

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 4 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860038

研究課題名(和文) プロサイモシン による癌幹細胞の創出・維持に関連した免疫抑制機構の解明

研究課題名(英文) Revealing the mechanism of the tumor initiation and development due to the tumor immunosuppression by Prothymosin-alpha.

研究代表者

水谷 龍明 (Mizutani, Tatsuaki)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：50701843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌は、何らかのメカニズムによって免疫系から許容され、表在化する。この癌の免疫抑制機構を明らかにするために、癌細胞から放出されるダメージ関連分子パターン(DAMPs)の一つであるプロサイモシンアルファ(PTMA)に着目し研究を推進した。はじめに、癌に対する免疫細胞の応答を適切に評価する新規の3次元細胞培養系を樹立した。次に、癌微小環境と結核病巣が類似している点に着目し、実際がんと同様に結核病巣でマクロファージが免疫抑制型になっている事実を突き止めた。

研究成果の概要(英文)：How does cancer escape the host immune system? To reveal the molecular mechanism underlying tumor immunosuppression, I focused on the PTMA, one of the DAMPs, which may release the tumor microenvironment from injured malignant cells. To analyze the physiological interaction between tumor and immune cells, I first developed a novel 3D co-culture system where heterogenous immune cells could be communicated together during a long period. I also developed a novel non-radioactive cellular cytotoxicity assay to evaluate the tumor immunosuppression. In addition to such in vitro assays, I specified one in vivo physiological condition upon bacterial infection is closely similar with tumor microenvironment in terms of the expression of M2 macrophages, which is known to one of the immunosuppressive immune cells. They will be certainly useful tools to understand the uncertain cancer immunosurveillance.

研究分野：免疫学

キーワード：がん生物学 免疫学

## 1. 研究開始当初の背景

プロサイモシン $\alpha$  (PTMA) は、グルタミン酸を多く含む分子量 12kDa の低分子量酸性蛋白質である。PTMA の細胞内の主たる局在は核にあり、遺伝子の発現を制御していると考えられるが、詳細な機能については不明な点が多い。PTMA は、一方で、細胞障害性ストレス等の負荷がかかることで細胞外に放出され、炎症反応を制御することが示唆されており、細胞内外で様々な役割を發揮する多機能性分子である。また、癌の悪性度と PTMA 発現レベルには相関性があることが分かっており、癌の予後予測因子としても有望視されている (Dominguez *et al*, *Eur J Cancer* 1993 等)。このように癌の悪性化との関連性が示されてはいるが、具体的な機能側面による説明は未だ不明である。

本研究開始当初は、固形癌の深部領域における低血糖・低酸素状態の環境ストレスによって、PTMA が自発的に放出され、周囲の免疫細胞活性を抑制する可能性や癌幹細胞の生存維持を制御する可能性を考え、その実証に向けて研究を計画した。

## 2. 研究の目的

癌悪性化の根幹となる癌幹細胞は、その発生がどのように誘導維持され、免疫系からの攻撃をどのようにして回避しているのか、その全容が解明されていない。固形癌の深部では、激しい細胞増殖と細胞死が繰り返し起こっており、低栄養低酸素状態だと考えられる。PTMA は、死にゆく細胞から放出されるダメージ関連分子パターン (Damage-associated molecular patterns; DAMPs) の一つである。癌微小環境は、DAMPs に常時さらされる特殊な環境と言える。こうした特殊な環境下におかれた免疫細胞と癌細胞の相互作用を解析することで、癌による免疫抑制作用や癌幹細胞の出現機構を分子レベルで紐解くことを目的とした。

## 3. 研究の方法

PTMA の細胞内外における癌細胞又は免疫細胞に対する生理機能を解明するために、癌と免疫細胞の両側面を解析する解析基盤の開発整備を行った。続いて PTMA が作用する標的免疫細胞をマクロファージに絞り、癌組織に浸潤したマクロファージのダイナミックな機能変換を明らかにするために必要かつ有用な生体モデルの構築を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 解析基盤の開発

①PTMA による免疫細胞抑制効果を検証するための癌細胞殺傷能を指標にしたスクリーニング系の開発:

