説に至った。がん細胞と臓器の環境を植物の種と土壌にそれぞれ例え、がん細胞は成長に適した土壌(環境)が整った臓器で増殖するという考え方である。

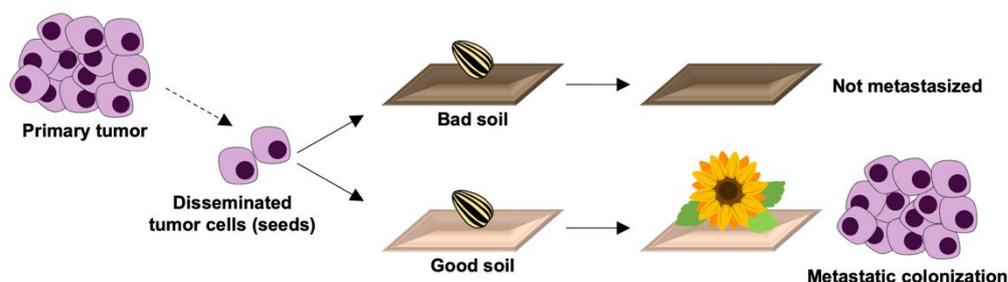


図1. 種と土壌仮説

がん細胞は成長に適した土壌(環境)が整った臓器で増殖し、転移性腫瘍を形成する。

近年では、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、そこに到ったがん細胞が転移性腫瘍を効率的に形成することが基礎研究レベルで示唆されている(7)。このようながん細胞の遠隔操作により、がん細胞自身が到達していない段階の臓器で作られた転移促進性の微小環境を前転移ニッチと呼ぶ。前転移ニッチでは器官を構成する線維芽細胞、血管、リンパ管、結合組織などの変化に加え、骨髄由来細胞(bone marrow-derived cell; BMDC)が動員される(8)。これは動員先組織における細胞外マトリックス(extracellular matrix;

ECM) の組成変化が一因となって、BMDC に対する生着能が強まった結果と考えられている。動員される BMDC には骨髄由来抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cell; MDSC) が含まれ、動員先組織にて免疫エフェクター細胞の抗腫瘍免疫応答を低下させる (9)。このような局所的な免疫抑制環境下ではがん細胞は増殖しやすくなり、転移性腫瘍の形成に繋がると考えられる。

腫瘍原発巣においても、腫瘍組織の進展に寄与する (腫瘍) 微小環境が存在する。がん細胞が周囲の間質成分を巻き込み、有機的な集合体として腫瘍組織が形成される。腫瘍微小環境は細胞成分と非細胞成分で構築される。非細胞成分とは、ECM、低分子量の代謝産物、ならびに情報伝達媒体としての液性因子を指す。腫瘍組織では上記の構成因子が質的または量的に正常組織とで異なり、特有の微小環境を形成する要因になっている。例えば、腫瘍組織における細胞外 pH の低下はがん細胞における乳酸などの酸性代謝物の産生ならびに分泌過多が根本的な要因である (10)。また、腫瘍組織において血管は不均一に発達しており、血流の乏しい領域では酸性代謝物の貯留により酸性環境が形成されやすい。細胞外 pH の低下に対する応答として、がん細胞は遺伝子発現を調節してエネルギー代謝系を変える。このような適応に加えて、治療抵抗性の獲得や組織浸潤能の亢進も生じる (11,12)。また血管、ECM、免疫細胞などの各間質成分に対しても、細胞外 pH の低下はそれぞれに異なった形で影響を与えるが、いずれもがん細胞の転移を間接的に促す (13-15)。すなわち、腫瘍組織における酸性微小環境は、がん転移を促進する一因と言える。

腫瘍微小環境に習い、前転移ニッチの形成は当該組織の pH 環境を酸性化させるのだろうか。いずれの微小環境も、「がん細胞の生存と増殖を支持する」という共通した生物学的意義を有しており、それに帰結するための具体的な特性には幾分の類似が散見される。MDSC の動員とそれによる局所的な免疫系の抑制は、その一例である (16,17)。前転移ニッチ形成下において、各系統細胞の代謝系に様々な変化が生じており、特有の代謝ネットワークが構築されている (17,18)。よって、これによる酸性代謝産物の量的変化が当該組織の pH 環境に影響を与える可能性が推察されるが、前転移ニッチの pH 環境を解析した報告はない。

以上の背景より、前転移ニッチにおける pH 環境は不明である。そこで前転移ニッチの特性の 1 つとして組織 pH の変化を明らかにすることを本研究の目的とし、低 pH 組織に貯留する pH low insertion peptide (pHLIP) を用いて検討した。第 1 章では、マウス乳がんモデルにおける pHLIP の臓器分布解析などの結果から、肺前転移ニッチにおいて解糖系亢進を介した組織酸性化が生じ、転移促進に寄与することを明らかにした。第 2 章では、肺組織酸性化に関与する候補細胞として 2 型肺胞上皮 (alveolar type 2; AT2) 細胞と一部の血球系細胞を同定するとともに、乳がん細胞から分泌される細胞外小胞 (extracellular vesicle; EV) を肺組織酸性化のトリガー因子の一つとして見出した。酸性化に関与する肺組織内の細胞集団をおよび乳がん細胞の分泌因子を解析した。最後に第 3 章では、pHLIP 修飾薬物が前転移ニッチの機能阻害に有用であることを明らかにした。

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

1. 緒言

本邦におけるがんの罹患数を部位別にみると、乳房は大腸、肺、胃に次ぐ4番目に多い(19)。女性における乳がんの罹患数は、150.0(人口10万対)と部位別で最多である。乳がんの臨床的特徴の一つとして、術後5年以降における再発が他の固形がんと比べて多いことが挙げられる(20)。中には、術後10年以降に再発した例も数多く存在する。ホルモン受容体およびErb-B2 receptor tyrosine kinase 2 (HER2) 受容体を発現しない乳がん (triple negative breast cancer; TNBC) の場合、アントラサイクリン系などの化学療法により再発を効果的に抑えられるが、それでも術後10年間での無再発率は73.4%と完全ではない(21)。これにより、乳がん患者の多くにおいては、遠隔転移を含む再発のリスクに怯えながらの生活を長きにわたり余儀なくされる。このような乳がんの臨床的問題点については、前転移ニッチにおける病態特性の理解を通じて、転移再発のリスクを測ることが一つの解決策になると考えられる。以上の背景より、本研究で取り扱うがん種はTNBCと定めた。前転移ニッチはがん細胞と宿主との相互作用の結果として生じるため、その模倣にあたっては移植するがん細胞と宿主となる個体の動物種ならびに系統を同一にしたモデルを使用することが多い。これに従い、本研究においてはBALB/c系マウスの自然発症TNBCに由来する4T1系統の細胞株を使用し(22)、BALB/cCrSlcマウスを細胞移植などの各実験処置を行う個体とした。当該細胞株およびマウス系統の組み合わせで施行された前転移ニッチ研究は複数報告されている(23,24)。

pHLIPはbacteriorhodopsinにおけるアミノ酸配列の一部から誘導された20-30残基のペプチドである。Bacteriorhodopsinは高度好塩菌の紫膜を構成しており、7つの膜貫通ヘリックスを有する。Reshnyakらは、bacteriorhodopsinに含まれるhelix cのアミノ酸配列を改変したpHLIPを合成し、培養系内のpHに依存してペプチドに結合した蛍光色素が細胞内へ取り込まれることを示した(25)。正常組織における細胞外pHは7.4程度であり、pHLIP中の酸性アミノ酸側鎖およびC末端のカルボキシル基は脱プロトン化している。よって、リン脂質などにより負電荷を帯びた細胞膜とは微弱ながらに結合するが、間質液の対流により取り除かれ、体循環に戻る。一方腫瘍組織においては、がん細胞などがプロトンを過剰に排出しており、当該細胞の膜表面にてプロトン濃度は最も高まっている。pHLIP中の各カルボキシル基はがん細胞表面における細胞外pHの低下によりプロトン化し、電荷的中性となる。これによる疎水性の増加は細胞膜中の疎水性コア領域への親和性を高め、 α -ヘリックス型への構造変換による膜挿入を促す。膜挿入後、C末端カルボキシル基は細胞内の中性pHにより脱プロトン化され、細胞膜からの脱離を防ぐ。以上の作用メカニズムより、pHLIPは細胞膜表面における細胞外pHの低下を感知し、当該部位への貯留を検出することで対象組織の酸性化を定量的に解析できる。放射性核種や蛍光色素をpHLIP中の官能基に修飾したものが開発されており、表皮近傍に形成した腫瘍組織における同プローブの蓄積は非侵襲的な画像解析によって検出されている(26,27)。また各臓器を摘出して画像解析することで、pHLIPの臓器分布が求められる。本研究で使用する4T1系統株は様々な臓器(肺、リンパ節、骨など)に転移する(28)。よって、転移前段階におけるpHLIPの臓器分布を対照マウスのそれと比較すれば、前転移ニッチにおけるpH環境を解明する足掛かりになると考えた。

以上より、前転移ニッチにおけるpH環境の解明に向けて、4T1系統株を用いて同種同所性の乳が

んマウスモデルを作製し、転移前段階における臓器の pH 環境を pHLIP の臓器分布から明らかにした。またその結果に基づき、当該細胞株の培養上清投与がマウス肺における pHLIP 分布および乳酸発生系に与える影響を検証した。最後に、培養上清による肺 pH 環境変化における肺転移形成への関与を解析した。

2. 実験方法

2-1. 細胞培養

マウス乳がん細胞株 (4T1.2, 66cl4) は Robin L. Anderson 教授 (Peter MacCallum Centre, Melbourne, Australia) から分与いただいた。両細胞株は、BALB/cfC3H マウスに自然発生した乳がん由来する (22)。4T1.2 細胞は肺転移巣から単離した 4T1 細胞を single cell cloning を介して得た株であり、様々な臓器 (肺、リンパ節、骨) に転移する (28)。一方、66cl4 細胞は上記の自然発生乳がんの原発巣から単離されたものである。肺のみに転移するものの、その転移効率は 4T1.2 細胞に比して低い。これらの細胞は 5% の非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、抗生物質 (100 units/mL penicillin および 100 µg/mL streptomycin; 富士フィルム和光純薬、東京) を含む Minimum Essential Medium α (MEM- α ; 富士フィルム和光純薬) で 37°C、5% CO₂ の環境下で培養した。マウスに移植したがん細胞の動態を可視化するために、luciferase 改変遺伝子 (*Luc2*) を含む pGL4.51 vector (Promega, Madison, WI, USA) を Lipofectamine® 3000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて 4T1.2 細胞へ導入した。遺伝子導入した 4T1.2 細胞は G418 (450 µg/mL; 富士フィルム和光純薬) を含んだ培地で 2 週間以上選択培養し、4T1.2-Luc2 細胞として樹立した。本遺伝子組換え実験は、本学の遺伝子組換え実験安全委員会において承認されている (承認番号: G22-004-01)。Luc2 遺伝子を導入した 66cl4 (66cl4-Luc2) 細胞は Cheryl L. Jorcyk 教授 (Boise State University, Boise, ID, USA) より分与いただいた (29)。以上の細胞は Venor® GeM Classic Mycoplasma Detection Kit (Minerva Biolabs, Berlin, Germany) によりマイコプラズマ感染陰性を確認した上で実験に使用した。

2-2. 蛍光標識 pHLIP の調製

Alexa Fluor (AF) 647 または AF750 が修飾された pHLIP (AF647-pHLIP または AF750-pHLIP) は、Yana K. Reshetnyak (University of Rhode Island, RI, USA) により化学合成されたものを使用した。粉末を dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解して -20 度にて保存した。当該溶液のモル濃度は、供与先から提供された各化合物のモル吸光係数を用いて算出した (AF647-pHLIP の $\epsilon_{651} = 270000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、AF750-pHLIP の $\epsilon_{753} = 290000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

2-3. マウス乳がん細胞の正所性移植モデルの作製

マウス乳がん 4T1.2-Luc2 細胞または 66cl4-Luc2 細胞を Ca²⁺, Mg²⁺-free phosphate buffered saline (PBS) で $1.0 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ になるように調製し、BALB/cCrSlc マウス (メス、7 週齢; 清水実験材料、京都) の第 4 乳腺にハミルトンシリンジ (Hamilton Company, Reno, NV, USA) を用いて皮下移植した。移植直前に三種混合麻酔 {ドミトール® (日本全薬、福島)、ドルミカム® (丸石製薬、大阪)、ベトルファール® (Meiji Seika ファルマ、東京)} を投与し、深麻酔下にて $1.0 \times 10^5 \text{ cells}/0.1\text{mL}$ の皮下投与を行った。原発腫瘍の進展と遠隔転移の有無を評価するために、D-luciferin (150 mg/kg、富士フィルム和光純薬) をマウス腹腔内に投与し、移植細胞由来の生物発光を IVIS Lumina XRMS SeriesIII (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) で検出した。取得データは Living image software v4.7.4 (PerkinElmer) で解析した。移植後 21 日のマウスを三種混合麻酔下で安楽死させ、各臓器を摘出し実験に使用した。原発腫瘍は切除後すぐに重量を測定した。以上の動物実験は、本学の動物実験委員会において

承認されている (承認番号: CTPH-20-006)。

2-4. がん細胞由来液性因子による前転移ニッチマウスモデルの作製

4T1.2 細胞または 66cl4 細胞 (いずれも 3.0×10^4 cells /mL) を 5% FBS 含有 MEM- α で 48 時間培養した。血清由来液性因子の影響を取り除くために、PBS で洗浄後、MEM- α でさらに 24 時間培養した。細胞播種 72 時間後に回収した培養上清は、2000 \times g、20 分間、4°C と 10000 \times g、30 分間、4°C の遠心分離を行い、死細胞とデブリを除去した。0.22 μ m 低吸着滅菌フィルター (MERK、Darmstadt、Germany) に通し、一日使用量に分注後、-20°C で保存した。BALB/cCrSlc (メス、7 週齢) に 0.3 mL の調製したがん細胞培養上清または MEM- α を 1 日 1 回、21 日間連続で腹腔内投与した。投与開始後 22 日目に肺を摘出し、*ex vivo* または *in vitro* での解析に使用した。以上の動物実験は、本学の動物実験委員会において承認されている (承認番号: CTPH-20-006、A22-066)。

2-5. 薬物処置と経脈管肺転移モデルの作製ならびに転移の進展評価

肺組織酸性化を抑制するために、sodium oxamate (oxamate、300mg/kg; 富士フィルム和光純薬) を 4T1.2 培養上清 (4T1.2-CM) または MEM- α に懸濁し、1 日 1 回、21 日間連続で BALB/cCrSlc マウス (メス、7 週齢) に腹腔内投与した。薬物処置終了の翌日、PBS に懸濁した 66cl4-Luc2 細胞 (5.0×10^4 cells/mL) を経尾静脈に 0.1 mL 投与した。肺転移の進行は“3. マウス乳がん細胞の正所性移植モデルの作製”で示した生物発光イメージングで経時的に評価した。投与部位に残留した移植細胞の生物発光が入り込むことを防ぐために、腹部以下を黒いシートで覆い発光画像を取得した。以上の動物実験は、本学の動物実験委員会において承認されている (承認番号: A22-066)。

2-6. 蛍光標識 pHLIP の生体内分布解析

PBS に溶解した 0.1 mL の AF750-pHLIP (20 μ M) を解析 24 時間前に腹腔内投与した。摘出した臓器や組織は PBS で洗浄した後、すぐに Lumina XRMS Series III で蛍光画像を取得した (励起波長: 740 nm、蛍光波長: 790 nm)。取得画像の解析には、Living image software v4.7.4 を用いた。

2-7. コロニー形成アッセイによる微小転移の解析

マウス肺を PBS で灌流後、PBS で 2.0 U/mL に溶解した dispase (Sigma-Aldrich) 2 mL を経気道投与した。Dispase の漏出を防ぐため、PBS で 2% に溶解した low melting point agarose (タカラバイオ、滋賀) 0.5 mL を経気道投与した。肺全体を氷で覆い、2 分間静置した。その後摘出した肺は 1 U/mL の dispase を含む Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; 富士フィルム和光純薬) に浸漬させ、室温で 45 分間静置した。Dispase による酵素処理が終了した肺は、25 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES; 同仁化学研究所、熊本)、10% FBS、100 U/mL DNase I (Roche Diagnostics、Basel、Switzerland) を加えた Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; ナカライテスク、京都) 中に移し、剪刀で 1 mm 以下になるように細分化した。5 分間室温で静置し、メッシュサイズ 70 μm および 40 μm のナイロンフィルターで組織片を除いた。回収した濾液を 340 $\times\text{g}$ 、7 分間の遠心し、ペレットに 3 mL の BD Pharm Lyse™ Lysing Buffer (BD Bioscience、Becton Drive Franklin Lakes、NJ、USA) を加え、2 分間室温で静置した (溶血による赤血球の除去)。30 mL の 2% FBS 含有 PBS で lysis buffer を希釈し、350 $\times\text{g}$ 、5 分間の遠心を行った。得られたペレットを再度 2% FBS 含有 PBS で懸濁した。単離した細胞は 60 μM の 6-thioguanine (富士フィルム和光純薬) を含む MEM- α で播種し、14 日間培養した。死細胞を取り除くために、細胞播種後 24 時間で培地交換を行い、それ以降は 48 時間ごとの培地交換を繰り返した。選択培養により形成されたコロニーは 100% methanol (富士フィルム和光純薬) で固定後、100% methanol で 0.03% に溶解した methylene blue (ナカライテスク) で染色した。

2-8. 免疫組織化学的解析

PBS に 20 μM で溶解した AF647-pHLIP 0.1 mL を解剖の 24 時間前に腹腔内投与した。PBS 10 mL で灌流後、肺を摘出し 24 時間、4°C で 4% paraformaldehyde (PFA) 含有 PBS 中に静置し固定した。その後、15%、20%、および 30% にそれぞれ調製した sucrose 溶液に 24 時間ずつ低濃度のものから順に交換した (脱水)。摘出肺を Optimal Cutting Temperature Compound (Sakura Finetec、東京) に包埋し、-20°C で凍結した。凍結肺からクライオスタット (Leica CM1950; Leica Biosystems、Nussloch、Germany) により 10 μm の肺切片を作製した。肺切片は 3% Triton® X-100 (ナカライテスク) を溶解した PBS (PBS-Triton X) 中で、抗 Cy5/AF647 抗体 (クローン: CY5-15; 希釈倍率: 1:500; Sigma-Aldrich) と 100 rpm で振動させながら、終夜 4°C で反応させた。PBS-Triton X で 100 rpm で 15 分間の洗浄を 2 回行った後、AF647 を標識した donkey anti-mouse IgG 抗体 (H+L; 希釈倍率: 1:500; Invitrogen、Waltham、MA、USA) と Hoechst33342 (希釈倍率: 1:5000; Thermo Fisher Scientific) を室温、2 時間反応させた。免疫染色された肺切片は、スライドガラス上で VECTASHIELD Mounting Medium (Vector Laboratories、Newark、NL、USA) により封入した。蛍光画像は LSM800 共焦点レーザー顕微鏡 (ZEISS、Oberkochen、Germany) を用いて取得した。画像解析には ZEN3.0 (ZEISS) と FIJI software v1.53t を用いた。

2-9. Lactate assay

内因性乳酸デヒドロゲナーゼによる乳酸の分解を抑えるため、摘出した肺は速やかに液体窒素で急速凍結した。解析当日に融解した肺組織を剪刀で 20-30 mg に細分化し、重量で 1000 倍量の PBS を加えた Triton® X-100 に移した。サンプルを氷冷しながら、Bioruptor II (TYPE12; BM Equipment、東京) を用いて組織成分を溶出した (出力: high; 1 回あたりの出力時間: 30 秒; インターバル: 30 秒; 出力回数: 30 回)。溶出液を 8000 ×g、5 分間の遠心分離に供し、その上澄み液を Amicon Ultra-0.5 ml 10K 限外ろ過フィルター (MERK) に通した。12000 ×g、10 分間で遠心分離することで、乳酸と乳酸分解酵素を分離した。ろ液中の乳酸濃度は Lactate assay Kit-WST (同仁化学研究所) を用いて測定した。

2-10. Western blot

肺組織タンパク質は“9. Lactate assay”に記載の方法で調製した。タンパク濃度を Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific) で測定した後、2-mercaptoethanol 含有試料用緩衝液 (富士フィルム和光純薬) および超純水と混合してタンパク質濃度 1 mg/mL に調製し、5 分間煮沸したものを電気泳動した。Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) にてタンパク質 10 µg を分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Merck) に転写 (100V、90 分) した。PVDF 膜への非特異的結合を防止するため、ブロッキング剤には 5% non-fat dry milk (NFD; 雪印メグミルク、東京) を使用し、室温にて 1 時間反応させた。一次抗体 (表 1) は 4°C で 1 時間または終夜反応させ、二次抗体は horseradish peroxidase (HRP) 標識された抗 rabbit または抗 mouse IgG 抗体 (Cell Signaling Technology、Danvers、MA、USA) を用いて 30 分、室温にて反応させた (表 1)。これらのブロッキング剤および各種抗体は、TBS-Tween (20 mM tris、0.5 M sodium chloride、0.05% Tween20、pH8.0) を用いて溶解または希釈した。Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Cytiva、Marlborough、MA、USA) を用いて化学発光を起こし、ImageQuant LAS (Cytiva) で検出した。

表 1. Western blot に用いた抗体

品名	希釈倍率	販売元 (品番)
Rabbit anti-lactate dehydrogenase A (LDHA)	1:1000	Cell Signaling Technology (2012)
Mouse anti-monocarboxylate transporter 4 (MCT4)	1:500	Santa Cruz (sc-376140)
Rabbit anti- monocarboxylate transporter 1 (MCT1)	1:400	Novus Biologicals (NBP1-59656)
Mouse anti-hexokinase 2 (HK2)	1:1000	Santa Cruz (sc-130358)
Mouse anti-β-actin	1:10000	Sigma-Aldrich (A5441)
Goat anti-rabbit IgG, HRP	1:1000	Cell Signaling Technology (7074)
Horse anti-mouse IgG, HRP	1:1000	Cell Signaling Technology (7076)

2-11. 統計解析

取得したデータは Prizm 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) で統計処理した。グラフは、生存期間解析を除いて平均値±標準偏差で示した。2 群間の平均値比較では、対応のない t 検定を用いて解析した。生存曲線は Kaplan-Meier method で示し、log-rank 検定で統計処理を行なった。P 値が 0.05 以下のものを統計学的に有意差があると判定した。

3. 実験結果

3-1. 4T1.2-Luc2 同所性移植モデルにおける pHHLIP の臓器分布

転移が生じる前段階の各臓器の pH 環境を解析するにあたって、はじめに同種同所性乳がん移植マウスモデルを作製した。4T1 細胞 (2.0×10^5 cells) を BALB/c マウスの乳腺に移植すると、21 日後の肺に転移細胞の存在が遺伝子レベルで確認されている (30)。そこで、 1.0×10^5 cells の 4T1.2-Luc2 細胞を BALB/c マウスの乳腺に移植し、21 日後時点での移植細胞の分布を生体発光イメージングで解析した。その結果、移植細胞由来の生物発光は移植部位に局限していた (図 2A)。4T1.2-Luc2 細胞の移植 21 日後において明らかな遠隔転移がなかったことから、当該時点における各臓器の pH 環境が担がん状態により変化しているか、pHLIP の分布量で評価した (図 2B)。

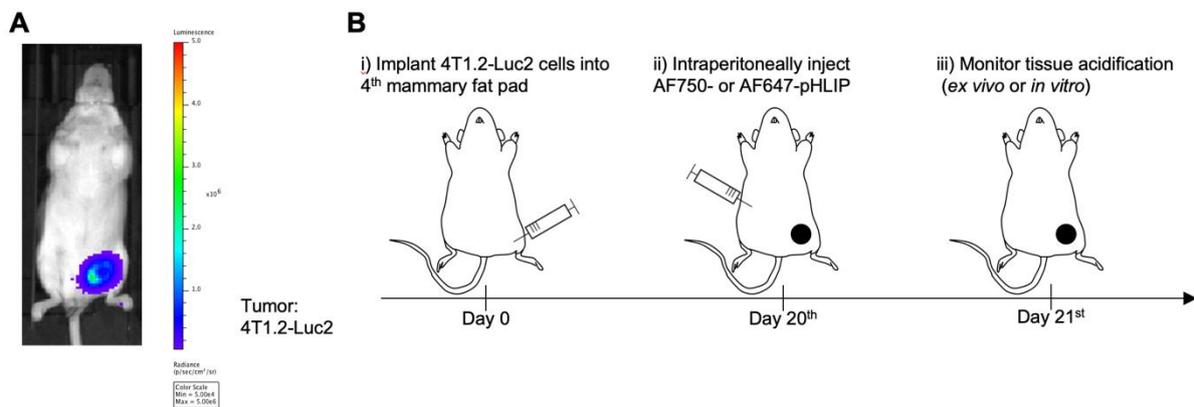


図 2. 4T1.2-Luc2 同所性移植モデルの作製

(A) 4T1.2-Luc2 を BALB/c マウスの乳腺に移植し、21 日後に移植細胞由来の生物発光を IVIS Lumina XRMS SeriesIII で検出した。(B) 転移前段階における各臓器の pH 環境解析に関する実験手順: i) 4T1.2-Luc2 細胞を BALB/c マウス乳腺に移植した。ii) 移植 20 日後に、AF750-pHLIP または AF647-pHLIP を腹腔内投与した。iii) 移植 21 日後に各臓器を摘出し、pHLIP の分布を解析した。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

AF750-pHLIP を移植 20 日後に投与し、24 時間後の各臓器における分布量を *ex vivo* で解析した。投与した AF750-pHLIP に由来する蛍光 (Total Radiant Efficiency [p/s]/[μ W/cm²]: TRE) は、担がんモデルマウスから摘出した原発腫瘍 (4.56×10^9 TRE)、肺 (1.10×10^9 TRE)、肝臓 (1.16×10^{10} TRE)、脾臓 (9.01×10^9 TRE)、腎臓 (3.42×10^{10} TRE)、ならびに大腿骨/脛骨 (1.83×10^9 TRE) で検出された (図 3A)。一方、対照マウスにおいては、肺 (8.99×10^8 TRE)、肝臓 (9.93×10^9 TRE)、脾臓 (5.41×10^8 TRE)、腎臓 (2.01×10^{10} TRE)、ならびに大腿骨/脛骨 (1.48×10^9 TRE) で蛍光が検出された。4T1.2-Luc2 移植の有無で pHHLIP 分布量が視覚的に顕著な差がみえた肺について、再現性を確認した。その結果、肺の蛍光強度 ($\times 10^8$ TRE) は 4T1.2-Luc2 移植群において有意に高かった (図 3B; 対照: 5.46 ± 1.18 , 4T1.2-Luc2 腫瘍: 8.77 ± 2.61)。担がんモデルマウス肺における pHHLIP 分布量の増加を肺組織切片から確認するために、AF647-pHLIP を先と同様のタイミングで投与し、24 時間後に摘出した肺を用いて免疫組織学的解析を行なった。投与した提案されたものに差し替えました。AF647 の蛍光が撮像までに退色

する可能性を考慮し、抗 Cy5/AF647 抗体にて pHLIP を検出した。4T1.2-Luc2 移植マウス肺から作製した組織切片において、AF647-pHLIP に相当する蛍光シグナルの相対値が、対照群の肺に比べて有意に高く検出された (図 3C; 対照: 1.0 ± 0.38 、4T1.2-Luc2 腫瘍: 4.9 ± 3.5)。

