

平成30年5月28日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14608

研究課題名（和文）腫瘍丸ごとイメージングによる腫瘍微小環境の1細胞解析

研究課題名（英文）Cellular basis of tumor microenvironment in tumor-bearing mice

研究代表者

安永 桂一郎（Yasunaga, Kei-ichiro）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20534572

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腫瘍微小環境を形成する癌細胞、免疫細胞、血管網の細胞間相互作用を理解するために、組織透明化技術とイメージング技術を利用して、担癌マウスの解析を実施した。その結果、腫瘍内における制御性T細胞と血管網の空間的不均一性が詳細に解析され、不活化センダイウイルス粒子を用いた癌免疫治療依存的変化の可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we utilized imaging techniques and tissue clearing methods to address cellular interaction between cancer cells, immune cells, and blood vessels in the tumor microenvironment, and found the possibility that HVJ-E treatment affected the distribution of tumor vasculatures in mouse tumors.

研究分野：生物学

キーワード：腫瘍微小環境 癌 抗腫瘍免疫 血管 制御性T細胞 組織透明化 不活化センダイウイルス粒子 HVJ-E

1. 研究開始当初の背景

腫瘍は無秩序に増殖する腫瘍細胞だけでなく、それを取りまく複数種の細胞から形成される。腫瘍細胞の周辺細胞や細胞外分子は腫瘍微小環境と呼ばれ、腫瘍の増殖に重要と考えられている。腫瘍微小環境は主に癌関連線維芽細胞 (CAF)、免疫系細胞、血管網、そしてこれらの細胞により分泌される細胞外分子から形成される。腫瘍細胞と腫瘍微小環境の相互作用を理解することは、癌の特性解明および治療法の進歩に必須である。しかし、従来の標準的解析手法であるフローサイトメトリーでは、腫瘍の3次元的構造が破壊されてしまう。また、組織切片による解析では、腫瘍の一部から全体を推測する。どちらの手法をとっても、腫瘍微小環境の細胞構成を正確に理解することは困難である。顕微鏡技術の発達により大型標本を高解像度イメージング可能なライトシート顕微鏡が普及し、また、組織を破壊することなく深部のシグナルを拾うための組織透明化技術も高度に進化してきている。腫瘍内部で顕著に異なる腫瘍微小環境の全体像、さらに、腫瘍微小環境を形成する分子・細胞メカニズムには不明な点が多いが、これらの技術を適用することにより、組織破壊することなく生体内の腫瘍を1細胞レベルで観察、解析できる可能性がある。

研究代表者はこれまでに、正常発生を対象にした個体レベルの研究において成果を上げている。特に、ショウジョウバエ神経系の再編メカニズムに着目し、1細胞レベルの *in vivo* ライブイメージング法を確立した (Yasunaga et al., *Genes. Dev.* (2015) 29: 1763-1775, Yasunaga et al., *Dev. Cell* (2010) 18:621-632)。一方、研究代表者の所属する研究室は、マウス腫瘍モデルを利用して腫瘍細胞の特性の解明や不活化センダイウイルス粒子 (HVJ-E) による分子治療の発展に貢献してきた (Kurooka and Kaneda, *Cancer Res.* (2007) 67: 227-236, Matsushima-Miyagi et al., *Clinical Cancer Res.* (2012) 18: 6271-83, etc)。研究代表者は生体イメージングを腫瘍研究に組み込むことにより、従来法では十分な情報が得られなかった腫瘍微小環境の形成メカニズムに新たな知見を与えることができると考えている。

2. 研究の目的

本研究では、主として近年急速に発展した組織透明化技術、顕微鏡イメージングを免疫組織染色、薬理的解析と融合させることにより、腫瘍微小環境における細胞間相互作用の分子・細胞メカニズムを明らかにすることを目的とする。腫瘍を構成する主な細胞は腫瘍細胞であるが、その周辺で機能するCAF細胞、腫瘍特異的細胞傷害性T細胞、制御性T細胞、血管網などが腫瘍細胞の増殖、転移、治療効果に強く関与することが知られている。腫瘍細胞とこれら腫瘍細胞以外の細胞の役割および相互作用を解明することは、腫瘍の

