

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07236

研究課題名（和文）組織常在性マクロファージによるがん免疫始動システムの解析

研究課題名（英文）Analysis of the initiation of cancer immunity by tissue-resident macrophages

研究代表者

梶田 美穂子 (Kajita, Mihoko)

立命館大学・生命科学部・助教

研究者番号：00607442

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：悪性腫瘍が免疫系から逃れる機構については多数の報告がある一方、がん免疫がどのように始動するのかほとんどわかっていなかった。研究代表者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、その役割を解析するため乳腺オルガノイドを用いた新しいモデルシステムを構築した。このシステムを用いて解析した結果、組織常在性マクロファージが発がん初期段階に出現するようながん原性変異細胞を認識し、貪食することが明らかになった。さらにそのメカニズムとして、Eat meシグナルである Phosphatidylserineの関与が示唆された。本研究の成果により、がん免疫始動システムの一部が明らかになった。

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可視化して解析することにより、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り得るだけでなく、その変異細胞認識メカニズムを示唆する結果も得られた。臨床においては、がんの早期治療が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、学術的に重要であるだけでなく、がんの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・がん予防に繋がることが期待でき、社会的にも非常に重要であると言える。

研究成果の概要（英文）：While there are many reports showing how malignant tumors escape cancer immunity, little is known about the mechanisms of initiation of cancer immunity. We focused on tissue-resident macrophages as the cells that initiate cancer immunity and constructed a new model system using mammary gland organoids to analyze their role. Analysis using this system revealed that tissue-resident macrophages recognize and phagocyte carcinogenic mutant cells, such as those appearing in the early stages of carcinogenesis. Furthermore, the involvement of 'Eat me' signal, phosphatidylserine, was suggested as a mechanism for this. The results of this study have revealed one aspect of the molecular mechanism of cancer immune initiating system.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：乳がん 組織常在性マクロファージ オルガノイド

1. 研究開始当初の背景

多数の変異が蓄積した悪性腫瘍における免疫抑制機構については多くの知見が集積している一方、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、さらにがん免疫の始動に関わる免疫細胞等はほとんどわかっていなかった。研究代表者は、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 (以下、組織マクロファージ) に着目し、その役割を解析するため、乳腺オルガノイドを用いた新しいモデルシステムを構築した。このモデルシステムでは、CX3CR1-GFP/+マウス由来の乳腺オルガノイドに、レンチウイルスベクターによって tdTomato-P2A-oncogene 配列を導入する。それにより、組織マクロファージを GFP+、oncogene 発現細胞を tdTomato+ として可視化することができ、両者の interaction を経時的に解析することを可能にした。まず oncogene として一般的な HRasG12V、上皮間葉転換を誘導する Twist、がん抑制遺伝子 TP53 のドミナントネガティブ変異体である p53DD についてウイルスベクターを作製して乳腺オルガノイドにモザイク状に発現させ、発がんの初期段階をオルガノイド上で再現した。このオルガノイドについて解析を進めた結果、組織常在性マクロファージが HRasG12V 発現細胞を認識し、貪食することが明らかになった。一方、Twist や p53DD 発現細胞に対して顕著な反応はなく、変異の種類によって組織マクロファージの反応性が異なることが示唆された。この結果により、発がんの初期段階で出現するような遺伝子変異が蓄積する前の細胞が、免疫細胞である組織常在性マクロファージのターゲットとなり得ることが示唆され、がん免疫の始動システムの一部が明らかになった。しかし、組織マクロファージが HRasG12V 発現細胞を認識するメカニズムは不明であり、HRasG12V 発現細胞以外に組織マクロファージに貪食される変異細胞は見つかっていなかった。

2. 研究の目的

組織常在性マクロファージによるがん原性変異細胞の認識・貪食のメカニズムを明らかにし、組織常在性マクロファージによる初期がん認識・貪食システムを強化し、がんが病変を形成する前に排除 (予防) することを目指す。また、HRasG12V 発現細胞以外に組織マクロファージに貪食される変異細胞を同定する。

