

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06225・19K21325

研究課題名（和文）腫瘍内浸潤リンパ球の遊走・活性化に関わる新規Gタンパク質共役型受容体の探索

研究課題名（英文）Exploration of novel G-protein coupled receptors involved in migration and activation of tumor-infiltrating lymphocytes

研究代表者

住田 隼一（SUMIDA, Hayakazu）

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30609706

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：癌細胞に対して細胞傷害活性を持つCD8陽性の腫瘍内浸潤リンパ球（Tumor-infiltrating lymphocyte;TIL）に注目した解析を実施し、継続している。本研究では、予備実験の結果からTILの浸潤や機能に重要と思われるGタンパク質共役型受容体や関連する分子に注目し、主にマウスを用いてその機能解析を実施している。本研究では、複数の細胞株を用いて実験を行っているため、得られた結果に癌種特異性がみられるかについても幅広く検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、抗PD-1抗体をはじめとする免疫チェックポイント阻害薬がメラノーマなど種々の癌に対して有効であることが明らかとなり、癌病態における免疫細胞、特に腫瘍内浸潤リンパ球（TIL）の役割が注目されている。腫瘍免疫におけるTILの重要性はこれまでの知見から明らかであるが、TILが腫瘍内に浸潤するメカニズム、さらには、活性化の制御機構等について、わかっていないことが多い。そこで、本研究により詳細な機序を明らかにし、結果を新規治療開発に応用することができれば、将来、抗腫瘍効果をもつ免疫細胞の腫瘍への集積性改善や治療効果の向上につながることを期待され、その社会的意義は大きいと予想される。

研究成果の概要（英文）：This research project has focused on the CD8-positive tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) with cytotoxic activity against cancer cells. In particular, some novel G-protein coupled receptors were considered to be involved in the infiltration and function of TILs based on preliminary experiments. Mice and several kinds of cancer cell lines were used for this project. Therefore, we not only examined the detailed mechanism but also planned to analyze cancer type specificity in this project.

研究分野：皮膚科学

キーワード：腫瘍内浸潤リンパ球 Gタンパク質共役型受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫(メラノーマ)をはじめとする一部の悪性腫瘍は未だ予後不良であり、新たな薬剤の開発・承認が望まれている。近年、免疫チェックポイント阻害薬等の登場と適応拡大により、癌病態における免疫担当細胞の役割、中でも腫瘍内浸潤リンパ球(Tumor-infiltrating lymphocyte;TIL)の重要性が注目されている。特に、癌細胞に対して細胞障害活性を持つ CD8 陽性 Cytotoxic T lymphocyte(CTL)は、中心的役割を担っている。しかしながら、CD8 陽性 TIL がどのように腫瘍細胞内へ homing, recruit されるかについては、詳しいことはわかっていない。特に、皮膚科領域において、TIL の腫瘍組織(特に悪性黒色腫や皮膚リンパ腫など)への homing に関しては、これまで、CXCL9 や CXCL10 など少数の報告があるものの、不明な点が多い。研究代表者は、これまで、皮膚や腸管といったバリア免疫臓器において、様々な G タンパク質共役型受容体(GPCR)が免疫細胞の動態や機能に重要であることを論文報告してきた。そこで、TIL においても、多くの GPCR がその homing や局所での dynamics に関与している可能性が高いと考えるに至った。

2. 研究の目的

TIL の腫瘍への遊走や機能に関わる新規 GPCR の探索とその詳細なメカニズムの解明を目的とした。また、受容体のみならず、リガンドや関連分子にも注目して、それらの癌免疫における役割について包括的に理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

実験に用いる癌細胞としては、野生型(C57BL/6)マウス由来のメラノーマ細胞株 B16 や T 細胞リンパ腫細胞株 EL-4 などを用いた。培養した細胞は、以下に述べるような発現解析、遊走実験や増殖実験といった機能解析に用い、さらには、マウス皮下への移植実験にも用いた。

(2) マウス皮膚での腫瘍形成実験

B16 細胞(マウスあたり 1×10^6 個)や EL-4 細胞(マウスあたり 1×10^7 個)を麻酔下にマウス腹部皮膚に皮下注射し、継時的に観察し、癌病巣部の大きさの測定やサンプリングを行い解析に用いた。

(3) 定量 PCR

採取した腫瘍を液体窒素により凍結し、ホモジナイズした後、QIAGEN RNeasy Tissue Kit (QIAGEN)を用いて RNA を抽出した。得られた RNA を逆転写し、cDNA を調整した。合成した cDNA に SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)を加えて定量 PCR を行った。GAPDH 等の housekeeping gene を用いて mRNA の標準化を行った。

(4) 組織学的評価

B16 細胞あるいは EL-4 細胞を接種し、継時的にサンプリングしたマウスの皮膚を 10%ホルマリオンで固定し、パラフィン包埋の後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。また、凍結切片を作成して、VECTASTAIN ABC Kit (Vector Laboratories)や各種抗体を用いて免疫組織学的検討も行った。

(5) フローサイトメトリー

得られた腫瘍組織を Digestion enzyme(コラゲナーゼ)による酵素処理などを行い、細胞を単離後、フローサイトメトリーにて解析し、CD3 ϵ +CD8+にて CD8 陽性 T 細胞の同定・確認を行った。T 細胞受容体や PD-1 についても同時に染色した。注目する GPCR につき特異的抗体があれば、抗

体染色にて発現を確認、ないものについては、CD8陽性T細胞をMagnetic beadsやsortingなどで単離、定量PCRによるmRNA発現量の定量を行った。

(6) 機能解析

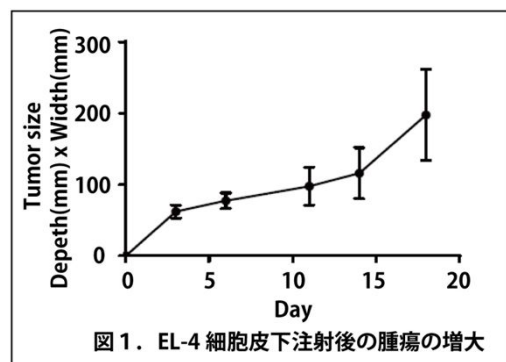
注目する分子のつき、欠損マウスや阻害剤を用いて、腫瘍細胞投与後の腫瘍形成・サイズを比較した。組織学的検討により、浸潤するCD8陽性T細胞数に差がみられた場合はTranswell assay(遊走実験)、抗Ki-67抗体による染色(増殖実験)等の一部実施、あるいは、現在追加で計画中である。また、フローサイトメトリーにより、PD-1の発現量やIFN γ の産生量などについても比較検討を行う。

(7) 今後の検討課題

包括的に機序を検討するために、腫瘍組織中のリガンド量やその産生酵素などについて調べることは重要であるために、腫瘍組織破砕サンプル中のリガンド量をELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)法、あるいは、質量分析法により確認することを今後の検討課題としている。リガンド産生細胞については、腫瘍細胞に加え、樹状細胞等の浸潤免疫細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞も候補となる。抗体があれば組織染色やフローサイトメトリーによる解析、なければ、単離後に上記同様、定量PCRを実施し、酵素のmRNA発現量を比較検討し、発現の局在などについて検討を行う予定である。

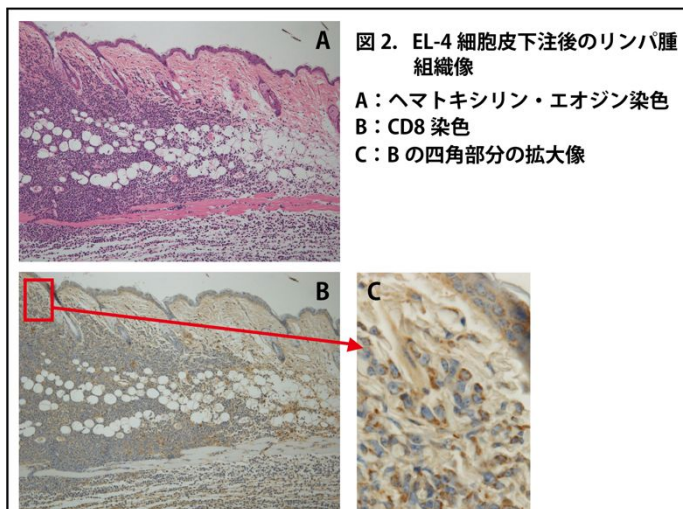
4. 研究成果

マウスメラノーマ細胞株B16あるいはマウスT細胞リンパ腫細胞株EL-4をレシピエントマウスの皮下に接種し、腫瘍の形成・増大を確認した。接種後、経時的に腫瘍が増大することが確認できた。例としてEL-4の時系列の腫瘍形成の結果を図1に示す(図1)。また、マウスから腫瘍を切除し、Digestion enzyme等による酵素処理などを行い、細胞を単離後、フローサイトメトリーにて解析し、



CD3 ϵ +CD8+(EL-4の場合はCD45.1+も追加)にて腫瘍内に浸潤したレシピエント由来のCD8陽性T細胞の同定・確認した。注目するGPCRにつき特異的抗体があるものについては、抗体染色にて発現を確認、ないものについては、CD8陽性T細胞をMagnetic beadsやsortingなどで単離、定量PCRによるmRNA発現量の定量を試みた。さらに、腫瘍組織の免疫組織染色により、CD8陽性T細胞のpositioningについても検討を行った。具体例として、EL-4で行った実験結果について、その組織染色結果の一例を図2に示す(図2)。

皮下に増殖するリンパ腫細胞を組織学的に同定でき(図2A)、また、腫瘍内あるいは周辺にCD8陽性のT細胞が多数存在することが確認できる(図2BC)。注目すべき分子については、ノックアウト(KO)マウスが得られるものについては野生型とKOマウスに細胞株を皮下投与、阻害剤のあるものは野生型に阻害剤を投与し、上記同様、その腫瘍形成・



サイズを比較し、組織学的評価なども追加した。また、B16やEL-4の結果を比較することで、得られた結果の癌の種類による特異性についても検討を実施あるいは今後追加検討を予定している。詳細なメカニズムについて、遊走実験、増殖実験等、*in vitro*、*ex vivo*による解析を実施あるいは今後計画を検討している。今後、追加で予定している実験の結果なども踏まえ、包括的な解釈を行った上で、詳細を報告できれば良いと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----