2025年度（第50回）学術研究振興資金　学術研究報告

| | | | |
|---|---|---|---|
| 学　校　名 | **金　沢　医　科　大　学** | 研究所名等 | |
| 研 究 課 題 | マクロファージによる腫瘍内鉄代謝機構の解明と<br>革新的がん治療法 | 研 究 分 野 | 医　　学 |
| キ ー ワ ー ド | ①腫瘍免疫、②マクロファージ、③RNA結合分子、④鉄代謝、⑤がん治療法 | | |

**〇研究代表者**

| 氏　　名 | 所　　属 | 職　　名 | 役　割　分　担 |
|---|---|---|---|
| 小　内　伸　幸 | 金沢医科大学医学部 | 教　　授 | 研究代表者　統括 |

**〇研究分担者**

| 氏　　名 | 所　　属 | 職　　名 | 役　割　分　担 |
|---|---|---|---|
| 小　泉　真　一 | 金沢医科大学医学部 | 助　　教 | 実験・データ整理・論文作成 |
| 小笠原　千絵 | 金沢医科大学医学部 | 助　　手 | 実験・データ整理 |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

# マクロファージによる腫瘍内鉄代謝機構の解明と革新的がん治療法

## 1. 研究の目的

がんは日本の死亡原因第1位であり、年間約100万人が罹患し37万人超が死亡する社会課題である。化学療法、分子標的薬、免疫チェックポイント阻害剤により治療は進歩したが、正常組織障害、適応患者の限定、耐性化、低い奏効率、免疫関連有害事象、高額な医療費などの限界が残る。特に免疫チェックポイント阻害剤はがん免疫応答を回復させる革新的治療である一方、奏効率は 20〜30%にとどまり、不応答性を規定する腫瘍微小環境の理解とその中で免疫抑制を担う腫瘍関連マクロファージ(Tumor associated macrophage)の制御解明が急務である。

腫瘍関連マクロファージ（TAM）は腫瘍内免疫細胞の中で大きな比率を占め、抗腫瘍T細胞応答の抑制、血管新生、線維化、転移前ニッチ形成を介して腫瘍進展に関与する。TAMに発現するCSF1R、CCR2、CD47/SIRPα、TREM2などを標的とするTAM制御研究は国際的に進展しているが、その多くはTAMの除去、遊走阻害、または表面分子制御を目的としている。一方で、TAMは腫瘍種や治療状況により腫瘍促進型にも腫瘍抑制型にも機能し得るため、一律な除去・阻害は抗腫瘍免疫を損なう危険がある。重要な未解決問題は、腫瘍微小環境に入ったマクロファージが、どのような細胞内機構により腫瘍促進性を維持・その機能を固定化するのかである。

RNA結合タンパク質poly(rC)-binding protein 1（PCBP1）は、mRNAの安定性、局在、翻訳効率を制御し、転写応答から様々な細胞機能を制御している。またPCBP1はRNA結合分子であると同時に鉄代謝制御にも関与するが、TAMにおけるPCBP1依存性の転写後制御機構はほとんど解明されていない。申請者は炎症性腸疾患マウスモデルにおいてPCBP1がマクロファージからのケモカインCCL2/CCL7および炎症性サイトカインTNF-α/IL-6産生を制御することを示しており、PCBP1がマクロファージ機能を規定する分子であるという独自の研究成果を発表している。そこで、本研究ではこの成果を発展させ、腫瘍微小環境におけるTAMの腫瘍促進性は外因性サイトカインやケモカイン刺激だけでなく、PCBP1を中心とする転写後制御ネットワークによって細胞内在的に固定化されるのか、またPCBP1の直接標的RNAは腫瘍免疫抑制、血管新生、腫瘍増殖をどのように制御するのかを解明し、新たながん免疫治療・診断の基盤を構築する。

## 2. 研究の計画

2025年度計画

### ① PCBP1欠損によるTAM機能と腫瘍進展の遺伝学的証明

*Pcbp1*$^{fl/fl}$マウスと*Cx3cr1*$^{creERT}$マウスを掛け合わしてマクロファージ特異的Pcbp1欠損マウス（*Pcbp1*$^{\Delta Cx3cr1}$マウス）を作製し、コントロールマウス(*Pcbp1*$^{fl/fl}$)と共にタモキシフェン投与する。その後、各種免疫細胞を純化し、mRNAを調整して定量的PCR法によってPCBP1遺伝子がマクロファージ特異的に欠損しているか確認する。確認後、コントロールマウスおよび*Pcbp1*$^{\Delta Cx3cr1}$マウスにB16-F10がん細胞株(2x10$^5$個)を皮下に投与し腫瘍体積を経時的に測定する。その後、腫瘍組織からCD45$^+$CD11b$^+$Ly6G$^-$CD64$^+$ F4/80$^+$細胞を腫瘍関連マクロファージ(TAM)として分取し、Pcbp1 mRNAおよびPCBP1タンパク質低下を確認する。さらに、MRC1/CD206、ARG1、PD-L1、MHCII、iNOS、SPP1、TREM2などの発現、TAM絶対数、腫瘍内分布をフローサイトメトリーおよび多重免疫染色で解析する。またTAMからの各種炎症性サイトカイン(TNFやIL-6など)や免疫細胞浸潤を制御するケモカイン(CCL2、CCL7など)産生量をqPCR法やELISA法にて検討する。各群8〜10匹を標準として独立実験を2回以上行う。

