

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19456

研究課題名（和文）大腸癌細胞集団の極性転換による免疫回避機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of the immune evasion through polarity switching of the colorectal cancer clusters

研究代表者

井上 正宏（INOUE, Masahiro）

京都大学・医学研究科・特定教授

研究者番号：10342990

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）：大腸正常上皮は一定の向きに並んだ（極性）細胞からできており、外部と接した面はapical面と呼ばれる。大腸がんオルガノイドを用いて、apical面ががん細胞集団の内側にできる場合（apical-in）と比べて、細胞塊外周にできる場合（apical-out）は、免疫から逃れる能力が高いことを明らかにした。また、がん細胞が細胞外基質に囲まれているにも関わらずapical-outを維持する病態において、apical面を消失させることで抗がん剤感受性を上げることができた。以上より、極性状態を標的とすることは治療戦略になりえる。

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阻害薬は一部の症例に劇的な効果を示し、免疫療法は新たながん治療法として確立された。しかし、免疫チェックポイント阻害薬の奏効率は決して高くないことも事実であり、未だ解明されていないがんが免疫から逃れるメカニズムが存在すると考えた。細胞極性と免疫応答についてはこれまでに報告が皆無であり、本研究では、細胞極性と免疫応答の関係を明らかにした。今後、apical-outの極性を標的とした治療法を始めとした、新たながん研究および治療戦略に発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The normal epithelium of the colon is composed of cells arranged in a certain orientation (polarity), and the surface in contact with the outside is called the apical membrane. Using colorectal cancer organoids, we found that the apical surface has a greater ability to evade immunity when it forms on the periphery of the cell mass (apical-out) compared to when it forms on the inside of the cancer cell mass (apical-in). In addition, in pathological conditions where cancer cells maintain apical-out despite being surrounded by extracellular matrix, the induction of apical membrane loss can enhance sensitivity to anticancer drugs. Thus, targeting the polarity state may be a therapeutic strategy.

研究分野：病態医化学、実験病理学、腫瘍生物学

キーワード：大腸癌 オルガノイド 免疫回避 極性 micropapillary 治療戦略

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは宿主免疫を回避して増殖する。近年、免疫チェックポイント阻害薬は一部の症例に劇的な効果を示し、免疫療法が新たながん治療法として確立された。しかし、免疫チェックポイント阻害薬の奏効率は決して高くないことも事実であり、未だ解明されていないがんの免疫回避機構が存在すると考えた。申請者は、これまでにがん細胞を単一の細胞としてとらえるのではなく、「集合体」として認識し、細胞集団で観察される性質の変化に着目してきた。世界に先駆けてがん細胞集団における「極性転換」の概念を提唱し、*in vitro* で実証 (Okuyama 2016 *Am J Pathol*)、病態における役割を明らかにした (Onuma 2021 *J Pathol*)。

さらに、大腸がん細胞塊の apical 面からは NOX1 を介して ROS が放出され、肝臓での着床の際に類洞内皮を排除することに必須であることを明らかにした (未発表データ) ことから、がん細胞塊の外周が apical 面に覆われている (apical-out) ことが、免疫応答にも影響していると予想した。事実、がんの微小環境では、ROS によって免疫機能が減弱することが報告されている (Deng 2020 *Nature Comm*)。そこで、大腸がん細胞塊とマウス活性化炎症細胞 (peritoneal exudate cells: PEC) あるいはマクロファージ様細胞株 (RAW264) とを共培養すると、apical 面が内腔に形成される apical-in のがん細胞塊との共培養では、マクロファージ様細胞で炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6, IL-1、IL-2, CCL1) の転写が増加し、抗炎症性のサイトカイン (TGF- β) の転写が抑制されたのに対し、apical-out のがん細胞塊と共培養した PEC では、単一培養群と同等レベルにまで抑制された。以上の実験結果は、apical-out の極性状態が、免疫細胞の活性化を阻害することで免疫の回避に関与する仮説を支持する。そこで、さらに分化型腺がんの“極性”を切り口にするにより、免疫回避の機構を明らかにし、新たながん治療の発展に繋げる着想に至った。

2. 研究の目的

本申請は、大腸がん細胞集団の「極性」という新たな視点から、免疫回避のメカニズムを明らかにすることを目的とした。我々はこれまでに、分化型腺がん細胞塊は、apical 面ががん細胞塊内の管腔側に存在する状態 (apical-in) と、がん細胞塊外周に存在する状態 (apical-out) が速やかに転換することを明らかにした。患者がんの脈管侵襲部においては、apical-out の細胞塊が存在する。血管内に浸潤したがん細胞塊は、宿主免疫応答を回避できなければ転移は成立しないことから、apical-out のがん細胞塊は、免疫を回避すると仮説を立てた。本申請では、apical-out の極性状態が免疫細胞の機能に及ぼす影響およびそのメカニズムを明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) オルガノイドとの共培養による腹腔滲出細胞の活性化の検討

C57BL/6 の腹腔内に異物を移入することで惹起した炎症によって誘導された腹腔滲出細胞を、異物移入 5 日目に回収した。一方で、大腸がんオルガノイドである C45 を浮遊培養し、apical-out の極性状態にした。また、オルガノイドを Matrigel (MG) に埋包し、apical-in の極性状態に極性転換させた。MG を溶解させるためにコラゲナーゼ type4 処理をした。実験条件を揃えるために、浮遊培養したオルガノイドにも同様の処理をした。直径が 40-70 μm のオルガノイドを回収し、200 個のオルガノイドと 2×10^5 個の腹腔滲出細胞を共培養した。12 時間後、40 μm のス

트레이ナーを通し、オルガノイドと腹腔滲出細胞を分離した。腹腔滲出細胞の炎症誘導性サイトカイン(IL-1、IL-6、IFN- γ など)や抗炎症性サイトカイン(TGF- β)、ケモカイン(CXCL-1、CXCL-2)の発現を real-time PCR で比較した。

(2) Apical 面の免疫制御分子の発現および局在の検討

C45 オルガノイドの apical-out から apical-in への極性転換にともない、apical 面に発現する免疫制御分子の局在が変化するか免疫組織化学染色によって検討した。免疫抑制性の分子は、マクロファージ、単球、NK 細胞に共通の分子(PD-L1、PD-L2)や NK および単球特異的な分子(Galectin-9、HMGB1)、NK 細胞特異的な分子(HLA、B7、PVR)、貪食細胞特異的な Eat me シグナル(Glycoprotein、SLAMF7)を候補とした。また、免疫を活性化する分子は、マクロファージと NK 細胞に共通の分子(GITRL、CD47)を候補とした。

(3) In vivo マウス大腸がんモデルの確立

共同研究者の青木らから提供された、Ctnnb1、Kras、Trp53、Smad4 の遺伝子変異を導入したマウス(CKPS マウス)で自然発症した転移性大腸がんから調製したオルガノイドを用いた。MG に包埋して培養した apical-in のがん細胞塊および浮遊培養した apical-out のがん細胞塊を C57BL6 マウスの肝臓に経門脈的に移植し、2週間後にマウスを犠牲死させ、肝表面から観察できるコロニー数を計測するとともに、各ローブの最大断面における腫瘍の面積を HE 染色により算出した。

(4) 大腸癌 MPC オルガノイドと活性化脾細胞との共培養および IFN- γ 処理による極性状態の検討

極性転換不全である micropapillary carcinoma(MPC)由来のオルガノイド 50 個と、 2×10^6 個の脾細胞を、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ の LPS および 10%MG を含んだ培地で共培養した。MPC オルガノイド(C166)は apical 面を real-time にモニターするために、GFP-GPI を遺伝子導入した(C166 GFP-GPI)。共培養 5 日後に GFP を指標に、MPC オルガノイドの極性状態を評価した。LPS を添加した脾細胞の IFN- γ の発現は、real-time PCR で比較した。MG に埋包した C166 GFP-GPI を IFN- γ ($6 \mu\text{g/ml}$) で処理し、24 時間後に極性状態を観察した。

4. 研究成果

(1) 共培養系での免疫応答の検討

異なる極性状態にある大腸がん細胞塊に対する免疫細胞の活性化あるいは細胞傷害性を比較検討した。apical-in の極性状態は、マクロファージ様細胞株(RAW264)のみならず、腹腔滲出細胞の活性化にも関与し、逆に apical-out の極性状態は不活性化あるいは無反応であることを明らかにした(図 1)。つまり、apical-out の極性を持つ大腸がん細胞集団は、免疫を回避する。