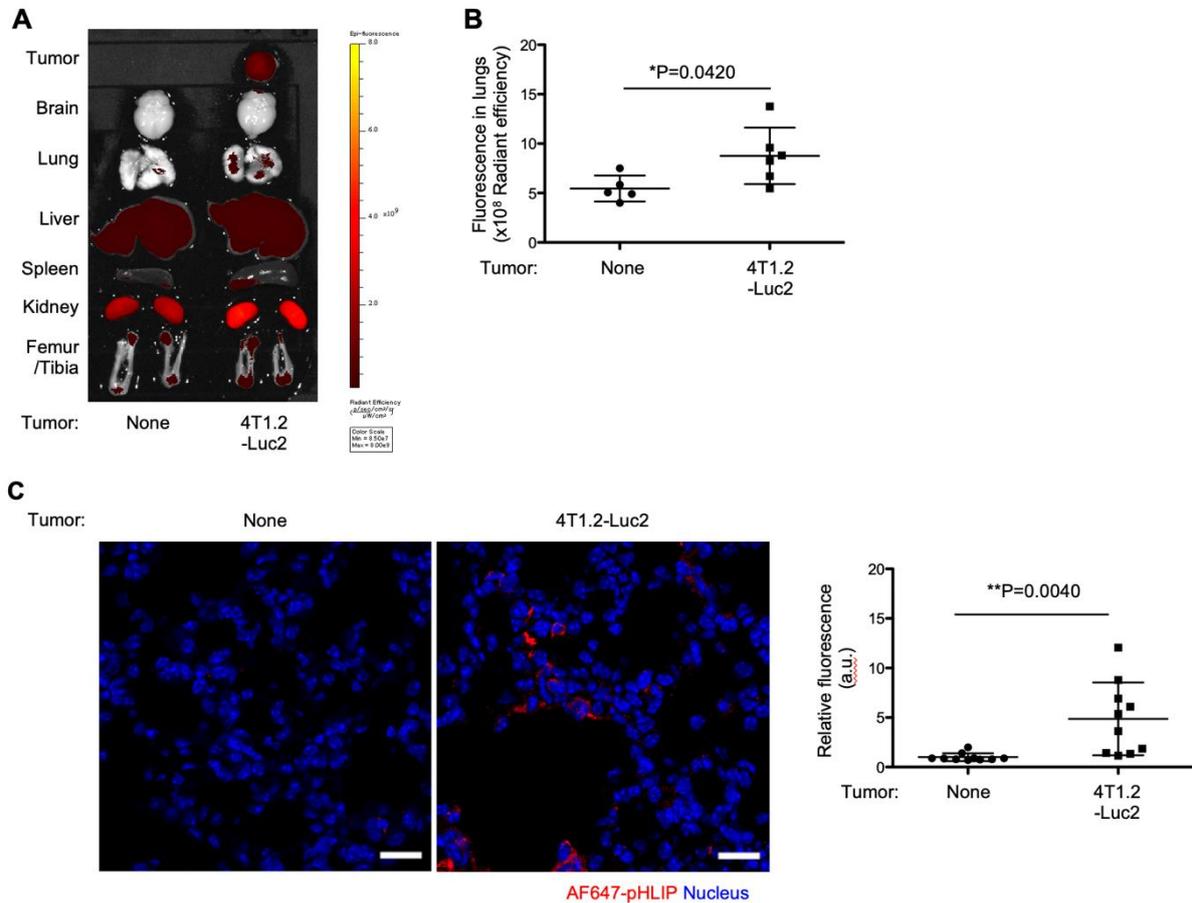


図 3. 4T1.2-Luc2 同所性移植モデルの移植 21 日後における pHLIP の臓器分布

(A) 対照マウス (none) および 4T1.2-Luc2 移植マウス (4T1.2-Luc2) からそれぞれ摘出した臓器 (上から原発腫瘍、脳、肺、肝臓、脾臓、腎臓、大腿骨/脛骨) における AF750-pHLIP 由来蛍光を *ex vivo* での撮像にて取得した。(B) 対照マウス (5 匹) および 4T1.2-Luc2 移植マウス (6 匹) 由来の肺における AF750-pHLIP 由来蛍光強度を *ex vivo* での撮像にて取得した。(C) AF647-pHLIP 投与マウスから摘出した肺を PFA 固定し、作製した組織切片に抗 Cy5/AF647 抗体を反応させ、AF647-pHLIP の局在を LSM で解析した (左: 対照マウス肺; 右: 4T1.2-Luc2 移植マウス肺; scale bars: 20 μm)。画像解析により、視野あたりの AF647-pHLIP 由来赤色蛍光強度を算出した (10 視野/群)。すべてのグラフにおいて、各サンプルの解析値および各群の平均値と標準偏差を示した。統計解析は Student's *t* test (両側検定; 対応なし) を用いた (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$)。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

3-3. 4T1.2-Luc2 同所性移植モデル肺における乳酸量およびその調節に関わるタンパク質の発現

腫瘍組織における酸性微小環境は、がん細胞から過剰に排出された乳酸によって主に形成されることから、4T1.2-Luc2 移植モデル肺における pHILIP 分布の増加に乳酸が関与している可能性を考え、同組織における乳酸を比色分析で定量した。その結果、移植モデル肺における組織重量当たりの乳酸量 ($\mu\text{mol/g}$) は対照群のそれよりも有意に増加していた (図 4A; 対照: 2.72 ± 0.549 、4T1.2-Luc2 腫瘍: 3.59 ± 0.294)。組織乳酸量が増加していたことから、その産生に関わる解糖系酵素や乳酸輸送体の肺組織内発現量を解析した。Western blot の結果より、移植モデル肺における lactate dehydrogenase A (LDHA)、monocarboxylate transporter 4 (MCT4)、ならびに hexokinase 2 (HK2) のタンパク質発現量が対照群に比べて上昇していた (図 4B)。

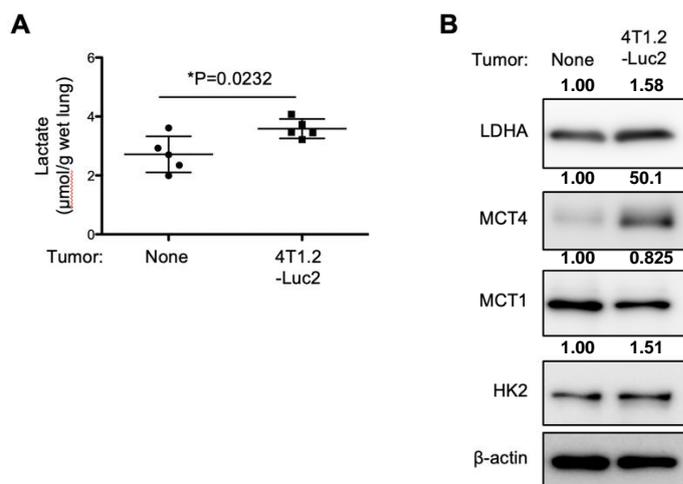


図 4. 4T1.2-Luc2 同所性移植モデル肺における乳酸量ならびに解糖系関連タンパク質の発現

4T1.2-Luc2 同所性移植モデルを作製し、移植 21 日後に摘出した肺における乳酸ならびに解糖系関連タンパク質の発現を解析した。(A) 対照マウス (none; 5 匹) および 4T1.2-Luc2 移植マウス (4T1.2-Luc2; 5 匹) 由来の肺における乳酸量を解析した。グラフには、各サンプルの解析値および各群の平均値と標準偏差を示した。統計解析は Student's *t* test (両側検定; 対応なし) を用いた (*: $P < 0.05$)。 (B) 対照マウスおよび 4T1.2-Luc2 移植マウス由来の肺における lactate dehydrogenase A (LDHA)、monocarboxylate transporter 4 (MCT4)、monocarboxylate transporter 1 (MCT1)、hexokinase 2 (HK2)、ならびに β -actin の発現量を western blot で解析した。対象タンパク質の発現量を β -actin のそれで除して、相対化した値を表示した。 *Front Oncol.* **2023**, *13*, 1258442 より一部改変して転載。

3-4. 4T1.2-Luc2 同所性移植モデル肺における転移細胞の定性的解析

上記の解糖系亢進や pHLIP 分布量が増加した肺組織へ、乳腺に移植した 4T1.2-Luc2 細胞が転移していないかを解析した。移植 21 日後および 43 日後の肺から酵素処理によりそれぞれ単離した細胞を 6-thioguanine 含有培地で選択培養した。2 週間の培養により、移植後 43 日のサンプルからは 6-thioguanine に耐性を示す多数のコロニー形成が観察された (図 5)。一方、移植後 21 日の肺から単離された細胞からコロニーは形成されなかった。

以上、図 2-5 の結果では、4T1.2-Luc2 細胞の同所性移植モデルにおける転移前段階の肺では、pHLIP の分布量、乳酸量、ならびに解糖系関連タンパク質の発現が対照のマウス肺に比べて増加することが示された。

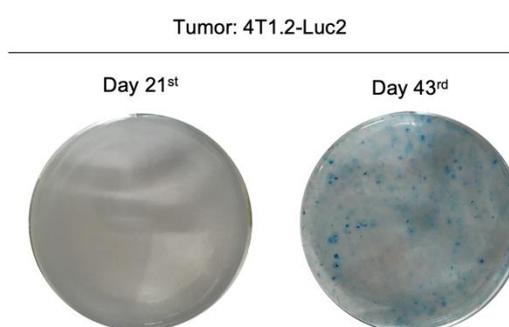


図 5. コロニー形成アッセイを用いた 4T1.2-Luc2 移植モデルにおける微小転移の評価

4T1.2-Luc2 同所性移植モデルを作製し、移植 21 日後 (左) および 43 日後 (右) の肺から単離した細胞を 6-thioguanine 存在下で培養し、コロニー形成を観察した。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

3-5. 66cl4-Luc2 細胞の移植による同種同所性乳がんモデルの作製と移植 21 日後の肺における pHLIP の分布

4T1.2-Luc2 細胞の移植により生じた転移前段階の肺における各種変化 (図 3、4) が、他の乳がんマウスモデルにおいても同様に生じるか検討した。4T1.2 細胞に比して転移効率が低い 66cl4-Luc2 細胞を BALB/c マウスに移植し、同種同所性モデルを作製した。両細胞株共に同じ細胞数で移植した場合、移植後 21 日の原発腫瘍重量 (mg) は 4T1.2-Luc2 に比べて 66cl4-Luc2 の方が大きかった (図 6A; 4T1.2-Luc2: 186 ± 98.3 、66cl4-Luc2: 342 ± 116)。一方、移植後 20 日に投与した AF750-pHLIP における投与 24 時間後の肺への分布量 ($\times 10^8$ TRE) は、非移植マウスと比して、66cl4-Luc2 移植マウスで少なかった (図 6B; 対照: 7.09 ± 0.720 、66cl4-Luc2 腫瘍: 5.07 ± 0.938)。以上の結果より、66cl4-Luc2 細胞の移植マウスでは、4T1.2 細胞移植マウスで見られた pHLIP の肺への蓄積は確認されなかった。

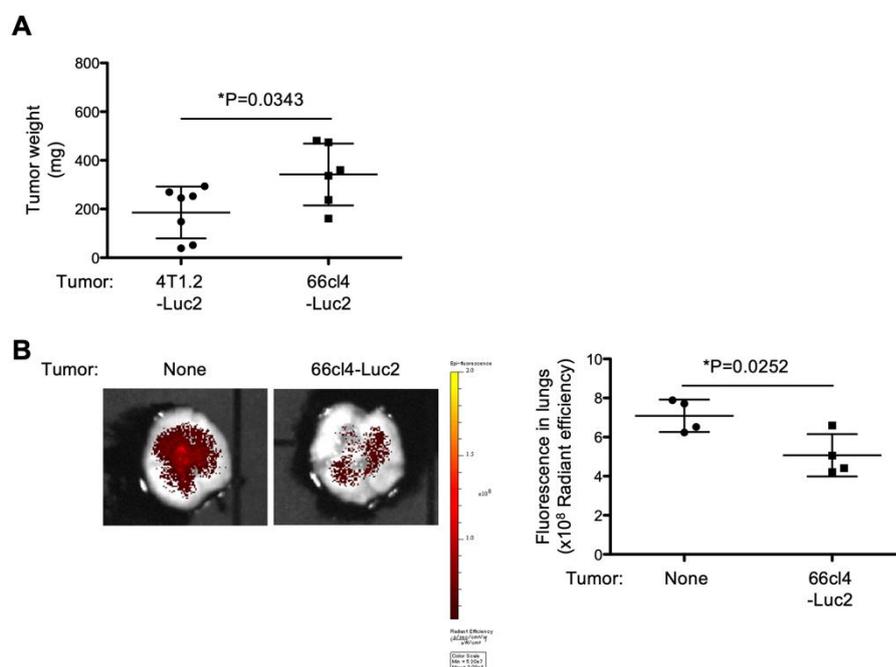


図 6. 66cl4-Luc2 同所性移植モデルの移植 21 日後における pHLIP の臓器分布

(A) 4T1.2-Luc2 細胞または 66cl4-Luc2 細胞を BALB/c マウス乳腺に移植し、移植 21 日後に摘出した原発腫瘍の重量を測定した (4T1.2-Luc2 移植群: 7 匹; 66cl4-Luc2 移植群: 6 匹)。(B) 対照マウス (none; 4 匹) および 66cl4-Luc2 移植マウス (66cl4-Luc2; 4 匹) において、移植 20 日後に AF750-pHLIP を投与し、24 時間後に摘出した肺における AF750-pHLIP 由来蛍光強度を *ex vivo* での撮像にて取得した。すべてのグラフにおいて、各サンプルの解析値および各群の平均値と標準偏差を示した。統計解析は Student's *t* test (両側検定; 対応なし) を用いた (*: $P < 0.05$)。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

3-6. 66cl4-Luc2 細胞移植 21 日後の肺における乳酸量とその調節に関わるタンパク質の発現

66cl4-Luc2 細胞の移植により、移植 21 日後における pHLIP の肺への分布が低下したことから、乳酸産生系への変化を検証した。肺組織中の乳酸量 ($\mu\text{mol/g}$) を定量した結果、66cl4-Luc2 細胞の移植の有無で有意な差は検出されなかった (図 7A; 対照: 4.07 ± 1.08 、66cl4-Luc2 腫瘍: 3.67 ± 0.777)。また同肺組織を western blot で解析した結果、解糖系酵素である LDHA や HK2 のタンパク質発現についても、66cl4-Luc2 細胞の移植の有無で変化を示すデータは得られなかった (図 7B)。一方乳酸輸送体のタンパク発現については、MCT4 と MCT1 で異なる傾向の結果であった。非移植群に比して、66cl4-Luc2 移植群における MCT4 の発現は低く、MCT1 の発現は高かった。

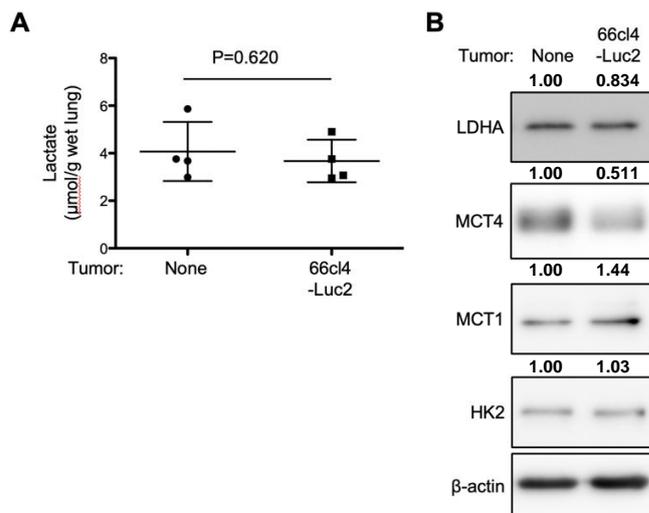


図 7. 66cl4-Luc2 同所性移植モデル肺における乳酸量ならびに解糖系関連タンパク質の発現

66cl4-Luc2 同所性移植モデルを作製し、移植 21 日後に摘出した肺における乳酸ならびに解糖系関連タンパク質の発現を解析した。(A) 対照マウス (none; 4 匹) および 66cl4-Luc2 移植マウス (66cl4-Luc2; 4 匹) 由来の肺における乳酸量を解析した。グラフには、各サンプルの解析値および各群の平均値と標準偏差を示した。統計解析は Student's *t* test (両側検定; 対応なし) を用いた (*: $P < 0.05$)。 (B) 対照マウスおよび 66cl4-Luc2 移植マウス由来の肺における LDHA、MCT4、MCT1、HK2、ならびに β -actin の発現量を western blot で解析した。対象タンパク質の発現量を β -actin のそれで除して、相対化した値を表示した。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

3-7. 4T1.2 細胞培養上清の投与が肺 pH 環境ならびに乳酸産生系に与える影響

マウス乳腺に移植した 4T1.2-Luc2 細胞が遠隔臓器の pH 環境を低下させる機序を考える上で、移植細胞の分泌因子に着目した。すなわち 4T1.2-Luc2 移植モデルにおいては、移植細胞の液性因子に 21 日間暴露された結果、肺 pH 環境が低下したと予想した。本仮説に基づき、4T1.2-CM または MEM- α (control media) を 21 日間腹腔内に投与した。投与終了後、AF750-pHLIP の肺への分布量を解析した。その結果、control media 投与群と比較して、4T1.2-CM 投与群では有意に pHLIP 由来蛍光量 ($\times 10^8$ TRE) が高かった (図 8A; control media: 5.01 ± 0.714 , 4T1.2-CM: 7.21 ± 0.750)。4T1.2-CM 投与群の肺組織重量当たりの乳酸量 ($\mu\text{mol/g}$) は control media 投与群のそれよりも有意に高かった (図 8B; control media: 3.08 ± 0.217 , 4T1.2-CM: 3.61 ± 0.263)。続いて、乳酸の産生および排出に関わるタンパク質の発現を western blot で解析した。その結果、LDHA、MCT1、ならびに MCT4 のタンパク質発現が 4T1.2-CM 投与群の肺で上昇していた (図 8C)。

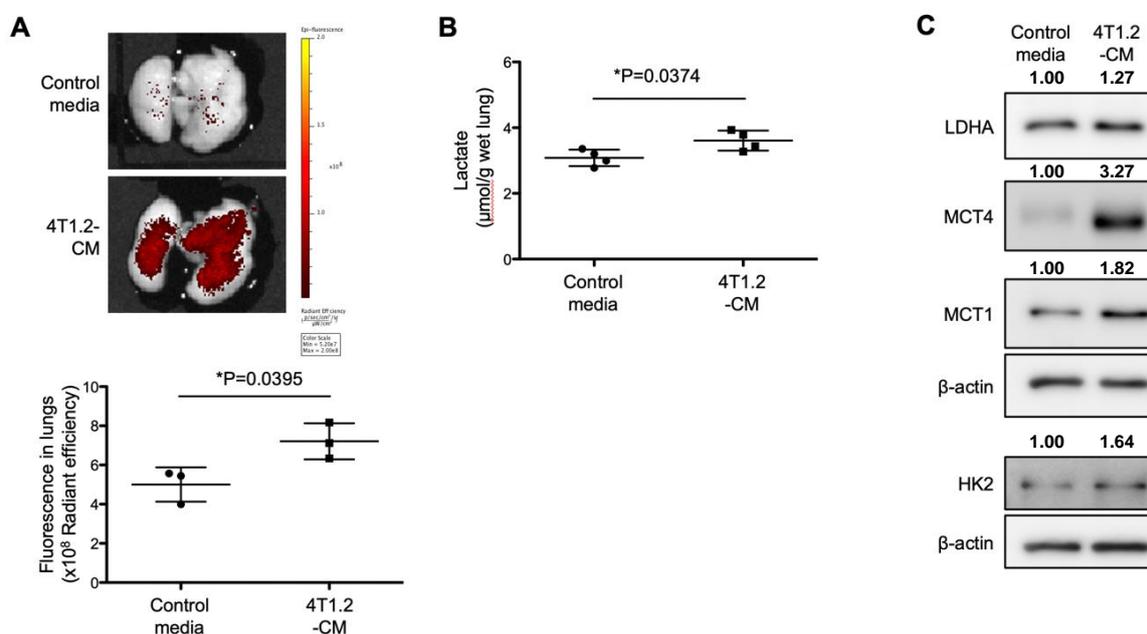


図 8. 4T1.2 細胞培養上清投与マウス肺における pHLIP の分布

Control media または 4T1.2-CM を BALB/c マウスの腹腔内に 1 日 1 回、21 日間連続で投与した。(A) 連続投与の最終日に AF750-pHLIP を投与し、24 時間後の肺における AF750-pHLIP 由来蛍光強度を *ex vivo* での撮像にて取得した (control media: 3 匹, 4T1.2-CM: 3 匹)。(B) 対照マウス (3 匹) および 4T1.2-CM 投与マウス (3 匹) 由来の肺における乳酸量を解析した。(C) 対照マウスおよび 4T1.2-CM 投与マウス由来の肺における LDHA、MCT4、MCT1、HK2、ならびに β -actin の発現量を western blot で解析した。グラフには、各サンプルの解析値および各群の平均値と標準偏差を示した。統計解析は Student's *t* test (両側検定; 対応なし) を用いた (*: $P < 0.05$)。対象タンパク質の発現量を β -actin のそれで除して、相対化した値を表示した。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

3-8. 66cl4 細胞培養上清の投与が肺 pH 環境ならびに乳酸産生系に与える影響

図 3、4 ならびに 8 の結果より、4T1.2 分泌因子による肺乳酸産生系を介した pH の低下の可能性が示唆された。一方、66cl4 細胞の移植では肺における pH_{LIP} の分布は変化した、乳酸量に有意な変化はなかった (図 7)。これより、66cl4 細胞では分泌因子による乳酸産生を介した pH 環境の改変を行わないと考えた。すなわち、4T1.2-CM 投与により生じた肺 pH 環境の変化は、66cl4 細胞の培養上清 (66cl4-CM) の投与では生じないと予想し、その仮説を検証した。4T1.2-CM 投与の条件と同様に、control media または 66cl4-CM を 21 日間連続で投与した。投与終了後、AF750-pHLIP の肺への分布量を解析した。その結果、66cl4 由来分泌因子の有無は肺の pH_{LIP} 由来蛍光量 ($\times 10^8$ TRE) に有意な差をもたらさなかった (図 9A; control media: 4.87 ± 0.535 、66cl4-CM: 5.51 ± 0.604)。また乳酸量 ($\mu\text{mol/g}$) も同様に、両群間で有意差はなかった (図 9B; control media: 2.75 ± 0.515 、66cl4-CM: 3.28 ± 0.566)。当該肺組織を western blot で解析した結果、LDHA と MCT1 のタンパク質発現量は control media 投与群に比して 66cl4-CM 投与群で低かった (図 9C)。一方、MCT4 と HK2 の発現量は 66cl4-CM 投与で上昇した。

以上、図 6-9 の結果をまとめると、4T1.2-CM の投与により pH_{LIP} の分布量、乳酸量、ならびに解糖系関連タンパク質の発現が対照のマウス肺に比べて増加することが示された。一方、66cl4-Luc2 細胞の同所性移植または 66cl4-CM の投与では、マウス肺において解糖系関連タンパク質の発現亢進に伴う乳酸アシドーシスの発生を示唆する結果は得られなかった。

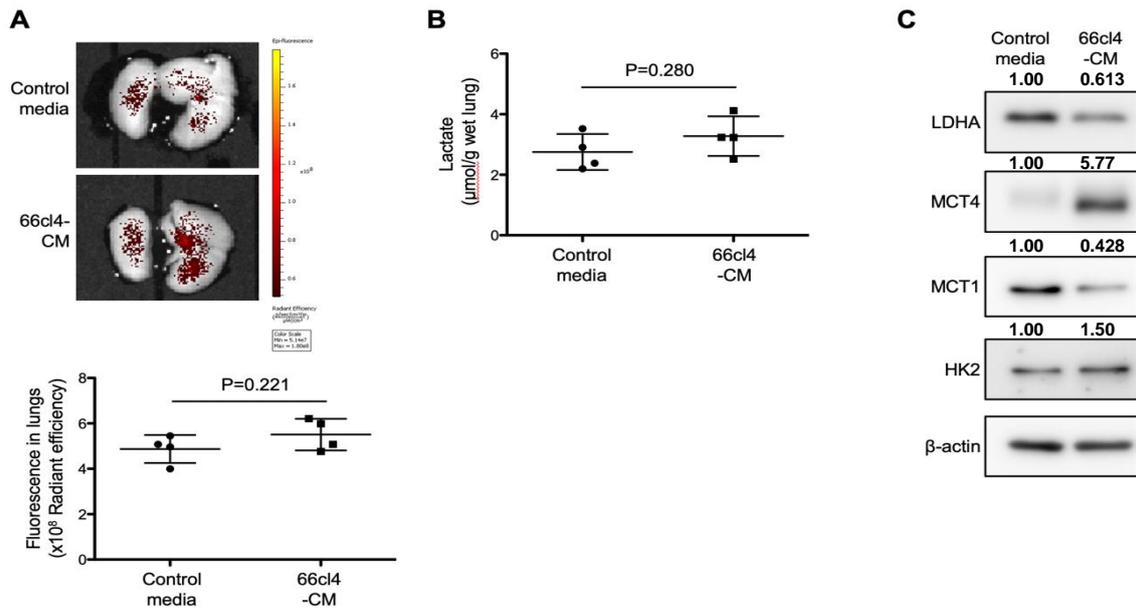


図 9. 66cl4 細胞培養上清投与マウス肺における pHLIP の分布

Control media または 66cl4-CM を BALB/c マウスの腹腔内に 1 日 1 回、21 日間連続で投与した。(A) 連続投与の最終日に AF750-pHLIP を投与し、24 時間後の肺における AF750-pHLIP 由来蛍光強度を *ex vivo* での撮像にて取得した (control media: 3 匹、66cl4-CM: 3 匹)。(B) 対照マウス (4 匹) および 4T1.2-CM 投与マウス (4 匹) 由来の肺における乳酸量を解析した。(C) 対照マウスおよび 4T1.2-CM 投与マウス由来の肺における LDHA、MCT4、MCT1、HK2、ならびにβ-actin の発現量を western blot で解析した。対象タンパク質の発現量をβ-actin のそれで除して、相対化した値を表示した。グラフには、各サンプルの解析値および各群の平均値と標準偏差を示した。統計解析は Student's *t* test (両側検定; 対応なし) を用いた。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

3-9. LDHA 阻害剤が pHHLIP の肺分布量に与える影響

4T1.2 液性因子による乳酸産生の亢進に着目し、LDHA 阻害剤 (oxamate) の処置が pHHLIP の肺分布量に影響を及ぼすか解析した。Oxamate を 4T1.2-CM に溶解して、1 日 1 回、21 日間連続で投与した。投与終了後、AF750-pHLIP の肺への分布量を解析した。その結果、4T1.2-CM 単独投与群と比較して、oxamate 併用投与群では有意に pHHLIP 由来蛍光量 ($\times 10^8$ TRE) が低かった (図 10A; 4T1.2-CM: 6.56 ± 0.433 ; 4T1.2-CM with oxamate: 4.99 ± 0.496)。Oxamate が AF750-pHLIP の蛍光を消光させる可能性について検証するために、oxamate または AF750-pHLIP を溶解させた 4T1.2-CM の蛍光強度を測定した。解析の結果、AF750-pHLIP 由来蛍光強度 ($\times 10^8$ TRE) は oxamate の同一溶液中での共存によって変化しなかった (図 10B; AF750-pHLIP⁺/oxamate⁻: 464、AF750-pHLIP⁺/oxamate⁺: 458)。このことから、oxamate は pHHLIP に結合された AF750 由来の蛍光に影響を与えずに、4T1.2 液性因子に誘導された肺組織酸性化を抑制することが示された。

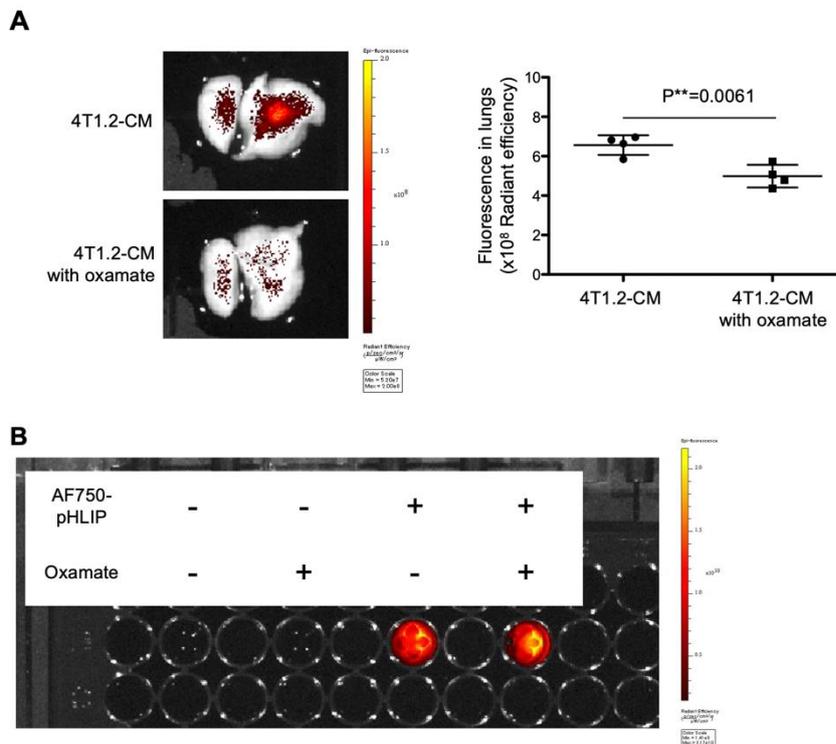


図 10. LDHA 阻害剤投与マウス肺における pHHLIP の分布

(A) 4T1.2-CM (4 匹) または oxamate を溶解した 4T1.2-CM (4T1.2-CM with oxamate; 4 匹) を BALB/c マウスの腹腔内に 1 日 1 回、21 日間連続で投与した。連続投与の最終日に AF750-pHLIP を投与し、24 時間後の肺における AF750-pHLIP 由来蛍光強度を *ex vivo* での撮像にて取得した。グラフには、各サンプルの解析値および各群の平均値と標準偏差を示した。統計解析は Student's *t* test (両側検定; 対応なし) を用いた (**: $P < 0.01$)。 (B) 4T1.2-CM に AF750-pHLIP または oxamate を溶解し、96 well plate に加えたものを IVIS Lumina XRMS SeriesIII で撮像することにより各群の AF750-pHLIP 由来蛍光強度を測定した。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

