

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08649

研究課題名(和文) がんの転移・免疫逃避における接触性膜断片移行(トロゴサイトーシス)の意義の解明

研究課題名(英文) Role of trogocytosis in tumor immune escape

研究代表者

齋藤 心(Saito, Shin)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60382909

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)：癌の転移能に影響を与えるのではないかという仮説のもと、癌-免疫細胞間の接触性膜断片移行(トロゴサイトーシス)の意義について調査を行った。細胞膜をPKH26により蛍光染色したT細胞を癌細胞と共培養すると、PKH26陽性となる癌細胞を認めた。T細胞と共培養後の癌細胞における免疫シナプス分子の発現を調査すると、CD11aの発現を認め、活性化T細胞との共培養でその発現は亢進した。また、活性化T細胞との共培養により癌細胞はCD11a依存性に血管内皮への接着能が亢進した。このことから、癌細胞はトロゴサイトーシスによりT細胞のCD11aを獲得、転移能を亢進させる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、癌細胞は血液中でTリンパ球による障害を免れるとtrogocytosisによりCD11aを獲得することで、標的臓器の血管内皮への接着性が亢進し、血行性転移能が増強する可能性があると考えられた。癌の転移へのトロゴサイトーシスの関与を示した報告はこれまでになく、新たな癌の転移メカニズムを示した点で今回の研究は学術的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)： We investigated the significance of membrane fragment transfer after contact (trogocytosis) between cancer cells and immune cells in vitro, based on the hypothesis that the phenomenon may affect the metastatic potential of cancer. When the cell membrane of T cells was fluorescently stained with PKH26 and co-cultured with cancer cells, a part of cancer cells turned out to be PKH26 positive. We investigated the expression of immune synapse molecules in cancer cells after co-culture with T cells. A part of cancer cells expressed CD11a and this expression was enhanced by activation of T cells. Furthermore, co-culture with activated T cells enhanced the ability of adhesion of cancer cells to vascular endothelium (HUVEC) in a CD11a-dependent manner. These evidences suggest that cancer cells may acquire CD11a from T cells through trogocytosis, thereby enhancing their metastatic potential.

研究分野：消化器外科学

キーワード：トロゴサイトーシス がん転移 リンパ球 接着分子

1. 研究開始当初の背景

近接する細胞同士は接着分子とリガンドが直接結合することにより情報伝達を行うが、動物細胞においては、この物理的接触の際に双方の細胞膜の一部が交換される現象が存在する。この現象は、1970年代にリンパ球において初めて報告され、トロゴサイトーシスと命名されていたが、その生物学的意義については長い間不明であった。しかし、近年、このトロゴサイトーシスはリンパ球や樹状細胞などの免疫細胞において極めて頻繁に起こっており、細胞膜上の機能分子が他の細胞の膜上に移動することにより、巧みに免疫応答が制御されている事実が明らかとなってきている。さらに、直近の研究によると、この現象は免疫細胞だけでなく多種の体細胞でも頻繁に起こっており、種々の生理現象と密接に関わっている可能性があることが推察されている。申請者らも、腹膜播種の腹水細胞の中に、上皮細胞と血球細胞のマーカーを共発現する奇妙な細胞集団が存在し、人体内でもトロゴサイトーシスが実際に起こっていることを示唆する現象を確認しており、今回の研究を企図した。

2. 研究の目的

本研究では、癌細胞と免疫細胞を様々な条件下で共培養し、異なる細胞間を移行する膜分子群を同定することを試みる。さらに、これらのうち、免疫シナプス分子に焦点を絞り、対側の細胞に移行した各分子が実際に機能しうるか?を *In vitro* の実験にて検証し、がんの転移現象におけるトロゴサイトーシスの意義を明らかにすることを目標とした。

3. 研究の方法

① 末梢血 T 細胞の分離方法と活性化 T 細胞の作成方法

健康人末梢血を採取したのち Ficol1 を用いて、末梢血単核球 (PBMC) と好中球分画に分離。T 細胞は PBMC より CD3 抗体あるいは、CD14、CD16、CD19 抗体を用いた磁気分離法 (MACS) にて分離した。また、活性化 T 細胞は、PBMC を CD3 抗体にて 2 日間刺激ののち、10ng/ml の IL-2 を添加した培養液にて 7-14 日間培養することにより作成した。