特性を理解するうえで重要である。とりわけ、腫瘍微小環境を形成する細胞が腫瘍の中でどのように分布しているのか、また局所的な違いがどの程度存在するのかについて詳細な研究が望まれている。しかし、組織を破壊せずに腫瘍の内部をそのまま1細胞レベルで観察することは技術的に難しい。こうした問題に取り組むために、以下の2つの研究計画を実施する。

(1) 組織透明化技術とイメージングを駆使し、腫瘍微小環境の1細胞レベルイメージングシステムを確立する。さらにこのシステムを発展させ、(2) 腫瘍微小環境に対するHVJ-Eの役割を解明する。

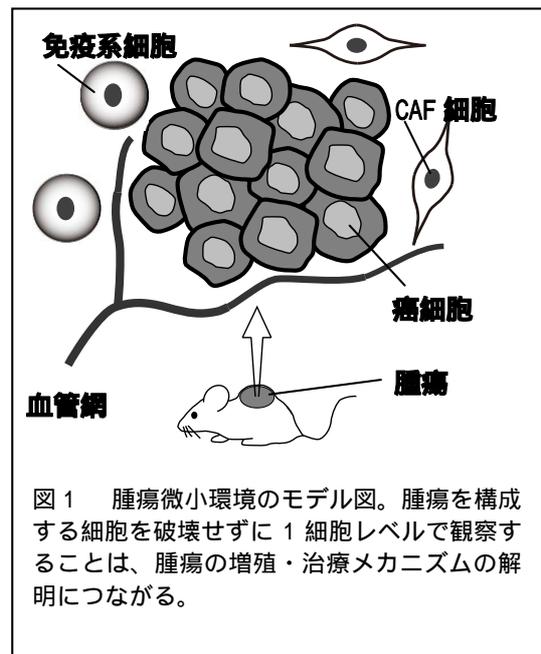


図1 腫瘍微小環境のモデル図。腫瘍を構成する細胞を破壊せずに1細胞レベルで観察することは、腫瘍の増殖・治療メカニズムの解明につながる。

3. 研究の方法

(1) 組織透明化技術に基づく腫瘍微小環境の1細胞レベルイメージングシステムの確立

腫瘍微小環境は主に癌関連線維芽細胞 (CAF)、免疫系細胞、血管網から構成される。多様なこれらの細胞群は腫瘍に積極的に動員され、腫瘍の増殖に顕著な役割を持つことが示されてきた。しかし、これらの細胞群の腫瘍内での分布は組織切片に基づき解析されることが多く、3次元的な全体像については不明である。本研究では、組織透明化技術と腫瘍全体の丸ごとイメージングを駆使することにより、腫瘍内で腫瘍微小環境を構成する種々の細胞群がどのように分布しているのかを明らかにする。

具体的には、癌細胞だけでなくCAF細胞、免疫系細胞、血管網の分布を可視化するために、皮下に形成させた大腸癌細胞株由来の腫瘍をCUBIC法を用いて透明化し、大型試料のイメージングに適したライトシート顕微鏡を使用して3次元データを取得し解析する。一方、腫瘍微小環境は腫瘍の増殖に応じ

て変化することが予想される。そこで、サイズの異なる腫瘍を同様の方法でイメージングし、腫瘍の増殖過程における腫瘍微小環境を形成する細胞の分布変化を明らかにする。並行して、同種自所性移植モデルマウスの解析をおこなう。このモデルでは、より生体環境に近い状態の腫瘍微小環境を再現可能である。これらのモデルでの組織透明化及びイメージングを実行する。効率的な深部イメージングのために、細胞特異的マーカー分子の転写を活性化するプロモータ配列制御下で蛍光タンパク質を発現するノックインマウスシステムを利用する。

(2) 腫瘍微小環境に対する HVJ-E の役割の解明

癌治療が十分な効果を発揮するためには、治療方法ごとに異なる作用メカニズムの正確な理解が必須である。研究代表者が所属する研究室のこれまでの研究から、不活化センダイウイルス粒子(HVJ-E)がメラノーマをはじめとする幾つかの腫瘍に対して非常に有望な治療方法であることが示されている(Tanemura et al., Cancer Gene Ther. (2013) 20: 599-605, etc.). HVJ-E をマウスの腫瘍内に注射すると、癌細胞が細胞死を起こすのみならず、免疫系細胞の腫瘍内浸潤も誘導される。しかし、HVJ-E が免疫系細胞を引き寄せる分子・細胞メカニズムは不明な点が多い。本研究では、HVJ-E を用いた治療において、「どのような」免疫系細胞が「どこに」分布するのかを明らかにするために、治療前後の腫瘍全体をイメージングする。