3-10. 肺組織酸性化が肺転移形成に与える影響

LDHA 阻害剤が pHLIP の肺への分布量を低下させたことから、pHLIP は LDHA による乳酸産生の亢進から引き起こされる組織酸性化を認識して貯留していると考えられる。酸性がん微小環境は、がん細胞の組織浸潤を促進して転移を助長させる (31)。これを踏まえ、4T1.2 分泌因子により誘導される肺組織酸性化が転移巣形成に関与するか解析した。4T1.2-CM の投与により肺組織酸性化を発症させたマウスおよび LDHA 阻害剤含有上清の投与によりその発症を抑制したマウスに 66cl4-Luc2 細胞を経尾静脈内に投与し、その後の肺における当該細胞の増殖とマウス生存の経過を観察した (図 11)。

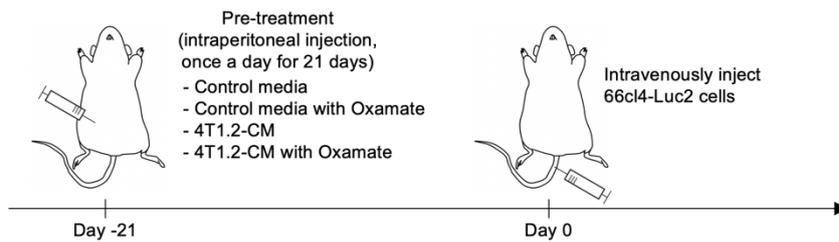


図 11. LDHA 阻害剤および各種培地の前処置と経脈管肺転移モデルの作製

BALB/c マウスに対し、control media、oxamate 含有 control media、4T1.2-CM、または oxamate 含有 4T1.2-CM を 1 日 1 回、21 日間連続で投与した。投与終了の翌日 (day 0)、66cl4-Luc2 細胞を全ての個体に尾静脈投与した。肺における移植細胞の増殖は IVIS Lumina XRMS SeriesIII による生体イメージングで経時的に評価した。

その結果、尾静脈投与 21 日後において、移植細胞に由来する生物発光は、4T1.2-CM を処置した全てのマウス肺で検出された (図 12A; 4T1.2-CM: 5 匹/5 匹)。それに比べ、LDHA 阻害剤含有上清を処置した群では 40% の個体で生物発光が検出された (4T1.2-CM with oxamate: 2 匹/5 匹)。LDHA 阻害剤の移植細胞に対する直接作用の可能性を鑑み、肺組織酸性化を発症しない control media を用いて同様の実験を行なった。その結果、尾静脈投与 21 日後のマウス肺における生物発光検出率は、control media 単独処置群で 40% (control media: 2 匹/5 匹)、LDHA 阻害剤含有 control media で 60% (control media with oxamate: 3 匹/5 匹) であった。また、各個体の生存期間に基づいて生存中央値 (MST: median survival time) を算出した (図 12B)。統計解析の結果、4T1.2-CM 処置群と LDHA 阻害剤含有上清処置群の間において、MST に有意差が認められた (4T1.2-CM: 24 日、4T1.2-CM with oxamate: 33 日)。一方、control media 処置群と LDHA 阻害剤含有 control media 処置群の間には、MST の統計学的有意差は検出されなかった (control media: 34 日、control media with oxamate: 32 日)。

以上の図 10-12 の結果をまとめると、4T1.2-CM の投与によるマウス肺への pHLIP 分布量の増加は oxamate により抑制され、経脈管的に投与した 66cl4-Luc2 細胞による肺転移形成の抑制が示された。

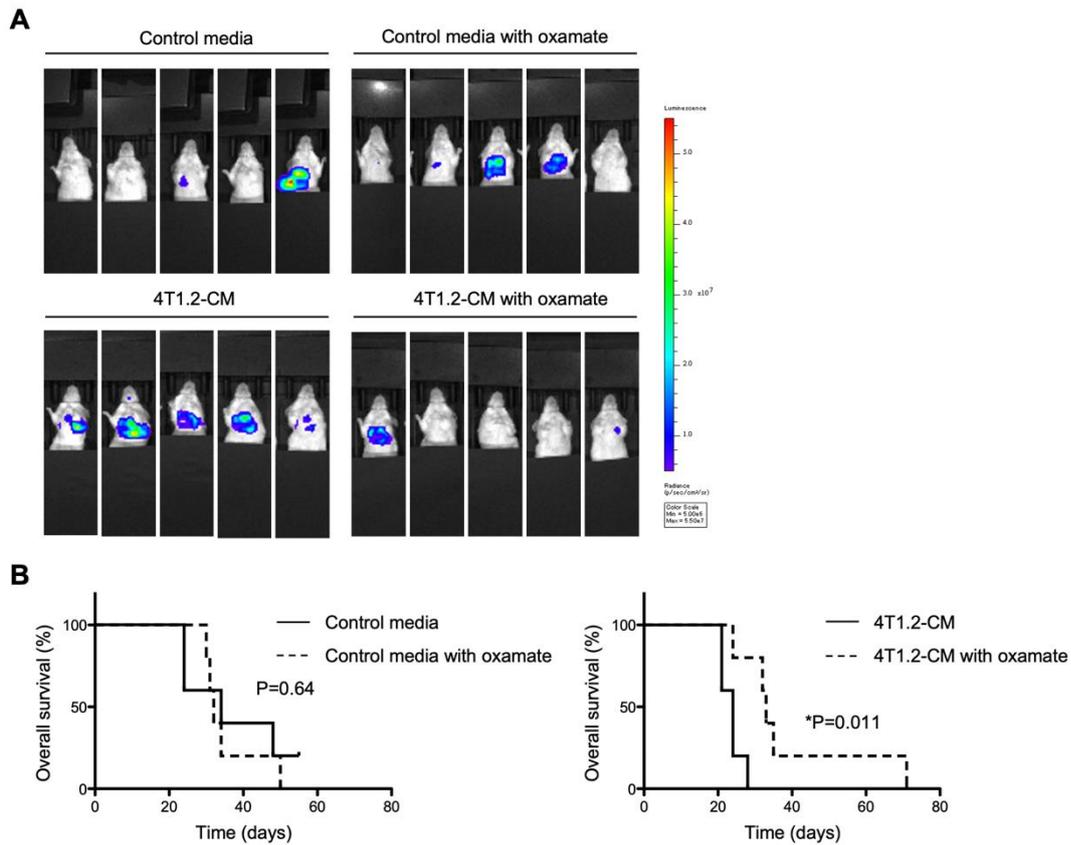


図 12. LDHA 阻害剤および各種培地を前処置したマウスにおける肺転移進展評価

(A) 66cl4-Luc2 細胞を移植して 21 日後のマウス肺における移植細胞由来生物発光を *in vivo* イメージングで解析した。当該マウスは細胞移植の前に以下のいずれかの培地を処置された: control media (5 匹)、oxamate 含有 control media (control media with oxamate; 5 匹)、4T1.2-CM (5 匹)、または oxamate 含有 4T1.2-CM (4T1.2-CM with oxamate; 5 匹)。(B) (A) に示した各個体 (5 匹/群) の生存期間を解析し、Kaplan-Meier plots で示した。統計解析は log-rank test を用いた (*: $P < 0.05$)。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

4. 考察

転移巣の形成は対象臓器に到達した少数のがん細胞 (微小転移) から始まり、それらが増殖して数ヶ月から数年後に画像診断でマクロ転移として検出される。前転移ニッチは、がん細胞と遠隔臓器内の細胞とで行われる相互作用の結果であり、微小転移が生じる直前の臓器において形成されている可能性が高い。遺伝子組換え操作を行なったがん細胞により自然転移モデルを作製した場合は、がん細胞へ導入したマーカー遺伝子を *polymerase chain reaction* で増幅して、微小転移を検出している (30,32)。一方、マーカー遺伝子を有していないがん細胞を使用したモデルの場合では、組織切片での病理学的解析から微小転移の生じる時期を確認している。本研究では、4T1.2-Luc2 細胞の同種同所性移植モデルにおける移植 21 日後の肺に転移した移植細胞が存在しないことを、6-thioguanine 含有培地でのコロニー形成アッセイにて明らかにした。4T1.2-Luc2 細胞の親株である 4T1 細胞は、株として樹立された時点で 6-thioguanine の細胞毒性に対して耐性を有している (33)。本系で評価したものは移植 21 日後と 43 日後の肺であり、後者では 4T1.2-Luc2 細胞に由来する多数のコロニーが観察された。すなわち本移植モデルでは、移植 22 日から 43 日の間で微小転移が始まると考えられる。

pHLIP は投与後 24 時間において、がん細胞の移植の有無に関係なく、肺、肝臓、脾臓、腎臓、および大腿骨/脛骨に分布した。組織常在マクロファージに取り込まれた pHLIP の肝臓や脾臓への集積や腎排泄に伴う腎臓への集積は良く知られている。また本結果で解析した臓器は、灌流操作などを行わずに摘出したものである。これは生体環境に従った pHLIP の分布が PBS などの灌流操作により変化する可能性を踏まえた措置であるが、それによって各臓器の血管系内に存在する pHLIP も含めて検出されている。よって、臓器間における pHLIP 分布量の差異は当該臓器の pH 環境に加えて、血流量に起因することが考えられる。がん病態の有無による pHLIP の肺分布量の変化は LDHA 阻害剤による影響を受けたことから、血流量の変動に基づくものではないと考えられる。肺以外の臓器の pHLIP の分布量についても LDHA 阻害剤の影響度を評価することで、組織酸性化の発生における臓器特異性について明らかにできると推察される。

4T1.2-Luc2 移植による前転移病態モデルにおいて、pHLIP の肺への分布量が対照モデルに比して高かったことに基づき、以後の研究では肺を解析対象とした。肺組織環境の酸性化の可能性を考慮して、乳酸量や解糖系関連タンパク質の発現などを解析した。また本現象の一般性を探るため、66cl4-Luc2 細胞を加えた 2 細胞株で検討した。その結果、4T1.2-Luc2 細胞の移植により、マウス肺組織における乳酸量ならびに解糖系関連タンパク質 (LDHA、MCT4、ならびに HK2) の発現が増加した。一方、66cl4-Luc2 細胞の移植では、肺への pHLIP 分布は対照マウスよりもむしろ低下した。pHLIP 分布量を解析した移植 21 日後における、原発腫瘍重量は 4T1.2-Luc2 移植モデルよりも 66cl4-Luc2 移植モデルで高値であった。このことから、66cl4-Luc2 移植モデルでは、4T1.2-Luc2 移植モデルに比べて有意に増大した原発腫瘍に pHLIP が捕捉されたことにより、肺への分布が低下した可能性は否定できない。一方で、66cl4-CM の投与では、マウス肺における pHLIP 分布量に有意な変化はもたらさなかった。本投与モデルでは、原発腫瘍による pHLIP の捕捉は生じない。また、66cl4-Luc2 移植による肺組織における乳酸量および解糖系関連タンパク質の発現の変動は、4T1.2-luc2 移植による各種変動に比して顕著ではなかった。よって少なくとも、4T1.2-Luc2 移植モデルの結果から想定される乳酸産生系に起因した肺組織酸性化は、66cl4-Luc2 細胞の移植から 21 日経過した肺に

は生じていないと示唆される。

4T1.2-Luc2 移植によりマウス肺で生じた各現象が移植細胞の分泌因子により引き起こされることを、4T1.2-CM 投与モデルを用いて示した。4T1.2-CM の 21 日間連続投与は、肺における pHILIP 分布量、乳酸量、ならびに解糖系関連タンパク質 (LDHA、MCT4、MCT1、ならびに HK2) の発現を増加させた。本結果は 4T1.2 移植モデルで得られた結果の大半を再現している一方で、MCT1 の発現変動については異なった傾向の結果であった。すなわち、4T1.2 移植では変動しなかった MCT1 発現が 4T1.2-CM 投与条件下では上昇していた。分泌因子の組成は分泌元細胞の生育条件に大きく影響される。4T1.2-CM は、プラスチックシャーレへの接着により培養した 4T1.2 細胞から調製したものである。一方で、低吸着プレートを用いて浮遊条件とすることで、自己組織化された細胞集塊 (オルガノイド) を形成する三次元培養を用いた研究も行われている。Yue らの研究では、ヒト大腸がん細胞 HT-29 を通常の接着条件または三次元で培養した場合、分泌タンパク質の組成が培養条件によって大きく異なっていた (34)。オルガノイドは *in vivo* にて形成した腫瘍の特性を部分的に再現すると言われている。よって、三次元培養した 4T1.2 細胞から作製した上清を用いることで、4T1.2 移植モデルで得た結果をより再現しやすくなる可能性が示唆される。また、66cl4-CM の投与では 66cl4-Luc2 移植時と同様に、マウス肺における乳酸量に有意な変化は生じなかった。一方、解糖系関連タンパク質の発現変動については、66cl4-CM 投与条件と 66cl4-Luc2 移植条件とで完全に一致した結果にはならなかった。これについては上述した対象細胞の生育環境に起因した分泌因子の組成差による可能性が一因として考えられる。66cl4-CM 投与が解糖系関連タンパク質の発現に与える影響は注目するタンパク質ごとで傾向が異なっていた。よって、本結果のみで当該肺組織における解糖系亢進の可否を判断することはできない。しかし、解析した 4 種の解糖系関連タンパク質すべての発現を上昇させた 4T1.2-CM とは明らかに異なる傾向であり、乳酸量および pHILIP 分布量が変化しなかった結果に沿うものと考えられる。

pHLIP の肺への分布量の増加に乳酸産生酵素である LDHA が関与することを、同酵素阻害剤 (oxamate) を用いて示した。4T1.2-CM の投与により増加する pHILIP の肺への分布量は、oxamate を 4T1.2-CM に添加して投与することで、有意に抑制された。また、4T1.2-CM に溶解した AF750-pHLIP の蛍光強度は oxamate 共存の有無で有意な変化がなかった。これより、oxamate 投与による AF750-pHLIP 由来蛍光強度の減少が oxamate の直接的なクエンチングによる可能性は否定される。マウス乳がんの自然発癌モデルにおいて、pHLIP は原発腫瘍における LDHA と共局在することが報告されている (35)。よって本研究において、pHLIP は肺における乳酸産生亢進に伴った酸性化 (肺組織酸性化) を認識していると考えられる。乳酸の非侵襲的イメージングとしては、核磁気共鳴による MR スペクトロスコピーイメージングがあり、pHLIP とは競合的な技術になる (36)。いずれの技術が実装化に近いかは、検出感度などの技術的側面に加えて、測定機器を導入または維持するための経済的および人的コストを踏まえて包括的に検討していく必要があるかもしれない。

注目している現象が前転移ニッチ形成に該当するかは、当該現象の転移性腫瘍形成に対する促進作用の有無で評価される。4T1.2-Luc2 細胞を移植した場合、その分泌因子の作用によって組織酸性化を誘導してしまう可能性が考えられた。66cl4-Luc2 細胞の同所性移植および培養上清の投与により肺組織酸性化を誘導しなかったことから、当該細胞における肺転移形成を評価した。なお転移性腫瘍の形成過程において、66cl4-Luc2 細胞自身の乳酸産生などによる肺組織酸性化が生じる可能性

は否定できない。尾静脈投与した 66cl4-Luc2 細胞による肺転移巣の進展は oxamate の前処置により遅延し、当該マウスの生存期間が延長した。また、control media 投与群と 4T1.2-CM 投与群における生存中央値の比較から、4T1.2 分泌因子により肺転移が促進される可能性が示唆された。これらのことから、oxamate の転移抑制効果は 4T1.2 液性因子が形成した前転移ニッチにおける肺組織酸性化を抑制したことに起因すると考えられる。一方、control media 投与群と oxamate 含有 control media 投与群の比較において、生存期間に有意な差は生じなかった。よって、oxamate のがん細胞に対する殺細胞効果が別で報告されているが (37)、本実験結果から oxamate の 66cl4-Luc2 細胞への直接作用はないと考えられる。一方で、多重比較法による統計学的解析を行っていないため、組織酸性化が 4T1.2 分泌因子による肺転移促進作用のすべてに介在するかは不明である。本研究では度重なる腹腔内投与によって腹膜が肥厚し正確な投与が行いづらくなることを踏まえ、投与回数を可能な限り少なくすることに努めた。その結果として、control media または 4T1.2-CM に oxamate を予め溶解してから投与する方法を取った。第 2 章にて示す 4T1.2-EV における LDHA の発現を踏まえると、4T1.2-CM には LDHA 活性が内在しており、oxamate の混合によりその活性が阻害される可能性が示唆される。LDHA は細胞質に局在していることから、同分子は 4T1.2-EV の膜内に内包されている可能性が高い。よって、oxamate が LDHA と相互作用するためには EV の膜を透過する必要があると考える。培養液由来の LDHA が肺組織酸性化に寄与するかは、当該分子をノックダウンした 4T1.2 細胞の培養液を用いた実験にて今後明らかにする必要がある。一方で、oxamate を培養液に混合せずに別途腹腔内投与を行った場合でも、培養液由来 LDHA と oxamate がそれぞれ肺に到達するまでに相互作用することが想定されるため、その想定に従った場合は混合液を用いた実験と同様の結果を得ると考えられる。また、oxamate のがん細胞に対する直接的な殺細胞効果が示唆されていることから (37)、転移成立後であっても同薬物による転移性腫瘍の増大抑制が期待される。

以上より、肺組織酸性化は転移性腫瘍の形成を促す前転移ニッチの特性を有していることが示唆される。一方で、どのようにして肺組織酸性化が転移性腫瘍の形成を促進したのか、は本研究で明らかにされていない。そこで、腫瘍微小環境における酸性化が免疫監視機構の破綻に寄与することを踏まえた考察を以下に記す。酸性環境に晒された T 細胞は自身の活性化に必要な T 細胞受容体の発現が低下する (37)。また、natural killer (NK) 細胞においても、細胞外 pH の低下および乳酸によって腫瘍組織への浸潤や活性化が減弱する (38,39)。このような抗腫瘍免疫作用を示す細胞集団の機能低下が肺前転移ニッチにおいても酸性化に起因して生じていることが予想される。Oxamate が腫瘍組織においてがん細胞殺傷能力の高い活性型 CD8⁺T 細胞の割合を増やすことも踏まえると (40)、同薬物による肺組織酸性化の阻害が当該組織における免疫系に影響を与えた結果、転移形成が抑制された可能性が十分に考えられる。

本研究で用いた経脈管肺転移モデルは、腫瘍原発巣から離脱したがん細胞が血管内に侵入して以降の転移プロセスを再現したものである。すなわち、全身を循環していたがん細胞が任意の血管壁に接着して末梢組織内に浸潤するステップ 1(血管外遊出) と、浸潤組織内にて増殖し腫瘍を形成するステップ 2(転移性腫瘍の形成) であり、これらは前転移ニッチの形成によって効率化される。肺組織酸性化が上記ステップのいずれに寄与するかを見出すことは、当該現象の転移促進作用の解明に直結すると考える。前段落で考察した免疫系への制御はステップ 2 に該当する。肺は豊富な毛細血管により微細な網目構造になっており、血中のがん細胞が捕捉されやすい。言い換えれば、肺で

は血管外遊出 (ステップ 1) の起点となる血管壁への接着が生じやすいといえる。肺組織酸性化によって、血管壁への接着がさらに効率化されるかについても検討していく余地はあると考える。

5. 小括

本節では、マウス乳がん細胞が形成する前転移ニッチにおける pH 環境を pHLIP の分布量で評価し、以下の知見を得た。

1. 4T1.2-Luc2 細胞の同所性移植または 4T1.2-CM の投与により、マウス肺における pHLIP の分布量、乳酸量、ならびに解糖系関連タンパク質の発現が増加した。
2. 66cl4-Luc2 細胞の同所性移植または 66cl4-CM の投与では、マウス肺における pHLIP 分布量および乳酸量は増加せず、解糖系関連タンパク質の明らかな発現増強も認められなかった。
3. LDHA 阻害剤 (oxamate) は、4T1.2-CM 投与によるマウス肺への pHLIP 分布量増加を阻害した。
4. Oxamate の前処置は、経脈管的に投与した 66cl4-Luc2 細胞による肺転移形成を抑制し、当該マウスの生存期間を延長した。

以上のことから、4T1.2 細胞特有の分泌因子が肺における乳酸産生系を改変し、肺転移性腫瘍の形成を促す「組織酸性化」が生じることを示した。

第2章 4T1.2 分泌因子による肺組織酸性化の発生機序

1. 緒言

肺組織は、肺胞 (実質) とその支持組織 (間質) に分かれる。肺胞はガス交換の場であり、空気に触れる肺胞上皮は2種類の細胞で構成される。扁平状のI型肺胞上皮 (alveolar type 1; AT1) 細胞は肺胞上皮の90%を構成する。隣接細胞とはtight junctionを形成して物質交換を厳密に制御しており、ガス交換に加えて水やイオンの輸送の役割も担う。立方形のII型肺胞上皮 (alveolar type 2; AT2) 細胞は細胞内小器官に富み、肺サーファクタントが貯蔵された特徴的な層状封入体 (lamellar body) を有している。分泌された肺サーファクタントは肺胞表面上における液層 (被覆層) の表面張力を制御し、肺胞の虚脱を防いでいる。AT2細胞は肺胞上皮における組織幹細胞でもあり、組織修復において中心的な役割を担う。また、周辺の免疫細胞と複雑に相互作用して、肺組織局所における免疫応答を調節している。支持組織には、内皮細胞、線維芽細胞、免疫細胞、平滑筋細胞などが含まれる。肺組織におけるこれらの系統細胞は多様なメカニズムで前転移ニッチを形成する (41,42)。

前転移ニッチを形成する分泌因子として、サイトカインや細胞外小胞 (extracellular vesicle, EV) が挙げられる。EVは細胞が分泌するすべての小胞を指し、その生成機構に基づいて exosome、microvesicle、apoptotic vesicleなどに細分化される。現状の研究技術で単離したEVの生成機構を個別に同定することが難しい背景から、粒子サイズでの分類が主流となっている (43)。またタンパク質や miRNAなどを内包しており、EVを取り込んだ細胞のシグナル伝達や転写制御に影響を及ぼす。前転移ニッチ形成においても、EV内包 miRNAが発生メカニズムの責任分子になる報告が多い (44,45)。脂質膜で覆われるEVの表面には、細胞膜と同様に受容体や接着因子などの膜タンパクを発現する (46,47)。Hosinoらは、転移性腫瘍の形成部位がEV中の integrinの発現パターンで規定されることを報告した (48)。これは integrinのサブタイプに応じてEVの各種臓器における親和性が異なり、EVの臓器分布とそれに伴う前転移ニッチの形成場所に変化が生じることによる。4T1細胞から分泌したEVによる肺前転移ニッチ形成について、複数の報告があるが (49,50)、本EVによる肺組織酸性化はこれまで検証されていない。このことから、肺組織酸性化の発症因子としてEVに着目した。

以上の背景より、本章では酸性化が生じた肺組織における各種系統細胞の解糖系関連タンパク質の発現を解析し、肺組織酸性化に関与する細胞集団の同定を試みた。また、4T1.2細胞から分泌されるEVによる肺組織酸性化の誘導について検証し、当該現象における発症因子の絞り込みに取り組んだ。

2. 実験方法

2-1. 細胞培養

マウス乳がん細胞株 (4T1.2, 4T1.2-Luc2, 66cl4) は 5%FBS、抗生物質 (100 units/mL penicillin および 100 µg/mL streptomycin) を含む MEM- α で 37°C、5% CO₂ の環境下で培養した。また、Venor® GeM Classic Mycoplasma Detection Kit によりマイコプラズマ感染陰性を確認した上で実験に使用した。

2-2. 蛍光標識 pHLIP の調製

AF647-pHLIP および AF750-pHLIP は、Yana K. Reshetnyak (University of Rhode Island, RI, USA) により化学合成されたものを使用した。粉末を DMSO に溶解して -20 度にて保存した。当該溶液のモル濃度は、供与先から提供された各化合物のモル吸光係数を用いて算出した (AF647-pHLIP の $\epsilon_{651} = 270000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 、AF750-pHLIP の $\epsilon_{753} = 290000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

2-3. マウス乳がん細胞の正所性移植モデルの作製

マウス乳がん 4T1.2-Luc2 細胞を PBS で 1.0×10^6 cells/mL になるように調製し、BALB/cCrSlc マウス (メス、7 週齢) の第 4 乳腺にハミルトンシリンジを用いて皮下移植した。移植直前に三種混合麻酔を投与し、深麻酔下にて 1.0×10^5 cells/0.1mL の皮下投与を行なった。以上の動物実験は、本学の動物実験委員会において承認されている (承認番号: CTPH-20-006)。

2-4. がん細胞由来液性因子による前転移ニッチマウスモデルの作製

4T1.2 細胞 (3.0×10^4 cells/mL) を 5%FBS 含有 MEM- α で 48 時間培養した。血清由来液性因子の影響を取り除くために、PBS で洗浄後、MEM- α でさらに 24 時間培養した。細胞播種 72 時間後に回収した培養上清は、2000 \times g、20 分間、4°C と 10000 \times g、30 分間、4°C の遠心分離を既報に従って行い、死細胞とデブリを除去した (51)。0.22 µm 低吸着滅菌フィルターに通し、一日使用量に分注後、-20°C で保存した。BALB/cCrSlc (メス、7 週齢) に 0.3 mL の調製したがん細胞培養上清または MEM- α を 1 日 1 回、21 日間連続で腹腔内投与した。投与開始後 22 日目に肺を摘出し、*ex vivo* または *in vitro* での解析に使用した。以上の動物実験は、本学の動物実験委員会において承認されている (承認番号: CTPH-20-006)。

2-5. 蛍光標識 pHLIP の生体内分布評価

PBS に溶解した 0.1 mL の AF750-pHLIP (20 µM) を解析 24 時間前に腹腔内投与した。摘出した臓器や組織は PBS で洗浄した後、すぐに Lumina XRMS Series III で蛍光画像を取得した (励起波長: 740 nm、蛍光波長: 790 nm)。取得画像の解析には、Living image software v4.7.4 を用いた。

2-6. 肺組織分散と各種系統細胞の単離

マウス肺を PBS で灌流後、PBS で 2.0 U/mL に溶解した dispase 2 mL を経気道投与した。Dispase の漏出を防ぐため、PBS で 2% に溶解した low melting point agarose 0.5 mL を経気道投与した。肺全体を氷で覆い、2 分間静置した。その後摘出した肺は 1 U/mL の dispase を含む Hank's Balanced Salt Solution (富士フィルム和光純薬) に浸漬させ、室温で 45 分間静置した。Dispase による酵素処理が終了した肺は、25 mM HEPES、10% FBS、100 U/mL DNase I を加えた DMEM 中に移し、剪刀で 1 mm 以下になるように細分化した。5 分間室温で静置し、メッシュサイズ 70 μ m および 40 μ m のナイロンフィルターで組織片を除いた。回収した濾液を 340 \times g、7 分間の遠心し、ペレットに 3 mL の BD Pharm Lyse™ Lysing Buffer を加え、2 分間室温で静置した (溶血による赤血球の除去)。30 mL の 2% FBS 含有 PBS で lysis buffer を希釈し、350 \times g、5 分間の遠心を行った。得られたペレットを再度 2% FBS 含有 PBS で懸濁した。上記プロトコルは過去に報告された複数の AT2 細胞の効率的な単離方法 (52,53) を基に改変したものである。

血球系細胞の単離には、collagenase type IV および DNase I を用いた標準的方法 (54) を適用した。PBS で灌流した肺を摘出し、collagenase type IV (Sigma-Aldrich)、25 μ g/mL DNase I、10% FBS を加えた Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (富士フィルム和光純薬) 中に移した。剪刀で 1 mm 以下の組織片になるように細分化し、酵素消化 (30 分間、37°C) した。メッシュサイズ 70 μ m のナイロンフィルターで組織片を除いた。回収した濾液を 340 \times g、7 分間の遠心し、ペレットに 3 mL の BD Pharm Lyse™ Lysing Buffer を加えて溶血した (1 分間、室温)。30 mL の 2% FBS 含有 PBS で lysis buffer を希釈し、350 \times g、5 分間の遠心を行った。得られたペレットを再度 2% FBS 含有 PBS で懸濁した。

調製した組織懸濁液に Rat anti-CD16/CD32 抗体 (eBioscience, San Diego, CA, USA; 希釈倍率: 1:1000) を 10 分間、室温で反応させた後、蛍光標識抗体 (表 2) を加えてさらに 10 分、4°C で反応させた。その後、PBS 1 mL を加えて 350 \times g、5 分間の遠心を行った。Biotin 化抗体を反応させたサンプルについては、さらに AF647 標識 streptavidin (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA; 希釈倍率: 1:1000) を加えて 10 分間、4°C で反応させた。その後、PBS 1 mL を加えて 350 \times g、5 分間の遠心を行った。抗体処置が完了したサンプルは解析直前に propidium iodide (PI) を含む PBS に懸濁し、BD FACSJazz™ (BD) にて CD326⁺ 上皮細胞、CD31⁻CD45⁻CD326⁻ 細胞、ならびに CD45⁺ Lineage⁺ 成熟血球系細胞をそれぞれ分取した。

表 2. BD FACSJazz™での細胞分取に用いた抗体

品名	クローン	販売元 (品番)
Rat anti-mouse CD326, Biotin	G8.8	Biolegend (118203)
Rat anti-mouse CD45, fluorescein (FITC)	30-F11	BD Biosciences (553080)
Rat anti-mouse CD31, phycoerythrin (PE)-Cy7	390	eBioscience (25-0311-81)
Lineage Cell Detection Cocktail, Biotin*	N/A	Miltenyi Biotec (130-092-613)
Rat anti-mouse CD64, Biotin	X54-5/7.1	Biolegend (139318)
Rat IgG2a, κ Isotype Control, PE-Cy7	N/A	Biolegend (400521)
Rat IgG2a κ Isotype Control, Biotin	ES26-15B7.3	Miltenyi Biotec (130-101-969)

*: CD5、CD11b、CD45R、Gr-1、Ly-6B.2、Ter-119 に対する各抗体 (biotin 標識物) の混合液

2-7. 免疫細胞染色

4T1.2-Luc2 細胞および肺組織から単離した CD326⁺上皮細胞を、CYTOSPUN 4 (fisher scientific, Waltham, MA, USA) を用いた 500 rpm、5 分間の遠心によりスライドガラスに塗抹した。室温で 5 分間乾燥させた後、PBS で洗浄し、4% PFA を処置して室温、5 分間の固定処理を行った。固定細胞は PBS-Triton X 中で一次抗体 (表 3) を終夜 4°C で反応させた。PBS-Triton X で 100 rpm で 15 分間の洗浄を 2 回行った後、二次抗体 (表 3) と Hoechst33342 (希釈倍率: 1:5000) を室温、2 時間反応させた。免疫染色された細胞は、スライドガラス上で VECTASHIELD Mounting Medium により封入した。蛍光画像は LSM800 共焦点レーザー顕微鏡を用いて取得した。画像解析には ZEN3.0 を用いた。

表 3. 免疫細胞染色に用いた抗体

品名	希釈倍率	販売元 (品番)
Rabbit anti-surfactant protein C (SP-C)	1:1000	Merck Millipore (ABC99)
Rabbit anti-LDHA	1:1000	Cell Signaling Technology (2012)
Goat anti-luciferase	1:50	Promega (G7451)
Donkey anti-rabbit IgG (H+L), AF647	1:500	Invitrogen (A-31573)
Donkey anti-goat IgG (H+L), AF488	1:500	Invitrogen (A-11055)
Goat anti-rabbit IgG (H+L), AF488	1:500	Invitrogen (A-11008)

2-8. 免疫組織化学的解析

PBS に 20 μ M で溶解した AF647-pHLIP 0.1 mL を解剖の 24 時間前に腹腔内投与した。PBS 10 mL で灌流後、肺を摘出し 24 時間、4°C で 4% PFA 中に静置し固定した。その後、15%、20%、および 30% にそれぞれ調製した sucrose 溶液に 24 時間ずつ低濃度のものから順に交換した (脱水)。肺を Optimal Cutting Temperature Compound に包埋し、-20°C で凍結した。凍結肺からクライオスタットにより 10 μ m の肺切片を作製した。肺切片は PBS-Triton X で一次抗体 (表 4) と 100 rpm で振動させながら、終夜 4°C で反応させた。PBS-Triton X で 100 rpm で 15 分間の洗浄を 2 回行った後、二次抗体 (表 4) と Hoechst33342 (希釈倍率: 1:5000) を室温、2 時間反応させた。免疫染色された肺切片は、スライドガラス上で VECTASHIELD Mounting Medium により封入した。蛍光画像は LSM800 共焦点レーザー顕微鏡を用いて取得した。画像解析には ZEN3.0 を用いた。

表 4. 免疫組織化学的解析に用いた抗体

品名	希釈倍率	販売元 (品番)
Rabbit anti-SP-C	1:1000	Merck Millipore (ABC99)
Mouse anti-Cy5	1:500	Sigma-Aldrich (C1117)
Rat anti-mouse CD45	1:1000	BD Biosciences (554875)
Donkey anti-mouse IgG (H+L), AF647	1:500	Jackson ImmunoResearch (715-605-151)
Goat Anti-rat IgG (H+L), AF488	1:500	Jackson ImmunoResearch (112-545-167)
Goat anti-rabbit IgG (H+L), AF488	1:500	Invitrogen (A-11008)

2-9. EV の単離および物性解析

FBS 由来 EV の混入を避けるため、4T1.2-CM および 66cl4-CM に含まれる EV を超遠心法で単離した。培養ディッシュから回収した上清は 2000 \times g、20 分間、4°C と 10000 \times g、30 分間、4°C の遠心分離により、死細胞とデブリを除去した。その後、100000 \times g、120 分間、4°C による超遠心を行い、EV をペレットとして得た。PBS による洗浄と 100000 \times g、120 分間、4°C の超遠心を繰り返すことにより、培地成分を除去した。培養上清の回収時に、培養系内に接着した生細胞数を計測し、EV の由来細胞数を概算した。得られた EV に含まれるタンパク質量は Micro BCA Protein assay Kit (Thermo Fisher Scientific) で定量した。

4T1.2-EV の形状は atomic force microscopy (AFM) で解析した。PBS に懸濁した 10 μ L の 4T1.2-EV を天然雲母板 (ニラコ、東京) の劈開面上にのせ、3 分間、室温の条件で吸着させた。吸着していない EV や塩を超純水で漱いだものを Nanoscope IIIa (Veeco; Plainview, NY, USA) で測定した。カンチレバーには OMCL-AC160TS-R3 (オリンパス、東京) を使用した。粒度分布は Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Malvern, WR, USA) を用いた dynamic laser scattering (DLS) で解析した。PBS に懸濁した 4T1.2-EV 約 0.1 mL をプラスチックセルに入れ、系内が 4°C に達してから平衡時間 120 秒後に測定を始めた。

2-10. 4T1.2-EV の投与

BALB/cCrSlc (メス、7 週齢) に 0.1 mL の PBS 懸濁液に調製した 4T1.2-EV (10 μg protein) を腹腔内投与した。対照群のマウスには PBS を vehicle として投与した。いずれの処置も 1 日 1 回、21 日間連続で行った。投与開始後 22 日目に肺を摘出し、*ex vivo* または *in vitro* での解析に使用した。以上の動物実験は、本学の動物実験委員会において承認されている (承認番号: CTPH-20-006)。

2-11. Lactate assay

内因性乳酸デヒドロゲナーゼによる乳酸の分解を抑えるため、摘出した肺は速やかに液体窒素で急速凍結した。解析当日に融解した肺組織を剪刀で 20-30 mg に細分化し、PBS で 0.1% に溶解した Triton[®] X-100 に移した。サンプルを氷冷しながら、Bioruptor II (TYPE12) を用いて組織成分を溶出した (出力: high; 1 回あたりの出力時間: 30 秒; インターバル: 30 秒; 出力回数: 30 回)。溶出液を 8000 $\times\text{g}$ 、5 分間の遠心分離に供し、その上澄み液を Amicon Ultra-0.5 ml 10K 限外ろ過フィルターに通した。12000 $\times\text{g}$ 、10 分間で遠心分離することで、乳酸と乳酸分解酵素を分離した。ろ液中の乳酸濃度は Lactate assay Kit-WST を用いて測定した。

2-12. Western blot

肺組織タンパク質は“9. Lactate assay”に記載の方法で調製した。単離した細胞や EV は RIPA buffer (富士フィルム和光純薬) でタンパク質を可溶化した。タンパク濃度を Pierce[™] BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific) で測定した後、2-mercaptoethanol 含有試料用緩衝液および超純水と混合してタンパク濃度 1 mg/mL に調製し、5 分間煮沸したものを電気泳動した。SDS-PAGE にてタンパク質 10 μg を分離し、PVDF 膜 (Merck) に転写 (100V、90 分) した。PVDF 膜への非特異的結合を防止するため、ブロッキング剤には 5%NFDM を使用し、室温にて 1 時間反応させた。一次抗体 (表 5) は 4°C で 1 時間または終夜反応させ、二次抗体は HRP 標識された抗 rabbit または抗 mouse IgG 抗体を用いて 30 分、室温にて反応させた (表 5)。これらのブロッキング剤および各種抗体は、TBS-Tween を用いて溶解または希釈した。Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent を用いて化学発光を起こし、ImageQuant LAS で検出した。

表 5. Western blot に用いた抗体

品名	希釈倍率	販売元 (品番)
Rabbit anti-LDHA	1:1000	Cell Signaling Technology (2012)
Mouse anti-MCT4	1:500	Santa Cruz (sc-376140)
Rabbit anti-MCT1	1:400	Novus Biologicals (NBP1-59656)
Mouse anti-HK2	1:1000	Santa Cruz (sc-130358)
Mouse anti-tumor susceptibility 101 (TSG101)	1:1000	Abcam (ab83)
Goat anti-programmed cell death 6 interacting protein (Alix)	1:1000	Santa Cruz (sc-49268)
Rabbit anti-Calnexin	1:1000	Abcam (ab22595)
Mouse anti- β -actin	1:10000	Sigma-Aldrich (A5441)
Goat anti-rabbit IgG, HRP	1:1000	Cell Signaling Technology (7074)
Horse anti-mouse IgG, HRP	1:1000	Cell Signaling Technology (7076)

2-13. 統計解析

取得したデータは Prizm 5 で統計処理した。グラフは、生存期間解析を除いて平均値 \pm 標準偏差で示した。2 群間の平均値比較では、対応のない t 検定を用いて解析した。生存曲線は Kaplan-Meier method で示し、log-rank 検定で統計処理を行なった。P 値が 0.05 以下のものを統計学的に有意差があると判定した。

3. 実験結果

3-1 肺組織構成細胞における解糖系関連タンパク質発現の解析

肺前転移ニッチにおける酸性化には乳酸産生系が関与する。よって、解糖系関連タンパク質の発現を指標にして各系統細胞を解析することで、肺組織酸性化における責任細胞が同定されることが考えられた。4T1.2-Luc2 細胞の移植により肺組織酸性化を引き起こしたマウス肺および vehicle を皮下投与したマウスの肺より、酵素処理にて細胞分散液を調製した。目的の系統細胞の単離に最適な酵素を各々選択した (CD326⁺上皮細胞および CD31⁺CD45⁺CD326⁻細胞の単離: dispase および DNase I; CD45⁺Lineage⁺成熟血球系細胞の単離: collagenase IV および DNase I)。分散した細胞を抗体染色し、FACS JAZZ にて上記 3 種の細胞を単離した (図 13)。いずれの細胞集団を単離する際においても、はじめに前方散乱光 (forward scatter; FSC) と側方散乱光 (side scatter; SSC) の展開により、サンプル中の大半の細胞を解析対象として検出し、そこに含まれる凝集した細胞集合体および死細胞を散乱光により検出されるパルス幅と PI に対する蛍光強度でそれぞれ除外した。これにより抽出された単細胞集団の中から CD326 の発現量を表す蛍光強度に従って、CD326⁺上皮細胞を分取した (図 13A)。また、CD326 を発現しない細胞集団を抽出し、CD31 と CD45 の発現量をそれぞれ表す蛍光強度で展開することにより、CD31⁺CD45⁺CD326⁻細胞を検出した (図 13B)。別の展開プロセスとして、凝集した細胞集合体および死細胞が除去された集団を CD45 と Lineage の発現量をそれぞれ表す蛍光強度で展開し、CD45⁺Lineage⁺成熟血球系細胞を検出した (図 13C)。

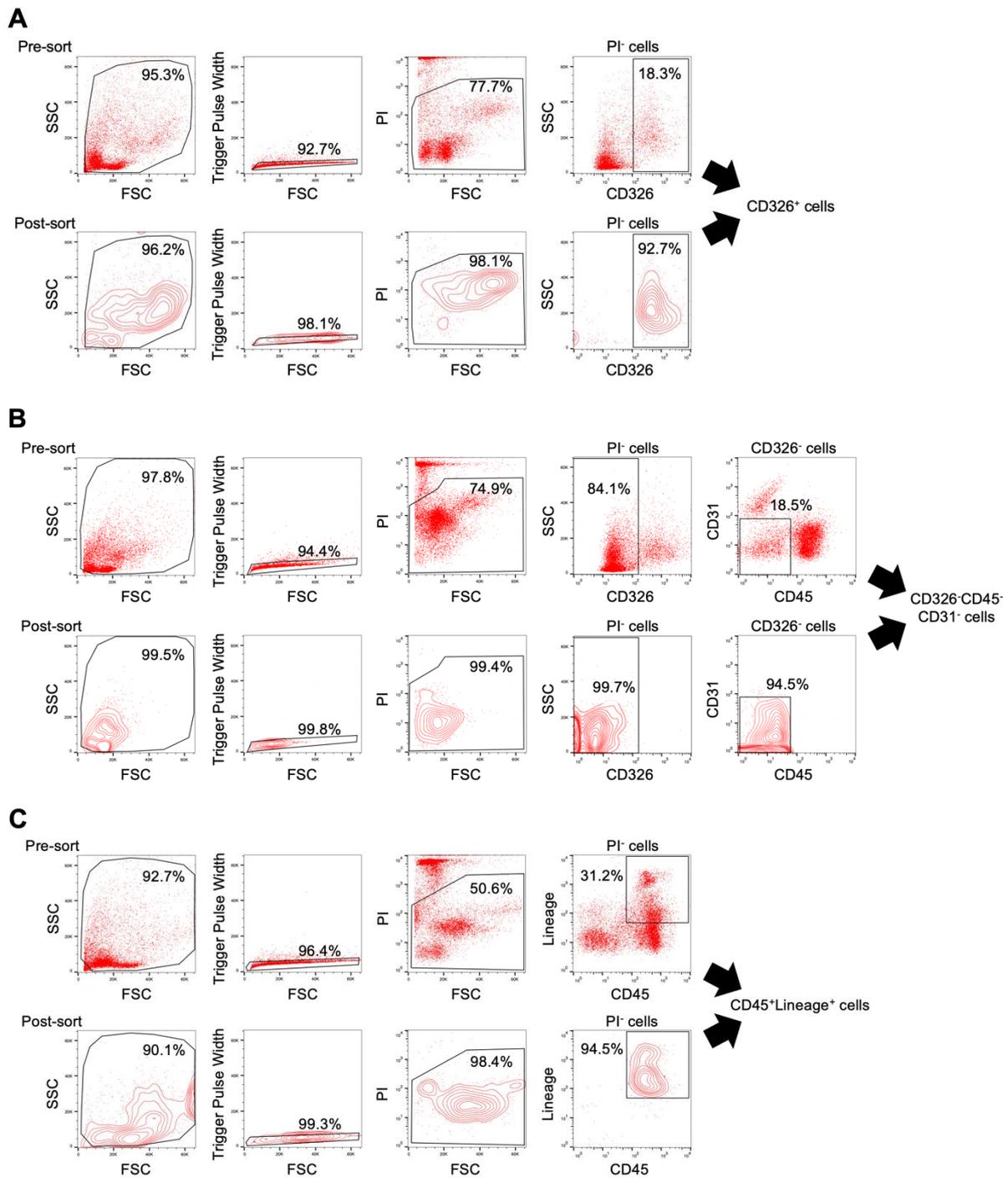


図 13. CD326⁺上皮細胞、CD326⁻CD45⁻CD31⁻細胞、ならびに CD45⁺Lineage⁺細胞の単離

4T1.2-Luc2 細胞または PBS (vehicle) を BALB/c マウスに皮下投与し、投与 21 日後に摘出した肺より CD326⁺上皮細胞 (A)、CD326⁻CD45⁻CD31⁻細胞 (B)、ならびに CD45⁺Lineage⁺成熟血球系細胞 (C) を単離した。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

Dispase および DNaseI を処理した肺組織より単離した CD45⁻CD31⁻CD326⁺細胞の 90%は prosurfactant protein C を発現する AT2 細胞である (52)。そこで、CD326⁺上皮細胞をより詳細に定義するために、スライドガラスに塗布した当該細胞における AT2 細胞マーカー SP-C の発現を免疫細胞染色で解析した。また、4T1 細胞における CD326 の発現が報告されていることから (55)、4T1.2-Luc2 細胞を移植マウス肺から CD326⁺上皮細胞を単離する際に、転移した 4T1.2-Luc2 細胞が混入する可能性が考えられた。そこで、単離した CD326⁺上皮細胞における luciferase 発現細胞の有無を免疫細胞染色にて評価し、上記の可能性を検証した。解析の結果、CD326⁺上皮細胞の大半において SP-C の発現が認められた一方、luciferase を発現する細胞は検出されなかった (図 14)。

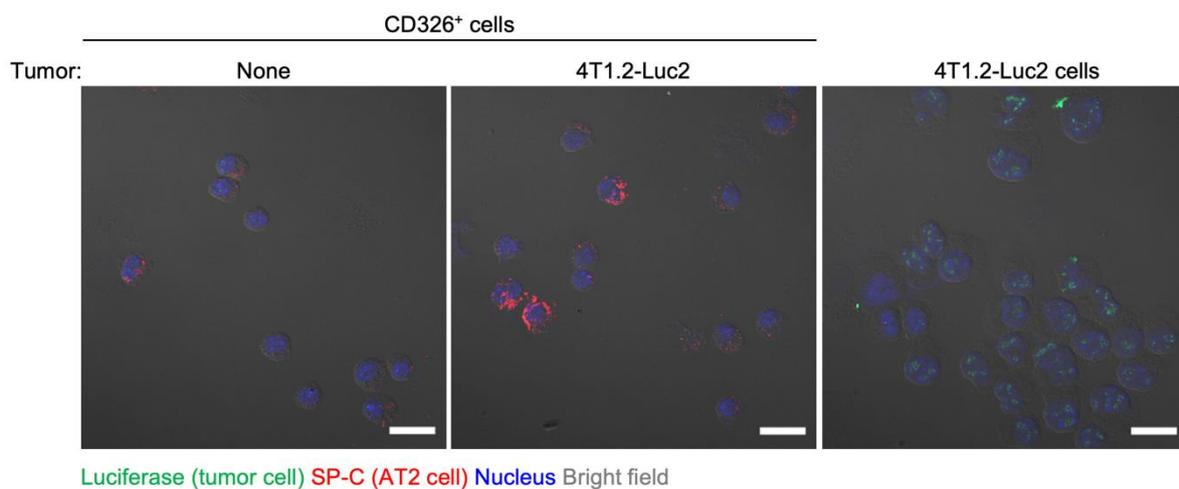


図 14. 4T1.2 同所性移植マウス肺より単離した CD326⁺細胞における SP-C と luciferase の発現

4T1.2-Luc2 細胞または PBS (none) を BALB/c マウスに皮下投与し、投与 21 日後に摘出した肺より CD326⁺上皮細胞を単離した。当該単離細胞または 4T1.2-Luc2 細胞をスライドガラスに塗布し、PFA 固定を行なった。各種抗体による免疫染色の後、塗布した細胞における SP-C および luciferase の発現を LSM で解析した (scale bars: 20 μm)。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

単離した上記 3 種の系統細胞における解糖系関連タンパク質の発現を western blot で解析した (図 15)。その結果、4T1.2-Luc2 移植マウス肺から単離した CD326⁺上皮細胞では、LDHA、MCT4、MCT1、ならびに HK2 の発現が対照マウス肺由来のものよりも高かった。CD326⁻CD31⁻CD45⁻細胞においては、LDHA、MCT1、ならびに HK2 の発現が 4T1.2-Luc2 移植マウス肺由来の方で低下していた。MCT4 の発現はいずれのマウス肺から単離した CD326⁻CD31⁻CD45⁻細胞においても認められなかった。4T1.2-Luc2 移植マウス肺由来の CD45⁺Lineage⁺成熟血球系細胞においては、LDHA および MCT4 の発現が対照マウス肺由来のものとは比べて増加していた。一方で、当該細胞における MCT1 および HK2 の発現については、両サンプル由来間で変化なかった。

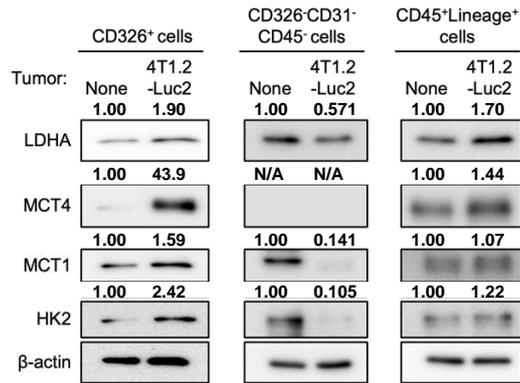


図 15. 4T1.2 同所性移植マウス肺より単離した 3 種の系統細胞における解糖系関連タンパク質の発現
 4T1.2-Luc2 細胞または PBS (none) を BALB/c マウスに皮下投与し、投与 21 日後に摘出した肺より
 CD326⁺上皮細胞、CD326⁻CD31⁻CD45⁻細胞、ならびに CD45⁺Lineage⁺成熟血球系細胞を単離した。当
 該単離細胞における解糖系関連タンパク質の発現を western blot で解析した。対象タンパク質の発現
 量をβ-actin のそれで除して、相対化した値を表示した。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変
 して転載。

3-2 4T1.2-Luc2 細胞移植により酸性化した肺組織における pHHLIP の局在

図 15 の結果より、組織酸性化に関与する候補細胞として、AT2 細胞および成熟血球系細胞が示唆された。pHLIP は組織酸性化に関与する細胞を標的として肺に分布すると考えられる。そこで、上述の 2 系統細胞における pHHLIP の局在について、免疫組織学的解析で評価した。その結果、AT2 細胞マーカーである SP-C を発現する細胞の大半において、AF647-pHLIP が各細胞の表面に局在していた (図 16A)。また、血球系細胞マーカー (CD45) と AF647-pHLIP の共免疫染色においては、一部の CD45⁺細胞における pHHLIP の共局在が認められた (図 16B)。

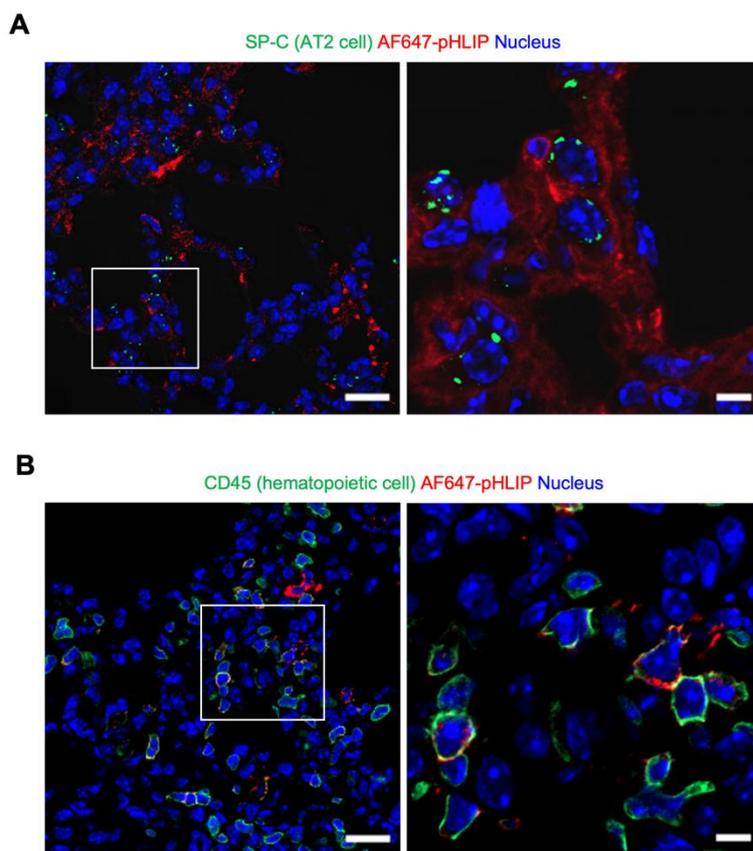


図 16. 4T1.2 同所性移植マウスの肺組織切片における pHHLIP の局在

4T1.2-Luc2 細胞を BALB/c マウスの乳腺に移植し、移植 20 日後に AF647-pHLIP を投与した。pHLIP 投与の 24 時間後に摘出した肺を PFA で固定し、作製した組織切片に各種抗体を反応させた。SP-C/AF647 (A) および CD45/AF647 (B) に対する蛍光染色画像は LSM で取得した。低倍率画像 (左; scale bars: 20 μ m) 内の白枠部分を高倍率画像 (右; scale bars: 5 μ m) として再取得した。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

3-3 CD326⁺上皮細胞における LDHA の発現

図 16 の結果から、酸性化した肺において AF647-pHLIP は主に AT2 細胞へ局在することが示唆された。そこで、図 15 で示唆された酸性化肺由来 CD326⁺上皮細胞における LDHA の発現亢進について、細胞免疫染色により再度評価した。その結果、4T1.2-Luc2 細胞を移植マウスの肺から単離した CD326⁺上皮細胞では、LDHA の発現が非移植マウス肺由来と比べて高発現していた (図 17)。

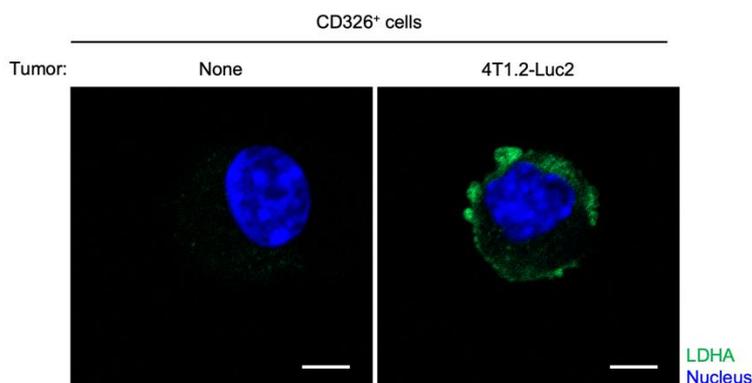


図 17. 4T1.2 同所性移植マウス肺より単離した CD326⁺上皮細胞における LDHA の発現

4T1.2-Luc2 細胞または PBS (none) を BALB/c マウスに皮下投与し、投与 21 日後に摘出した肺より CD326⁺上皮細胞を単離した。当該単離細胞または 4T1.2-Luc2 細胞をスライドガラスに塗抹し、PFA 固定を行なった。anti-LDHA 抗体および Goat anti-rabbit IgG (H+L; AF488 標識)による免疫染色の後、塗抹した細胞における LDHA の発現を LSM で解析した (scale bars: 5 μm)。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

3-4 4T1.2 培養上清の投与により酸性化した肺組織における pHHLIP の局在

4T1.2-Luc2 移植モデルにおいて、pHLIP は LDHA 発現が亢進した AT2 細胞に局在することが示唆された。このような pHHLIP の肺組織内局在が 4T1.2 培養上清 (4T1.2-CM) の投与により酸性化した肺において認められるか、検討した。免疫組織化学的解析の結果、AF647-pHLIP 由来蛍光は 4T1.2-CM 投与マウスの肺切片で強く検出され、MEM- α (control media) 投与マウス肺の組織切片ではほとんど検出されなかった (図 18)。また、4T1.2-CM 投与マウス肺の組織切片において、AF647-pHLIP は SP-C⁺細胞の周囲に局在していた。

以上、図 13-18 の結果より、4T1.2-Luc2 細胞の同所性移植による組織酸性化を誘導したマウス肺において、CD326⁺ AT2 細胞および CD45⁺Lineage⁺成熟血球系細胞の解糖系関連タンパク質の発現が対照マウス肺由来のそれに比べて各々増加することが示された。また、組織酸性化を誘導したマウス肺において、SP-C⁺ AT2 細胞および CD45⁺血球系細胞の一部に pHHLIP の局在が認められた。