② T 細胞から癌細胞への細胞膜や膜分子の移行を調査

②-1 細胞膜の移行の調査

癌細胞は、ヒト胃癌細胞株 OCUM-1 に GFP を発現させたもの (OCUM-GFP) を使用することにより T 細胞と識別した。PKH26 を用いて細胞膜を蛍光染色した T 細胞を癌細胞と共培養 (1, 3, 6, 9, 24 時間) したのち、FVS780 による死細胞染色、4%パラホルムアルデヒドによる固定を行い、Flowcytometry を用いて PKH26 陽性の OCUM-GFP の割合を測定した。また、35mm dish 内で 0.4 μ m filter の下層にて癌細胞を、上層にて T 細胞を培養することにより非接触状態で共培養ののち (11 時間)、下層の癌細胞における PKH26 陽性率を測定した。

②-2 膜分子の移行の調査

T 細胞 (あるいは、PBMC, 活性化 T リンパ球) と癌細胞を共培養 (12 時間) したのち、FVS780 による死細胞染色、Fc block、CD11a および CD45 に対する蛍光抗体を用いた標識を行なった。その後、Flowcytometry を用いて CD11a、CD45 陽性の癌細胞の割合を測定した。

③ 活性化 T 細胞と共培養後の癌細胞の血管内皮への接着実験

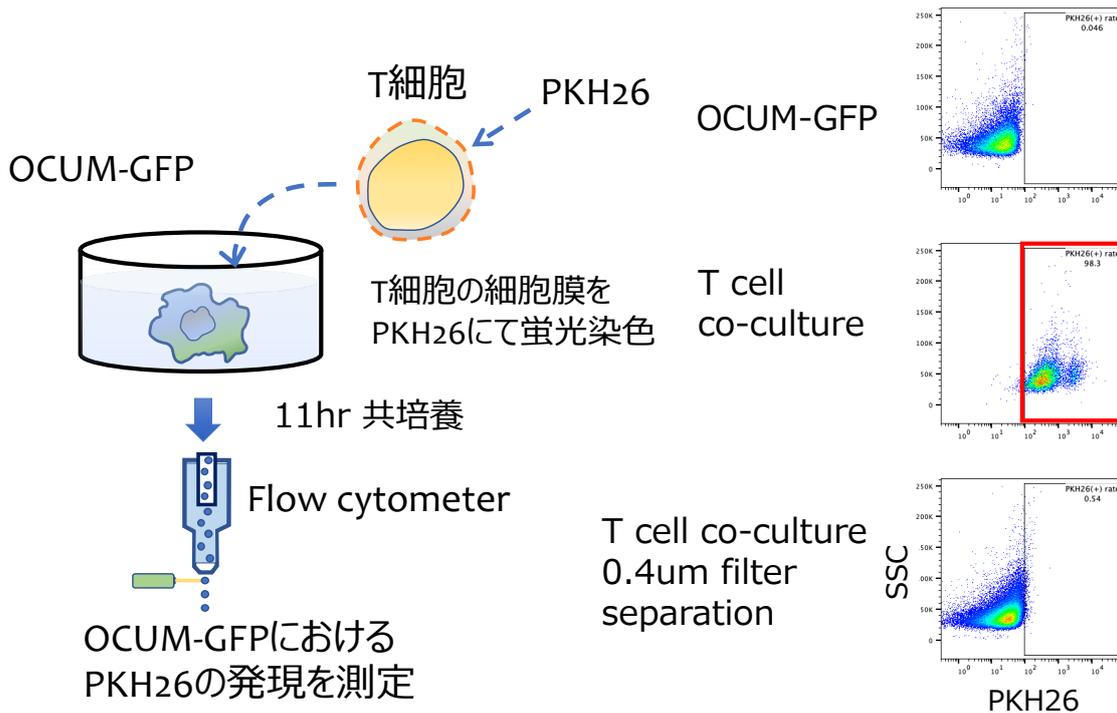
GFP 陽性の癌細胞を活性化 T 細胞と 12 時間共培養したのち、8 μ m pore のフィルターを用いて活性化 T 細胞を可及的に除去、フィルター上に残った癌細胞を接着実験に使用した。96 well plate に播種し、コンフルエントになった HUVEC (ヒト臍帯静脈血管内皮細胞) の上に癌細胞を播種。5 分間 incubate したのち、PBS にて 3 回洗浄。Plate に残存した癌細胞の蛍光強度 (GFP) をプレートリーダーで測定した。洗浄しなかった plate の蛍光強度に対する割合を測定することで、癌細胞の HUVEC への接着率を算出した。また、CD11a 抗体を添加した PBS 中で、活性化 T 細胞と共培養後の癌細胞を incubate したのち接着実験を行い、癌細胞の血管内皮細胞への接着が、CD11a 抗体によりブロックされるか調査を行った。

