

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07258

研究課題名(和文) 初期がん段階での根治を目指したがん免疫始動システムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the initiation system of cancer immunity

研究代表者

梶田 美穂子 (Kajita, Mihoko)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・日本学術振興会特別研究員

研究者番号：00607442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：現行のがん免疫療法のターゲットは多数の変異が蓄積した悪性腫瘍であり、高額な医療費や患者の精神的・身体的負担などが問題となっている。そのため、初期がんの治療やがん予防に繋がるような、初期もしくは前がん段階の知見の集積が急務である。一方、発がんの初期段階でがん免疫がどのように始動するのか、そのタイミングやメカニズム、さらにはがん免疫の始動に関わる免疫細胞等はわかっていない。本研究では、がん免疫を始動する細胞として組織常在性マクロファージに着目し、乳腺オルガノイドを利用した新しい実験系を確立して、組織常在性マクロファージが発がんの極めて初期に反応する免疫細胞であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで不明であった発がんのごく初期段階における免疫反応を解析し、組織常在性マクロファージが、がん免疫の始動を担う細胞であることを示唆するデータが得られた。さらに組織常在性マクロファージは、変異が蓄積する前の「前がん細胞」を正常細胞と見分けて貪食・排除していることもわかった。臨床においては、がんは早期治療できるかどうかはその後の患者の生存率に大きく影響している。本研究を通じて、発がんの初期段階に起こる現象が明らかになり、早期治療を可能にするようなマーカーの創出や、腫瘍を形成する前の「前がん細胞」の段階で排除するような新しいがん治療・がん予防に繋がるのが期待できる。

研究成果の概要(英文)：The target of current cancer immunotherapy is malignant tumors that have accumulated numerous mutations, which poses problems such as high medical costs and mental and physical burdens for patients. Therefore, there is an urgent need to accumulate knowledge in the early or precancerous stages that will lead to the early treatment of cancer or cancer prevention. On the other hand, it is not known how cancer immunity is activated in the early stage of carcinogenesis, its timing and mechanism, and the immune cells that initiate the cancer immunity. In this study, we focused on tissue-resident macrophages as cells that initiate cancer immunity and established a new experimental system using mammary gland organoids, and clarified that tissue-resident macrophages are immune cells that respond at the very early stage of carcinogenesis.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：乳がん オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤や CAR-T 療法などのがん免疫療法は目覚ましい成果を挙げている一方、そのターゲットはすでに多数の変異が蓄積した悪性腫瘍であり、患者の精神的・身体的負担も大きく、高額な医療費も問題となっている。さらにがんはごく初期の段階ですでに転移が始まっているという報告も相次いでおり（Harper et al., *Nature*, 2016; Hosseini et al., *Nature*, 2016, 他複数）、より早期のがん（前がん）細胞捕捉システムの構築が必須である。近年、悪性腫瘍が免疫系から逃れるシステムについては多くの知見が蓄積しているが、発がん過程の初期において、がん免疫がどのように始動するのか、そのタイミングやメカニズム、さらにがん免疫の始動に関わる免疫細胞等はわかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、日本人女性においてがん罹患率が第1位である乳がんをモデルシステムとしてがん免疫の始動に関わる免疫細胞を同定し、がん免疫がどのように始動するのか、そのメカニズムを解析する。さらに発がんの初期段階において、がん免疫の始動を人為的に操作することにより、前がん細胞を積極的に排除するような新しいがん治療（予防）に繋げることを目指す。

