

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08671

研究課題名（和文）腫瘍疾患にかかわるマクロファージの探求と解析

研究課題名（英文）research for new macrophage subtype

研究代表者

國吉 佳奈子（kuniyoshi, kanako）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・プロジェクト助教

研究者番号：70747881

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍はがん細胞だけでなく、様々な浸潤細胞、分泌因子、細胞外タンパク質等から成る腫瘍微小環境を構成している。この腫瘍微小環境では免疫細胞をはじめとしたさまざまな細胞とがん細胞の相互作用により腫瘍の病態進行に大きく影響を与え、原発腫瘍の転移や根絶、増悪を決定することが知られている。

本研究では腫瘍微小環境における免疫細胞と腫瘍細胞、さらに周辺細胞との細胞間相互作用を詳しく解析し、包括的な理解を深めるために、本研究では腫瘍微小環境に浸潤する免疫細胞の中でも腫瘍増殖に抑制的な作用を有する新規細胞の同定、さらにその細胞の分化を制御する分子の同定と機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍は日本だけではなく、高齢化社会を迎えた国において罹患率、死亡率が高く、様々な角度から精力的に研究がおこなわれている。中でも腫瘍微小環境はがん細胞と直接細胞間のやり取りを行い、がん細胞の根絶や転移、さらに病巣の増悪に大きな影響を与える場である。本研究により腫瘍微小環境に浸潤し腫瘍増殖に抑制的な働きをする細胞集団を特定することができた。今後同定した細胞の機能解析や分子制御機構を標的とした抑制剤の開発につながる可能性が期待でき、学術的社会的に意義のある成果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：The tumour microenvironment consists not only cancer cells but also infiltrated immune cells, endothelial cells, secreted factors and proteins. In this project, we identified new macrophage subtype and new gene which has a role in inhibition of tumor growth.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：マクロファージ 腫瘍免疫 腫瘍微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

マクロファージは感染病原体等の異物排除および迅速な炎症反応の惹起を担い、さらにはその後起こる獲得免疫系の誘導にも必須な役割を果たす自然免疫系細胞である。近年の盛んな研究でマクロファージは刺激に応じてM1/M2という2つのサブタイプに分化することが報告されている。申請者らはマクロファージが2種類だけではなく、各疾患の病巣特異的な刺激や環境に応じて機能や形態を変化させる疾患特異的なマクロファージが存在することを明らかにしてきた。本研究では腫瘍疾患に焦点を当て、がん細胞や腫瘍微小環境特異的な新規マクロファージサブタイプの同定・解析を試みた。

これまでの報告から腫瘍が形成され増殖する過程には宿主側の血管・リンパ管、繊維芽細胞、免疫細胞等との相互作用を含む腫瘍周辺環境（腫瘍微小環境）が病態進行に大きな影響を及ぼすことが明らかになっている。この腫瘍微小環境には腫瘍浸潤細胞としてNK細胞や樹状細胞、腫瘍随伴マクロファージTAM (tumor associated macrophage: TAM) が多く浸潤しており、癌細胞の増殖促進や血管新生因子の放出、抗腫瘍免疫細胞の抑制等を行っている。本研究では腫瘍微小環境に浸潤する細胞でこれまで報告されている既知の細胞とは異なる働きを有している新規マクロファージサブタイプを同定し解析を行った。

## 2. 研究の目的

本研究ではがんに関心を絞って、これまで癌とのかかわりが全く知られていなかった新規マクロファージサブタイプが抗腫瘍作用を有していることが示唆されたため、この細胞の抗腫瘍における役割と分化制御について生命現象に近い状態で網羅的に解析し、包括的解明を目標とした。

## 3. 研究の方法

本研究の計画では、2つのトピックを中心に解析を行った。

### 【1】新規マクロファージサブタイプの生理的機能、さらに抗腫瘍作用におけるメカニズム解析

新規マクロファージサブタイプはT1c（データ未発表のため仮名）欠損マウスにおいて増殖が見られている細胞であるためフローサイトメーターにより分取し、細胞における遺伝子発現を網羅的に解析した。また、新規細胞の抗腫瘍効果メカニズムを明らかにするため、フローサイトメーターを用いて細胞を分取し、担癌モデルマウスに移植することで細胞の局在を免疫染色にて解析した。さらに分化制御を行う遺伝子の特定を行い、遺伝子欠損マウスや遺伝子発現ベクターを用いて解析を行った。

### 【2】新規マクロファージサブタイプが相互作用する細胞群の特定と作用因子の同定

新規細胞細胞の腫瘍への浸潤密度と腫瘍血管新生頻度、細胞から産生されるサイトカインや血管新生因子等に焦点を当てシングルセル解析を行い、未知な部分の多い新規細胞の機能と腫瘍増殖への関与を分子レベルで解析を行った。またリガンドレセプター解析を行い、新規細胞が相互作用する細胞群の特定と新規細胞が産生する因子の同定を行った。