4. 研究成果

① 細胞膜の断片が免疫細胞から癌細胞へ移行するか (トロゴサイトーシスが起きるか) を調査

健康人の末梢血由来 T 細胞の細胞膜を PKH26 にて蛍光染色したのち、この T 細胞と GFP 遺伝子導入ヒト胃癌細胞株 (OCUM1) との共培養を行なった。flowcytometry による解析を行うと、共培養 1 時間の時点 から PKH26 陽性の癌細胞の存在を認め、6-9 時間の時点で 98% の癌細胞が PKH26 陽性となった。この現象は 0.4 μ m pore のフィルターを用いた非接触下の共培養では認めないことから、接触に伴う膜断片の移行 (trogocytosis) が起きていると考えられた。

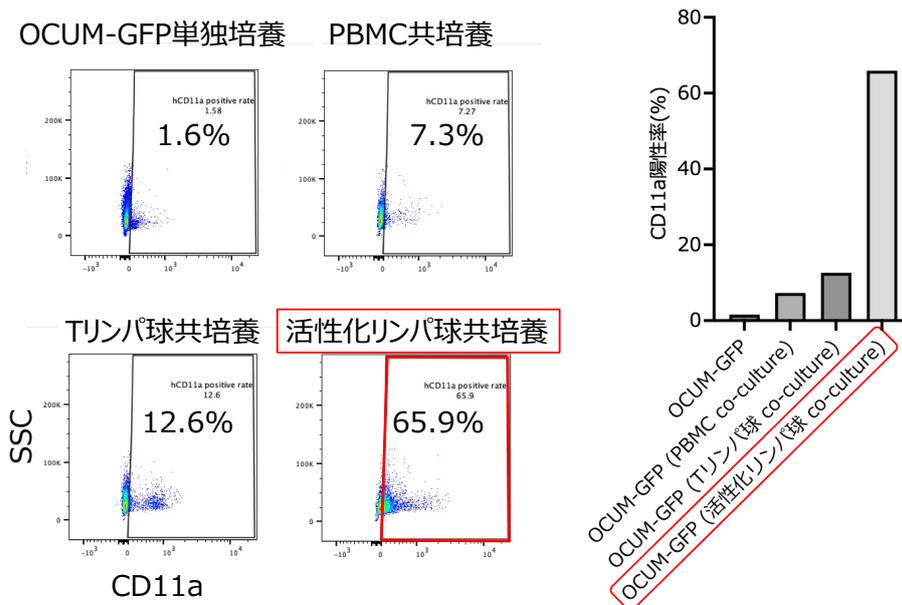
癌細胞と免疫細胞の間で、細胞膜の移動が起きるか調査



②T細胞から癌細胞への細胞膜の移行に伴い、通常癌細胞には発現せずT細胞に発現する分子の中でどのような分子が癌細胞に発現するようになるかを調査

抗原提示分子複合体(免疫シナプス)の形成に関与する分子に着目し、T細胞のみに発現する分子の中で、どのような分子が癌細胞にも発現するようになるかを調査した。4時間の共培養により $\beta 2$ integrin, CD11a(陽性率 $18.7 \pm 3.8\%$, $n=2$)、および CD45 の発現を癌細胞側でも認めた。また、CD3 抗体+IL-2 存在下に7日間培養した活性化T細胞と12時間共培養すると CD11a の発現がさらに亢進した(OCUM1上のCD11a陽性率: T細胞:12.6%, 活性化T細胞:65.9%)。

