

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32689

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02675

研究課題名(和文) がん変異細胞の抗原提示と正常上皮細胞による認識排除機構

研究課題名(英文) Epithelial cells recognize antigen presentation of transformed cells

研究代表者

丸山 剛 (Maruyama, Takeshi)

早稲田大学・高等研究所・講師(任期付)

研究者番号：30613872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々が独自に同定した正常細胞のタンパク質受容体ECARが、変異細胞において発現亢進するMHC-Iを認識することで、抗腫瘍能応答を惹起することを見出した。異常発生時を起点として正常上皮細胞は、a)がん変異細胞の物性を感知し、プライミングされる(ECARの発現誘導)、b)誘導されたECARによる変異細胞のMHC-Iの認識を経て、c)変異細胞に対する排除能を惹起する、という多段階機構であることを示してきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗原提示による上皮細胞の抗腫瘍の制御機構を医療に応用することで、まさに「発がんする前にがん変異細胞を除去する」という超早期がんの治療を対象とした「予防的医療」へと発展できると期待される。これまで臨床対象になってこなかった超早期がん治療法の確立のために、病変部位(あるいはその存在)を診断するバイオマーカーの開発、および「正常上皮細胞によるがん細胞の排除を促進する」という全く新規の作用メカニズムを標的としたがん治療薬の開発が必須となる。正常細胞が変異細胞を「認識」し、自身の抗腫瘍能を惹起するメカニズムの解明は、まさに新規薬剤の開発に繋がるため、国内外におけるインパクトは非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：Epithelial cells in the early stage of carcinogenesis with mutations in the proto-oncogene Ras are outcompeted to the luminal side (out of the body) by surrounding normal cells (cell competition phenomenon). However, it has been unclear how normal cells recognize Ras-transformed cells. Recently, we found that the normal cell protein receptor ECAR elicits an antitumor response by recognizing MHC-I, which is upregulated in RasV12 cells.

Starting from the time of aberration, normal epithelial cells are able to, a) Sensing the physical properties of RasV12 cells and priming them (induction of ECAR expression), b) Recognition of MHC-I of RasV12 cells by the induced ECAR, and then c) Induction of exclusion of RasV12 cells We have shown that this is a multi-step mechanism.

研究分野：がん

キーワード：がん

1. 研究開始当初の背景

細胞は自身の細胞内の微小な変化を、抗原というかたちで細胞外へ開示する。この内在性抗原の提示はMHCクラスIIに依存しており、傷害性T細胞の活性化によりがん細胞を含む異常細胞の認識および排除に極めて重要な役割を担う。一方で我々は、最近原がん遺伝子Rasに変異を生じたがん化初期段階にある上皮細胞は、周辺正常細胞によって管腔側(体外へ排出される方向)へと押し出される細胞競合現象を見出している。この正常細胞の抗腫瘍能応答のトリガーとして、MHCクラスIIによる抗原提示が関与するという知見が得られてきた。これは、非免疫系における抗原提示とその認識機構が存在することを意味する。

上皮組織細胞層に生じたがん変異細胞は、周辺正常細胞によって駆逐されるが、重要なことに、この現象は変異細胞のみが存在する状態では起こらない。これは、正常上皮細胞と変異細胞間のクロストークが、変異細胞に対する正常細胞の抗腫瘍能を引き起こすことを意味している。正常上皮細胞が、近傍Ras変異細胞の存在を認識し、Filaminなどの細胞骨格形成因子を細胞間に能動的に集積させる。また一方で、変異細胞においては細胞骨格クロスリンカーPlectinが頂端側へ集積する(Kadeer & Maruyama *et al.*, *Sci Rep.* 2017, Maruyama *et al.*, *PNAS* 2017)。このように、正常および変異細胞それぞれにおいて、物理的なモーメントが生じることで、変異細胞は正常細胞層から排除される。しかしながら、「正常細胞がどのようにして、変異細胞の存在を認識しているか」という、変異細胞排除の引き金については全く不明である。本研究では、正常上皮細胞がどのようにしてがん変異細胞を「認識」し、排除能を惹起するかという疑問にアプローチする。

2. 研究の目的

これまで、「細胞内のイベント」が、正常細胞による変異細胞の認識に大きく影響をあたえることを示してきた。例えば、RasV12変異細胞内では、ミトコンドリアの機能低下やDNAダメージの蓄積が生じており、これらは変異細胞の排除を正に制御することが分かってきた。これらのことは、正常細胞は細胞質や核内といった変異細胞内の情報変化を認識し、抗腫瘍能を惹起していることを意味している。このような細胞内変化を細胞外へと開示する機構として、主要組織適合遺伝子複合体(Major Histocompatibility Complex; MHC)クラスIIによる内在性抗原の細胞外への提示がよく知られている。プロテアソームによってプロセッシングを受けたペプチド断片は、TAP1(transporter associated with antigen processing 1)を介して小胞体(ER)内腔へと輸送される。小胞体へと挿入されたペプチドは、待機しているMHCクラスIIと会合することで、細胞外へと輸送され、抗原提示が完了する。Ras変異依存的なタンパク質発現のプロファイル変化は、この抗原提示を亢進することが知られている。そこで、クラスII依存的な抗原提示が*in vitro*細胞競合モデルシステムにおいて、変異細胞の排除に関与するかを検討した。テトラサイクリン(Tet)誘導性pTRE3G-RasV12安定発現MDCK細胞(Ras細胞)を正常MDCK細胞(正常細胞)と共培養すると、Tet依存的にRas細胞は正常上皮細胞層から排除される。一方で、TAP1を欠損したRasV12細胞と正常細胞を共培養すると、この変異細胞の排除が低下した。また更に、正常細胞の抗腫瘍能の指標となるFilaminの集積も、変異細胞におけるTAP1欠損で著しく減弱すること分かった(図2-c)。これらのことは、変異細胞の抗原提示を正常細胞が認識し、正常細胞自身の抗腫瘍能を惹起していることを示唆している。