## 4. 研究成果

### 【1】新規細胞の生理的機能、さらに腫瘍増殖における役割の機能解析

新規マクロファージの機能を調べるために、フローサイトメトリーを使用して細胞を分取し、担癌マウスに移植したところ、細胞を移植したマウスでは腫瘍増殖が顕著に抑制された。また免疫染色によってこの新規マクロファージの

局在を調べたところ腫瘍内に存在しており、さらに腫瘍内血管周辺に集積していることが明らかとなった。また新規マクロファージの担癌マウス内での遺伝子発現変化を調べるために、黒色メラノーマ B16F1 から産生される因子を用いて細胞を刺激しマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。その結果新規マクロファージにより顕著に増殖する細胞集団が見られ、さらにその細胞内で発現が誘導される遺伝子群と抑制される遺伝子群が存在することが明らかになった (図 1)。

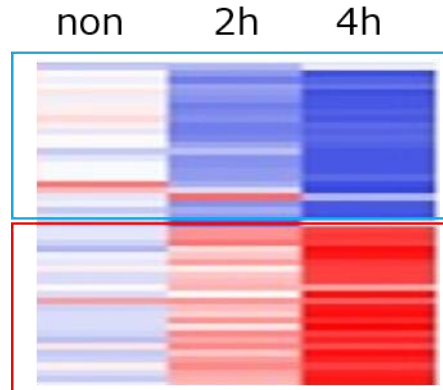


図1. 新規マクロファージ内で発現抑制/誘導される遺伝子群

## 【2】新規細胞が相互作用する細胞群の特定と作用因子の同定

腫瘍微小環境において新規マクロファージサブタイプと相互作用する細胞を特定するためにシングルセル RNA-seq 解析を行った。担がんモデルマウスにフローサイトメータを使用して分取した新規マクロファージを移植後経時的に腫瘍内に浸潤する免疫細胞の分取を行った。腫瘍を処理した後、腫瘍細胞と死細胞を除去できるように段階的に細胞を分散させ、CD45 陽性 CD31 陰性の細胞を腫瘍内浸潤免疫細胞、CD45 陰性 CD31 陽性 Podoplanin 陰性細胞を腫瘍内血管内皮細胞、CD45 陰性 CD31 陰性 Podoplanin 陽性細胞をがん関連線維芽細胞として分取した。これらの細胞を新規マクロファージ移植後に経時的に腫瘍内から分取しシングルセル RNA-seq ライブラリの作成を行った。その後 1 細胞当たり 10 万リード読めるようにライブラリシーケンスを行った。得られたシーケンスデータより視細胞の除去、ダブルットの除去を行い、主成分解析 (PCA) の後に tSNE および UMAP 圧縮にて 2次元で細胞分布を可視化し、さらに階層的クラスタ解析による樹形図を構築し該当組織及び該当部位に存在している細胞を分類した。既知の各細胞マーカーを Feature プロットで可視化し、細分化されたクラスターに特異的に発現する遺伝子を抽出し、さらに細胞間相互作用を理解するために、リガンド・レセプター解析を行った。これらの遺伝子群から抗腫瘍作用に重要な遺伝子の特定を行ったところ、Tlc 発現を誘導する新規遺伝子が同定された (図 2)。この新規遺伝子は新規マクロファージによって発現が誘導され、さらにこの細胞の分化に関与している可能性が示唆されたため、今後分化制御機構の解析を進めていく予定である。

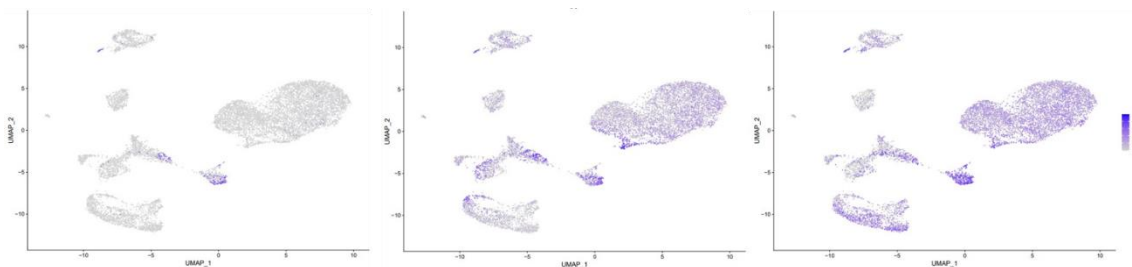


図2. 新規マクロファージによって腫瘍微小環境内で発現が誘導される遺伝子

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
研究分担者	福島 清春  (Fukushima Kiyoharu)  (00752156)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教    (14401)	

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