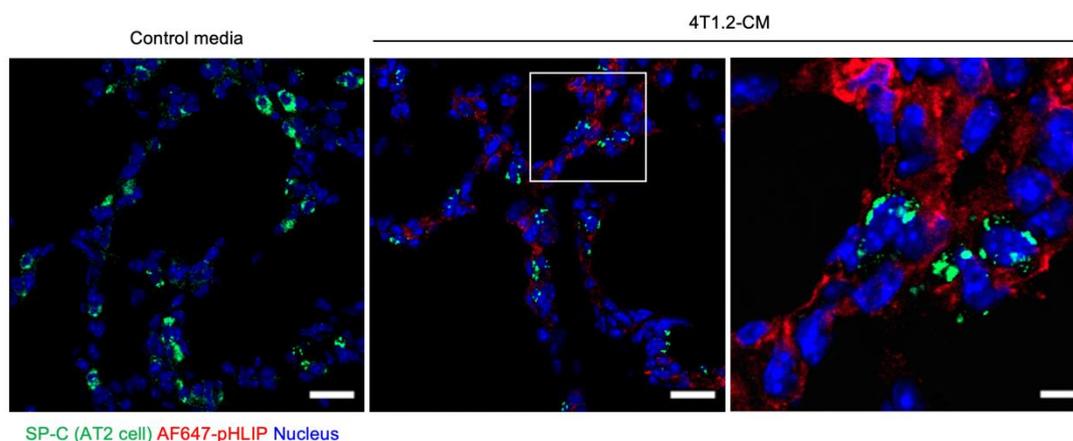


図 18. 4T1.2 培養上清投与マウスの肺組織切片における pHHLIP の局在

MEM- α (control media) または 4T1.2 培養上清 (4T1.2-CM) を BALB/c マウスの腹腔内に 1 日 1 回、21 日間連続で投与した。連続投与の最終日に AF750-pHLIP を投与し、24 時間後に摘出した肺を PFA で固定した。作製した組織切片に各種抗体を反応させ、SP-C/AF647 に対する蛍光染色画像を LSM で取得した。低倍率画像 (左および中央; scale bars: 20 μ m) 内の白枠部分を高倍率画像 (右; scale bars: 5 μ m) として再取得した。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

3-5 4T1.2-EV の単離と同定

がん細胞から分泌する EV の前転移ニッチ形成への関与が様々ながん種で報告されている。そこで、4T1.2 培養上清から超遠心法によりペレットを回収し、EV の精製を試みた。得られたサンプルに含まれる物質の形態を AFM で解析した結果、直径が約 100 nm の粒子が観察された (図 19A)。また形態は粒子個々により不均一であり、一部では凝集も確認された。粒度分布 DLS で解析したところ、AFM 解析の結果同様の直径 100 nm 周辺の粒子集団が認められた (図 19B)。EV の生化学的解析による同定として、western blot による EV マーカー (TSG1、Alix) の発現を解析した。その結果、4T1.2-EV において両 EV マーカーの発現が認められ、その発現は 4T1.2 細胞よりも高かった (図 19C)。一方、細胞内小器官の混入の確認として、小胞体マーカー (calnexin) の発現を解析したが、その発現は 4T1.2-EVs で確認されなかった。以上より、EV の各性状に当てはまる 4T1.2-EV を単離した。

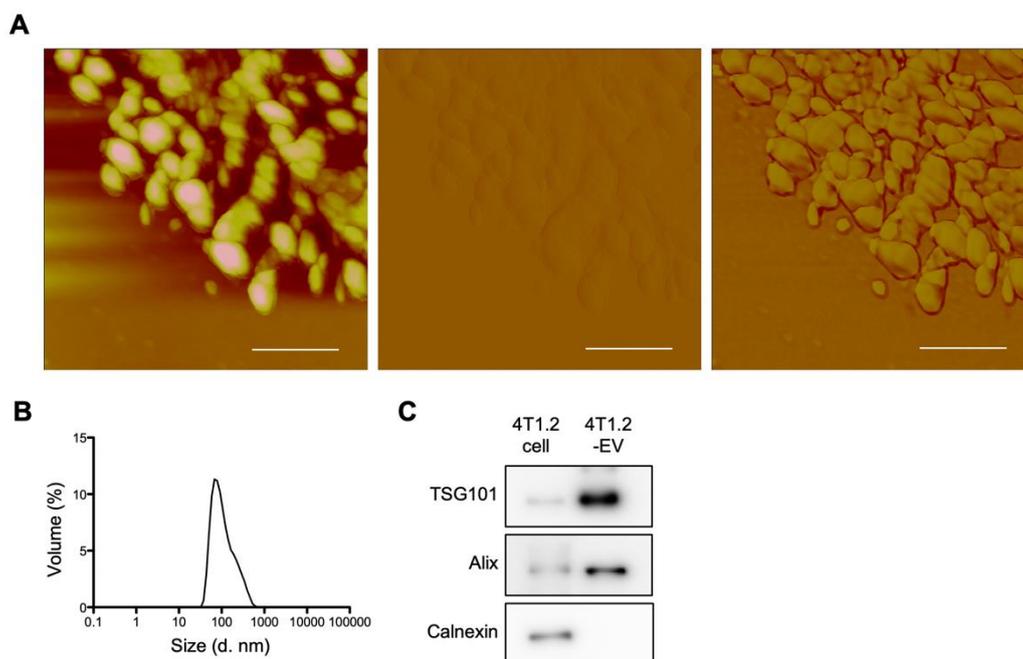


図 19. 超遠心法による 4T1.2-EV の精製と同定

4T1.2-CM を段階的に遠心し、最終の超遠心処理 (100000 xg、4°C、120 分) で得たペレットを 4T1.2-EV とした。(A) 4T1.2-EV を天然雲母板の劈開面上に塗布し、大気中での AFM 解析にて探針とサンプル表面における原子間力を画像化した (左から高さ像、電位差像、位相差像; scale bars: 200 nm)。(B) 4T1.2-EV の粒度分布を DLS により解析した。分析温度: 25°C (C) 4T1.2-EV および 4T1.2 細胞における EV マーカーと小胞体マーカーの発現を western blot で解析した。*Front Oncol.* 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

3-6 4T1.2-EV 投与による肺組織酸性化の誘導

上述の方法で単離した 4T1.2-EV または vehicle (PBS) を BALB/c マウスに 21 日間連続で投与した。投与終了後、AF750-pHLIP の肺への分布量を解析した。その結果、vehicle 群に比して、4T1.2-EV 投与群では有意に pHLIP 由来蛍光強度 ($\times 10^8$ TRE) が高かった (図 20A; vehicle: 8.95 ± 1.06 、4T1.2-EV: 10.63 ± 0.705)。4T1.2-EV 投与群の肺組織重量当たりの乳酸量 ($\mu\text{mol/g}$) は vehicle 群のそれよりも高い傾向があった (図 20B; vehicle: 2.47 ± 0.262 、4T1.2-EV: 3.25 ± 0.344)。また、解糖系関連タンパク質 (LDHA、MCT4、MCT1、HK2) の発現を先の 2 群で比較したところ、いずれのタンパク質においても 4T1.2-EV 投与群の肺で相対的に高く発現していた (図 20C)。以上の結果より、4T1.2-EV 投与によって肺組織酸性化が誘導されることが示唆された。

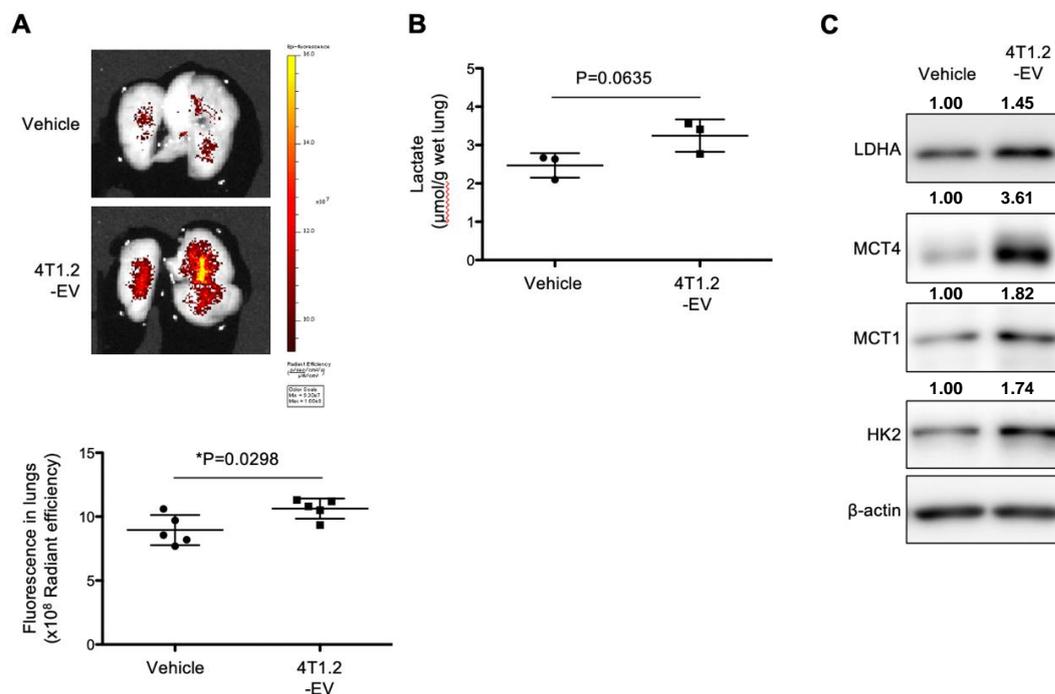


図 20. 4T1.2-EV 投与マウス肺における酸性化と乳酸産生系の解析

PBS (vehicle) または 4T1.2 分泌 EV (4T1.2-EV) を BALB/c マウスの腹腔内に 1 日 1 回、21 日間連続で投与した。(A) 連続投与の最終日に AF750-pHLIP を投与し、24 時間後の肺における AF750-pHLIP 由来蛍光強度を *ex vivo* での撮像にて取得した (vehicle: 5 匹、4T1.2-EV: 5 匹)。(B) 対照マウス (3 匹) および 4T1.2-CM 投与マウス (3 匹) 由来の肺における乳酸量を解析した。(C) 対照マウスおよび 4T1.2-CM 投与マウス由来の肺における LDHA、MCT4、MCT1、HK2、ならびに β -actin の発現量を western blot で解析した。対象タンパク質の発現量を β -actin のそれで除して、相対化した値を表示した。グラフには、各サンプルの解析値および各群の平均値と標準偏差を示した。統計解析は Student's *t* test (両側検定; 対応なし) を用いた (*: $P < 0.05$)。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

3-7 4T1.2 細胞の EV 分泌能

肺組織酸性化における 4T1.2-EV の関与が示唆されたことから、66cl4-CM には当該現象を引き起こすための十分な EV が含まれていない可能性について検討した。4T1.2-CM および 66cl4-CM から超遠心法にてそれぞれ EV を精製し、タンパク質濃度を指標として収量を導いた。その結果、4T1.2 細胞における細胞数 10000 cells 当たりの EV 分泌量 (ng proteins) は、66cl4 細胞のそれに比べて、有意に高かった (図 21; 4T1.2: 40 ± 4.7 、66cl4: 0.76 ± 0.25)。

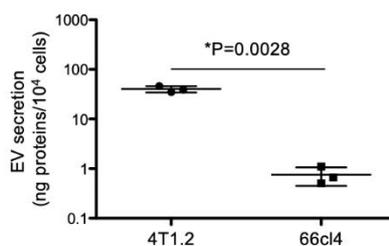


図 21. 4T1.2 細胞および 66cl4 細胞の EV 分泌量

4T1.2-CM および 66cl4-CM を段階的に遠心し、最終の超遠心処理 (100000 ×g、4°C、120 分) で得たペレットのタンパク質量を測定した (4T1.2: 3 検体、66cl4: 3 検体)。測定値は上清回収元の細胞数で標準化した。グラフには、各サンプルの解析値および各群の平均値と標準偏差を示した。統計解析は Student's *t* test (両側検定; 対応なし) を用いた (*: $P < 0.05$)。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

3-8 4T1.2-EV における解糖系関連タンパク質の発現

解糖系関連分子が EV を介して伝達され、レシピエント細胞における解糖系を亢進させることが報告されている (56)。そこで、4T1.2-EV を介した解糖系関連分子の伝達による肺組織酸性化の誘導メカニズムを考えた。当該仮説の検証として、4T1.2-EV における解糖系関連タンパク質の発現を western blot で解析した。4T1.2 細胞のタンパク質ライセートは対照タンパク質を検出する際のポジティブコントロールとして使用した。その結果、4T1.2-EV において LDHA の発現が認められた (図 22)。また MCT4 および MCT1 についても 4T1.2-EV で僅かな発現が確認された。特に MCT1 については、4T1.2 細胞と 4T1.2-EV とで異なる分子サイズのバンドが検出された。HK2 は 4T1.2-EV において発現を示すデータは得られなかった。

以上、図 19-22 の結果をまとめると、マウス肺における pHLIP の分布量および解糖系関連タンパク質の発現が 4T1.2-EV の投与により増加すること示された。また、4T1.2 細胞が 66cl4 細胞よりも EV 分泌量が多く、解糖系関連タンパク質が 4T1.2-EV に発現することを明らかにした。

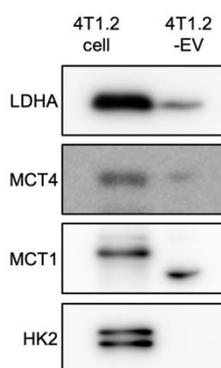


図 22. 4T1.2-EV における解糖系関連タンパク質の発現

4T1.2-EV および 4T1.2 細胞における LDHA、MCT4、MCT1、ならびに HK2 の発現を western blot で解析した。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

4. 考察

Fluorescence-activated cell sorting を用いて、肺組織由来における特定の系統細胞を単離した。本法の適用には、酵素的および機械的に組織破碎を行って、生存率の高い単細胞懸濁液を得ることが必要である。一方、肺組織を構成する系統細胞の多くは ECM を介した近傍細胞との相互作用により恒常性を保っている。そのため、対象細胞における傷害性が低い条件で単細胞化することが重要である。本研究にて単離された CD326⁺細胞の大半は SP-C を発現することから、AT2 細胞であることが示唆された。また、4T1.2-Luc2 移植マウス肺から単離した CD326⁺細胞において、luciferase を発現するものは認められなかった。よって、転移した 4T1.2-Luc2 細胞が単離した AT2 細胞に混入している可能性は否定された。CD326⁺CD45⁻CD31⁻細胞は、上皮系、血球系、ならびに内皮系のいずれにも含まれない細胞集団であり、線維芽細胞や平滑筋細胞などで構成される (57)。また、成熟が完了した血球系細胞で発現する各種抗原に対して反応する抗体の混合物 (Lineage) と anti-CD45 抗体を用い、成熟血球系 (CD45⁺Lineage⁺) 細胞を単離した。Lineage の構成物より、本細胞分画には成熟したリンパ球系 (B 細胞、T 細胞) および骨髄系 (顆粒球、単球、マクロファージ) の細胞が本分画に含まれると考えられる。

4T1.2-Luc2 移植モデルにおける酸性化肺において、単離された CD326⁺細胞および CD45⁺Lineage⁺細胞は解糖系関連タンパク質の発現が亢進していた。特に CD326⁺細胞においては、本研究で解析した 4 種の解糖系関連タンパク質のすべてで発現が増加していた。また 4T1.2-Luc2 移植および 4T1.2-CM の投与により誘導した酸性化肺において、AF647-pHLIP は AT2 細胞のほとんどに局在していた。このことから、肺組織酸性化の誘導において AT2 細胞が主要な役割を担う可能性が示唆される。肺組織傷害後において、AT2 細胞では解糖系由来 ATP 産生が亢進し、AT1 細胞への分化が誘導される (58)。本研究では AT2 細胞における解糖系関連タンパク質の発現を解析したのみであり、解糖系による代謝産物は乳酸を除いて定量していない。解糖系関連タンパク質の発現が亢進した AT2 細胞が細胞外 pH を酸性化させるのか、詳細な代謝動態の評価が求められる。AT2 細胞が分泌する肺サーファクタントは脂質/タンパク質の複合体であり、その組成の約 90%は脂質である (58)。Altea-Manzano らは AT2 細胞が作り出す脂質微小環境が転移形成に影響を与えることを報告した (24)。マウス乳がん (4T1) 細胞は分泌因子を介して AT2 細胞の分泌する脂質成分を改変し、パルミチン酸が豊富な微小環境を形成させる。パルミチン酸は微小転移したがん細胞におけるアセチル CoA 合成に使用され、p65 のアセチル化を介して腫瘍形成を高める。本研究では解糖系に着目した解析のみを行ったため、脂質やアミノ酸を含めた代謝系全体を評価することで、酸性化前転移ニッチにおける AT2 細胞の新たな特性を見出すことができるかもしれない。

CD45⁺Lineage⁺細胞における解糖系関連タンパク質の発現亢進が LDHA と MCT4 のみであり、CD326⁺細胞のそれと比べて顕著ではなかった。CD45⁺Lineage⁺細胞は AT2 細胞として純化された CD326⁺細胞に比べて多様性が高い。各細胞亜集団における固有の発現レベルを平均した結果を表していると推察する。これを踏まえ、本結果のみでは LDHA と MCT4 のみで発現亢進した要因についてはこれ以上十分には考察できない。pHLIP の局在は CD45⁺細胞の一部のみに認められた。このことから、多様な血球集団を含む CD45⁺細胞において解糖系関連タンパク質を高発現する細胞集団の存在が推察される。pHLIP を修飾した薬物は腫瘍微小環境を構成する cancer-associated fibroblast および tumor-associated macrophage に集積することが報告されている (60)。また、肺前転移ニッチに

存在するマクロファージは解糖系を亢進し、programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) を発現する (61)。これらの知見から、pHLIP の局在が認められた一部の CD45⁺細胞は肺組織中のマクロファージである可能性が示唆される。その検証には、酸性化肺におけるマクロファージへの pHLIP の局在や解糖系関連タンパク質の発現解析が妥当と考えられる。

また CD326⁺CD31⁺CD45⁺細胞における LDHA、MCT1、ならびに HK2 の発現が 4T1.2-Luc2 移植マウス肺由来の方で低下していた。これについても CD326⁺CD31⁺CD45⁺細胞が多様性の高い粗な集団であることから、より厳密に純化した系統細胞における解糖系関連タンパク質の発現変動の評価を通して考察を深める必要がある。

本研究で解析対象とした細胞群以外では、内皮細胞が産生する活性酸素種が転移微小環境の複数の宿主細胞に作用して、ミトコンドリアの機能不全を引き起こし、エネルギー産生系が酸化的リン酸化から解糖系へ傾くことが知られている (62)。酸性化前転移ニッチでは、活性酸素種の産生が生じており、抗酸化作用としての解糖系亢進の結果、宿主細胞からの乳酸蓄積による酸性化を引き起こしているかもしれない。

4T1.2-EV を投与することで肺組織酸性化および解糖系関連タンパク質の発現亢進が生じることを示した。しかし、投与された 4T1.2-EV が肺組織においてどのように肺組織酸性化を引き起こすのか、詳細は不明である。肺前転移ニッチの形成において、EV は様々な作用メカニズムで関与する。Liu らの研究では、がん細胞由来 EV により運搬される RNA が AT2 細胞の TLR3 受容体を刺激し、C-X-C motif chemokine ligand 5 などのケモカインの分泌を促すことが示された (63)。AT2 細胞は分泌因子を介した免疫細胞との様々な相互作用によって免疫応答を制御しているが、がん細胞はその機構を巧みに操って転移に適した免疫環境を作り出すと考えられる。また、肺前転移ニッチ内マクロファージにおける PD-L1 の発現誘導においても、がん細胞から分泌する EV の関与が示唆されている (61)。以上より、肺組織酸性化の責任細胞候補として挙げた AT2 細胞やマクロファージのがん細胞分泌 EV による機能制御が示唆される。これを考慮し、4T1.2-EV の両細胞への取り込みおよび解糖系シグナル調節についての検証が有意義と考えられる。肺胞壁内面にて界面を形成するサーファクタントの一部は脱落して、AT2 細胞や肺胞マクロファージに取り込まれる。脱落したサーファクタントは小胞構造を取っており (64)、それに類似した構造物である EV が AT2 細胞に取り込まれる可能性はあると考える。Soni らの報告では、肺胞上皮細胞が EV の phosphatidylserine を integrin α V β III により認識して取り込み、肺胞マクロファージはファゴサイトーシス経路を介した EV 取り込みの可能性が示されている (65)。本研究では 4T1.2-EV の肺組織内局在を明らかにしていない。AT2 細胞やマクロファージなど特定の細胞集団でのみ解糖系亢進が生じる要因の一つとして、4T1.2-EV の上記の細胞集団における選択的な取り込みが考えられる。また別の考え方として、4T1.2-EV を取り込んだ多様な細胞のうち、AT2 細胞やマクロファージのみで解糖系亢進が引き起こされた可能性もある。この考えは、EV が細胞内に取り込まれた後、どのような生物学的インパクトを与えるかは、当該細胞における固有のシグナル制御機構により異なる可能性に基づいたものである。EV には膨大な種類の生理活性分子で構成されており、生薬成分の混合物である漢方薬に例えられる。漢方薬における標的細胞の状態に依存した (cell-context dependent な) 薬理作用を踏まえると、4T1.2-EV の生物学的機能もまた同様かもしれない。すなわち、当該 EV が取り込まれた細胞すべてにおいて解糖系亢進が生じるとは限らないと考える。

4T1.2-EV における LDHA のタンパク質発現が認められたことから、それが標的細胞内で機能し肺組織酸性化を引き起こす可能性について考察する。EV が担う生命現象において、内包された生理活性を保持したタンパク質が標的細胞にてその機能を発現することが示唆されている。マウス骨髄より単離した間葉系幹細胞は *hepatocyte growth factor* を発現し、同分子は *lipopolysaccharide* 刺激に伴う血管内皮細胞の透過性亢進の抑制に関与する (66)。また、*matrix metalloproteinase (MMP)* の発現が EV で認められ、ECM の再構築や受容体の EV 膜上移行に関わっている (67)。前立腺がん幹細胞が分泌する EV においては、含有する MMP によって ECM リモデリングを介した前転移ニッチが形成される (68)。糖代謝に関連するタンパク質の EV を介した輸送についても報告があり、当該分子群が標的細胞における解糖系分子の発現を制御することが示唆されている (56)。EV における LDHA の発現は複数のがん種で報告があることも踏まえ、同分子による肺組織酸性化の発生については十分検討の価値があると考えられる。一方で、EV が内包する *micro RNA(miRNA)* も様々な生命現象や疾患の機能において重要であり、注目すべき対象分子である。前転移ニッチにおける糖利用能が EV 内包 *miRNA* により制御され、微小転移したがん細胞の増殖をサポートすることが報告されている (44)。よって、4T1.2-EV に含まれる *miRNA* に焦点を当て、エピジェネティック制御に基づいた肺組織酸性化の発生メカニズムを検証することも必要かもしれない。EV の分子組成は分泌元細胞によって大きく異なる。4T1.2 細胞および 66cl4 細胞が分泌する EV のプロテオーム解析に関する報告では、*integrin* の各サブタイプの発現がいずれも 4T1.2 分泌 EV の方で高いことが示唆されている (69)。*Integrin* サブタイプの発現パターンが EV の臓器指向性を規定することから、このような組成差が各培養上清投与による肺組織酸性化の発生の可否を決めているかもしれない (48)。なお、両 EV の臓器指向性についての報告はない。一方で、4T1.2 細胞の EV 分泌量は 66cl4 細胞に比べて約 100 倍異なっていたことから、EV 分泌の量的な差異による可能性も考慮した検討を行う必要があると考えられる。

4T1.2-EV において *anti-MCT1* 抗体処置により検出されたバンドは 4T1.2 細胞のそれよりも低分子サイズのものであった。*MCT1* は細胞種によっては酵素分解などにより生じたフラグメントとして発現することが報告されており (70)、そのようなフラグメント型 *MCT1* が 4T1.2-EV に濃縮している可能性が示唆される。または、4T1.2 細胞においては糖鎖などの修飾により分子量が増加した *MCT1* を発現している可能性も否定できない。

本研究では、肺組織酸性化に関与する 4T1.2 分泌因子として EV に着目した検討を行ったが、前転移ニッチはサイトカインなどの他の分泌因子によっても形成される。よって、肺組織酸性化の発生において 4T1.2-EV がどれほど寄与しているかは、本現象の発生メカニズムを解明する上で重要な学術的問いである。本研究では 4T1.2-CM を超遠心により得たペレットを 4T1.2-EV として用いている。超遠心後の上清と 4T1.2-CM をそれぞれ投与し、肺組織酸性化の発生を比較検証すれば肺組織酸性化を発生に係る他因子の存在の可否を明らかにできるかもしれない。ただし、超遠心処理によりサンプル中の EV を完全に沈殿させることは難しいとされている (71)。超遠心後の上清における EV の残存率が先に提案した実験の結果に影響を与える可能性はある。EV 分泌経路を遺伝子組換え技術により操作するなど、4T1.2-CM 中の EV 含有量を減らす方法などが考えられるが、いずれにおいても EV の除去率が付随する実験の結果を左右すると考える。4T1.2-CM の処置により肺組織乳酸量は有意に上昇する一方で、4T1.2-EV の処置では上昇傾向に留まった。この差は 4T1.2-EV 以

外の液性因子の有無に起因するかもしれない。また、4T1.2-EV には乳酸産生亢進を介さずに組織酸性化を引き起こす作用がある可能性も考えられる。その一例として、*vacuolar-type ATPase* や *carbonic anhydrase* などの乳酸産生系に依存しない pH 制御機構が 4T1.2-EV によりリモデリングされる説が挙げられる。

5. 小括

本章では、4T1.2 細胞が形成した酸性化肺組織における解糖系関連タンパク質の発現や pHLIP の局在、および 4T1.2-EV による肺組織酸性化について評価し、以下の知見を得た。

1. 4T1.2-Luc2 細胞の同所性移植により組織酸性化を誘導したマウス肺において、CD326⁺ AT2 細胞および CD45⁺Lineage⁺成熟血球系細胞の解糖系関連タンパク質の発現が増加した。
2. 4T1.2-Luc2 細胞の同所性移植または 4T1.2-CM の投与により組織酸性化を誘導したマウス肺において、SP-C⁺ AT2 細胞および CD45⁺血球系細胞の一部に pHLIP が局在した。
3. 4T1.2 細胞は 66cl4 細胞よりも EV 分泌量が多く、4T1.2-EV の投与によりマウス肺における pHLIP の分布量および解糖系関連タンパク質の発現が増加した。
4. 4T1.2-EV は解糖系関連タンパク質を発現していた。

以上のことから、4T1.2 細胞は EV を介して乳酸産生系の亢進ならびに肺組織酸性化を引き起こすことが示唆された。また、AT2 細胞や一部血球系細胞における肺組織酸性化の関与および肺組織酸性化の責任分子として 4T1.2-EV に内包された解糖系関連タンパク質が示唆された。

第3章 pHLIP 修飾薬物による前転移ニッチ治療の検討

1. 緒言

がん転移の成立における前転移ニッチの重要性が明らかになり、当該ニッチを標的とした治療戦略が様々に施行され、その一部は臨床試験にて検証が行われている。これまでに提唱された治療戦略は、(A) 前転移ニッチの形成阻害、(B) 前転移ニッチの正常化、(C) 前転移ニッチと微小転移したがん細胞の間で行われる相互作用の阻害、に分類される。(A) では、前転移ニッチ形成の中心を担う EV を標的とした報告が多い。降圧剤である *reserpine* は腫瘍由来 EV の脾臓細胞や骨髄細胞への取り込みを阻害し、前転移ニッチ形成に対する抑制効果が示唆された (72)。EV に発現する *integrin* の各種サブタイプに対する中和抗体を用いて、EV の転移予定臓器への作用を制御する手法も報告されている。一方、骨髄での前転移ニッチ形成には *TNF Receptor Superfamily Member 11a (RANK)/RANK ligand (RANKL)* シグナルが重要であることから (73)、ヒト抗 *RANKL* 抗体 (*denosumab*) の骨転移への適応が検討されている。その一環として、前立腺がんにおける骨転移の発症を遅らせることが臨床試験で明らかにされた (74)。(B) は、転移成立が容易になるよう改変された組織環境 (血管系の不安定化、免疫応答の抑制など) を正常化する戦略である。がん病態において、*angiopoietin-2* などの血管新生因子が過剰に産生される。これにより血管密度が異常に高まることで血管系全体が脆弱化した組織に対し、がん細胞は容易に浸潤/遊走することができる。上記背景の元、血管新生因子に対する抗体療法が前臨床レベルで検証され、その転移抑制効果が報告されている (75)。また担がん状態では、末梢組織において局所的な免疫応答の低下が生じており、抗腫瘍免疫を回避して転移性腫瘍が形成される。*Cyclooxygenase 2* により産生される *prostaglandin E2* は前転移ニッチにおける免疫抑制細胞の集積に関与しており、当該酵素を標的とした治療戦略の有効性が確認されている (76)。前転移ニッチにおける転移促進因子と微小転移したがん細胞との相互作用は、転移性腫瘍の形成プロセスにおける最終段階である。好中球は前転移ニッチにおいて特有の細胞死が誘導され、それに伴って脱凝集したクロマチンと抗菌タンパク質により形成した網状の構造物 (*neutrophil extracellular traps; NETs*) を細胞外に放出する。がん細胞は前転移ニッチ内に分泌された *NETs* に覆われ、免疫細胞による接触を介した攻撃を回避する (77)。本現象を標的として、*NETs* の分解や形成阻害による転移抑制が検証されている。

