様　式　C－19、F－19－1、Z－19　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　6 年　5 月 22 日現在

機関番号：11301
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2023
課題番号：21K16465

研究課題名（和文）大腸癌オルガノイドを用いた免疫原性改善と腸管由来樹状細胞との共培養システムの構築

研究課題名（英文）Improvement of immunogenicity and development of co-culture system with intestinal-derived dendritic cells using human colon cancer organoids.

研究代表者
梶原　大輝（Kajiwara, Taiki）

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60844438

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,500,000円

研究成果の概要（和文）：免疫原性細胞死（ICD; Immunogenic cell death）を誘導し癌細胞の免疫原性を高めることで全ての大腸癌に免疫チェックポイント阻害薬が効果を示す可能性がある。本研究ではICDにおけるカルレティキュリン（CRT; Calreticulin）に着目し、大腸癌細胞株およびヒト大腸癌オルガノイドを用いて抗癌剤投与による細胞表面のCRT発現の誘導機序を検討した。5-FUとオキサリプラチンの暴露により大腸癌細胞株4種とヒト大腸癌オルガノイドにおいてCRTの露出を証明し、さらにRNAシークエンスを用いて抗癌剤投与時の細胞ストレス応答がICDの誘導に関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
免疫原性細胞死において、カルレティキュリンが細胞膜に露出することはわかっているが、その機序については知見に乏しい。また、細胞株での研究は行われているが、臨床検体を用いた研究は行われていない。本研究では、免疫原性細胞死は細胞ストレスにより起こることが示唆され、またヒト大腸癌オルガノイドにおいて初めてカルレティキュリンの細胞膜への露出を確認することで臨床応用可能な現象であることが示唆された。これら知見は免疫チェックポイント阻害薬が幅広く使用できる可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：Induction of immunogenic cell death (ICD) enhances the immunogenicity of cancer cells and may make immune checkpoint inhibitors effective against all colorectal cancers. In this study, we focused on calreticulin (CRT) exposure in ICD and investigated the mechanism of induction of cell surface CRT exposure by administering anticancer agents using colorectal cancer cell lines and human colorectal cancer organoids. Four colon cancer cell lines and human colon cancer organoids showed CRT exposure after treatment with 5-FU and oxaliplatin, and further analysis using RNA sequencing demonstrates that the induction of ICD may be related to cellular stress responses during anticancer drug administration.

研究分野：消化器外科学

キーワード：免疫原性細胞死　カルレティキュリン　抗癌剤　オルガノイド

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

大腸癌の薬物療法において、免疫チェックポイント阻害剤の登場は大きな変革をもたらした。しかし、免疫原性の高い MSI-high（高頻度マイクロサテライト不安定性）大腸癌に強い効果が期待できる一方、全体の約 10%と頻度が低い。大多数は免疫原性が低い MSS（マイクロサテライト安定性）大腸癌であり、免疫チェックポイント阻害剤を使用しても免疫に認識されにくく効果を十分に発揮することができない。大腸癌患者の多数を占める MSS 大腸癌の免疫原性を改善することで、より多くの大腸癌患者が免疫チェックポイント阻害剤の恩恵を受けられるようになると考えた。免疫原性の改善の方法として、“免疫原性細胞死（Immunogenic cell death：ICD）”を利用する方法があるが、誘導できる薬剤はわかっているものの、詳細な機序は不明である。また、臨床検体での確認は困難で細胞株による証明に限られている。そのため、我々はヒト大腸癌オルガノイドを使用して、腫瘍周囲環境も含めて検討する必要があると考えた。

２．研究の目的

ヒト大腸癌オルガノイドで抗癌剤が ICD を誘導することを検証し、またその機序を明らかとすることを目的とする。

３．研究の方法

（１）大腸癌細胞株における早期アポトーシスの評価

ICD において重要なマーカーであるカルレティキュリン（Calreticulin:CRT）は早期アポトーシスの段階で小胞体から細胞表面へ移行することが知られており、大腸癌細胞株が早期アポトーシスを生じる抗癌剤の適切な濃度と暴露時間を調べた。大腸癌細胞株へ抗癌剤を暴露し、フローサイトメトリーによる Annexin V/PI 染色で早期アポトーシスを評価した。細胞株は HT-29 を使用し、抗癌剤は ICD の誘導剤として知られているオキサリプラチンを使用した。各種濃度、暴露時間による早期アポトーシス割合の変化を解析した。