PTMA によって免疫細胞が抑制される状態を *in vitro* で実証するために、免疫エフェクター細胞、もしくはそれらと樹状細胞等を加えて、癌細胞を共培養し、癌細胞殺傷度を評価する実験系の開発に着手した。エフェクター細胞には、健康人末梢血単核細胞由来のヒト  $\gamma\delta$  T 細胞を利用した。一般的に、末梢血単核細胞から  $\gamma\delta$  T 細胞を高純度で培養するのは非常に難しいとされるが、研究代表者らは、健康人末梢血から高純度で培養する系を確立している (Sugie *et al*, *Cancer Immunol Immunother* 2013)。よって本研究では、得られた高純度・高活性を示す免疫エフェクター細胞を用いて、癌細胞障害能をより簡便に定量化する非 RI 検出評価系の樹立を試みた。平成 26 年度に研究代表者が所属した長崎大学創薬研究教育センターにおいて、非 RI 細胞障害度検出系が新たに開発されたことから、当該法を採用してプロトコルの作成に着手した。この新規細胞障害検出系は、エステラーゼ感受性の新規化合物が標的となる癌細胞に取り込まれた後、細胞内で生じた加水分解産物を定量するアッセイ系である。生成された加水分解産物は、ランタノイド系遷移元素間とキレートを形成し、レーザー励起により時間分解蛍光を発する。時間分解蛍光は、創薬スクリーニングで標準的に用いられる方法で、バックグラウンドに対するシグナル比が高いことが知られている。この非 RI 系細胞障害アッセイ系は、従来の RI を用いた chromium-release cytotoxicity assay や AnnexinV/PI による蛍光細胞アッセイに比べて、短時間の反応時間及び作業時間で、定量性の優れた評価が可能であった。

具体的なプロトコルとしては、標的となる癌細胞 (EJ-1) を用意し、別に免疫エフェクター細胞を準備する。癌細胞にエステラーゼ感受性の新規化合物を 15 分作用させる。ここで、新規化合物が腫瘍細胞中に取り込まれエステラーゼの作用を受け、加水分解産物が遊離される。このラベル化された癌細胞に、免疫エフェクター細胞であるヒト  $\gamma\delta$  型 T 細胞を作用させ、40 分後に細胞培養濾液を取り、ユーロピウム溶液と混合し、時間分解蛍光 (励起波長 340nm : 蛍光波長 : 615nm) を測定する。細胞障害度 (比細胞障害率%) は、対象となるサンプルの蛍光から自然漏出した蛍光バックグラウンドを引いた値に対して、(最大漏出\* - 自然漏出) 分で割った値を算出した。\*最大漏出は、癌細胞に対して界面活性剤処理を行ったものを用いた。

②PTMA によって発現制御を受ける癌悪性化因子の同定に資する癌細胞と免疫細胞の細胞共培養系の開発:

癌細胞と免疫細胞が共存し、それらの相互作用によって生じる免疫抑制効果を評価する細胞共培養系として適当なモデルがなかったために、新たに細胞共培養系を樹立することとした。従来の二次元細胞培養は、単層の細胞増殖であり、実際の生体内における癌の増殖環境・形態と大きく異なることが分かってきた。そこで二次元培養に代わる培養系として注目されているのが三次元細胞培養系である。当該培養系は、生体内環境と類似性が高い細胞形態を取ることが知られており、PTMA の免疫抑制やそれに付随した遺伝子変化スクリーニングに資する新規培養系として有用であると判断し、その開発に着手した。開発における重要な着眼点は、ヒト病理で観察されるように、癌細胞塊に対して免疫細胞が浸潤・包囲するよう配置された3次元構造であり、そのような構造体が観察されることを念頭に置いてモデル培養系の構築を行った。作製は難航を極めたが、病原体の慢性感染モデルを応用することに思い当たり、結核慢性感染モデルの試作に取り組んだ。BCG 感染細胞もしくは BCG そのものと免疫細胞を混ぜ合わせ、コラーゲン含有培地で三次元共培養することで標的細胞塊（感染細胞）の周囲及び内部に末梢血由来免疫細胞が局在する新規三次元培養系の構築に成功した（図 1）。このモデル培養系では、主にマクロファージ（MHCII 陽性）の集積が確認された。これまでの研究からも癌に浸潤するマクロファージは確認されており、特に免疫抑制に働くいわゆる M2 マクロファージに変容することが、癌の悪性度と密接な関係にあることが示されている（Michele *et al.* *Nature*, 2011）。これらの知見及び確立した実験基盤を基に、PTMA による免疫抑制効果の一つとして、マクロファージの M2 変容に焦点を絞り、研究を推進することとした。

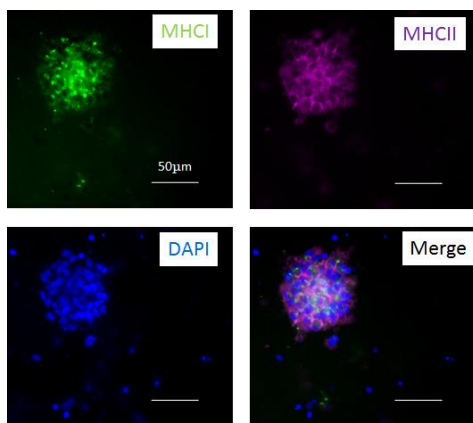


図 1. アカゲサル末梢血単核細胞と BCG を、95%コラーゲン/PBS 溶液中で混合し、96-well スケールで播種し、37°C/5%CO<sub>2</sub> 下で 45 分培養した後、上層に RPMI/10%FBS 培地を添加し、再び 10 日間インキュベーターにて培養した。得られた細胞塊を固定し、蛍光ラベル化した表記抗体を用いて免疫染色し可視化した。