上記に示した治療戦略の多くは全身性に作用する可能性が高いものが大半であり、前転移ニッチに対して特異的に作用するための工夫がなされたものは少ない。一方腫瘍原発巣に対しては、自然免疫応答に関わる *stimulator of interferon gene* に対するアゴニストを pHLIP に修飾することで、腫瘍組織への作用強度が高まり、効果的に抗腫瘍免疫を誘導することが報告されている (60)。第1章において、著者は肺前転移ニッチにおける pHLIP の有意な集積を明らかにした。これより、pHLIP を修飾した薬物は腫瘍原発巣だけでなく、酸性化した肺前転移ニッチにも送達されると予想した。本仮説に基づき、第3章では酸性化した肺前転移ニッチにおける転移促進因子の働きを抑制する薬物を pHLIP に修飾し、前転移ニッチの機能を阻害する計画を立案した。

本計画を進めるにあたり、酸性化した肺前転移ニッチの病態特性を明らかにし、pHLIP に修飾する薬物を見定める必要があった。そこで、酸性化した病態として知られる炎症に着目した。炎症は、異物や自己の死細胞を排除して生体の恒常性を維持しようとする反応と考えられている。細菌

やウイルスの構成成分は toll-like receptor (TLR) などのセンサー分子を介して異物と認識され、その排除に向けた炎症シグナルが誘導される。本シグナルにより分泌される炎症性サイトカインは免疫細胞を活性化、動員、ならびに増殖させることにより、異物除去を促す。炎症組織における酸性化は炎症性細胞の活性化または動員によるものと考えられている (78)。炎症促進にはたらく M1 型マクロファージや Th1 型/Th17 型リンパ球は解糖系に依存したエネルギー代謝により乳酸を分泌する (79)。がん病態において、内因性 TLR4 リガンドによる炎症応答の惹起が前転移ニッチを形成することが示唆されている (80)。これにより発現誘導された炎症性サイトカインが転移性腫瘍の形成に寄与する。

以上の背景より、本章では酸性化した前転移ニッチの病態解析として炎症応答の有無を検討した。またその結果に基づいて、pHLIP 修飾型ステロイド性抗炎症薬 (pHLIP-Dex) を作製し、当該前転移ニッチの炎症応答と肺転移形成に対する阻害効果を検証した。

2. 実験方法

2-1. 細胞培養

マウス乳がん細胞株 (4T1.2、4T1.2-Luc2、66cl4-Luc2) は 5% FBS、抗生物質 (100 units/mL penicillin および 100 µg/mL streptomycin) を含む MEM- α で 37°C、5% CO₂ の環境下で培養した。また、Venor[®]GeM Classic Mycoplasma Detection Kit によりマイコプラズマ感染陰性を確認した上で実験に使用した。

2-2. pHILIP-Dex の調製

Dexamethasone が修飾された pHILIP は、Yana K. Reshetnyak (University of Rhode Island、RI、USA) により化学合成されたものを使用した。粉末を DMSO に溶解して-20 度にて保存した。当該溶液のモル濃度は、供与先から提供された各化合物のモル吸光係数を用いて算出した ($\epsilon_{280} = 12660 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

2-3. マウス乳がん細胞の正所性移植モデルの作製

マウス乳がん 4T1.2-Luc2 細胞を PBS で 1.0×10^6 cells/mL になるように調製し、BALB/cCrSlc マウス (メス、7 週齢) の第 4 乳腺にハミルトンシリンジを用いて皮下移植した。移植直前に三種混合麻酔を投与し、深麻酔下にて 1.0×10^5 cells/0.1mL の皮下投与を行なった。以上の動物実験は、本学の動物実験委員会において承認されている (承認番号: CTPH-20-006)。

2-4. がん細胞由来液性因子による前転移ニッチマウスモデルの作製

4T1.2 細胞 (3.0×10^4 cells/mL) を 5%FBS 含有 MEM- α で 48 時間培養した。血清由来液性因子の影響を取り除くために、PBS で洗浄後、MEM- α でさらに 24 時間培養した。細胞播種 72 時間後に回収した培養上清は、2000 \times g、20 分間、4°C と 10000 \times g、30 分間、4°C の遠心分離を行い、死細胞とデブリを除去した。0.22 µm 低吸着滅菌フィルターに通し、一日使用量に分注後、-20°C で保存した。BALB/cCrSlc (メス、7 週齢) に 0.3 mL の調製したがん細胞培養上清または MEM- α を 1 日 1 回、21 日間連続で腹腔内投与した。投与開始後 22 日目に肺を摘出し、*ex vivo* または *in vitro* での解析に使用した。以上の動物実験は、本学の動物実験委員会において承認されている (承認番号: CTPH-20-006、A22-066、A23-006)。

2-5. 薬物処置と経脈管肺転移モデルの作製ならびに評価

肺組織酸性化を抑制するために、oxamate (300mg/kg) を 4T1.2-CM または MEM- α に懸濁し、1 日 1 回、21 日間連続で BALB/cCrSlc マウス (メス、7 週齢) に腹腔内投与した。また、肺組織における炎症性サイトカイン発現を低下させるために、pHLIP-Dex (4 mg/kg) を 1 日 1 回、7 日間連続で腹腔内投与した。pHLIP-Dex の投与は 4T1.2-CM または MEM- α の 21 日間連続投与が完了した翌日より開始した。薬物処置終了の翌日、PBS に懸濁した 66cl4-Luc2 細胞 (5.0×10^4 cells/mL) を経尾静脈に 0.1 mL 投与した。肺転移の進行を評価するために、D-luciferin (150 mg/kg) をマウス腹腔内に投与し、胸部周囲における移植細胞由来の生物発光を IVIS Lumina XRMS SeriesIII で検出した。投与部位に残留した移植細胞の生物発光が入り込むことを防ぐために、腹部以下を黒いシートで覆い発光画像を

取得した。得られたデータは Living image software v4.7.4 で解析した。以上の動物実験は、本学の動物実験委員会において承認されている (承認番号: A22-066、A23-006)。

2-6. Cytokine bead array (CBA)

三種混合麻酔薬により誘導した深麻酔下にて、右心室から 10 mL の PBS で灌流を 2 回行った。胸腔から肺を分離し、解析当日まで -80°C で凍結保存した。肺組織 (20-30 mg) を 0.3 mL のタンパク質抽出バッファー {100 mM tris (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM ethylene glycol tetraacetic acid (同仁化学研究所)、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (ナカライ)、1% Triton[®] X-100、0.5% sodium deoxycholate (ナカライ)、1x protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich)、40 mM sodium fluoride (富士フィルム和光純薬)、2 mM sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich)} に懸濁し、Bioruptor UCD-250 (BM Equipment) で超音波処理を行った (サイクル数: 7 回、インターバル: 30 秒)。遠心分離 ($9000 \times g$ 、10 分間、 4°C) で得られた上清を CBA の解析サンプルとした。肺前転移ニッチにおける免疫抑制の誘導に関与することが知られている、Interleukin (IL)-6 および tumor necrosis factor (TNF)- α を解析対象に選び (81,82)、その定量試薬として Mouse IL-6 Flex Set、Mouse TNF Flex Set、ならびに Mouse/Rat Soluble Protein Master Buffer Kit (all from BD) を使用した。補足抗体が結合した CBA ビーズは、2 つの蛍光チャネル (allophycocyanin; APC および APC-Cy7) で固有の蛍光強度を検出するため、multiplex での解析が可能である。室温下にてサンプル、PE 標識検出抗体の順で各 1 時間反応させた CBA ビーズを BD LSRFortessa[™] X-20 (BD) で解析した。取得データは Flowjo ソフトウェア v10.4.2 を使用して解析し、標準物質の測定データに基づく検量線を作成した。サンプルデータを当該検量線に外挿し、各サイトカイン濃度を算出した。さらに BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific) で測定された個々のサンプルのタンパク質濃度により補正を行った。

2-7. 統計解析

取得したデータは Prism 5 および 9 (GraphPad Software) で統計処理した。グラフは、生存期間解析を除いて平均値 \pm 標準偏差で示した。2 群間の平均値比較では対応のない t 検定を用い、3 群間においては一元配置分散分析および Turkey's test により統計解析を行った。生存曲線は Kaplan-Meier method で示し、log-rank 検定で統計処理を行なった。P 値が 0.05 以下のものを統計学的に有意差があると判定した。

3. 実験結果

3-1 4T1.2-Luc2 細胞移植により酸性化した肺組織における炎症性サイトカインの発現

酸性化肺組織における炎症応答の有無を明らかにするために、4T1.2-Luc2 細胞の移植により組織酸性化を誘導した肺における炎症性サイトカインの発現 ($\mu\text{g}/\text{mg protein}$) を Cytokine bead array (CBA) にて解析した。CBA とは、標的タンパク質に対する抗体が修飾された捕捉用ビーズと検出用抗体を用いて抗原を挟み込んだ複合体を形成し、検出用抗体に由来する蛍光強度を用いて標的タンパク質を定量するものである (図 23A)。はじめに FSC と SSC の展開により、サンプル中のビーズを解析対象として検出し、これらを AF647 および APC-Cy7 に対するチャンネルで再度展開する (図 23B)。これらのチャンネルで検出される 2 色の蛍光色素が捕捉ビーズに固有量包埋されており、その蛍光強度は各抗原に対する捕捉抗体ごとに異なる。よってこの過程で IL-6 捕捉ビーズと TNF- α 捕捉ビーズをそれぞれ同時に抽出される。最後に各分画に含まれる捕捉ビーズに結合した標的抗原量を PE 標識された検出抗体で定量するため、PE に対する検出チャンネルにてヒストグラムを表示した。同ヒストグラムにおける平均値からサンプル中の標的抗原濃度が換算される。解析の結果、4T1.2-Luc2 移植マウス肺において、IL-6 の発現量 ($\mu\text{g}/\text{mg protein}$) は非移植群に比して有意に高かった (図 23B; None: 0.422 ± 0.191 , 4T1.2-Luc2: 0.878 ± 0.203)。また TNF- α の発現量 ($\mu\text{g}/\text{mg protein}$) においても 4T1.2-Luc2 細胞移植群で上昇傾向がみられた (None: 0.247 ± 0.0758 , 4T1.2-Luc2: 0.504 ± 0.179)。本結果より、4T1.2-Luc2 の同所性移植により酸性化した肺組織における炎症性サイトカインの発現上昇が示唆された。

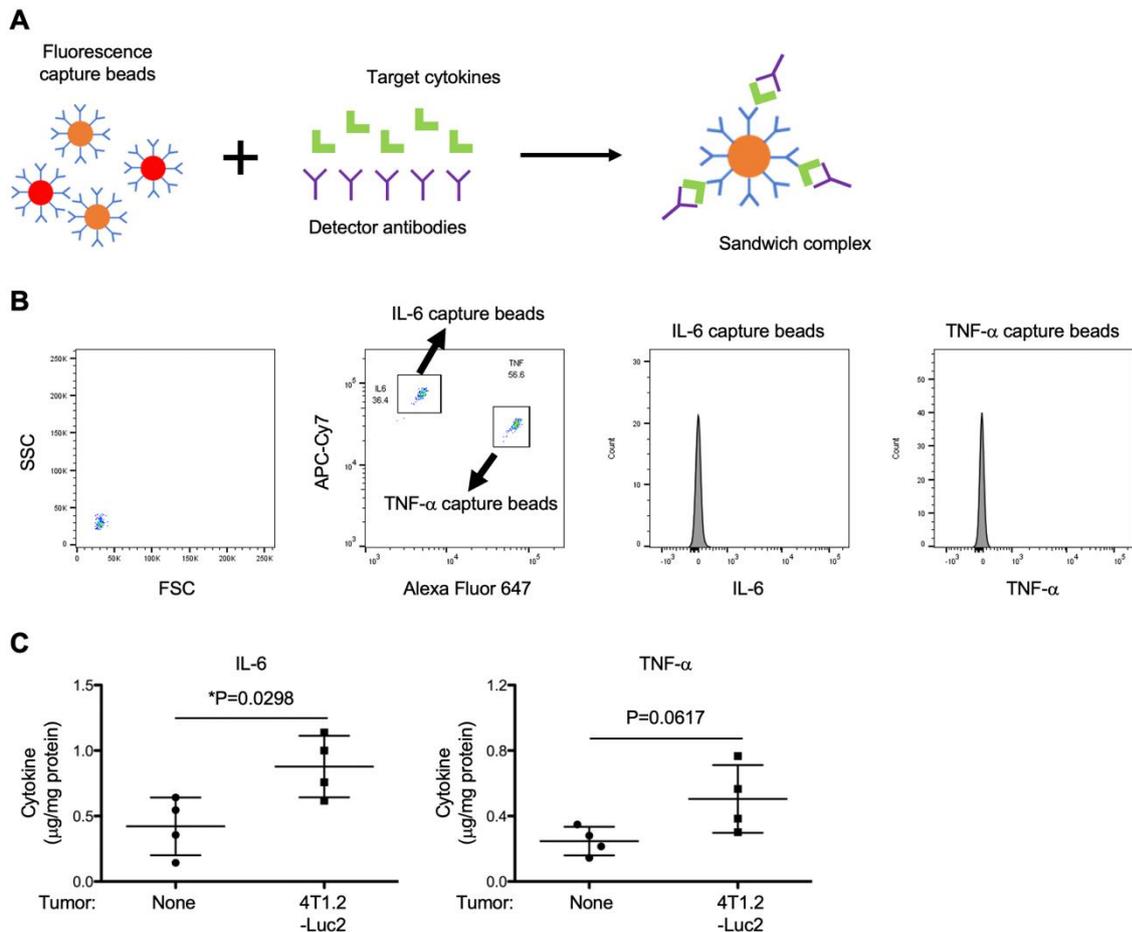


図 23. 4T1.2 同所性移植マウス肺における炎症性サイトカイン発現の解析

(A) CBA の原理: IL-6、TNF- α それぞれに対する捕捉ビーズと検出用抗体をサンプルと混合して複合体を形成させ、標的抗原のビーズへの結合量を FCM で解析する。(B) 両捕捉ビーズは固有の蛍光強度を AF647 と APC-Cy7 におけるチャンネルで検出することで、区別される。捕捉ビーズに結合した検出用抗体 (PE 標識) に由来する蛍光強度から標的タンパク質を定量する。(C) Vehicle (None: 4 匹) または 4T1.2-Luc2 細胞 (4T1.2-Luc2: 4 匹) を BALB/c マウスの乳腺に皮下投与し、投与 21 日後に摘出した肺組織における炎症性サイトカイン量を測定した。グラフには、各サンプルの解析値および各群の平均値と標準偏差を示した。統計解析は Student's *t* test (両側検定; 対応なし) を用いた (*: $P < 0.05$)。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

3-2 Oxamate による肺組織酸性化の抑制が炎症性サイトカイン発現に及ぼす影響

4T1.2-Luc2 細胞の移植により組織酸性化が生じた肺における炎症性サイトカインの発現が上昇したため、両現象の関係性について検討した。MEM- α 、4T1.2-CM、または oxamate を含む 4T1.2-CM (4T1.2-CM with oxamate) のいずれかを、BALB/c マウスの腹腔内に 21 日間連続で投与し、各肺の炎症性サイトカイン発現 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) を CBA で解析した。その結果、4T1.2-CM 投与群における IL-6 発現量は MEM- α 投与群と比較して有意に高値であったが、oxamate 含有 4T1.2-CM 投与群と同程度であった (図 24A; MEM- α : 0.167 ± 0.124 、4T1.2-CM: 0.473 ± 0.171 、4T1.2-CM with oxamate: 0.385 ± 0.283)。TNF- α の発現量については、上記の 3 群内で任意の 2 群間を選んだ場合にいずれも統計学的に有意な差はなかった (図 24B; MEM- α : 0.154 ± 0.150 、4T1.2-CM: 0.324 ± 0.195 、4T1.2-CM with oxamate: 0.357 ± 0.120)。このことから、4T1.2 液性因子により肺組織における IL-6 のタンパク質発現が上昇するが、oxamate による肺組織酸性化の抑制はその上昇に影響しないことが示された。

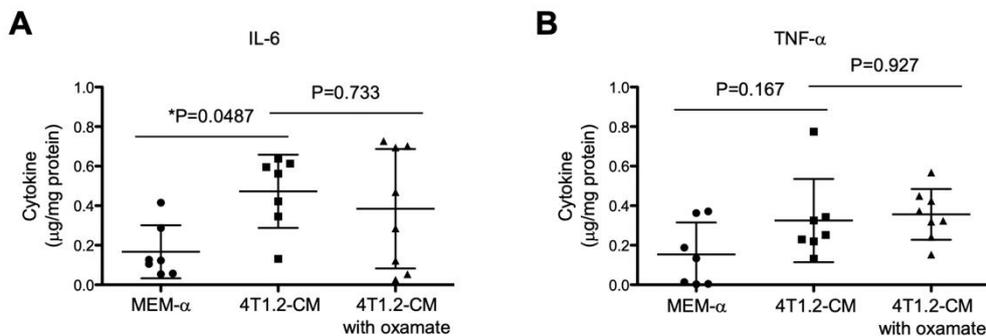


図 24. 4T1.2 培養上清により誘導した肺組織酸性化と炎症性サイトカイン発現の関係性

Control media、4T1.2-CM、または oxamate 含有 4T1.2-CM (4T1.2-CM with oxamate) を BALB/c マウスの腹腔内に 21 日間連続で投与し、投与完了の翌日に摘出した肺組織における IL-6 (A) および TNF- α (B) の発現量を測定した。グラフには、各サンプルの解析値および各群の平均値と標準偏差を示した。統計解析は 1 元配置分散分析および Turkey test を用いた (*: $P < 0.05$)。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

3-3 pHLIP-Dex による転移抑制効果の検証

肺前転移ニッチにおける IL-6 や TNF- α は転移性腫瘍を支持する免疫環境の形成に関与する。よって、酸性化前転移ニッチにおいて亢進した両サイトカインの発現を抑えれば、転移性腫瘍の形成阻害に繋がると予想した。そこで、酸性化前転移ニッチにおける炎症シグナルを効果的に阻害するために、pHLIP の C 末端終末にステロイド性抗炎症薬 (dexamethasone) を修飾したもの (pHLIP-Dex) を化学合成した。4T1.2-CM を 21 日間投与したマウスに、本化合物を 7 日間連続で引き続き投与した。投与終了翌日に 66cl4-Luc2 を投与し、肺転移巣の形成および当該マウスの生存を評価した (図 25)。

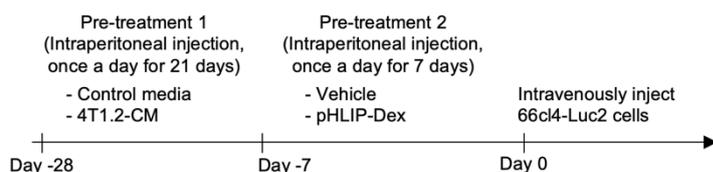


図 25. 各種培地および pHLIP-Dex の前処置と経脈管肺転移モデルの作製

BALB/c マウスに対し、control media または 4T1.2-CM を 1 日 1 回、21 日間連続で投与した。培地投与終了の翌日から (day -7)、vehicle または pHLIP-Dex を 1 日 1 回、7 日間連続で投与した。以上の前処置が終了した翌日 (day 0)、66cl4-Luc2 細胞を全ての個体に尾静脈投与した。肺における移植細胞の増殖は IVIS Lumina XRMS Series III による生体イメージングで経時的に評価した。

その結果、尾静脈投与 17 日後において、移植細胞に由来する生物発光は vehicle を処置した全てのマウス肺で検出された (図 26A; 4T1.2-CM/vehicle: 5 匹/5 匹)。それに対し、pHLIP-Dex を処置した群では 60% の個体で生物発光が検出されなかった (4T1.2-CM/pHLIP-Dex: 3 匹/5 匹)。pHLIP-Dex の移植細胞に対する直接作用の可能性を鑑み、肺組織酸性化を発症しない MEM- α (control media) を用いて同様の実験を行なった。その結果、尾静脈投与 17 日後のマウス肺における生物発光は、vehicle または pHLIP-Dex を処置されたすべてのマウスで検出された (control media/vehicle: 5 匹/5 匹、control media/pHLIP-Dex: 5 匹/5 匹)。また各群における MST を算出した結果、4T1.2-CM/vehicle 群と 4T1.2-CM/pHLIP-Dex の間において、MST の統計学的に有意な差が認められた (図 26B; 4T1.2-CM/vehicle: 21 日、4T1.2-CM/pHLIP-Dex: 28 日)。一方、control media/vehicle 群と control media/pHLIP-Dex 群の間には、MST の統計学的有意差は検出されなかった (control media/vehicle: 28 日、control media/pHLIP-Dex: 24 日)。

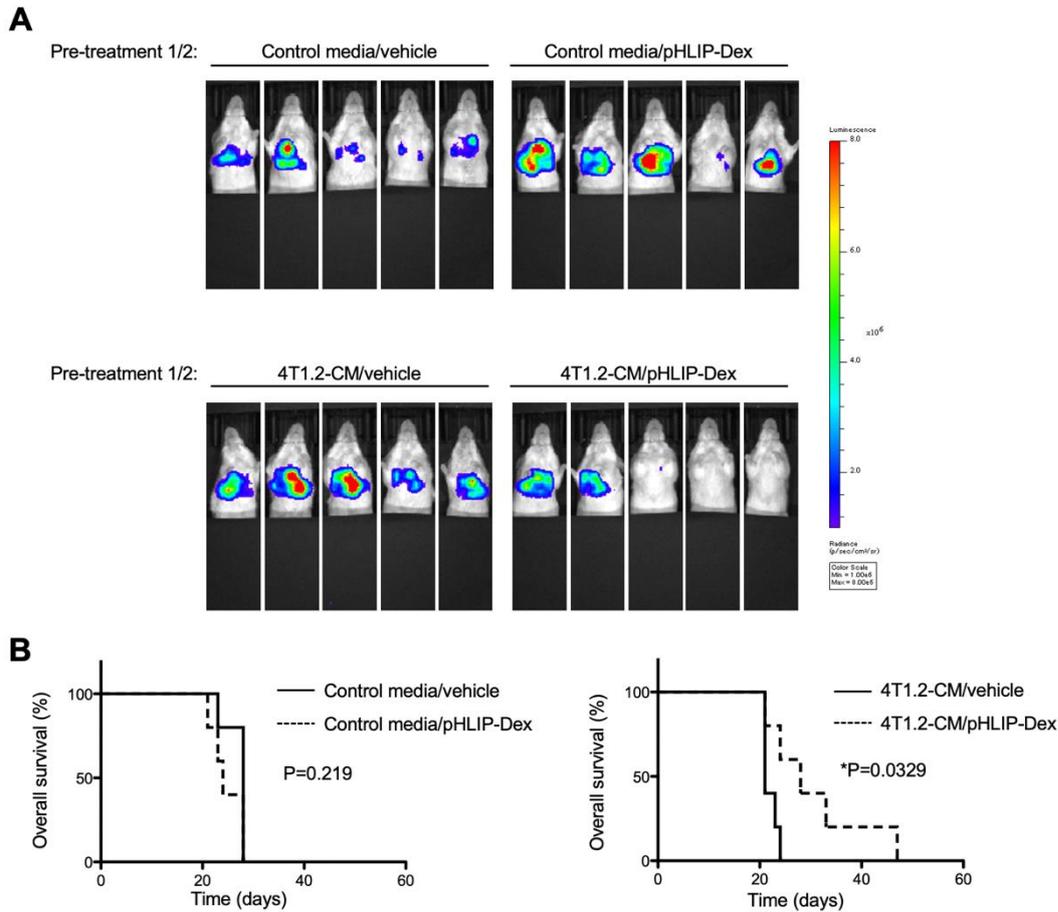


図 26. 各種培地および pHLIP-Dex を前処置したマウスにおける肺転移進展評価

(A) 66cl4-Luc2 細胞を移植して 17 日後のマウス肺における移植細胞由来生物発光を *in vivo* イメージングで解析した。当該マウスは細胞移植の前に以下のいずれかの培地を処置された: control media および vehicle (control media/vehicle; 5 匹)、control media および pHLIP-Dex (control media/pHLIP-Dex; 5 匹)、4T1.2-CM および vehicle (4T1.2-CM/vehicle; 5 匹)、または 4T1.2-CM および pHLIP-Dex (4T1.2-CM/pHLIP-Dex; 5 匹)。(B) (A) に示した各個体 (5 匹/群) の生存期間を解析し、Kaplan-Meier plots で示した。統計解析は log-rank test を用いた (*: $P < 0.05$)。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

3-4 pHLIP-Dex による炎症性サイトカイン発現抑制の検証

pHLIP-Dex が酸性化した肺前転移ニッチにおける IL-6 や TNF- α の発現を抑制するか、検討した。4T1.2-CM を BALB/c マウスの腹腔内に 21 日間連続で投与した後、vehicle または pHLIP-Dex をさらに 7 日間連続で腹腔内に投与した。投与終了翌日に摘出した各肺の炎症性サイトカイン発現 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) を CBA で解析した。その結果、pHLIP-Dex 投与群における IL-6 発現量は vehicle 投与群と比較して有意に低値であった (図 27A; 4T1.2-CM/vehicle: 1.14 ± 0.299 、4T1.2-CM/pHLIP-Dex: 0.514 ± 0.0256)。TNF- α の発現量についても同様に、pHLIP-Dex 投与群で有意に低下した (図 27B; 4T1.2-CM/vehicle: 0.700 ± 0.110 、4T1.2-CM/pHLIP-Dex: 0.343 ± 0.115)。

図 23-27 の結果より、マウス肺における IL-6 の発現が 4T1.2-Luc2 細胞の同所性移植または 4T1.2-CM の投与により増加するが、肺組織酸性化はその増加には関与しないことが示された。TNF- α の発現は 4T1.2 分泌因子により有意に変化しなかった。また、pHLIP-Dex の前処置により炎症性サイトカインの発現を低下させたマウス肺において、転移巣形成の遅延および当該マウスにおける生存期間の延長が認められた。

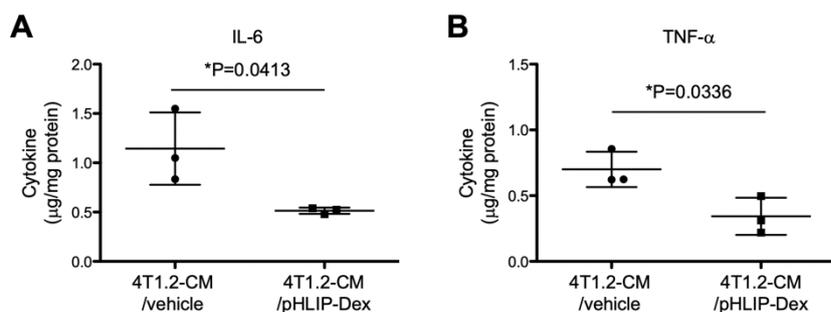


図 27. pHLIP-Dex を処置したマウス肺における炎症性サイトカイン発現の解析

4T1.2-CM を腹腔内に 21 日間連続で投与した BALB/c マウスに対し、vehicle または pHLIP-Dex を 7 日間連続で投与した。投与完了の翌日に摘出した肺組織における IL-6 (A) および TNF- α (B) の発現量を測定した。グラフには、各サンプルの解析値および各群の平均値と標準偏差を示した。統計解析は Student's *t* test (両側検定; 対応なし) を用いた ($*: P < 0.05$)。Front Oncol. 2023, 13, 1258442 より一部改変して転載。

4. 考察

本章では酸性化肺前転移ニッチにおける炎症病態の有無について解析し、炎症性サイトカインの発現上昇を明らかにした。4T1.2-Luc2 同所性移植モデルの酸性化肺において IL-6 および TNF- α の発現が増加または増加傾向であった。また、4T1.2-CM により誘導した酸性化肺では IL-6 のみが発現亢進していた。両モデル間における上記の差異は、第 1 章の考察に記載した 4T1.2 細胞の生育環境に起因した分泌因子の組成差による可能性が考えられる。IL-6 などの炎症性サイトカイン発現を誘導するものとしては、TLR に対する内因性リガンドなどが挙げられる。TLR 内因性リガンドの一種である high mobility group box 1 (HMGB1) は 4T1 細胞を含む様々ながん細胞株から分泌されている (83)。本分子は NF- κ B の活性化を介して肺組織マクロファージに PD-L1 を発現誘導し、腫瘍免疫応答が抑制された前転移ニッチの形成に関与する (61)。また、同マクロファージにおける NF- κ B シグナルの活性化は IL-6 を発現亢進させるとともに、電子伝達系の抑制による hypoxia-inducible factor-1 alpha シグナルの活性化を介して乳酸産生能を増大させる。よって、NF- κ B の活性化を起点として、組織酸性化のための解糖系亢進と IL-6 の発現誘導が生じる可能性がある。4T1.2 分泌因子が NF- κ B の活性化を介して IL-6 発現と解糖系を亢進させているのであれば、LDHA 阻害剤である oxamate では IL-6 発現亢進を抑えられないと考えられ、図 24 の結果に一致する。また、HMGB1 発現 EV が同定されていることを踏まえると、HMGB1 も 4T1.2-EV に発現する組織酸性化関連分子の候補と考えられる。また、*Il6* mRNA の選択的な安定化に関わる分子 (AT-rich interactive domain-containing protein 5a; Arid5a) が同定されている (84)。本分子は *Tnf* や *Il12a/b* に対する各 mRNA の安定化には関与しないことから、4T1.2 分泌因子が IL-6 および TNF- α の発現に与える影響の大小に関与しているかもしれない。