3. 研究の方法

日本人女性においてがん罹患率が第1位である乳がんのモデルシステムとして、マウスの乳腺オルガノイドを用いて乳腺組織マクロファージとがん原性変異細胞との相互作用を解析する。マウス乳腺組織では、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^{tp/+}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。そこで実験は図1のように進めた。まず CX3CR1-GFP^{tp/+}メスマウスから乳腺オルガノイドを調製し、tdTomato-P2A-oncogene 配列を有するレンチウイルスを感染させる。その後ウイルス感染オルガノイドを基底膜の代わりに果たす Matrigel に包埋する。一定期間培養するとウイルス由来の tdTomato-P2A-oncogene が発現し、組織常在性マクロファージを GFP+、がん遺伝子発現細胞を tdTomato+ として可視化できる。この状態のオルガノイドを細胞染色やタイムラプスで観察した。

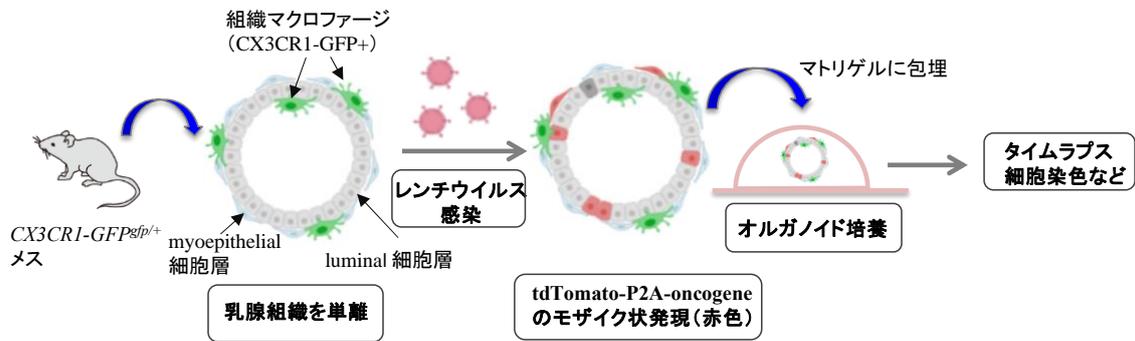


図1 マウス乳腺オルガノイドを用いた発がん初期段階の解析の流れ

① Eat me シグナル phosphatidylserine の解析

組織マクロファージによる HRasG12V 発現細胞の認識メカニズムとして、Eat me シグナルとして知られる phosphatidylserine (PS) の細胞膜外側への露出を検討した。PS の検出には、PS に強い親和性を持つ AnnexinV-FITC を用いた。図1の通りに乳腺オルガノイドを調製し、tdTomato のみもしくは tdTomato-P2A-HRasG12V を発現するレンチウイルスを感染させた。ウイルス感染3日後にオルガノイドを AnnexinV-FITC とインキュベートし、細胞外外側に露出した PS を染色した。その後、各オルガノイドを共焦点顕微鏡で観察し、AnnexinV-FITC の蛍光強度を画像解析により定量した。

② HRasG12V 発現細胞の Cleaved-Caspase 3 染色

Eat me シグナルである PS は、アポトーシス細胞の細胞膜外側に露出することが知られている。HRasG12V 発現細胞で PS シグナルが上昇していたのは、細胞がアポトーシスを起こしていた可能性があるため、HRasG12V 発現細胞をアポトーシス検出に用いられる Cleaved-caspase 3 で染色し、その染色度合いを評価した。

4. 研究成果

まず、組織マクロファージが HRasG12V 発現細胞を認識するメカニズムとして、Eat me シグナルとして知られる phosphatidylserine (PS) の細胞膜外側への露出を検討した。その結果を図2に示す。まずはマトリゲルに包埋された乳腺オルガノイド上の PS に対して AnnexinV-