3. 研究の方法

当初は、野生型メスマウスの乳腺組織から調整した初代乳腺上皮細胞に各種がん遺伝子やがん抑制遺伝子のドミナントネガティブ変異体を導入して、少数の細胞を野生型メスマウスの mammary fat pad に同所移植することにより、がん免疫の始動する様子を解析するという予定であった。しかし、移植した乳腺上皮細胞がほとんど乳腺組織に残らず、思ったように免疫反応を追跡することができなかった。そこで生体内での生存に有利になるよう、乳腺オルガノイドを調整して、各種がん遺伝子やがん抑制遺伝子のドミナントネガティブ変異体をレトロウイルスにより導入し、種々の「前がんオルガノイド」を作成した。この前がんオルガノイドを野生型メスマウスの mammary fat pad に同所移植して、4日後～8日後の乳腺組織から免疫細胞を調整し、FACS や免疫組織染色によって解析した。しかしこちらの系でも、オルガノイドは乳腺組織に残るものの、その量は乳腺組織へ移植する微妙な手技の差によって大きく変動した。さらに、移植の際にオルガノイドを懸濁する matrigel によって前がんオルガノイドがコートされ、移植して数日間は、前がん細胞と免疫細胞との直接的な反応を追跡することができなかった。

以上の理由により、がん免疫の始動システムを解析するためには、発がんの初期段階に生じるような前がん細胞と、そのごく近傍に位置する免疫細胞との直接的な反応を可視化する必要があると考えた。そこで組織常在性マクロファージに着目した。組織常在性マクロファージ（以下、組織マクロファージ）は各組織に存在し、組織特異的な役割を担っている。例えば乳腺組織では、組織マクロファージが乳腺上皮組織に張り付くように存在し、乳腺幹細胞の維持や乳腺組織の形成に寄与している（Plaks et al., *Dev Cell*, 2015; Chakrabarti et al., *Science*, 2018）。がんが発生する初期の段階においては、このように上皮組織のごく近傍に存在する免疫細胞によって最初の免疫反応が誘導されている可能性が高い。実際、組織マクロファージは、1細胞程度の小さな傷に対して最初に反応し、炎症反応によるダメージを抑えているという報告もあり、組織における微小な異変を最初に察知する免疫細胞としての役割が注目されている（Uderhardt et al., *Cell*, 2019; Dawson et al., *Nat Cell Biol*, 2020）。一方、組織マクロファ-

ジは各組織に特化した役割を担うため、その機能を解析するには、マクロファージ研究で汎用される腹腔マクロファージや骨髄細胞由来マクロファージではなく、当該組織に存在する組織マクロファージを生体内と近い状態で解析することが重要になる。乳腺組織では、CX3CR1+組織マクロファージが2層の乳腺上皮組織（luminal 細胞と myoepithelial 細胞）の間に潜り込むあるいは張り付くように存在し、CX3CR1-GFP^{sfp/+}マウス由来の乳腺オルガノイドではGFP+細胞として可視化できる（Plaks et al., Dev Cell, 2015; Dawson et al., Nat Cell Biol, 2020）。我々はこのシステムを利用し、CX3CR1-GFP^{sfp/+}マウス由来の乳腺オルガノイドの構造を維持したまま、レンチウイルスによってがん原性変異を導入する方法を世界で初めて確立した（図1 A, B）。この新しい系を用いて、組織マクロファージと発がんの初期に生じるような前がん細胞との相互作用を *ex vivo* で解析した。

具体的な手法としては、まず CX3CR1-GFP^{sfp/+}マウスから mammary fat pad を採取し、ハサミで細分化した後にコラゲナーゼによって 37°C 30 分間処理した。次に、F12/DMEM 培地によって洗浄する過程で 5 秒間 1500 rpm で遠心して沈殿を回収することを 6 回以上繰り返し、乳腺組織だけを単離した。単離した乳腺組織に GFP+細胞が張り付いている様子を蛍光顕微鏡で確認し、乳腺組織にレンチウイルス液を添加して 37°C/5%CO₂ で反応させた。4 時間後、反応液からオルガノイドを回収し、マトリゲルに包埋して乳腺オルガノイド用培地を加え、2-3 日後にレンチウイルス由来の Tdtomato の蛍光を確認した（図 1 B）。この際、発がんの初期段階を模倣するため、乳腺組織全体に発現させるのではなく、上皮組織に散在的にウイルス由来遺伝子が発現するようにウイルスタイターを調整した。この乳腺オルガノイドについて、図 1 C に示す複数のがん原性遺伝子をそれぞれ導入し、タイムラプスや免疫蛍光染色によって、組織マクロファージと前がん細胞との相互作用を解析した。