（２）大腸癌細胞株における細胞表面への CRT 発現の評価

早期アポトーシスの評価実験の結果をふまえ検討した抗癌剤濃度、暴露時間で細胞表面に ICD のマーカーである CRT が発現した細胞(CRT 発現細胞)をフローサイトメトリーで評価した。細胞株は HT-29、HCT116、KM12C、RKO を使用し、抗癌剤は 5-FU、オキサリプラチンを使用し、抗癌剤濃度、暴露時間による CRT 発現細胞を解析した。

（３）免疫蛍光染色による細胞表面の発現の評価

大腸癌細胞株およびヒト大腸癌オルガノイドに抗癌剤を暴露し、CRT の免疫蛍光染色を行い ICD 誘導の有無を評価した。細胞株は HT-29、HCT116、KM12C、RKO、ヒト大腸癌オルガノイドは MSS 結腸癌から得られた 3 検体を使用し、抗癌剤は 5-FU、オキサリプラチンを使用した。

（４）RNA シークエンスによる遺伝子発現変化の解析

細胞株 HT-29、HCT116、KM12C、RKO に抗癌剤 5-FU、オキサリプラチンを暴露し RNA シークエンスによる解析を行った。解析は遺伝子発現量のクラスター解析、パスウェイ解析、全遺伝子発現量解析を行った。

（５）定量リアルタイム PCR による遺伝子発現の評価

RNA シークエンスから抽出された遺伝子について、定量リアルタイム PCR による遺伝子発現を評価した。細胞株は HT-29、HCT116、KM12C、RKO を使用し、抗癌剤は 5-FU、オキサリプラチンを使用した。

４．研究成果

（１）大腸癌細胞株における早期アポトーシスの評価

初めにオキサリプラチンへの暴露時間を検討した。2、6、8、24 時間で経時的に評価したところ、細胞死が起きている細胞である Annexin V（+）/PI（+）の割合はオキサリプラチンの暴露時間に伴って増加したが、早期アポトーシス細胞を示す Annexin V（+）/PI（-）は 3～6%とほぼ一定の割合であった。次にオキサリプラチンの暴露時間を 24 時間として、濃度を 3、10、30、100μM に設定し検討した。オキサリプラチンの濃度に依存して細胞死の割合が増加したが、早期アポトーシス細胞は暴露時間同様に 3～6%とほぼ一定であった。以上より、抗癌剤による早期アポトーシス細胞の割合は暴露時間、濃度に関わらずほぼ一定の割合で起こることが考えられた。

（２）大腸癌細胞株における細胞表面へ CRT 発現の評価

抗癌剤の暴露時間、濃度による細胞表面に CRT が発現した細胞（CRT 発現細胞）の割合の変化を調査した。早期アポトーシスの評価実験結果より、濃度を 0～100μM に設定したオキサリプラチンに 6 時間もしくは 24 時間暴露し、CRT 発現細胞を評価した。HCT116 では 6 時間のオキサリプラチン暴露ではいずれの濃度においても CRT 発現細胞の割合は 0.5%程度と低かったが、24 時間の暴露では 6 時間の暴露に比べ濃度依存的に CRT 発現細胞の割合が増加した。HT-29 でも同様に 6 時間のオキサリプラチン暴露ではいずれの濃度においても CRT 発現細胞の割合は低かっ

たが、24 時間ではこちらも濃度依存的に CRT 発現細胞の割合が増加した。これらの結果から、抗癌剤による CRT 発現の評価は 24 時間の暴露で行うこととした。続いて 4 種類の大腸癌細胞株をオキサリプラチンおよび 5-FU に 24 時間暴露し、抗癌剤濃度と CRT 発現の関係を検討した。オキサリプラチン投与群では、HCT116 では全ての濃度で、また HT-29、KM12C、RKO では 100µM、300µM で 0µM と比較して有意な CRT の発現上昇を認めた。次に 5-FU 投与群では全ての大腸癌細胞株で 1000µM、3000µM において 0µM と比較して CRT 発現細胞の有意な増加を認め、HCT116 については 300µM においても有意な発現上昇を認めた。以上の結果から、抗癌剤による CRT 発現は 24 時間以上の暴露が必要で、濃度依存的に発現割合が上昇することが考えられた。また CRT 発現機序を評価するにあたり、暴露時間は 24 時間で濃度はオキサリプラチンが 100µM、5-FU が 1000µM が適当であると考えられた。