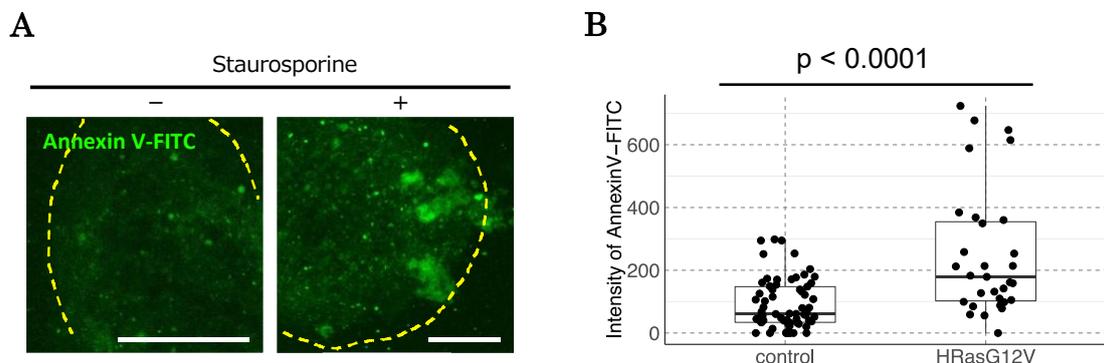


図2 乳腺オルガノイド上での PS の検出

(A) 乳腺オルガノイドのアポトーシス誘導による細胞膜外側のホスファチジルセリンの検出。培養3日目の乳腺オルガノイドに1 μMのStaurosporineを添加して5時間インキュベートした後、Annexin V-FITCで染色して共焦点顕微鏡で観察した。黄色の点線はオルガノイドの輪郭。スケールバー：40 μm
(B) コントロールとしてtdTomatoのみ、もしくはHRasG12Vを感染させ、3日後の乳腺オルガノイドをAnnexin V-FITCで染色して共焦点顕微鏡で画像を取得した。その後、画像解析により蛍光強度を定量した。

FITC が正常に結合できるか検討した。具体的には乳腺オルガノイドに Staurosporine を作用させてアポトーシスを誘導したのち、AnnexinV-FITC を作用させて細胞膜外側の PS が染色されるか調べた。その結果、DMSO のみを添加したオルガノイドと比べて、Staurosporine を作用させたオルガノイドでは AnnexinV-FITC の蛍光強度が明らかに上昇しており、マトリゲルに包埋された乳腺オルガノイドに対して、AnnexinV-FITC は期待通り作用することが示された(図 2A)。次に乳腺オルガノイドに tdTomato のみもしくは tdTomato-P2A-HRasG12V を有するレンチウイルスを感染させ、3 日後に AnnexinV-FITC を作用させた。その結果、HRasG12V 発現細胞では AnnexinV-FITC の蛍光強度が明らかに強かった。その蛍光強度を定量した結果、HRasG12V 発現細胞では AnnexinV-FITC シグナルが有意に上昇していた(図 2B)。また、アポトーシス細胞も PS を細胞膜外側へ露出することが知られているため、アポトーシスマーカーである活性化 Caspase-3 (Cleaved Caspase-3) を染色したが、コントロールである tdTomato のみを発現する細胞と同様に HRasG12V 発現細胞では染色されなかった(図 3)。以上の結果より、組織マクロファージは HRasG12V 発現細胞の細胞膜外側に露出した PS を認識して、細胞死非依存的に貪食していることが示唆された。以上の結果より、組織マクロファージが発がんの初期段階に発生するがん原性変異細胞を認識するメカニズムの一端が明らかとなり、これまで全くわかっていなかったがん免疫始動システムが明らかになりつつある(Kajita et al., 投稿準備中)。今後は、HRasG12V 発現細胞以外に組織マクロファージに認識・貪食される細胞を同定するため、Ras family の変異体である KRasG12D, 一般的なヒトのがんでの変異が高頻度に報告されている p53R273H (マウスでは R270H) についてもレンチウイルスベクターを構築済みであり、まずはタイムラプスにて、組織マクロファージとの相互作用を解析していく。