### ② PCBP1の標的RNA同定と腫瘍関連マクロファージ機能への影響の検討

コントロールマウスおよび*Pcbp1*$^{\Delta Cx3cr}$マウス由来のTAMから調整したmRNAを用いてRNA-seqを行い、PCBP1遺伝子欠損の結果、変化する遺伝子群を同定する。次に、両マウスのTAM由来mRNAと抗マウスPCBP1抗体を用いたRNA沈降-定量PCR(RIP-qPCR)によりPCBP1と直接結合するRNAを同定する。これらRNA-seqとRIP-qPCRの結果からPCBP1が腫瘍促進型TAMの機能を制御する候補分子mRNAを3〜5個に絞る。その後、候補分子mRNAを骨髄由来マクロファージに

おいて Cas9 RNP nucleofection によって除去し、腫瘍促進型遺伝子(Arg1、Il10、Mrc1)や腫瘍抑制型遺伝子(Nos2、Tnf、Il6)発現への影響を検証する。さらに *Pcbp1*$^{\Delta Cx3cr}$ マウス由来のマクロファージに PCBP1 をレンチウイルスベクターによって導入するレスキュー実験を行い、腫瘍促進型遺伝子や腫瘍抑制型遺伝子の発現を検討する。これらの実験によって PCBP1 による TAM 機能を決定する RNA 制御機構を解明し、がん治療創薬に繋がる新たな分子標的を検索する。

## 3. 研究の成果

① マクロファージ特異的 PCBP1 欠損マウスの作製

コントロールマウスおよび *Pcbp1*$^{\Delta Cx3cr}$ マウスの脾臓から、マクロファージ、単球、好中球、樹状細胞、T 細胞及び B 細胞をセルソーターよって純化し、mRNA を抽出し cDNA を合成後、PCBP1 の発現量を定量的 PCR によって検討した。その結果、マクロファージ特異的に PCBP1mRNA 発現が有意に減少し、他の細胞における発現にはほとんど影響はないことが確認できた。

② コントロールマウスおよび *Pcbp1*$^{\Delta Cx3cr}$ マウスの皮下に MC38 細胞を移植し、継時的に腫瘍の体積を測定した。この結果、投与後 18 日目から *Pcbp1*$^{\Delta Cx3cr}$ マウスではコントロールマウスと比較して著しい腫瘍の増殖抑制が認められた。また、*Pcbp1*$^{\Delta Cx3cr}$ マウスにおいて腫瘍がほとんど増殖しない個体も確認された。

③ コントロールマウスおよび *Pcbp1*$^{\Delta Cx3cr}$ マウスの腫瘍組織から腫瘍浸潤細胞を調整し、腫瘍関連マクロファージの細胞表面マーカー発現を FCM 解析によって検討した。この結果、CD11b$^{+}$F4/80$^{+}$Ly6c$^{int}$CD206$^{+}$の免疫抑制型マクロファージが著しく減少していることが確認できた。また、*Pcbp1*$^{\Delta Cx3cr}$マウスの腫瘍組織ではCD4$^{+}$T細胞、CD8$^{+}$T細胞及びB細胞の数が増加していることが確認できた。

## 4. 研究の反省・考察

本研究の成果によって、PCBP1 が腫瘍関連マクロファージの腫瘍抑制型機能を決定する細胞内マスター分子であることが示唆された。今後は Pcbp1ΔCx3cr マウスの腫瘍関連マクロファージにおける免疫チェックポイント分子(PDL1 や PDL2 等)の発現やサイトカイン産生能力と行った機能を解析する。また、同マウスの腫瘍浸潤 T 細胞のサイトカイン産生や抗腫瘍活性を検討する。

さらに、抗 PCBP1 抗体を用いた RNA 沈降-定量 PCR によって PCBP1 の標的 RNA と腫瘍関連マクロファージの機能維持機構を同定する。

## 5. 研究発表

(1)学会誌等

なし

(2)口頭発表

なし

(3)出版物

なし