(2) 癌の生体微小環境の *in vivo* モデル化：三次元共培養のモデルとして結核感染細胞を採用し観察・解析を行った結果、癌とマクロファージの相互作用と、結核感染細胞とマクロファージの相互作用について高い類似性があることがわかってきた。例えば、結核の特徴的な病巣である肉芽腫組織の深部は、低酸素低栄養状態であり、固形癌深部の環境と非常に酷似している。当初の計画では、従来の癌 xenograft マウスモデルによって癌と免疫細胞の共存を *in vivo* で捉えようと考えていたが、結核感染モデルを癌微小環境模倣モデルとして利用できる可能性が浮上したために、先に結核感染モデルの評価を行うこととした。ヒトとマウス間の免疫系の違いはすでに問題視されていることから、アカゲサル又はモルモットをモデル動物に採用して、モデルを構築した。図 2 に示すように、多層状に集積する炎症細胞と、肉芽腫中心部に乾酪壊死領域が観察された。これらの病理学的所見は、ヒト病理においても観察されることから、ヒト結核肉芽腫に酷似した病理組織像であった。次に、得られたモデル肉芽腫におけるマクロファージの空間的分布を明らかにするため、抗 Arginase-1 抗体の作製を試みた。Arginase-1 は、免疫抑制に作用するマクロファージが特異的に発現するマーカー分子である（Murray *et al.* *Immunity*, 2014）。はじめにモルモット Arginase-1 リコンビナント蛋白質を抗原として、ラットに免疫し、1043 個のハイブリドーマを樹立した。次に、2 種類の抗体産生クローンの選別に成功し、最終的にそれぞれから免疫組織染色に利用可能な抗 Arginase-1 ラットモノクローナル抗体を取得し、BCG 肺組織を免疫組織染色すると、肉芽腫中心部に Arginase-1 細胞が限局する組織像が得られた。従って、肉芽腫中心部の低栄養・低酸素状態と考えられる領域近傍に、Arginase-1 を発現する M2 マクロファージが局在することが示された。癌深部における低酸素低栄養状態はすでに知られていることから、今回の肉芽腫病巣における M2 マクロファージの局在や極性化に関わるメカニズムは、癌のそれと共通項が多いことが期待される。

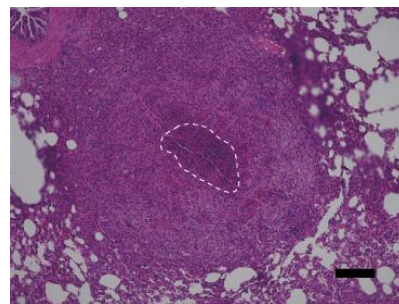


図 2. BCG 感染後のモルモット肺組織の薄切片標本の HE 染色像。肺に浸潤した炎症細胞

胞が局所で集積し、肉芽腫を形成し、中心部に壊死領域（点線で囲んだ範囲）が確認できる。スケールバーは、100  $\mu$ m。

## まとめ

(1) 免疫細胞による細胞障害性を評価する非RI検出系の開発：

従来のRI検出系に比べて、簡便かつ短時間で細胞障害能を評価できる系を開発した。

(2) 免疫細胞の慢性炎症反応を試験管内で再現する3次元細胞培養系モデルの構築：

先行モデル研究を基にして技術開発を進めた結果、外来抗原及び感染細胞に反応する免疫細胞を三次元的に観察する新規細胞培養系の樹立に成功した。

(3) 癌における免疫抑制効果を抽出可能な有用な生体モデルの樹立：

癌微小環境と高い類似性を持つ結核肉芽腫の動物モデルを構築することに成功した。

今後、免疫抑制作用を呈するであろうM2マクロファージの分化・機能制御におけるPTMAの役割及びそれに伴う癌悪性化メカニズムの実証につなげたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計2件）

① Mizutani T, N Neugebauer, EM Putz, V Sexl, Stoiber D.

The role of type I IFN signaling for NK cell activation in tumor surveillance.

37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan

平成26年11月16日

「横浜国際会議場」（神奈川県・横浜市）

② Mizutani T, Putz EM, Neugebauer N, Sexl V, Stoiber D.

The role of type I IFN in NK cell dependent tumor surveillance.

79th Annual Meeting of the Japanese Society of Interferon & Cytokine Research

平成26年6月19日

「北海道大学」（北海道・札幌市）

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

水谷龍明 (MIZUTANI, Tatsuaki)

京都大学ウイルス研究所・特定助教

研究者番号：50701843