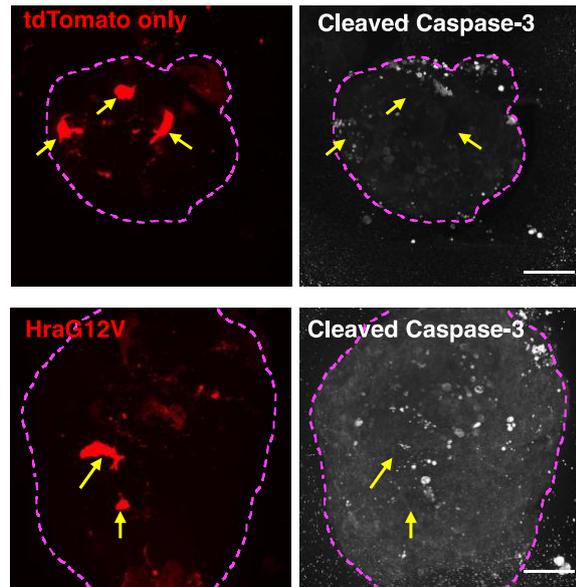


図3 HRasG12V 発現細胞の Cleaved-Caspase-3 染色

乳腺オルガノイドに tdTomato only もしくは HRasG12V 配列を有するレンチウイルスを感染させ、3 日後の乳腺オルガノイドを Cleaved Caspase-3 で免疫染色して共焦点顕微鏡で画像を取得した。ピンクの点線はオルガノイドの輪郭。黄色矢印はウイルス感染細胞の位置を示す。スケールバー：40 μm 。

前述のように、悪性腫瘍と免疫システムの関係については多くの報告があるが、発がん初期段階に着目した、遺伝子変異が蓄積する前のがん原性変異細胞と免疫細胞との関係についての報告はほとんどない。本研究は、正常上皮組織に変異細胞がモザイク状に生じた発がんの初期段階をオルガノイドシステムで再現し、生体由来の組織マクロファージの役割を可視化して解析する全く新しい着眼点の研究である。本研究の推進により、現行の悪性腫瘍に対する免疫療法とは異なり、初期がんをターゲットにしたがん免疫療法や予防法の確立に繋がることを期待できる。

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 2件）

1. 著者名 Kohashi Koki, Mori Yusuke, Narumi Rika, Kozawa Kei, Kamasaki Tomoko, Ishikawa Susumu, Kajita Mihoko, Kobayashi Rei, Tamori Yoichiro, Fujita Yasuyuki	4. 巻 31
2. 論文標題 Sequential oncogenic mutations influence cell competition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3984 ~ 3995.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.06.064	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 -

1. 著者名 Hua Zhihai, Watanabe Ryoma, Fukunaga Taku, Matsui Yojiro, Matsuoka Mayu, Yamaguchi Shoya, Tanabe Shun-ya, Yamamoto Miyu, Tamura-Kawakami Keiko, Takagi Junichi, Kajita Mihoko, Futai Eugene, Shirakabe Kyoko	4. 巻 696
2. 論文標題 C-terminal amino acids in the type I transmembrane domain of L-type lectin VIP36 affect secretase susceptibility	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149504 ~ 149504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2024.149504	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶田 美穂子、菅波 孝祥、浅原 哲子、白壁恭子
2. 発表標題 細胞外領域シェディング耐性のTREM2変異体の作製
3. 学会等名 第27回 日本病態プロテアーゼ学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田邊駿弥、梶田美穂子、元村一基、白壁恭子
2. 発表標題 組織常在性マクロファージによる変異細胞の認識メカニズムの解明
3. 学会等名 第69回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田邊駿弥、梶田美穂子、元村一基、樽木俊聡、白壁恭子
2. 発表標題 組織常在性マクロファージによる変異細胞の認識メカニズムの解明
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

〔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