具体的には、大腸癌細胞をマウス皮下組織に接種し、長径 5-10mm の腫瘍を形成させる。その後、HVJ-E を腫瘍内注射し、一定期間の経過後に腫瘍を摘出して、組織透明化とイメージングをおこなう。また、治療初期と後期でサイズの異なる腫瘍をイメージングし、細胞分布の時間変化を解析する。特に、免疫系細胞の種類、分布、血管網の位置に注目する。すでに、HVJ-E による再現性の高い治療方法を発見しており、投与量、投与期間、回数を特定している(Kurooka and Kaneda, Cancer Res. (2007) 67: 227-236)。

4. 研究成果

(1) 組織透明化技術に基づく腫瘍微小環境の 1 細胞レベルイメージングシステムの確立

腫瘍内の細胞を高精度にイメージングする系を確立するために、CUBIC 法で効率的に組織透明化可能な担癌マウスモデルを探索した。そのために、癌細胞株に関するアプローチをおこなった。細胞種による透明化効率の違いについて検討するために、異なるマウス組織由来の癌細胞株を比較検討した。その結果、大腸癌細胞と肺癌細胞に由来する皮下腫瘍は、2 ミリメートル程度の深部まで蛍光シグナルを検出することができた。一方、乳

癌細胞を乳腺組織に移植した自所性モデルでは、数 100 マイクロメートル程度の蛍光シグナルを検出するにとどまった。この結果により、組織透明化技術を利用した効率的な深部イメージングには、大腸癌細胞株由来腫瘍と肺癌細胞株由来腫瘍が適していることが見いだされた。

次に、組織特異的に蛍光タンパク質を発現できるトランスジェニックマウスを利用して、マウス腫瘍内と周辺部における宿主細胞の分布様式と構造的な特徴を解析した。はじめに、腫瘍内とその周辺部に存在する宿主由来細胞を組織透明化技術の 1 つである CUBIC 法により効率的に観察することができると検討した。これを行うために、マウス全身の細胞が蛍光タンパク質 GFP を発現するトランスジェニックマウスを宿主として、マウス大腸癌細胞株を接種し腫瘍を形成させた。その結果、腫瘍内全体に渡って GFP(+) 細胞が検出された。これは宿主由来細胞が効率的に検出できることを示していた。観察画像を詳細に解析すると、細胞サイズの違いを判別できる程度の解像度を確認することができた。次に、特定の機能を有する細胞集団についての解析を実現するために、組織特異的に蛍光タンパク質を発現できるトランスジェニックマウスを使用した。近年、癌治療では免疫療法の発展が期待されているが、腫瘍内での種々の免疫細胞の 3 次元的情報とその空間的意義についてはほとんど分かっていなかった。本研究では、制御性 T 細胞が蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウスを使用し、腫瘍内の制御性 T 細胞の 3 次元分布を観察した。この実験から得られた情報は、腫瘍内での深部と辺縁といった空間的不均一性を詳細に示した。したがって、この観察系は、癌の免疫療法の効果に関係する制御性 T 細胞の動態を解析するために使用可能だと考えられる。

(2) 腫瘍微小環境に対する HVJ-E の役割の解明

癌免疫療法としての HVJ-E の腫瘍内投与が、腫瘍内血管系にどのような影響を及ぼすかを評価するために、血管細胞特異的に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニックマウスに大腸癌細胞株由来の皮下腫瘍を形成させた。その結果、HVJ-E 治療によって、腫瘍内血管の総延長が減少する傾向を見出した。一方で、腫瘍内血管のネットワークの複雑さや血管径には有意な違いが検出されなかった。これらの結果は HVJ-E による腫瘍縮小効果の一部が、血管網の減少によって担われている可能性を示唆している。今後、この可能性を追求することにより HVJ-E 癌免疫療法の改善につながることを期待される。

5．主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

該当なし

出願状況

該当なし

取得状況

該当なし

〔その他〕
ホームページ等

研究室ホームページ
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gts/>

6．研究組織

(1)研究代表者

安永 桂一郎 (YASUNAGA, Kei-ichiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20534572

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし