

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22661

研究課題名（和文）がん免疫成立の場の力学制御を可能にするリンパ節オルガノイドの創出

研究課題名（英文）Creation of lymph node organoids enabling mechanical control of immunity

研究代表者

清木 誠（Seiki, Makoto）

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50226619

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：がん免疫成立の場としてリンパ節は、中心的な役割を担う。私たちが見出したYAPメカノホメオスタシスによる場の力学的制御の視点から、がん免疫を賦活できるリンパ節オルガノイドを創出するために、(1)リンパ節の場、すなわち細胞外マトリクスの力学特性を測定する方法を樹立し、(2)リンパ節では、細胞外基質を産生するfibroblastic reticular cellでYAPが活性化していることを明らかにした。現在、(3)血管を導入するために、あらかじめ人工血管を導入した組織工学の技術を導入して、リンパ節オルガノイドの作成を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント療法の限定的な効果は、がん免疫成立の場が十分に考慮されていないことが一因である。リンパ節はがん転移により腫脹・硬化し力学特性が変化し、免疫機能が低下する。私たちが見出した転写因子YAPによる場の力学制御機構(Polazinski et al., Nature 2015)の観点から、リンパ節の力学特性を制御による、がん免疫機能賦活化療法開発の着想を得た。本研究による、生体での力学特性測定、その力学特性によるYAP活性化と力学場制御機構の同定、人工血管導入技術を用いたリンパ節オルガノイド作製基盤樹立は、学術的・社会的意義が高いと考える。

研究成果の概要（英文）：The lymph node plays a central role for inducing anti-cancer immunity. The limited effects of current immune-checkpoint therapy is partly due to the lack of understanding mechanical properties of the lymph nodes. To develop a lymph node organoid that induces more potent anti-cancer immunity, (1) we established the methods to measure mechanical properties of the lymph node, (2) we found that YAP is activated in fibroblastic reticular cells that produce matrix proteins in lymph nodes and (3) we are now developing a new lymph node organoid by introducing tissue engineered blood vessels and controlling tissue mechanical properties.

研究分野：メカノバイオロジー

キーワード：リンパ節 免疫チェックポイント療法 がん免疫 YAP 力学特性

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤は、がん微小環境における T リンパ球の抑制を解除することで抗腫瘍活性を促す。しかし、悪性黒色腫でも 80%の患者には効果が無く、ほとんど効果の無いがんもある。腫瘍浸潤 T リンパ球を用いた細胞免疫治療も大半の症例では効果が限定的である (Tran *et al*, *N Engl J Med* 2016)。

最近、がん免疫成立の場として、リンパ節が中心的な役割を担うことが明らかとなった (Spitzer, Cell, 2017)。現在の細胞免疫治療での限定的な効果は、がん免疫成立の場が十分に考慮されていないことも一因だと考えられる。免疫成立の場として、マトリクスと免疫細胞を用いて作製したリンパ節様組織で強い免疫反応を惹起できることが示されているが (Suematsu, *Nat. Biotech.*, 2004)、腎皮膜下移植のため、場の力学制御など多くの課題が残っている。

2. 研究の目的

私たちは、場の“力学的”制御が機能を持った 3 次元臓器構築に必須であることを見出し、YAP-メカノホメオスタシスと名付けた (Porazinski *et al.*, *Nature* 2015)。最近、リンパ節形成にも力学制御が重要であることが示された (Bovay *et al.*, *J.E.M.*, 2018)。そこで、免疫成立の場の力学的制御によるがん免疫制御という着想を得た。独自の場の力学的制御の視点からがん免疫治療のためのリンパ節オルガノイドを創出することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

渡邊らによるリンパ節様の組織は、コラーゲンゲルを用い腎皮膜下に移植して作製されたため (Suematsu, *Nat. Biotech.*, 2004)、場の制御ができないだけでなく、がん細胞の浸潤により場の硬化が起こると免疫能の低下が想定される。そこで、人工マトリクスを用いて場の力学的操作を可能とし、体外で観察・維持するためにマイクロデバイスを用いて生体とつなぐとの着想を得た。

(1) 独自に見出した 3 次元臓器形成原理の活用

私たちは、3 次元臓器形成原理において、組織の中でも細胞外環境 (マトリクス) の力学特性の制御が重要であることを見出した (投稿準備中)。そこで、

- ① 生体で、マトリクスの力学特性を測定できる唯一の方法である磁性流体の液滴注入法 (Câmpas *et al.*, *Nat. Methods* 2014) を樹立した。
- ② ①で得られる力学特性を持つマトリクスを用いてリンパ節の力学特性を再現する。これにより、YAP-メカノホメオスタシスを再現して自己組織化能を促進し臓器形成が起こると考えられる (Gjorevski, *et al.*, *Nature*, 2017)。

(2) リンパ節での YAP 活性化細胞の同定

リンパ節での YAP メカノホメオスタシスの状態を明らかにするため、マウスリンパ節の YAP 免疫染色を行った。

(3) 自己組織化の促進によるオルガノイド作製

iPS 細胞からの眼杯オルガノイドの作出では、臓器形成の 3 つの基本条件を与えて自己組織化 (自発的な細胞分化と組織構築) を誘発した (Eiraku *et al.*, *Nature* 2011)。そこで、リンパ節の自己組織化能を促進する基本条件として、発生足場となる血管、リンパ管叢をマイ

クロデバイス上に作製し、リンパ節オーガナイザーであるストローマ細胞 (LT₀) 細胞 (Suematsu, *Nat. Biotech.*, 2004)を用いる。リンパ節原基誘導細胞 (LT_i) は ROR γ mat-GFP マウスより精製 (Eberl *et al.*, *Nat. Immunol.*, 2003)。マトリクスも自己組織化を促進する。これらの細胞群とデザイナーマトリクスを混合してマイクロデバイス上の血管・リンパ管叢に上層しオルガノイドを作製する。

(4) 抗がん免疫能検定系の樹立

作製したマウスリンパ節オルガノイドの抗がん免疫能を評価するために、腭がん発症マウスモデルから腭がんオルガノイドを作製した。この腭がんオルガノイド細胞への殺傷機能で評価を行う。

4. 研究成果

(1) 独自に見出した3次元臓器形成原理の活用

① 磁性流体の液滴注入法 (Càmpas *et al.*, *Nat. Methods* 2014) を樹立した(図1)。マウス腸オルガノイドを用いて、その ECM(図1上左図:赤枠)に磁性流体の液滴を注入した。液滴に磁場をかけ、その後磁場を除き、液滴の変形度の時間経過を記録し(図1下図)、その結果から ECM の粘性と弾性を算出する計測系を確立した。

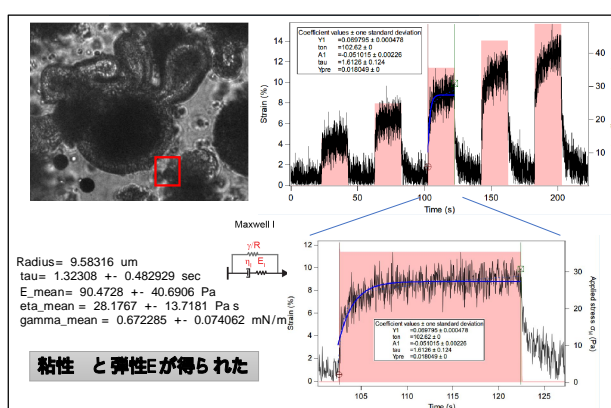


図1 磁性流体油滴を用いた生体での ECM 力学特性の測定法の確立

② での測定結果に合うデザイナーマトリクスを当初用いる予定であった。しかし、マトリゲルとコラーゲン混合マトリクスによる硬さを合わせて用いることができることから、後者を用いてリンパ節オルガノイドの作製を進めている。

(2)リンパ節での YAP 活性化細胞の同定

マウスリンパ節の YAP 免疫染色により、fibroblastic reticular cellでの活性化が見出された。fibroblastic reticular cell は、細胞外基質を産生することから、fibroblastic reticular cell は、マウスリンパ節の力学を感知して YAP を活性化し細胞外基質を産生することで、力学場を制御する可能性が高いと考えられた(図2)。

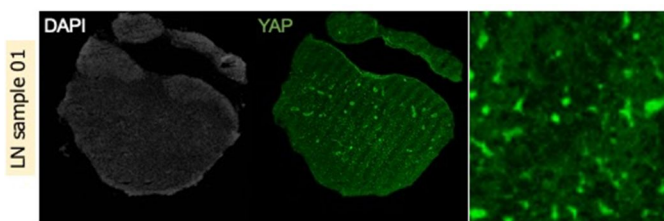


図2 リンパ節での YAP 免疫染色: fibrotic reticular cell で YAP は核移行し活性化している。

(3) 自己組織化の促進によるオルガノイド作製

発生の足場となる血管、リンパ管叢を作製するため、共同研究者から組織工学による人工血管を持つマイクロデバイスを用いた。

リンパ節細胞として、当初の計画を変更して、ヒト扁桃腺手術標本を用いている。

マトリクスとして(1)で同定した硬さを持つマトリゲルとコラーゲン混合マトリクスを用いた。

以上の方法を用いて、現在、ヒト及びマウスのリンパ節オルガノイドの作製を進めている。

(4) 抗がん免疫活性検定系の樹立

作製したマウスリンパ節オルガノイドの抗がん免疫能を評価するために、膵がん発症 KPC マウスモデル KPC (*LSL-Kras^{G12D/+}; Trp53^{fllox/+}; Pdx1-Cre*) の末梢血と膵がんオルガノイドとを共培養系を

確立した(図

3)。

CD8+T

リンパ球が

増殖し活性化

マーカー

CD69 が増

加した。本

検定系を用

いて、リン

パ節オルガ

ノイドで誘

導されるリン

パ球のがん

細胞殺傷能

力を検定す

る。

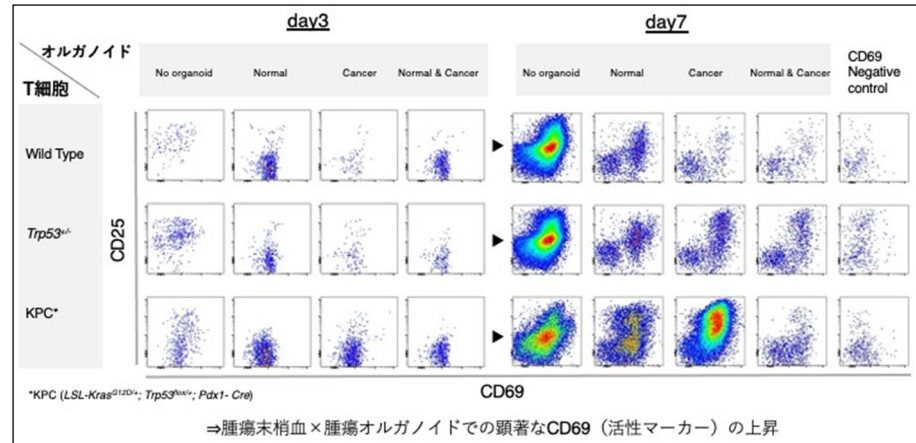


図3 膵がんオルガノイドを用いた抗がん免疫活性検定系の確立。リンパ節オルガノイドの免疫細胞を用いて、膵がん細胞の殺傷能を計測できる。

導されるリンパ球のがん細胞殺傷能力を検定する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asaoka Yoichi, Morita Hitoshi, Furumoto Hiroko, Heisenberg Carl-Philipp, Furutani-Seiki Makoto	4. 巻 1893
2. 論文標題 Studying YAP-Mediated 3D Morphogenesis Using Fish Embryos and Human Spheroids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol	6. 最初と最後の頁 167 ~ 181
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8910-2_14	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Shimizu Kosuke, Matsumoto Hiroaki, Hirata Hiroshi, Ueno Koji, Samoto Masahiro, Mori Junichi, Fujii Nakanori, Kawai Yoshihisa, Inoue Ryo, Yamamoto Yoshiaki, Yano Seiji, Shimabukuro Tomoyuki, Furutani-Seiki Makoto, Matsuyama Hideyasu	4. 巻 44
2. 論文標題 ARHGAP29 expression may be a novel prognostic factor of cell proliferation and invasion in prostate cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 2735 ~ 2745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2020.7811	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 Takahashi Ken, Takahashi Hideyuki, Furuichi Takuya, Toyota Masatsugu, Furutani-Seiki Makoto, Kobayashi Takeshi, Watanabe-Takano Haruko, Shinohara Masahiro, Numaga-Tomita Takuro, Sakaue-Sawano Asako, Miyawaki Atsushi, Naruse Keiji	4. 巻 7
2. 論文標題 Gravity sensing in plant and animal cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 npj Microgravity	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41526-020-00130-8	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
研究分担者	永野 浩昭 (Nagato Hiroaki) (10294050)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究分担者	白井 睦訓 (Shirai Mutsunori) (20196596)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究分担者	碓 彰一 (Hazama Syoichi) (50253159)	山口大学・医学部・教授(寄附講座等) (15501)	
研究分担者	柴田 健輔 (Shibata Kensuke) (50529972)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (15501)	

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		
カナダ		University of Toronto	
英国		University of Bath	