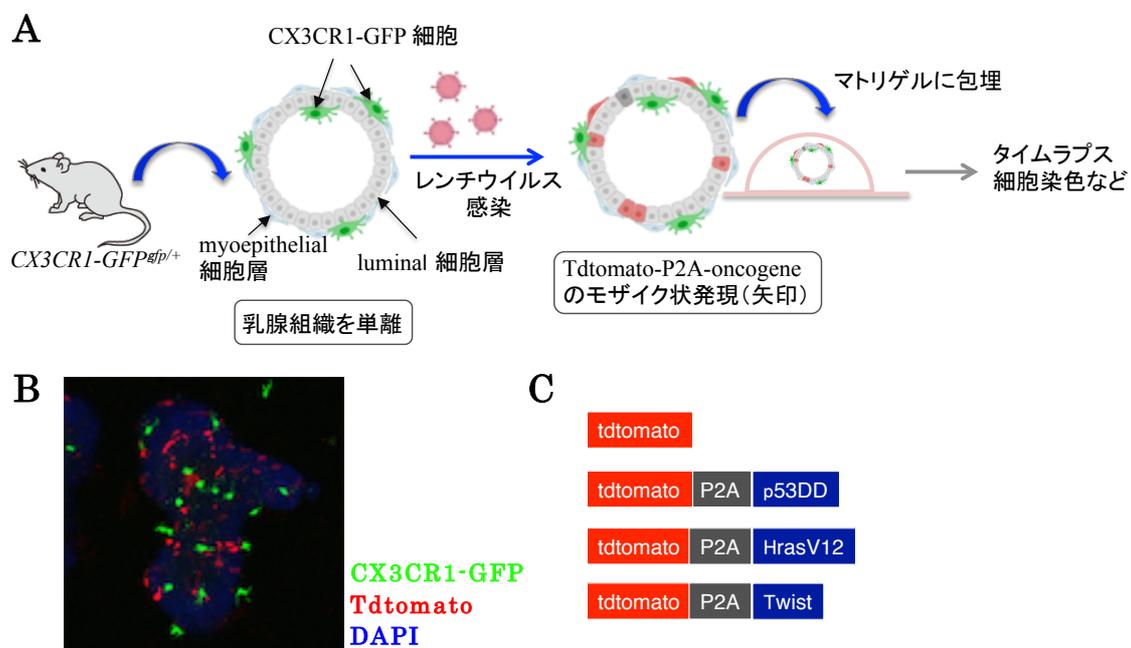


図 1. 乳腺オルガノイドを用いたがん免疫始動システムの解析

(A) 乳腺オルガノイドを用いた実験の流れ (B) CX3CR1-GFP^{sfp/+}マウス由来の乳腺オルガノイドにレンチウイルスで Tdtomato を導入してマトリゲルに包埋した様子。感染後 3 日目。生体由来の組織マクロファージ（緑色）とモザイク状に遺伝子を導入した細胞（赤色）との相互作用を解析することができる。スケールバー：100 μm (C) レンチウイルスにより導入される配列。P2A は self-cleaving 配列。蛍光タンパク質 Tdtomato とがん遺伝子が P2A の位置で切断されて、別々のタンパク質として発現する。

4. 研究成果

上述した通り、乳腺オルガノイドを用いて生体由来の組織常在性マクロファージと前がん細胞の相互作用を解析できる系を世界で初めて確立したことは、本研究の大きな成果である。つづいて、この乳腺オルガノイドが生体内の構造を維持しているのか調べた。乳腺組織は2層の上皮細胞層により形成されており、内側の Luminal 細胞層は Keratin 8、外側の Myoepithelial 細胞層は Keratin 14 をマーカーとして染色することができる (図 2A)。Tdtomato のみを発現するコントロールのレンチウイルスを乳腺オルガノイドに感染させて3日目に、オルガノイドを固定し、図 2B に示すように各マーカーで染色した。その結果、keratin-8 は乳腺オルガノイドの内側の層に染まり、keratin-14 は外側の層に染まっていた。また、Tdtomato は、K8+細胞と K14+細胞のどちらにも発現していた。以上の結果より、レンチウイルスを感染させた乳腺オルガノイドは、生体内の乳腺組織の構造を維持しており、またレンチウイルスは Luminal 細胞層と Myoepithelial 細胞層の両方に感染し得ることがわかった。一方、レンチウイルスは GFP+細胞には感染しておらず (20 個以上の乳腺オルガノイド上の 288 個の GFP+細胞を観察した結果、Tdtomato+細胞は 0 個であった)、細胞によるインフェクション効率の違いが示された。

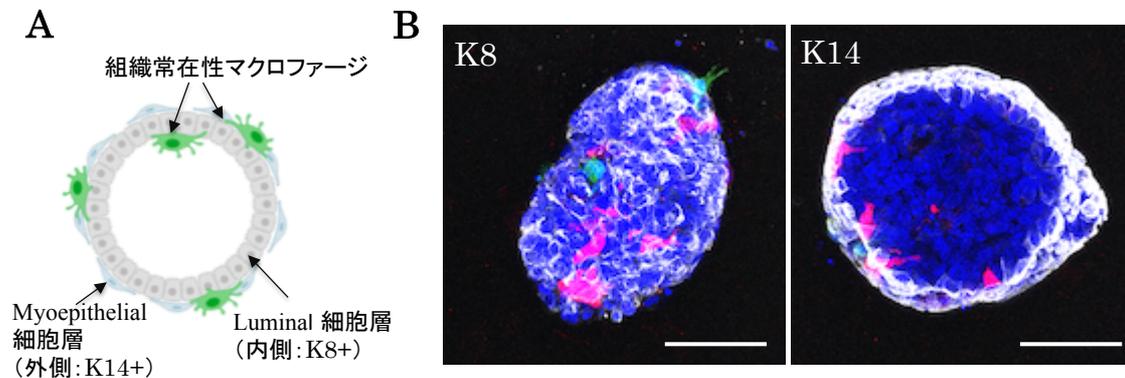


図 2. レンチウイルス感染後の乳腺オルガノイド構造

(A) 乳腺組織構造のモデル図。(B) レンチウイルス感染3日後の乳腺オルガノイドを keratin 8 (K8: 左図)もしくは keratin 14(K14: 右図)で免疫染色した共焦点顕微鏡像。緑色: CX3CR1-GFP(組織常在性マクロファージ), 赤色: Tdtomato, 白色: keratin 8 (左図) もしくは keratin 14 (右図)。スケールバー: 50 μm

続いて、図 1C の配列をレンチウイルスによって導入した各乳腺オルガノイドについて、タイムラプスにて継時的に解析した。まず、コントロールとなる Tdtomato だけを発現する乳腺上皮細胞について解析した結果、コントロール Tdtomato+細胞は組織常在性マクロファージによって貪食されたりアポトーシスを誘導されることはなく、レンチウイルスに感染しただけの細胞では、組織常在性マクロファージのターゲットにはならないことがわかった (図 3 上)。一方、HRasV12 を発現した細胞は、CX3CR1-GFP+で可視化される組織常在性マクロファージによって感知され、貪食されていた (図 3 下)。また、この感知には direct interaction が必要であり、HRasV12 細胞の細胞死には依存していないようであった。興味深いことに、HRasV12 以外の Twist や p53DD (ドミナントネガティブ変異体) 等の前がん細胞については組織マクロファージの反応はなく、がん原性変異の種類によって反応が異なることが示唆された。

以上の結果より、組織常在性マクロファージが、上皮組織層にモザイク状に生じた少数の前がん細胞に対して、その存在を感知し、貪食することによって排除することが明らかになった。このことは、組織常在性マクロファージががん免疫を始動する細胞として機能することを示唆しており、がん免疫の統合的理解にも繋がる非常に興味深い結果である。これまで、がんとマ

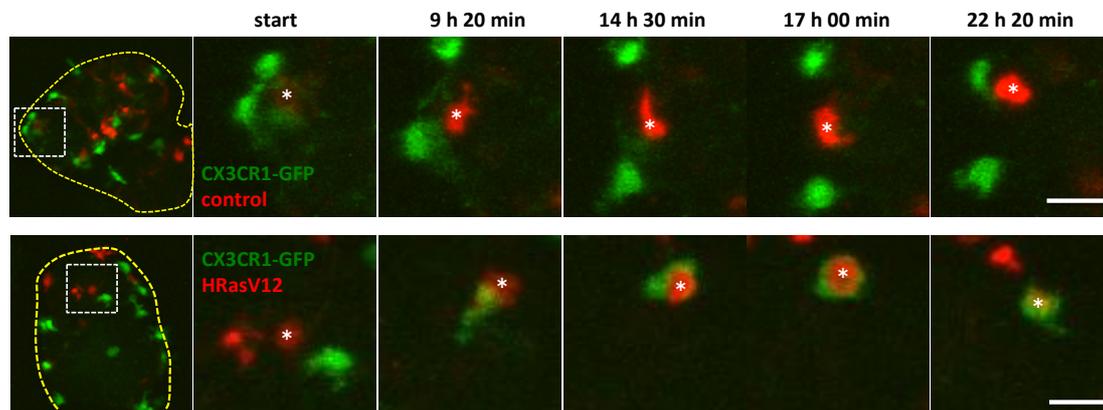


図 3. 組織常在性マクロファージによる前がん細胞の選択的な食食の様子

(上図) コントロールとして Tdtomato だけを導入した乳腺オルガノイド。(下図) HRasV12 を導入した乳腺オルガノイド。上下共に、左図における白色点線内の拡大図のタイムラプス像を示す。*は上下それぞれにスタート時から同じ細胞 (CX3CR1-GFP 細胞と接触したウイルス感染細胞) を示す。黄色点線はオルガノイドの輪郭を示す。時間はタイムラプススタートからの経過時間。ウイルス感染 3 日後からタイムラプススタート。スケールバー : 20 μm

クローファージの関係については多数の報告があるが (Franklin et al., Science, 2014; Georgoudaki et al., Cell Rep, 2016; Qiu et al., Cancer Treat Rev, 2018; Delprat et al., Sci Rep, 2020; 他多数)、そのほとんどががん (細胞株) と tumor-associated macrophage (TAM) や骨髄由来マクロファージとの相互作用を調べており、がんの初期における組織常在性マクロファージの役割をダイレクトに可視化した研究は、本研究が世界初である。さらに本研究では、生体内に近い状態である 3 次元オルガノイド培養に着目し、本来生体内では発見困難であった発がんの初期段階における前がん細胞と免疫細胞の相互作用を可視化することに成功している。今後は組織常在性マクロファージが、前がん細胞を認識するメカニズムや、前がん細胞を食食する現象ががんの予防に繋がるのか等を確認していくとともに、発がんの初期段階における前がん細胞の排除を人為的に促進できるような系の確立に繋げていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanayama Masashi, Izumi Yuta, Yamauchi Yasuharu, Kuroda Shoko, Shin Takaei, Ishikawa Shun, Sato Taku, Kajita Mihoko, Ohteki Toshiaki	4. 巻 136
2. 論文標題 CD86-based analysis enables observation of bona fide hematopoietic responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1144 ~ 1154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2020004923	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Taku, Sase Miwako, Ishikawa Shun, Kajita Mihoko, Asano Jumpei, Sato Toshiro, Mori Yoshiyuki, Ohteki Toshiaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Characterization of radioresistant epithelial stem cell heterogeneity in the damaged mouse intestine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8308
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-64987-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------