IL-6 は前転移ニッチにおける MDSC やマクロファージの動員を促し、抗腫瘍免疫応答の低下に関わる (81)。よって、酸性化した肺前転移ニッチにおける炎症応答の抑制が転移性腫瘍の形成の阻害につながると考え、pHLIP-Dex によりそれを実証した。4T1.2-CM の前投与により TNF- α の発現は有意に増加しなかったが、pHLIP-Dex を引き続いて投与することで IL-6 および TNF- α の発現が非投与群よりも減少した。未処置マウスとの比較はできていないが、4T1.2-CM/pHLIP-Dex 群における TNF- α 発現は定常レベル以下になっている可能性がある。酸性化肺に pHLIP-Dex を前処置することにより、引き続く肺転移の形成を遅らせ、当該マウスの生存期間を改善した。本研究における経脈管肺転移モデルでは、肺転移能をもつ 66cl4-Luc2 細胞を 5×10^4 cells の尾静脈投与している。当該条件では前転移ニッチ形成の有無に関わらず肺転移を形成し、その進行によって移植 60 日後までに概ね個体死に至る。図 12A にて、control media 群は移植 21 日時点で転移形成を示す発光は 2 匹/5 匹中のみにみられているが、その後転移が発生し移植 60 日後までには 4/5 匹が死亡した。図 26A の control media/vehicle および control media/pHLIP-Dex ではいずれも 5/5 匹が移植後 17 日時点で転移が検出されており、図 12A の結果と比べて早期に発生している。これは 66cl4-Luc2 細胞を想定よりも多く移植した可能性が考えられる。図 26A の control media/vehicle と 4T1.2-CM/vehicle を比較すると、4T1.2-CM/vehicle の発光強度がより高く、転移形成がより進行していることが示唆される。これは、4T1.2 由来液性因子による前転移ニッチの形成に起因すると考えられる。

Dexamethasone などのステロイド性抗炎症薬はがん化学療法による副作用の軽減や進行がんに伴う各種症候の是正を目的として幅広く使用されている。一方で、dexamethasone が 4T1 細胞の遊走能

を高め、肺転移を促すことを報告した興味深い論文がある (2)。当該論文では、4T1 細胞における glucocorticoid receptor への結合を起点とした詳細な薬理作用メカニズムが示されている。よって、dexamethasone または pHLIP-Dex が 4T1 およびその系統細胞に直接作用した場合は、転移を促す可能性がある。著者の研究では、pHLIP-Dex の前転移ニッチに対する薬理作用に注目した検証を目的とした実験系を組んでおり、肺転移に対する治療効果としては Zhao らとは逆行する結果が得られている。pHLIP-Dex の肺転移抑制効果は、control media の投与により肺組織酸性化を誘導していない場合には生じなかった。本結果は、pHLIP による酸性化組織への標的化が成功していることを示唆している。つまり、酸性化していない肺に対して pHLIP-Dex は作用していない。図 26A の control media/vehicle と control/pHLIP-Dex を比較すると、後者の発光強度がより高く転移形成がより pHLIP-Dex により促進しているように見え、先述した dexamethasone の 4T1 細胞に対する直接的な転移促進作用が現れているのかもしれない。しかし、両群の生存期間に有意な差は生じなかった。このことから、肺組織酸性化条件における pHLIP-Dex の肺転移抑制効果の主たるは肺に対する薬理作用に起因するものと考えられる。すなわち、dexamethasone は肺前転移ニッチの機能を阻害して転移を抑制する一方で、がん細胞への直接作用により転移を促進する可能性が示唆された。

以上より Dexamethasone の前転移ニッチに対する有益な薬理効果を高める上で、今回用いた pHLIP による酸性化前転移ニッチへの標的化は有効と考えられる。非酸性化条件では pHLIP-Dex の治療効果が認められないことから一定の有効性が示唆されるものの、同一実験系における pHLIP-Dex と dexamethasone の治療効果を比較することで、今後厳密に検証されることが望ましい。酸性化前転移ニッチの形成に関わる 4T1.2-EV は肺に一定量分布することが想定されるため、本 EV を薬物送達のための担体として用いる戦略も考えられる。しかし、投与された EV により肺組織酸性化が発生し、却って転移を助長することが懸念される。4T1.2-EV に高い肺組織移行性があるならば、その性質のみを抽出して送達キャリアに昇華させたものを利用することが望ましいと考える。以上より pHLIP-Dex の結果については、肺前転移ニッチ内の酸性環境に局在する細胞に対して dexamethasone を効率的に作用させることで炎症性サイトカインの発現を抑制し、当該分子による転移促進作用を消失させたと推察している。Dexamethasone の抗炎症作用が生じるメカニズムの 1 つは NF- κ B の機能阻害であることから、pHLIP-Dex による炎症性サイトカインの発現抑制も同様のメカニズムが考えられる。また上述した NF- κ B の活性化を起点として解糖系亢進が生じるのであれば、pHLIP-Dex が肺組織酸性化の抑制を介して転移を阻害した可能性もあり、今後の検討に含むべき課題である。pHLIP が AT2 細胞や一部の成熟血球系細胞に局在することから、これらの細胞に pHLIP-Dex が作用した可能性が示唆されるが、その裏付けとして当該細胞における炎症性サイトカインの発現低下を検討する必要があると思われる。4T1.2 分泌因子による IL-6 発現亢進と組織酸性化の関係性を完全には明らかにできなかったが、少なくとも当該肺での転移性腫瘍の形成において炎症性サイトカインの重要性が示唆される。前転移ニッチにおける有望な治療標的分子は様々な同定されているため、これらの機能を制御する小分子化合物を pHLIP に修飾したものは pHLIP-Dex よりも大きな転移抑制効果をもたらすかもしれない。pHLIP-薬物複合体が作用する細胞における最も重大な転移促進機能を同定し、それを薬理的に制御した際の有効性をみることを提案する。

5. 小括

本章では、酸性化肺における炎症性サイトカインの発現および pHLIP-Dex の転移抑制効果について評価し、以下の知見を得た。

1. 4T1.2-Luc2 細胞の同所性移植または上清の投与により組織酸性化を誘導したマウス肺において、IL-6 の発現が増加した。
2. 4T1.2-CM の単独投与と oxamate との併用投与では肺組織における IL-6 の発現に有意な差は検出されなかった。
3. pHLIP-Dex の前処置は、酸性化肺における転移形成を抑制し、当該マウスの生存期間を延長した。
4. pHLIP-Dex は 酸性化肺組織における炎症性サイトカインの発現を抑制した。

以上のことから、酸性化肺では炎症応答が生じており、その誘導に酸性化は関与しないことが示唆された。また、酸性化肺における炎症応答を pHLIP-Dex を用いて阻害すると、転移形成が抑制されることが明らかとなった。

総括

本研究は、前転移ニッチにおける pH 環境の解明を目的として行った。第 1 章では、マウス乳がん (4T1.2) 細胞の分泌因子が肺前転移ニッチにおける乳酸産生を亢進させ、これにより pHHLIP の同肺への蓄積量が有意に高まること (肺組織酸性化) を見出した。pHLIP は主に腫瘍組織の可視化や標的治療を目的としてこれまで使用されており、前転移ニッチの特性解析への適用を本研究成果として初めて報告した。肺などの生命活動の維持に重要な臓器に対しては、電極穿刺などの侵襲性が高い手法を取れず、その生体 pH 環境は不明とされてきた。生体内で酸性化した組織に分布する pHHLIP は旧来の解析技術の限界を克服し、肺前転移ニッチの酸性化を明らかにした。しかし、本成果が摘出臓器における蛍光イメージング解析に基づくものであり、その点は本研究の限界と考える。すでに開発済みの放射性標識 pHHLIP などを用いれば、酸性化前転移ニッチを生体から検出できるかもしれない。また、肺に転移したがん細胞による腫瘍形成が組織酸性化により促進されることを明らかにしており、その詳細な機能メカニズムの解明が待たれる。

第 2 章では、肺組織酸性化の発生メカニズムを検証した。その結果、酸性化肺において解糖系関連タンパクの発現の亢進と pHHLIP の局在がみられる細胞集団 (AT2 細胞と一部の成熟血球系細胞) を同定した。これらの細胞により産生した乳酸が組織酸性化に関与するかは、コンディショナルノックアウトマウスなどを用いて各集団の寄与を明らかにすることが必要である。また、4T1.2 細胞から分泌する EV が組織酸性化の発生させるトリガー因子の一つであることを突き止めた。本成果で得た発生メカニズムに係る細胞や作用因子を基に、分子レベルでの解明を進めることが次の課題と考えられる。これにより同 EV に含まれる責任分子が同定されれば、肺組織酸性化の発生リスクを測るバイオマーカーの開発につながる可能性がある。

第 3 章では、組織酸性化により集積する pHHLIP の特性を利用した前転移ニッチの機能制御について検討した。酸性化肺で惹起された炎症応答を pHHLIP-Dex で抑制することにより、当該肺組織における転移性腫瘍の形成を遅らせた。全身作用では様々な有害反応の可能性が示唆される dexamethasone に対し、pHLIP 修飾によって標的部位に対する有効性を最大化させたと考える。よって前転移ニッチの治療を考える上において、当該機能を阻害するための標的分子の選択だけでなく、薬物送達技術などの治療効果の向上に資する方法論の重要性を示唆する知見である。

以上より、本研究ではこれまで未知であった前転移ニッチ形成に伴う pH 環境の変化を pHHLIP の適用により明らかにした (図 28)。さらに、pHLIP を修飾することで薬物を肺前転移ニッチへ効果的に作用させる、新規標的化戦略の有効性を実証した。前転移ニッチの定義上、その存在をヒトで確認するのは困難である。しかし本研究成果を活かすことにより、各臓器の pH 環境を評価軸としたがん転移の予測とそれに基づく予防的治療アプローチが創造される。具体的には非転移症例に対して、画像診断用 pHHLIP による定期的なモニタリングを実施する。pH 環境の変化として病巣を検出した場合には、治療用 pHHLIP を用いて転移性腫瘍の発生および増大を防ぐ。pHLIP により検出された病変が前転移ニッチまたは転移性腫瘍のいずれかについては、別途組織針などで区別される。治療用 pHHLIP は、病巣の機能特性に基づいて修飾薬物を個別に検討する必要があると予想される。前転移ニッチの機能特性に迫った本研究の成果は、がん転移病態の理解を pH 環境の観点からさらに深化させたと考えられる。pHLIP に限ることなく、乳酸代謝や pH 制御機構に基づいた様々な戦略

が想起され、がん転移の克服に寄与することを期待したい。

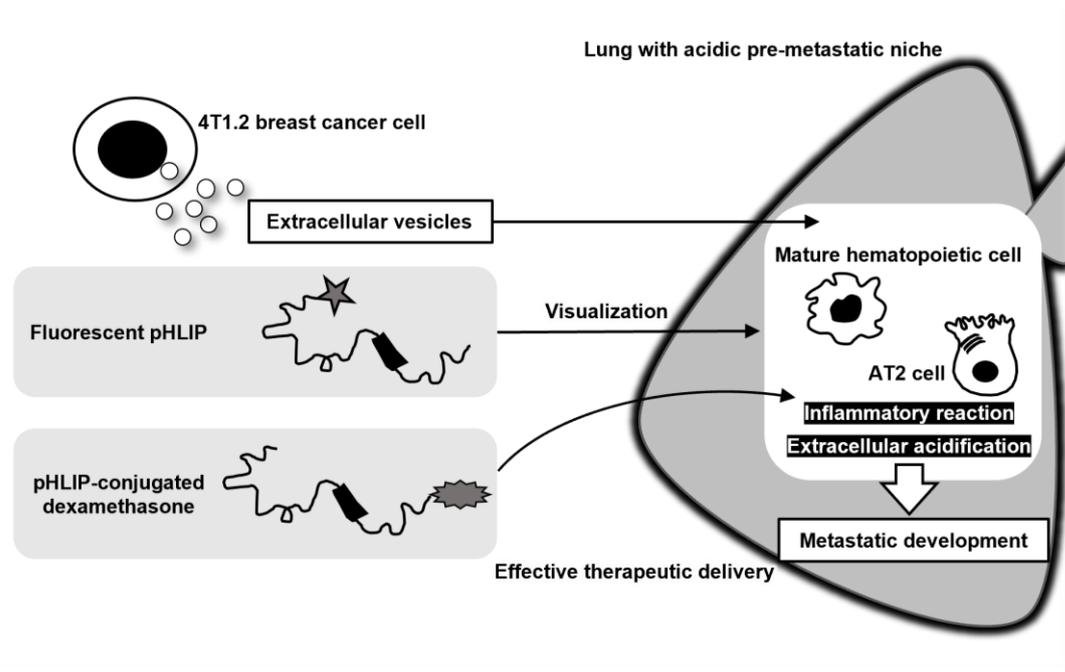


図 28. 本研究成果の概要

マウス乳がん (4T1.2) 細胞が EV を介して形成する肺前転移ニッチにおいて、解糖系関連分子の発現亢進と組織酸性化が生じている。AT2 細胞および一部の成熟血球系細胞が組織酸性化に関与すると予想される。pHLIP は肺前転移ニッチの酸性化を認識して当該部位へ有意に集積する。本特性は、肺前転移ニッチの検出および当該ニッチへの効率的な薬物送達へ適用される。本研究では pHLIP と結合させた dexamethasone が酸性化肺での炎症応答を抑えて、肺転移形成を遅延させた。

謝辞

はじめに、本研究を終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました京都薬科大学病態生理学分野 芦原英司 教授、細木誠之 准教授、に深甚なる謝意を表します。

また、本論文の査読およびご指導を賜りました京都薬科大学細胞生物学分野 藤室雅弘 教授、同大学シナジーラボ 高田和幸 教授に篤く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、pHLIP 誘導体を合成していただいた University of Rhode Island Professor Yana K. Reshetnyak、Professor Oleg A. Andreev、Research Assistant Professor Anna Moshnikova に心より感謝申し上げます。

病態生理学分野での研究生活において、共に切磋琢磨し成長させていただいた河西翔平 博士、黒田絵莉子 博士、若林亮介 博士、清水輝記 博士、宮下雅亜 博士、角陽子 博士、甘利圭悟 博士、友金眞光 博士、今吉菜月 博士、佐野友亮 博士、杉山雄輝 博士、清水大器 学士、吉澤正人 学士、藤堂暢久 学士、羽立祐貴 学士、法山康太 学士、山本頼仁 学士、また、同じ研究グループのメンバーとして共に研究活動に励んだ沢田瑛子 学士、浅山菜々子 学士、板原多勇 学士、中井亮太 学士、板垣里奈 学士、須藤里彩 学士、丸茂寛子 学士、小西和也 氏、佐藤晴夏 氏、皿谷桃寧 氏、そして、研究室の学生にいつも気を配っていただき研究室運営をサポートしていただいた河崎由華 様を含めた京都薬科大学病態生理学分野の所属者一同に深謝申し上げます。

がんプロ研修期間においては、非常に忙しい薬剤師業務の中、臨床の現場で薬剤師としての視野を広げてくださった滋賀大学附属病院 森田真也 教授、池田義人 准教授、須藤正朝 先生、若杉吉宣 先生、同病院のスタッフの方々、また、がんプロ研修をサポートしていただいた京都薬科大学 臨床薬理学分野 中田徹男 教授、同臨床薬学教育研究センター 中村暢彦 講師、同臨床薬剤疫学分野 冢瀬諒 助教、村上由理 様、坂口由美子 様に心より感謝申し上げます。

そして、学部生時代から7年間直接研究指導いただき、毎日の実験や議論、論文作成を通して著者自身の研究者としての礎を築いてくださった、戸田侑紀 助教には、再度、心から感謝申し上げます。

最後に、これまで人生28年間誰よりも私の活動全てを支えて応援してくれた両親に心から深く感謝いたします。

引用文献

1. Talmadge, J. E.; Fidler, I. J. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Res.* **2010**, *70* (14), 5649–5669.
2. Zhang, Y.; Shi, G.; Zhang, H.; Xiong, Q.; Cheng, F.; Wang, H.; Luo, J.; Zhang, Y.; Shi, P.; Xu, J.; Fu, J.; Chen, N.; Cheng, L.; Li, Y.; Dai, L.; Yang, Y.; Yu, D.; Zhang, S.; Deng, H. Dexamethasone Enhances the Lung Metastasis of Breast Cancer via a PI3K-SGK1-CTGF Pathway. *Oncogene* **2021**, *40* (35), 5367–5378.
3. Fukuda, H.; Nakamura, S.; Chisaki, Y.; Takada, T.; Toda, Y.; Murata, H.; Itoh, K.; Yano, Y.; Takata, K.; Ashihara, E. Daphnetin Inhibits Invasion and Migration of LM8 Murine Osteosarcoma Cells by Decreasing RhoA and Cdc42 Expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *471* (1), 63–67.
4. Yoshizawa, M.; Nakamura, S.; Sugiyama, Y.; Tamai, S.; Ishida, Y.; Sueyoshi, M.; Toda, Y.; Hosogi, S.; Yano, Y.; Ashihara, E. 6-Hydroxythiobinupharidine Inhibits Migration of LM8 Osteosarcoma Cells by Decreasing Expression of LIM Domain Kinase 1. *Anticancer Res.* **2019**, *39* (12), 6507–6513.
5. Sugiyama, Y.; Nakamura, S.; Tokuda, Y.; Nakano, M.; Hattori, Y.; Nishiguchi, H.; Toda, Y.; Hosogi, S.; Yamashita, M.; Tashiro, K.; Ashihara, E. 7,8-Dihydroxy-3-(4'-Hydroxyphenyl)Coumarin Inhibits Invasion and Migration of Osteosarcoma Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2023**, *638*, 200–209.
6. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev.* **1989**, *8* (2), 98-101.
7. Peinado, H.; Zhang, H.; Matei, I. R.; Costa-Silva, B.; Hoshino, A.; Rodrigues, G.; Psaila, B.; Kaplan, R. N.; Bromberg, J. F.; Kang, Y.; Bissell, M. J.; Cox, T. R.; Giaccia, A. J.; Ertler, J. T.; Hiratsuka, S.; Ghajar, C. M.; Lyden, D. Pre-Metastatic Niches: Organ-Specific Homes for Metastases. *Nat. Rev. Cancer* **2017**, *17* (5), 302–317.
8. Kaplan, R. N.; Riba, R. D.; Zacharoulis, S.; Bramley, A. H.; Vincent, L.; Costa, C.; MacDonald, D. D.; Jin, D. K.; Shido, K.; Kerns, S. A.; Zhu, Z.; Hicklin, D.; Wu, Y.; Port, J. L.; Altorki, N.; Port, E. R.; Ruggero, D.; Shmelkov, S. V.; Jensen, K. K.; Rafii, S.; Lyden, D. VEGFR1-Positive Haematopoietic Bone Marrow Progenitors Initiate the Pre-Metastatic Niche. *Nature* **2005**, *438* (7069), 820–827.
9. Ouzounova, M.; Lee, E.; Piranlioglu, R.; El Andaloussi, A.; Kolhe, R.; Demirci, M. F.; Marasco, D.; Asm, I.; Chadli, A.; Hassan, K. A.; Thangaraju, M.; Zhou, G.; Arbab, A. S.; Cowell, J. K.; Korkaya, H. Monocytic and Granulocytic Myeloid Derived Suppressor Cells Differentially Regulate Spatiotemporal Tumour Plasticity during Metastatic Cascade. *Nat. Commun.* **2017**, *8* (14979), 1–13.
10. Kondo, A.; Yamamoto, S.; Nakaki, R.; Shimamura, T.; Hamakubo, T.; Sakai, J.; Kodama, T.; Yoshida, T.; Aburatani, H.; Osawa, T. Extracellular Acidic PH Activates the Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 to Promote Tumor Progression. *Cell Rep.* **2017**, *18* (9), 2228–2242.
11. Sauvant, C.; Nowak, M.; Wirth, C.; Schneider, B.; Riemann, A.; Gekle, M.; Thews, O. Acidosis Induces Multi-Drug Resistance in Rat Prostate Cancer Cells (AT1) in Vitro and in Vivo by Increasing the Activity of the p-Glycoprotein via Activation of P38. *Int. J. Cancer* **2008**, *123* (11), 2532–2542.
12. Sutoo, S.; Maeda, T.; Suzuki, A.; Kato, Y. Adaptation to Chronic Acidic Extracellular PH Elicits a Sustained Increase in Lung Cancer Cell Invasion and Metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **2020**, *37* (1), 133–144.

13. Kato, Y.; Ozawa, S.; Miyamoto, C.; Maehata, Y.; Suzuki, A.; Maeda, T.; Baba, Y. Acidic Extracellular Microenvironment and Cancer. *Cancer Cell Int.* **2013**, *13* (1), 1–8.
14. Pickup, M. W.; Mouw, J. K.; Weaver, V. M. The Extracellular Matrix Modulates the Hallmarks of Cancer. *EMBO Rep.* **2014**, *15* (12), 1243–1253.
15. Yuan, L.; Tatineni, J.; Mahoney, K. M.; Freeman, G. J. VISTA: A Mediator of Quiescence and a Promising Target in Cancer Immunotherapy. *Trends Immunol.* **2021**, *42* (3), 209–227.
16. Jeon, H.; Ohaegbulam, K. C.; Abadi, Y. M.; Zang, X. B7x and Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment a Tale of Two Cities. *Oncoimmunology* **2013**, *2* (7), 1–3.
17. Elia, I.; Rossi, M.; Stegen, S.; Broekaert, D.; Doglioni, G.; van Gorsel, M.; Boon, R.; Escalona-Noguero, C.; Torrekens, S.; Verfaillie, C.; Verbeken, E.; Carmeliet, G.; Fendt, S. M. Breast Cancer Cells Rely on Environmental Pyruvate to Shape the Metastatic Niche. *Nature* **2019**, *568* (7750), 117–121.
18. Gong, Z.; Li, Q.; Shi, J.; Liu, E. T.; Shultz, L. D.; Ren, G. Lipid-Laden Lung Mesenchymal Cells Foster Breast Cancer Metastasis via Metabolic Reprogramming of Tumor Cells and Natural Killer Cells. *Cell Metab.* **2022**, *34* (12), 1960-1976.e9.
19. がん情報サービス「がん統計」(厚生労働省人口動態統計).
Cancer_mortality(1958-2022).
20. Kamata, A.; Hino, K.; Kamiyama, K.; Takasaka, Y. Very Late Recurrence in Breast Cancer: Is Breast Cancer a Chronic Disease? *Cureus* **2022**, *14* (3):e22804 ,1-6.
21. van Maaren, M. C.; de Munck, L.; Strobbe, L. J. A.; Sonke, G. S.; Westenend, P. J.; Smidt, M. L.; Poortmans, P. M. P.; Siesling, S. Ten-Year Recurrence Rates for Breast Cancer Subtypes in the Netherlands: A Large Population-Based Study. *Int. J. Cancer* **2019**, *144* (2), 263–272.
22. Lelekakis, M.; Moseley, J. M.; Martin, T. J.; Hards, D.; Williams, E.; Ho, P.; Lowen, D.; Javni, J.; Miller, F. R.; Slavin, J.; Anderson, R. L. A Novel Orthotopic Model of Breast Cancer Metastasis to Bone. *Clin. Exp. Metastasis* **1999**, *17* (2), 163–170.
23. Hongu, T.; Pein, M.; Insua-Rodríguez, J.; Gutjahr, E.; Mattavelli, G.; Meier, J.; Decker, K.; Descot, A.; Bozza, M.; Harbottle, R.; Trumpp, A.; Sinn, H. P.; Riedel, A.; Oskarsson, T. Perivascular Tenascin C Triggers Sequential Activation of Macrophages and Endothelial Cells to Generate a Pro-Metastatic Vascular Niche in the Lungs. *Nat. Cancer* **2022**, *3* (4), 486–504.
24. Altea-manzano, P.; Doglioni, G.; Liu, Y.; Cuadros, A. M.; Nolan, E.; Fernández-garcía, J.; Wu, Q.; Planque, M.; Laue, K. J.; Cidre-aranaz, F.; Liu, X.; Marin-bejar, O.; Elsen, J. Van; Broekaert, D.; Demeyer, S.; Spotbeen, X.; Idkowiak, J.; Richard, F.; Geukens, T.; Schepper, M. De; Leduc, S. A Palmitate-Rich Metastatic Niche Enables Metastasis Growth via P65 Acetylation Resulting in pro-Metastatic NF- κ B Signaling. *Nat Cancer* **2023**, *4* (3), 344–364.
25. Reshetnyak, Y. K.; Andreev, O. A.; Lehnert, U.; Engelman, D. M. Translocation of Molecules into Cells by PH-Dependent Insertion of a Transmembrane Helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (17), 6460–6465.
26. Weerakkody, D.; Moshnikova, A.; Thakur, M. S.; Moshnikova, V.; Daniels, J.; Engelman, D. M.; Andreev, O. A.; Reshetnyak, Y. K. Family of PH (Low) Insertion Peptides for Tumor Targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110* (15), 5834–5839.

27. Bauer, D.; Visca, H.; Weerakkody, A.; Carter, L. M.; Samuels, Z.; Kaminsky, S.; Andreev, O. A.; Reshetnyak, Y. K.; Lewis, J. S. PET Imaging of Acidic Tumor Environment With ⁸⁹Zr-Labeled PHLIP Probes. *Front. Oncol.* **2022**, *12* (882541), 1–13.
28. Eckhardt, B. L.; Parker, B. S.; Van Laar, R. K.; Restall, C. M.; Natoli, A. L.; Tavaría, M. D.; Stanley, K. L.; Sloan, E. K.; Moseley, J. M.; Anderson, R. L. Genomic Analysis of a Spontaneous Model of Breast Cancer Metastasis to Bone Reveals a Role for the Extracellular Matrix. *Mol. Cancer Res.* **2005**, *3* (1), 1–13.
29. Bolin, C.; Sutherland, C.; Tawara, K.; Moselhy, J.; Jorczyk, C. L. Novel Mouse Mammary Cell Lines for in Vivo Bioluminescence Imaging (BLI) of Bone Metastasis. *Biol. Proced. Online* **2012**, *14* (1), 1–10.
30. Kowanetz, M.; Wu, X.; Lee, J.; Tan, M.; Hagenbeek, T.; Qu, X.; Yu, L.; Ross, J.; Korsisaari, N.; Cao, T.; Bou-Reslan, H.; Kallop, D.; Weimer, R.; Ludlam, M. J. C.; Kaminker, J. S.; Modrusan, Z.; van Bruggen, N.; Peale, F. V.; Carano, R.; Meng, Y. G.; Ferrara, N. Granulocyte-Colony Stimulating Factor Promotes Lung Metastasis through Mobilization of Ly6G+Ly6C+ Granulocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107* (50), 21248–21255.
31. Thews, O.; Riemann, A. Tumor PH and Metastasis: A Malignant Process beyond Hypoxia. *Cancer Metastasis Rev.* **2019**, *38* (1–2), 113–129.
32. Zeng, Z.; Xu, S.; Wang, F.; Peng, X.; Zhang, W.; Zhan, Y.; Ding, Y.; Liu, Z.; Liang, L. HAO1-Mediated Oxalate Metabolism Promotes Lung Pre-Metastatic Niche Formation by Inducing Neutrophil Extracellular Traps. *Oncogene* **2022**, *41* (29), 3719–3731.
33. Dexter, D. L.; Kowalski, H. M.; Blazar, B. A.; Fligiel, Z.; Vogel, R.; Gloria, H.; Heppner, H. Heterogeneity of Tumor Cells from a Single Mouse Mammary Tumor. *Cancer Res.* **1978**, *38* (10), 3174–3181.
34. Yue, X.; Lukowski, J. K.; Weaver, E. M.; Skube, S. B.; Hummon, A. B. Quantitative Proteomic and Phosphoproteomic Comparison of 2D and 3D Colon Cancer Cell Culture Models. *J. Proteome Res.* **2016**, *15* (12), 4265–4276.
35. Adochite, R. C.; Moshnikova, A.; Carlin, S. D.; Guerrieri, R. A.; Andreev, O. A.; Lewis, J. S.; Reshetnyak, Y. K. Targeting Breast Tumors with PH (Low) Insertion Peptides. *Mol. Pharm.* **2014**, *11* (8), 2896–2905.
36. Brender, J. R.; Kishimoto, S.; Merkle, H.; Reed, G.; Hurd, R. E.; Chen, A. P.; Ardenkjaer-Larsen, J. H.; Munasinghe, J.; Saito, K.; Seki, T.; Oshima, N.; Yamamoto, K.; Choyke, P. L.; Mitchell, J.; Krishna, M. C. Dynamic Imaging of Glucose and Lactate Metabolism by ¹³C-MRS without Hyperpolarization. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 1–14.
37. Calcinotto, A.; Filipazzi, P.; Grioni, M.; Iero, M.; De Milito, A.; Ricupito, A.; Cova, A.; Canese, R.; Jachetti, E.; Rossetti, M.; Huber, V.; Parmiani, G.; Generoso, L.; Santinami, M.; Borghi, M.; Fais, S.; Bellone, M.; Rivoltini, L. Modulation of Microenvironment Acidity Reverses Anergy in Human and Murine Tumor-Infiltrating T Lymphocytes. *Cancer Res.* **2012**, *72* (11), 2746–2756.
38. Brand, A.; Singer, K.; Koehl, G. E.; Kowitz, M.; Schoenhammer, G.; Thiel, A.; Matos, C.; Bruss, C.; Klobuch, S.; Peter, K.; Kastenberger, M.; Bogdan, C.; Schleicher, U.; Mackensen, A.; Ullrich, E.; Fichtner-Feigl, S.; Kesselring, R.; Mack, M.; Ritter, U.; Schmid, M.; Blank, C.; Dettmer, K.; Oefner, P.