癌細胞は、T細胞との共培養によりCD11a陽性となる

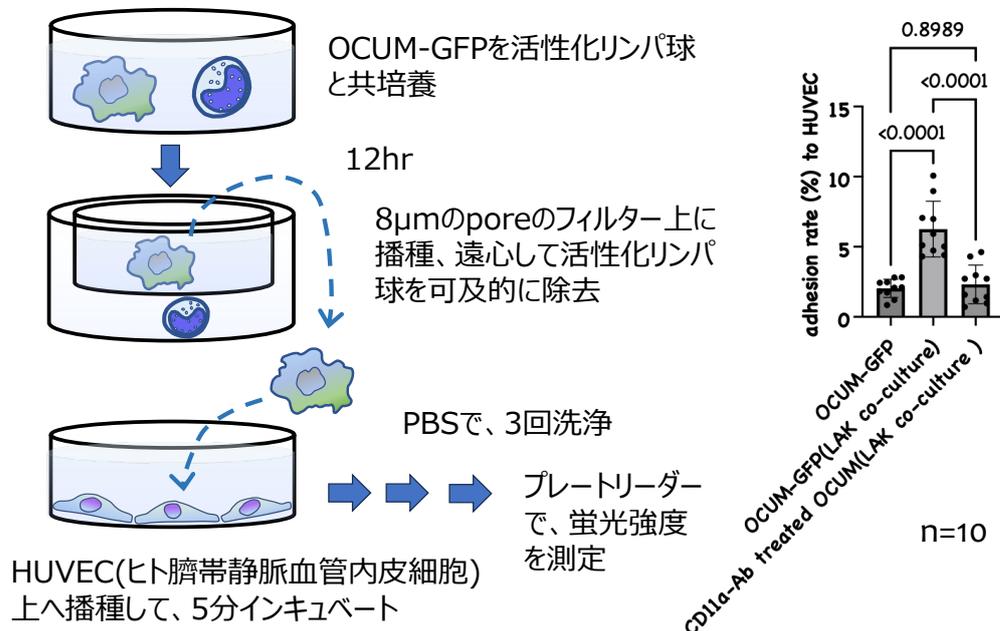


活性化Tリンパ球との共培養にて、CD11a陽性割合が顕著に増加

③癌細胞に発現するようになった分子が実際に機能するかを in vitro の接着実験で調査
CD11a は血液細胞全般に発現し、血液細胞が血管内皮上の ligand に接着し血管外へ遊出する時に機能する分子であるが、通常癌細胞には発現を認めない。OCUM1 の血管内皮細胞 (HUVEC) への

接着能を検討したところ、活性化 T 細胞と共培養後の癌細胞は単独培養時と比較して HUVEC への接着が亢進したが、CD11a 抗体の前処理により阻害された(接着率:単独培養 $2.0 \pm 0.64\%$ 、共培養 $6.3 \pm 2.0\%$ 、CD11a 抗体処理 $2.3 \pm 1.4\%$)。

活性化リンパ球と共培養すると 癌細胞の血管内皮への接着がCD11a依存的に亢進



結果のまとめ

癌細胞は活性化 T 細胞による障害を免れると trogocytosis により CD11a を獲得することで、標的臓器の血管内皮への接着性が亢進し、血行性転移能が増強する可能性があると考えられた。

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 Satoi, S., N. Takahara, T. Fujii, H. Isayama, S. Yamada, Y. Tsuji, H. Miyato, H. Yamaguchi, T. Yamamoto, D. Hashimoto, S. Yamaki, Y. Nakai, K. Saito, H. Baba, T. Watanabe, S. Ishii, M. Hayashi, K. Kurimoto, H. Shimada, J. Kitayama	4. 巻 29(6)
2. 論文標題 Synopsis of a clinical practice guideline for pancreatic ductal adenocarcinoma with peritoneal dissemination in Japan; Japan Peritoneal Malignancy Study Group.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Hepatobiliary Pancreat Sci 29(6):600-608.	6. 最初と最後の頁 600-608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jhbp.1085.	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 宮戸 秀世、斎藤 心、松宮 美沙希、高橋 礼、大澤 英之、山口 博紀、佐田 尚宏、北山 丈二
2. 発表標題 癌細胞は活性化リンパ球と接触後CD11aを獲得し血管内皮細胞への接着能が亢進する
3. 学会等名 癌転移学会
4. 発表年 2024年～2025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
研究分担者	北山 丈二 (Kitayama Joji) (20251308)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	山口 博紀 (Yamaguchi Hironori) (20376445)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

6. 研究組織（つづき）

	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	佐田友 藍 (Sadatomo Ai) (40528585)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	
研究分担者	相澤 健一 (Aizawa Kenichi) (70436484)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	
研究分担者	宮戸 秀世 (Miyato Hideyo) (90813163)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	

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