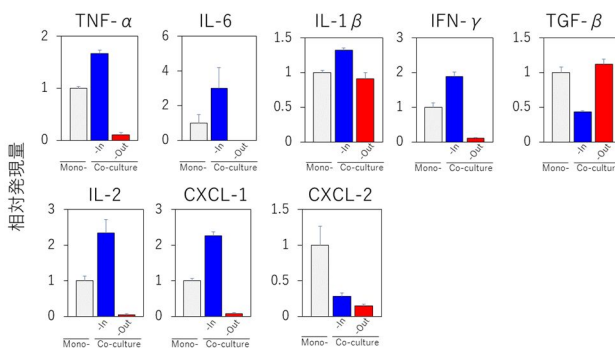


図 1 オルガノイド共培養後の腹腔滲出細胞サイトカイン転写レベル

(2) 免疫応答回避のメカニズムの検討

マトリゲルに包埋して培養した apical-in のがん細胞塊と浮遊培養した apical-out のがん細胞塊に対して、がん細胞に発現する免疫制御分子 (PD-L1, PD-L2, Galectin-9, HMGB1, B7-H3, SLAMF7, MHCclass) および免疫活性化分子 (GITRL, CD47 など) の局在を、免疫組織化学染色によって検討した。その結果、T 細胞を抑制的に制御する PDL-2 と、免疫回避に機能的に働く CD47 が、apical 面のマーカーである Villin と局在が一致しており、この二つの分子が apical-out による免疫回避のメカニズムの一つである可能性が考えられた。

(3) マウス大腸がんモデルによる in vivo での検証

In vivo で宿主応答を解析するために、自然発がんマウス大腸がんからオルガノイドを作製し、ヒト大腸がんオルガノイドと同様に極性転換することを確認した。次に、同系マウスにおける肝転移モデルでの転移能の違いを評価することで、獲得免疫の関与の有無を明らかにするために、肝転移モデルを作製した。自然発がんマウス大腸がんから作製したオルガノイドをマトリゲルに包埋して培養した apical-in の細胞塊と浮遊培養した apical-out のがん細胞塊を C57BL6 マウスの肝臓に経門脈的に移植し、肝転移能を検討した。その結果、apical-in と比較して、apical-out のオルガノイドを移植した方が、コロニー数は約 2 倍、腫瘍面積は約 2.5 倍増加した (図 2)。

Apical 面が血管内皮への接着を促進する可能性があるため、免疫不全マウスでも同様の解析を行う予定である。以上の結果から、マウス大腸がんモデルにおいても、apical-out の極性状態が転移に有利に働いており、本モデルは、apical-out の免疫回避のメカニズムを解析するための有用なプラットフォームになりうると考えられる。

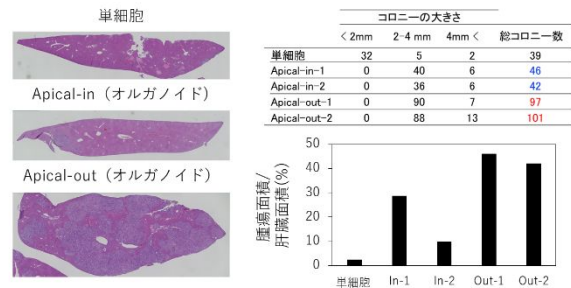


図2 マウス大腸がんオルガノイドを用いた肝転移モデル

(4) 免疫回避能を持つ apical-out を標的とした治療法の開発

以上の研究結果から、apical-out の極性状態は、免疫回避に寄与すると推察できた。極性に関わる病態の一つに micropapillary carcinoma (MPC) がある。MPC は細胞外基質 (ECM) が周囲にあるにも関わらず apical-out の極性を維持する「極性転換不全」の病態で、リンパ行性転移率が高く薬剤耐性であり予後不良である。実際に、MPC の腫瘍部位には、免疫細胞の浸潤が少ないことが報告されている (Guo 2008 Modern Pathology)。そこで、apical-out の極性を消失させることができれば、免疫回避が解除され、治療につながると仮説を立てた。C57BL/6 マウス由来の脾細胞を LPS で処理し、MPC オルガノイドと共培養した。その結果、MPC オルガノイドの apical-out の極性は消失した (図 3a)、LPS で処理した脾細胞は、24 時間で IFN の転写レベルが 1000 倍以上増加した (図 3b)。また、Recombinant IFN を MPC オルガノイドに直接処理すると apical-out のオルガノイド外周の apical 面が消失した (図 3c)。以上の結果から、IFN は、MPC の極性転換不全を標的とする治療戦略になり得ると考えられた。

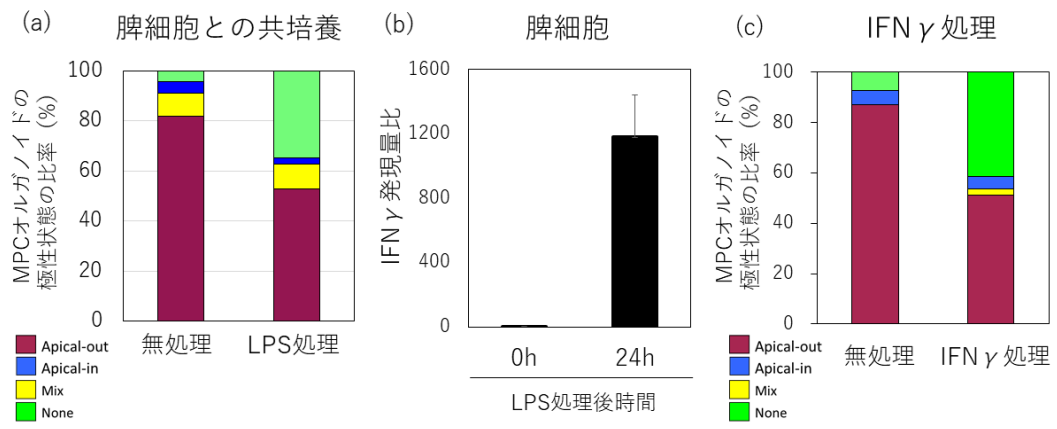


図3 IFN γ によるapical-outの減弱

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Masamune Masuda, Keita Iida, Mie Tanaka, Satoshi Kubota, Kunishige Onuma, Yoji Kukita, Shoji Kamiura, Aya Nakajima, Yutaka Ueda, Eiichi Morii, Tadashi Kimura, Jumpei Kondo, Mariko Okada-Hatakeyama, Shinichi Hashimoto, Masahiro Inoue.	4. 巻 194
2. 論文標題 Clonal Origin and Lineage Ambiguity in Mixed Neuroendocrine Carcinoma of the Uterine Cervix	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 415 ~ 429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2023.11.013	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 Uematsu Hiroyuki, Saito Chieko, Kondo Jumpei, Onuma Kunishige, Coppo Roberto, Mori Yukiko, Muto Manabu, Kikawa Yuichiro, Tada Manami, Sugie Tomoharu, Inoue Masahiro	4. 巻 36
2. 論文標題 De-differentiation in cultures of organoids from luminal-type breast cancer is restored by inhibition of NOTCH signaling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 2099 ~ 2112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-023-00975-7	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 Coppo Roberto, Kondo Jumpei, Onuma Kunishige, Inoue Masahiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Tracking the growth fate of single cells and isolating slow-growing cells in human colorectal cancer organoids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 102395 ~ 102395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2023.102395	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 Shimizu Shota, Kondo Jumpei, Onuma Kunishige, Coppo Roberto, Ota Kasumi, Kamada Mayumi, Harada Yohei, Tanaka Yoshihisa, Nakazawa Mai Adachi, Tamada Yoshinori, Okuno Yasushi, Kawada Kenji, Obama Kazutaka, Coffey Robert J., Fujiwara Yoshiyuki, Inoue Masahiro	4. 巻 114
2. 論文標題 Inhibition of the bone morphogenetic protein pathway suppresses tumor growth through downregulation of epidermal growth factor receptor in <sc>MEK</sc>/<sc>ERK</sc> dependent colorectal cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3636 ~ 3648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15882	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 Ito Yu, Kondo Jumpei, Masuda Masamune, Matsuzaki Shinya, Onuma Kunishige, Kanda Mizuki, Watanabe Yuko, Sakaguchi Hitomi, Yoshino Kiyoshi, Ueda Yutaka, Kamiura Shoji, Kimura Tadashi, Inoue Masahiro	4. 巻 36
2. 論文標題 Ex vivo chemosensitivity assay using primary ovarian cancer organoids for predicting clinical response and screening effective drugs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 752 ~ 761
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-022-00827-w	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 Coppo Roberto, Kondo Jumpei, Iida Keita, Okada Mariko, Onuma Kunishige, Tanaka Yoshihisa, Kamada Mayumi, Ohue Masayuki, Kawada Kenji, Obama Kazutaka, Inoue Masahiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Distinct but interchangeable subpopulations of colorectal cancer cells with different growth fates and drug sensitivity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105962 ~ 105962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.105962	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 Nashimoto Yuji, Shishido Shotaro, Onuma Kunishige, Ino Kosuke, Inoue Masahiro, Shiku Hitoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Oxygen metabolism analysis of a single organoid for non-invasive discrimination of cancer subpopulations with different growth capabilities	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1184325 ~ 1184325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fbioe.2023.1184325	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 Nashimoto Yuji, Mukomoto Rei, Imaizumi Takuto, Terai Takato, Shishido Shotaro, Ino Kosuke, Yokokawa Ryuji, Miura Takashi, Onuma Kunishige, Inoue Masahiro, Shiku Hitoshi	4. 巻 219
2. 論文標題 Electrochemical sensing of oxygen metabolism for a three-dimensional cultured model with biomimetic vascular flow	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 114808 ~ 114808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2022.114808	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 Onuma Kunishige, Inoue Masahiro	4. 巻 113
2. 論文標題 Abnormality of apico-basal polarity in adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3657 ~ 3663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15549	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 Kawata Mayuko, Kondo Jumpei, Onuma Kunishige, Ito Yu, Yokoi Takeshi, Hamanishi Junzo, Mandai Masaki, Kimura Tadashi, Inoue Masahiro	4. 巻 113
2. 論文標題 Polarity switching of ovarian cancer cell clusters via SRC family kinase is involved in the peritoneal dissemination	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3437 ~ 3448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15493	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 井上 正宏	4. 巻 第4版
2. 論文標題 CTOSとPDXのシャトルシステム.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 細胞培養・組織培養の技術	6. 最初と最後の頁 223 ~ 226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計32件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小沼邦重, 井上正宏
2. 発表標題 Micropapillary carcinoma の極性転換不全を標的とした治療戦略
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小沼邦重, 井上正宏
2. 発表標題 Micropapillary carcinomaの薬剤感受性における極性転換の役割
3. 学会等名 第32回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松浦吉晃, 小沼邦重, 下村雅律, 内堀篤樹, 井上匡美, 井上正宏
2. 発表標題 オルガノイドを用いたがん気道内転移モデルによるSTASの病態検証
3. 学会等名 第32回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松浦吉晃, 小沼邦重, 下村雅律, 内堀篤樹, 井上匡美, 井上正宏
2. 発表標題 オルガノイドを用いたがん気道内転移モデルによるSTASの病態検証
3. 学会等名 第63回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上正宏
2. 発表標題 肺癌オルガノイドの臨床・基礎研究への応用
3. 学会等名 第63回日本肺癌学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松浦吉晃, 小沼邦重, 下村雅律, 内堀篤樹, 井上匡美, 井上正宏
2. 発表標題 オルガノイドを用いたがん細胞塊によるがん気道内転移モデル
3. 学会等名 第75回胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小沼邦重, 井上正宏.
2. 発表標題 Micropapillary carcinoma病態における極性転換不全とその分子機構
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 Inhibition of Src abrogates polarity switching and adhesion to extracellular matrix of ovarian cancer cell clusters
2. 発表標題 Kawata Mayuko, Kimura Tadashi, Inoue Masahiro
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松浦吉晃, 小沼邦重, 井上匡美, 井上正宏
2. 発表標題 オルガノイドを用いたがん細胞塊によるがん気道内転移モデル
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河田真由子, 近藤純平, 井上正宏
2. 発表標題 腹膜播種の抑制を目指した、腹水中卵巣癌の極性制御
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小沼邦重, 井上正宏
2. 発表標題 大腸がん転移におけるがん細胞集団の極性転換の役割
3. 学会等名 第31回日本がん転移学会学術集会・総会
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
研究分担者	小沼 邦重 (ONUMA Kunishige) (90597890)	京都大学・医学研究科・特定助教 (14301)	
研究分担者	青木 正博 (AOKI Masahiro) (60362464)	愛知県がんセンター(研究所)・がん病態生理学分野・副所 長兼分野長 (83901)	
研究分担者	近藤 純平 (KONDO Jumpei) (80624593)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授 (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
---------	---------