- J.; Hoffmann, P.; Walenta, S.; Geissler, E. K.; Pouyssegur, J.; Villunger, A.; Steven, A.; Seliger, B.; Schreml, S.; Haferkamp, S.; Kohl, E.; Karrer, S.; Berneburg, M.; Herr, W.; Mueller-Klieser, W.; Renner, K.; Kreutz, M. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab.* **2016**, *24* (5), 657–671.
39. Loeffler, D. A.; Paul, L.; Heppner, G. H. Natural Killer-Cell Activity Under Conditions Reflective of Tumor Micro-Environment. **1991**, *48*, 895–899.
40. Zhai, X.; Yang, Y.; Wan, J.; Zhu, R.; Wu, Y. Inhibition of LDH-A by Oxamate Induces G2/M Arrest, Apoptosis and Increases Radiosensitivity in Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Oncol. Rep.* **2013**, *30* (6), 2983–2991.
41. Christenson, J. L.; Williams, M. M.; Richer, J. K. The Underappreciated Role of Resident Epithelial Cell Populations in Metastatic Progression: Contributions of the Lung Alveolar Epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2022**, *323* (6), C1777–C1790.
42. Patel, U.; Susman, D.; Allan, A. L. Influence of Extracellular Vesicles on Lung Stromal Cells during Breast Cancer Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (11801), 1–21.
43. Théry, C.; Witwer, K. W.; Aikawa, E.; Alcaraz, M. J.; Anderson, J. D.; Andriantsitohaina, R.; Antoniou, A.; Arab, T.; Archer, F.; Atkin-Smith, G. K.; Ayre, D. C.; Bach, J. M.; Bachurski, D.; Baharvand, H.; Balaj, L.; Baldacchino, S.; Bauer, N. N.; Baxter, A. A.; Bebawy, M.; Beckham, C.; Bedina Zavec, A.; Benmoussa, A.; Berardi, A. C.; Bergese, P.; Bielska, E.; Blenkiron, C.; Bobis-Wozowicz, S.; Boilard, E.; Boireau, W.; Bongiovanni, A.; Borràs, F. E.; Bosch, S.; Boulanger, C. M.; Breakefield, X.; Breglio, A. M.; Brennan, M.; Brigstock, D. R.; Brisson, A.; Broekman, M. L. D.; Bromberg, J. F.; Bryl-Górecka, P.; Buch, S.; Buck, A. H.; Burger, D.; Busatto, S.; Buschmann, D.; Bussolati, B.; Buzás, E. I.; Byrd, J. B.; Camussi, G.; Carter, D. R. F.; Caruso, S.; Chamley, L. W.; Chang, Y. T.; Chaudhuri, A. D.; Chen, C.; Chen, S.; Cheng, L.; Chin, A. R.; Clayton, A.; Clerici, S. P.; Cocks, A.; Cocucci, E.; Coffey, R. J.; Cordeiro-da-Silva, A.; Couch, Y.; Coumans, F. A. W.; Coyle, B.; Crescitelli, R.; Criado, M. F.; D'Souza-Schorey, C.; Das, S.; de Candia, P.; De Santana, E. F.; De Wever, O.; del Portillo, H. A.; Demaret, T.; Deville, S.; Devitt, A.; Dhondt, B.; Di Vizio, D.; Dieterich, L. C.; Dolo, V.; Dominguez Rubio, A. P.; Dominici, M.; Dourado, M. R.; Driedonks, T. A. P.; Duarte, F. V.; Duncan, H. M.; Eichenberger, R. M.; Ekström, K.; EL Andaloussi, S.; Elie-Caille, C.; Erdbrügger, U.; Falcón-Pérez, J. M.; Fatima, F.; Fish, J. E.; Flores-Bellver, M.; Försönits, A.; Frelet-Barrand, A.; Fricke, F.; Fuhrmann, G.; Gabrielsson, S.; Gámez-Valero, A.; Gardiner, C.; Gärtner, K.; Gaudin, R.; Gho, Y. S.; Giebel, B.; Gilbert, C.; Gimona, M.; Giusti, I.; Goberdhan, D. C. I.; Görgens, A.; Gorski, S. M.; Greening, D. W.; Gross, J. C.; Gualerzi, A.; Gupta, G. N.; Gustafson, D.; Handberg, A.; Haraszti, R. A.; Harrison, P.; Hegyesi, H.; Hendrix, A.; Hill, A. F.; Hochberg, F. H.; Hoffmann, K. F.; Holder, B.; Holthofer, H.; Hosseinkhani, B.; Hu, G.; Huang, Y.; Huber, V.; Hunt, S.; Ibrahim, A. G. E.; Ikezu, T.; Inal, J. M.; Isin, M.; Ivanova, A.; Jackson, H. K.; Jacobsen, S.; Jay, S. M.; Jayachandran, M.; Jenster, G.; Jiang, L.; Johnson, S. M.; Jones, J. C.; Jong, A.; Jovanovic-Talisman, T.; Jung, S.; Kalluri, R.; Kano, S. ichi; Kaur, S.; Kawamura, Y.; Keller, E. T.; Khamari, D.; Khomyakova, E.; Khvorova, A.; Kierulf, P.; Kim, K. P.; Kislinger, T.; Klingeborn, M.; Klinker, D. J.; Kornek, M.; Kosanović, M. M.; Kovács, Á. F.; Krämer-Albers, E. M.; Krasemann, S.; Krause, M.; Kurochkin, I. V.; Kusuma, G. D.; Kuypers, S.; Laitinen, S.; Langevin, S. M.; Languino, L.

- R.; Lannigan, J.; Lässer, C.; Laurent, L. C.; Lavieu, G.; Lázaro-Ibáñez, E.; Le Lay, S.; Lee, M. S.; Lee, Y. X. F.; Lemos, D. S.; Lenassi, M.; Leszczynska, A.; Li, I. T. S.; Liao, K.; Libregts, S. F.; Ligeti, E.; Lim, R.; Lim, S. K.; Linē, A.; Linnemannstöns, K.; Llorente, A.; Lombard, C. A.; Lorenowicz, M. J.; Lörincz, Á. M.; Lötvall, J.; Lovett, J.; Lowry, M. C.; Loyer, X.; Lu, Q.; Lukomska, B.; Lunavat, T. R.; Maas, S. L. N.; Malhi, H.; Marcilla, A.; Mariani, J.; Mariscal, J.; Martens-Uzunova, E. S.; Martin-Jaular, L.; Martinez, M. C.; Martins, V. R.; Mathieu, M.; Mathivanan, S.; Maugeri, M.; McGinnis, L. K.; McVey, M. J.; Meckes, D. G.; Meehan, K. L.; Mertens, I.; Minciacchi, V. R.; Möller, A.; Møller Jørgensen, M.; Morales-Kastresana, A.; Morhayim, J.; Mullier, F.; Muraca, M.; Musante, L.; Mussack, V.; Muth, D. C.; Myburgh, K. H.; Najrana, T.; Nawaz, M.; Nazarenko, I.; Nejsun, P.; Neri, C.; Neri, T.; Nieuwland, R.; Nimrichter, L.; Nolan, J. P.; Nolte-'t Hoen, E. N. M.; Noren Hooten, N.; O'Driscoll, L.; O'Grady, T.; O'Loghlen, A.; Ochiya, T.; Olivier, M.; Ortiz, A.; Ortiz, L. A.; Osteikoetxea, X.; Ostegaard, O.; Ostrowski, M.; Park, J.; Pegtel, D. M.; Peinado, H.; Perut, F.; Pfaffl, M. W.; Phinney, D. G.; Pieters, B. C. H.; Pink, R. C.; Pisetsky, D. S.; Pogge von Strandmann, E.; Polakovicova, I.; Poon, I. K. H.; Powell, B. H.; Prada, I.; Pulliam, L.; Quesenberry, P.; Radeghieri, A.; Raffai, R. L.; Raimondo, S.; Rak, J.; Ramirez, M. I.; Raposo, G.; Rayyan, M. S.; Regev-Rudzki, N.; Ricklefs, F. L.; Robbins, P. D.; Roberts, D. D.; Rodrigues, S. C.; Rohde, E.; Rome, S.; Rouschop, K. M. A.; Rughetti, A.; Russell, A. E.; Saá, P.; Sahoo, S.; Salas-Huenuleo, E.; Sánchez, C.; Saugstad, J. A.; Saul, M. J.; Schiffelers, R. M.; Schneider, R.; Schøyen, T. H.; Scott, A.; Shahaj, E.; Sharma, S.; Shatnyeva, O.; Shekari, F.; Shelke, G. V.; Shetty, A. K.; Shiba, K.; Siljander, P. R. M.; Silva, A. M.; Skowronek, A.; Snyder, O. L.; Soares, R. P.; Sódar, B. W.; Soekmadji, C.; Sotillo, J.; Stahl, P. D.; Stoorvogel, W.; Stott, S. L.; Strasser, E. F.; Swift, S.; Tahara, H.; Tewari, M.; Timms, K.; Tiwari, S.; Tixeira, R.; Tkach, M.; Toh, W. S.; Tomasini, R.; Torrecilhas, A. C.; Tosar, J. P.; Toxavidis, V.; Urbanelli, L.; Vader, P.; van Balkom, B. W. M.; van der Grein, S. G.; Van Deun, J.; van Herwijnen, M. J. C.; Van Keuren-Jensen, K.; van Niel, G.; van Royen, M. E.; van Wijnen, A. J.; Vasconcelos, M. H.; Vechetti, I. J.; Veit, T. D.; Vella, L. J.; Velot, É.; Verweij, F. J.; Vestad, B.; Viñas, J. L.; Visnovitz, T.; Vukman, K. V.; Wahlgren, J.; Watson, D. C.; Wauben, M. H. M.; Weaver, A.; Webber, J. P.; Weber, V.; Wehman, A. M.; Weiss, D. J.; Welsh, J. A.; Wendt, S.; Wheelock, A. M.; Wiener, Z.; Witte, L.; Wolfram, J.; Xagorari, A.; Xander, P.; Xu, J.; Yan, X.; Yáñez-Mó, M.; Yin, H.; Yuana, Y.; Zappulli, V.; Zarubova, J.; Žékas, V.; Zhang, J. ye; Zhao, Z.; Zheng, L.; Zheutlin, A. R.; Zickler, A. M.; Zimmermann, P.; Zivkovic, A. M.; Zocco, D.; Zuba-Surma, E. K.
- Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 (MISEV2018): A Position Statement of the International Society for Extracellular Vesicles and Update of the MISEV2014 Guidelines. *J. Extracell. Vesicles* **2018**, *7* (1535750), 1–42.
44. Y., F. M.; Weiyang, Z.; L, L.; AY, A.; M, C.; J, A.; A, C.; ST, O.; S, L.; AR, C.; G., S. Breast Cancer-Secreted miR-122 Reprograms Glucose Metabolism in Pre-Metastatic Niche to Promote Metastasis. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17* (2), 183–194.
45. Tominaga, N.; Kosaka, N.; Ono, M.; Katsuda, T.; Yoshioka, Y.; Tamura, K.; Lötvall, J.; Nakagama, H.; Ochiya, T. Brain Metastatic Cancer Cells Release MicroRNA-181c-Containing Extracellular Vesicles Capable of Destructing Blood-Brain Barrier. *Nat. Commun.* **2015**, *6* (6716), 1–12.
46. Frawley, T.; Piskareva, O. Extracellular Vesicle Dissemination of Epidermal Growth Factor Receptor

- and Ligands and Its Role in Cancer Progression. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12* (11), 1–13.
47. Hurwitz, S. N.; Meckes, D. G. Extracellular Vesicle Integrins Distinguish Unique Cancers. *Proteomes* **2019**, *7* (14).
 48. Hoshino, A.; Costa-Silva, B.; Shen, T. L.; Rodrigues, G.; Hashimoto, A.; Tesic Mark, M.; Molina, H.; Kohsaka, S.; Di Giannatale, A.; Ceder, S.; Singh, S.; Williams, C.; Soplop, N.; Uryu, K.; Pharmed, L.; King, T.; Bojmar, L.; Davies, A. E.; Ararso, Y.; Zhang, T.; Zhang, H.; Hernandez, J.; Weiss, J. M.; Dumont-Cole, V. D.; Kramer, K.; Wexler, L. H.; Narendran, A.; Schwartz, G. K.; Healey, J. H.; Sandstrom, P.; Jørgen Labori, K.; Kure, E. H.; Grandgenett, P. M.; Hollingsworth, M. A.; De Sousa, M.; Kaur, S.; Jain, M.; Mallya, K.; Batra, S. K.; Jarnagin, W. R.; Brady, M. S.; Fodstad, O.; Muller, V.; Pantel, K.; Minn, A. J.; Bissell, M. J.; Garcia, B. A.; Kang, Y.; Rajasekhar, V. K.; Ghajar, C. M.; Matei, I.; Peinado, H.; Bromberg, J.; Lyden, D. Tumour Exosome Integrins Determine Organotropic Metastasis. *Nature* **2015**, *527* (7578), 329–335.
 49. Wen, S. W.; Sceneay, J.; Lima, L. G.; Wong, C. S. F.; Becker, M.; Krumeich, S.; Lobb, R. J.; Castillo, V.; Wong, K. N.; Ellis, S.; Parker, B. S.; Andreas, M. The Biodistribution and Immune Suppressive Effects of Breast Cancer – Derived Exosomes. **2016**, *76* (23), 6816–6828.
 50. Ghoroghi, S.; Mary, B.; Larnicol, A.; Asokan, N.; Klein, A.; Osmani, N.; Busnelli, I.; Delalande, F.; Paul, N.; Halary, S.; Gros, F.; Fouillen, L.; Haerberle, A. M.; Royer, C.; Spiegelhalter, C.; André-Grégoire, G.; Mittelheisser, V.; Detappe, A.; Murphy, K.; Timpson, P.; Carapito, R.; Blot-Chabaud, M.; Gavard, J.; Carapito, C.; Vitale, N.; Lefebvre, O.; Goetz, J. G.; Hyenne, V. Ral GTPases Promote Breast Cancer Metastasis by Controlling Biogenesis and Organ Targeting of Exosomes. *Elife* **2021**, *10*, 1–29.
 51. Toda, Y.; Takata, K.; Nakagawa, Y.; Kawakami, H.; Fujioka, S.; Kobayashi, K.; Hattori, Y.; Kitamura, Y.; Akaji, K.; Ashihara, E. Effective Internalization of U251-MG-Secreted Exosomes into Cancer Cells and Characterization of Their Lipid Components. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *456* (3), 768–773.
 52. Hasegawa, K.; Sato, A.; Tanimura, K.; Uemasu, K.; Hamakawa, Y.; Fuseya, Y.; Sato, S.; Muro, S.; Hirai, T. Fraction of MHCII and EpCAM Expression Characterizes Distal Lung Epithelial Cells for Alveolar Type 2 Cell Isolation. *Respir. Res.* **2017**, *18* (1), 1–13.
 53. Chen, Q.; Liu, Y. Isolation and Culture of Mouse Alveolar Type II Cells to Study Type II to Type I Cell Differentiation. *STAR Protoc.* **2021**, *2* (100241), 1-13.
 54. Chakarov, S.; Lim, H. Y.; Tan, L.; Lim, S. Y.; See, P.; Lum, J.; Zhang, X. M.; Foo, S.; Nakamizo, S.; Duan, K.; Kong, W. T.; Gentek, R.; Balachander, A.; Carbajo, D.; Bleriot, C.; Malleret, B.; Tam, J. K. C.; Baig, S.; Shabeer, M.; Toh, S. A. E. S.; Schlitzer, A.; Larbi, A.; Marichal, T.; Malissen, B.; Chen, J.; Poidinger, M.; Kabashima, K.; Bajenoff, M.; Ng, L. G.; Angeli, V.; Ginhoux, F. Two Distinct Interstitial Macrophage Populations Coexist across Tissues in Specific Subtissular Niches. *Science*. **2019**, *363* (6432).
 55. Hall, M. A.; Pinkston, K. L.; Wilganowski, N.; Robinson, H.; Ghosh, P.; Azhdarinia, A.; Vazquez-Arreguin, K.; Kolonin, A. M.; Harvey, B. R.; Sevic-Muraca, E. M. Comparison of MAbs Targeting Epithelial Cell Adhesion Molecule for the Detection of Prostate Cancer Lymph Node Metastases with Multimodal Contrast Agents: Quantitative Small-Animal PET/CT and NIRF. *J. Nucl. Med.* **2012**, *53* (9),

- 1427–1437.
56. Wan, L.; Xia, T.; Du, Y.; Liu, J.; Xie, Y.; Zhang, Y.; Guan, F.; Wu, J.; Wang, X.; Shi, C. Exosomes from Activated Hepatic Stellate Cells Contain GLUT1 and PKM2: A Role for Exosomes in Metabolic Switch of Liver Nonparenchymal Cells. *FASEB J.* **2019**, *33* (7), 8530–8542.
 57. Singer, B. D.; Mock, J. R.; D'Alessio, F. R.; Aggarwal, N. R.; Mandke, P.; Johnston, L.; Damarla, M. Flow-Cytometric Method for Simultaneous Analysis of Mouse Lung Epithelial, Endothelial, and Hematopoietic Lineage Cells. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **2016**, *310* (9), L796–L801.
 58. Kaushik, D. K.; Bhattacharya, A.; Mirzaei, R.; Rawji, K. S.; Ahn, Y.; Rho, J. M.; Yong, V. W. Enhanced Glycolytic Metabolism Supports Transmigration of Brain-Infiltrating Macrophages in Multiple Sclerosis. *J. Clin. Invest.* **2019**, *130* (8), 3277–3292.
 59. Agudelo, C. W.; Samaha, G.; Garcia-Arcos, I. Alveolar Lipids in Pulmonary Disease. A Review. *Lipids Health Dis.* **2020**, *19* (1), 1–21.
 60. Moshnikova, A.; DuPont, M.; Visca, H.; Engelman, D. M.; Andreev, O. A.; Reshetnyak, Y. K. Eradication of Tumors and Development of Anti-Cancer Immunity Using STINGa Targeted by PHLIP. *Front. Oncol.* **2022**, *12* (1023959), 1–16.
 61. Morrissey, S. M.; Zhang, F.; Ding, C.; Montoya-Durango, D. E.; Hu, X.; Yang, C.; Wang, Z.; Yuan, F.; Fox, M.; Zhang, H. ge; Guo, H.; Tieri, D.; Kong, M.; Watson, C. T.; Mitchell, R. A.; Zhang, X.; McMasters, K. M.; Huang, J.; Yan, J. Tumor-Derived Exosomes Drive Immunosuppressive Macrophages in a Pre-Metastatic Niche through Glycolytic Dominant Metabolic Reprogramming. *Cell Metab.* **2021**, *33* (10), 2040-2058.e10.
 62. Cencioni C, Comunanza V, Middonti E, Vallariello E, Bussolino F. The role of redox system in metastasis formation. *Angiogenesis.* **2021**, *24*(3), 435-450.
 63. Liu, Y.; Gu, Y.; Han, Y.; Zhang, Q.; Jiang, Z.; Zhang, X.; Huang, B.; Xu, X.; Zheng, J.; Cao, X. Tumor Exosomal RNAs Promote Lung Pre-Metastatic Niche Formation by Activating Alveolar Epithelial TLR3 to Recruit Neutrophils. *Cancer Cell* **2016**, *30* (2), 243–256.
 64. Castillo-Sánchez, J. C.; Cruz, A.; Pérez-Gil, J. Structural Hallmarks of Lung Surfactant: Lipid-Protein Interactions, Membrane Structure and Future Challenges. *Arch. Biochem. Biophys.* **2021**, *30* (703), 108850.
 65. Soni, S.; O'Dea, K. P.; Abe, E.; Khamdan, M.; Shah, S. V.; Sarathchandra, P.; Wilson, M. R.; Takata, M. Microvesicle-Mediated Communication Within the Alveolar Space: Mechanisms of Uptake by Epithelial Cells and Alveolar Macrophages. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 1–13.
 66. Wang, H.; Zheng, R.; Chen, Q.; Shao, J.; Yu, J.; Hu, S. Mesenchymal Stem Cells Microvesicles Stabilize Endothelial Barrier Function Partly Mediated by Hepatocyte Growth Factor (HGF). *Stem Cell Res. Ther.* **2017**, *8* (1), 1–10.
 67. Shimoda, M.; Khokha, R. Metalloproteinases in Extracellular Vesicles. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2017**, *1864* (11), 1989–2000.
 68. Sánchez, C. A.; Andahur, E. I.; Valenzuela, R.; Castellón, E. A.; Fullá, J. A.; Ramos, C. G.; Triviño, J. C. Exosomes from Bulk and Stem Cells from Human Prostate Cancer Have a Differential MicroRNA Content That Contributes Cooperatively over Local and Pre-Metastatic Niche. *Oncotarget* **2016**, *7* (4),

- 3993–4008.
69. Gangoda, L.; Liem, M.; Ang, C. S.; Keerthikumar, S.; Adda, C. G.; Parker, B. S.; Mathivanan, S. Proteomic Profiling of Exosomes Secreted by Breast Cancer Cells with Varying Metastatic Potential. *Proteomics* **2017**, *17*, 23–24.
 70. Merezhinskaya N, Ogunwuyi SA, Mullick FG, Fishbein WN. Presence and localization of three lactic acid transporters (MCT1, -2, and -4) in separated human granulocytes, lymphocytes, and monocytes. *J Histochem Cytochem.* **2004**, *52*(11), 1483-1493.
 71. Momen-heravi, F. Isolation of Extracellular Vesicles by Ultracentrifugation. *Springer Sci. Media LLC* **2017**, *1660*, 25–32.
 72. Ortiz, A.; Gui, J.; Zahedi, F.; Yu, P.; Cho, C.; Bhattacharya, S.; Carbone, C. J.; Yu, Q.; Katlinski, K. V.; Katlinskaya, Y. V.; Handa, S.; Haas, V.; Volk, S. W.; Brice, A. K.; Wals, K.; Matheson, N. J.; Antrobus, R.; Ludwig, S.; Whiteside, T. L.; Sander, C.; Tarhini, A. A.; Kirkwood, J. M.; Lehner, P. J.; Guo, W.; Rui, H.; Minn, A. J.; Koumenis, C.; Diehl, J. A.; Fuchs, S. Y. An Interferon-Driven Oxysterol-Based Defense against Tumor-Derived Extracellular Vesicles. *Cancer Cell* **2019**, *35* (1), 33-45.e6.
 73. Chu, G. C. Y.; Zhau, H. E.; Wang, R.; Rogatko, A.; Feng, X.; Zayzafoon, M.; Liu, Y.; Farach-Carson, M. C.; You, S.; Kim, J.; Freeman, M. R.; Chung, L. W. K. RANK-and c-Met-Mediated Signal Network Promotes Prostate Cancer Metastatic Colonization. *Endocr. Relat. Cancer* **2014**, *21* (2), 311–326.
 74. Smith, M. R.; Saad, F.; Coleman, R.; Shore, N.; Fizazi, K.; Tombal, B.; Miller, K.; Sieber, P.; Karsh, L.; Damião, R.; Tammela, T. L.; Egerdie, B.; Van Poppel, H.; Chin, J.; Morote, J.; Gómez-Veiga, F.; Borkowski, T.; Ye, Z.; Kupic, A.; Dansey, R.; Goessl, C. Denosumab and Bone-Metastasis-Free Survival in Men with Castration-Resistant Prostate Cancer: Results of a Phase 3, Randomised, Placebo-Controlled Trial. *Lancet* **2012**, *379* (9810), 39–46.
 75. Srivastava, K.; Hu, J.; Korn, C.; Savant, S.; Teichert, M.; Kapel, S. S.; Jugold, M.; Besemfelder, E.; Thomas, M.; Pasparakis, M.; Augustin, H. G. Postsurgical Adjuvant Tumor Therapy by Combining Anti-Angiopoietin-2 and Metronomic Chemotherapy Limits Metastatic Growth. *Cancer Cell* **2014**, *26* (6), 880–895.
 76. Ogawa, F.; Amano, H.; Eshima, K.; Ito, Y.; Matsui, Y.; Hosono, K.; Kitasato, H.; Iyoda, A.; Iwabuchi, K.; Kumagai, Y.; Satoh, Y.; Narumiya, S.; Majima, M. Prostanoid Induces Premetastatic Niche in Regional Lymph Nodes. *J. Clin. Invest.* **2014**, *124* (11), 4882–4894.
 77. Teijeira, Á.; Garasa, S.; Gato, M.; Alfaro, C.; Migueliz, I.; Cirella, A.; de Andrea, C.; Ochoa, M. C.; Otano, I.; Etxeberria, I.; Andueza, M. P.; Nieto, C. P.; Resano, L.; Azpilikueta, A.; Allegretti, M.; de Pizzol, M.; Ponz-Sarvisé, M.; Rouzaut, A.; Sanmamed, M. F.; Schalper, K.; Carleton, M.; Mellado, M.; Rodriguez-Ruiz, M. E.; Berraondo, P.; Perez-Gracia, J. L.; Melero, I. CXCR1 and CXCR2 Chemokine Receptor Agonists Produced by Tumors Induce Neutrophil Extracellular Traps That Interfere with Immune Cytotoxicity. *Immunity* **2020**, *52* (5), 856-871.e8.
 78. Rajamäki, K.; Nordström, T.; Nurmi, K.; Åkerman, K. E. O.; Kovanen, P. T.; Öörni, K.; Eklund, K. K. Extracellular Acidosis Is a Novel Danger Signal Alerting Innate Immunity via the NLRP3 Inflammasome. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288* (19), 13410–13419.
 79. Soto-Herederó, G.; Gómez de las Heras, M. M.; Gabandé-Rodríguez, E.; Oller, J.; Mittelbrunn, M.

- Glycolysis – a Key Player in the Inflammatory Response. *FEBS J.* **2020**, 287 (16), 3350–3369.
80. Deguchi, A.; Maru, Y. Inflammation-Associated Premetastatic Niche Formation. *Inflamm. Regen.* **2022**, 42 (22), 1-7.
 81. Chang, Q.; Bournazou, E.; Sansone, P.; Berishaj, M.; Gao, S. P.; Daly, L.; Wels, J.; Theilen, T.; Granitto, S.; Zhang, X.; Cotari, J.; Alpaugh, M. L.; de Stanchina, E.; Manova, K.; Li, M.; Bonafe, M.; Ceccarelli, C.; Taffurelli, M.; Santini, D.; Altan-Bonnet, G.; Kaplan, R.; Norton, L.; Nishimoto, N.; Huszar, D.; Lyden, D.; Bromberg, J. The IL-6/JAK/Stat3 Feed-Forward Loop Drives Tumorigenesis and Metastasis. *Neoplasia (United States)* **2013**, 15 (7), 848–862.
 82. Hiratsuka, S.; Watanabe, A.; Aburatani, H.; Maru, Y. Tumour-Mediated Upregulation of Chemoattractants and Recruitment of Myeloid Cells Predetermines Lung Metastasis. *Nat. Cell Biol.* **2006**, 8 (12), 1369–1375.
 83. Parker, K. H.; Sinha, P.; Horn, L. A.; Clements, V. K.; Yang, H.; Li, J.; Tracey, K. J.; Ostrand-Rosenberg, S. HMGB1 Enhances Immune Suppression by Facilitating the Differentiation and Suppressive Activity of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Res.* **2014**, 74 (20), 5723–5733.
 84. Masuda, K.; Ripley, B.; Nishimura, R.; Mino, T.; Takeuchi, O.; Shioi, G.; Kiyonari, H.; Kishimoto, T. Arid5a Controls IL-6 mRNA Stability, Which Contributes to Elevation of IL-6 Level in Vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, 110 (23), 9409–9414.