（3）免疫蛍光染色による細胞表面の CRT 発現の評価

4 種類の大腸癌細胞株および MSS 大腸癌 3 検体から作成したヒト大腸癌オルガノイドをオキサリプラチン 100µM、5-FU 1000µM に 24 時間暴露し免疫蛍光染色により CRT の細胞表面への発現を評価した。4 種類の大腸癌細胞株全てにおいて細胞表面に CRT の発現を認めた。また、ヒト大腸癌オルガノイド 3 検体でも大腸癌細胞株の結果と同様に、3 症例全てで細胞表面に CRT の発現を認めた。今回の免疫蛍光染色においては細胞膜の透過処理を行わなかったことから、CRT の発色は細胞表面に発現した CRT を観察していると考えた。ヒト大腸癌オルガノイド 3 検体でも大腸癌細胞株と同様に細胞表面に CRT の発現を認めており、このことから実臨床においても起きうる現象であることが示唆された。

（4）RNA シークエンスによる遺伝子発現変化の解析

オキサリプラチン 100µM、5-FU 1000µM を 24 時間暴露した 4 種類の大腸癌細胞株を用いて RNA シークエンスを行った。遺伝子発現量のクラスター解析では細胞株の種類で大きく 2 つのサブグループにクラスタリングされ、さらに HT-29、HCT116 は抗癌剤の投与有無と種類によってグループ化された。一方、KM12C、RKO は細胞株毎に分類され、抗癌剤投与の有無よりも細胞株の特性が強く表れている結果であった。続いて行ったパスウェイ解析では使用した抗癌剤の作用機序に関連する DNA 合成、複製障害等に関する経路が抽出され、2 種類の抗癌剤投与で共通して変化しているシグナル伝達経路を見出すことが難しかった。次に、全遺伝子の中からオキサリプラチン、5-FU で共通して有意に発現上昇（Fold-change >log2、p<0.05）している遺伝子を検索し、抗癌剤による CRT 発現誘導に関与している可能性がある 79 遺伝子を抽出した。さらに 79 遺伝子から遺伝子発現量の低いものを除外し、発現量上昇率の上位 20 遺伝子の中から CRT 発現誘導に関与している遺伝子を検討したところ、細胞ストレスに関する 4 種類の遺伝子（*TP53I3*、*TP53INP1*、*YPEL3*、*SMPD1*）が細胞表面への CRT の発現に関与する候補遺伝子として抽出された。

（5）定量リアルタイム PCR による遺伝子発現の評価

オキサリプラチン 100µM、5-FU 1000µM に 24 時間暴露した 4 種類の大腸癌細胞株から total RNA を抽出後、定量リアルタイム PCR を行い、*TP53I3*、*TP53INP1*、*YPEL3*、*SMPD1* の発現量を比較した。*TP53I3* では、KM12C に 5-FU を投与した場合を除く全てで抗癌剤投与によって 1.7～6.4 倍の有意な発現上昇が確認された。*TP53INP1* においては、KM12C に 5-FU を投与した場合を除き、抗癌剤投与によって 2～8 倍程度の有意な遺伝子発現上昇を認めた。*YPEL3* ではオキサリプラチン投与群にて HT-29 で約 3 倍、RKO で役 5 倍、5-FU 投与群では HCT116、HT-29、RKO で 3～5 倍と有意に高発現していた。*SMPD1* においては RKO に 5-FU を投与したもの以外全てで約 2～8 倍と有意に遺伝子発現の上昇を認めた。RNA シークエンスの結果同様に定量リアルタイム PCR においても細胞ストレスに関する 4 種類の遺伝子（*TP53I3*、*TP53INP1*、*YPEL3*、*SMPD1*）が発現上昇しており、抗癌剤投与時の細胞ストレス応答が細胞表面への CRT の発現を介し ICD の誘導に関与している可能性が示唆された。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　1件）

１．発表者名 Satoru Naito, Taiki Kajiwara, Tomoyuki Ono, Minoru Kobayashi, Hideaki Karasawa, Shinobu Ohnuma, Michiaki Unno
２．発表標題 Exploring the association between colorectal cancer and immunogenic cell death
３．学会等名 第81回日本癌学会学術総会
４．発表年 2022年

１．発表者名 Satoru Naito, Taiki Kajiwara, Hideaki Karasawa, Minoru Kobayashi, Tomoyuki Ono, Ryo Funayama, Keiko Nakayama, Shinobu Ohnuma, Michiaki Unno
２．発表標題 Immunogenic cell death is induced by anticancer drugs in colorectal cancer cell lines and organoids.
３．学会等名 12th AACR-JCA Joint Conference（国際学会）
４．発表年 2022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