この知見を足がかりに、まず がん変異細胞側の抗原提示に関わるMHCなどの膜タンパク質を具体的に絞り込む。またさらに、正常細胞が変異細胞を認識するために必須である抗原提示受容体(上皮細胞抗原受容体; Epithelial cell Antigen receptor; ECAR)を同定することで、この細胞間コミュニケーション機構を詳細に解析する。これにより、細胞競合現象における上皮細胞間コミュニケーションにおける抗原提示と認識機構の実態に迫る。

3. 研究の方法

変異細胞の抗原提示にかかわる分子の同定および抗原変化を認識する認識受容体分子の同定をおこなう。その後、同定した分子に関する詳細な認識機構を培養細胞系で解明

するとともに、*in vivo*マウスモデルシステムに移行することで、より生理的条件下での解析をおこなう。特に認識機構は、ペプチド認識機構のみならず、様々な認識様式が予想される。そのため、網羅的に抗原認識タンパク質および関連タンパク質を、申請者の経験を基にCRISPR/Cas9スクリーニングにより同定する(Maruyama *et al.*, *Nat Biotechnol.* 2015, Maruyama *et al.*, *Sci Signal.* 2014)。

平成30～31年度：

変異細胞の抗原提示に関わる分子の同定および解析

がん変異細胞の内在性低分子抗原を提示するMHCクラスIの絞り込み：内在性抗原の提示を担うMHCクラスIは、古典的MHCクラスIaおよび非古典的Ibというサブファミリーに分けられる。IbにもTAP1依存的に抗原提示を担う分子があるため、IaおよびIbを対象として細胞競合に關与するクラスI分子を絞り込む。マウスでは少なくとも16種類のサブクラスが存在するが、イヌのそれは4種類と少ない。そこで、イヌの4つのクラスI分子(クラスIa：DLA88；クラスIb：DLA12、64および79)をノックアウトおよび過剰発現することで、変異細胞の排除およびFilaminの集積への影響を解析する。その後、相同性を基にマウス-クラスI分子を探索する。*in vitro*マウス培養細胞系はこれまで構築できていないため、タモキシフェン依存的RasV12変異細胞を誘導できるマウス(CK19-CreERT2; LSL-RasV12-IRES-GFP)から採取した腸管上皮幹細胞を用いた腸管上皮オルガノイド・システムにて、同定したクラスI分子の細胞競合への影響を評価する。

正常細胞側でどのようなタンパク質が「認識」機構に關与しているか

変異細胞が提示する抗原リガンドを認識する正常細胞側の受容体タンパク質の

CRISPR/Cas9スクリーニングによる同定：で同定されるMHCクラスIのカウンターパート分子の同定をおこなう。上皮細胞では、TおよびB細胞のようなVDJ組み換えは生じない。そのため、TCRのように抗原そのもののバリエーション認識以外の認識機構を考慮する必要がある。これまでクラスI認識機構として、クラスIの翻訳後修飾や細胞表面における量的変化が認識される機構が報告されている。加えて、ナチュラルキラー細胞などは特定の抗原とクラスIの複合体を認識する「パターン認識受容体」を持つことが知られている。これらの報告および上皮組織における発現を考慮して、現在対象遺伝子を300程度まで絞り込んでいる。そこでまず、これら遺伝子を対象としたCRISPR/Cas9-sgRNAライブラリーを構築する。また、スクリーニングのリードアウトとしては、マイクロアレイ解析から同定した正常-変異細胞の共培養特異的に正常細胞側で発現が亢進する遺伝子COX-2に注目する。このCOX-2遺伝子のプロモーター下流にVenus蛍光タンパク質をノックインしたレポーター細胞を樹立し、上述したライブラリーを用いた蛍光レポーター・ノックアウト細胞ライブラリーを構築する。これら細胞とRas変異細胞とを共培養することで正常細胞内での蛍光が統計的有意に減弱する遺伝子を絞り込む。同定した遺伝子は、既に構築している*in vitro*細胞競合モデルシステムにて評価することで、詳細な解析を進める。

平成31～32年度：

同定した遺伝子は、マウス*in vivo*において細胞競合現象を制御しているか

同定したMHCクラスI分子およびECARを欠損した免疫不全-細胞競合マウスモデルでの細胞競合現象の解析：特にクラスI分子欠失変異は、マウス個体の免疫系への影響が懸念される。この免疫系への影響を除外するため、免疫不全(SCID)マウスにおいて絞り込んだクラスI分子もしくはECARをCRISPR/Cas9システムにて欠損させる(Maruyama *et al.*, *Nat Biotechnol.* 2015)。この遺伝子欠損型SCIDマウスとすでに構築している少量のタモキシフェン投与により上皮組織全般にモザイク状にRas変異細胞を誘導できる*in vivo*細胞競合モデルマウス(CK19-CreERT2; LSL-RasV12-IRES-GFP)とをバッククロスしたSCIDマウスを用いて、*in vivo*細胞競合の解析を進める。

4. 研究成果

原がん遺伝子Rasに変異を生じたがん化初期段階にある上皮細胞は、周辺正常細胞によって管腔側(体外へ排出される方向)へと押し出される(細胞競合現象)。しかし、どのようにして正常細胞ががん変異細胞を認識しているかは不明であった。最近、我々が独自に同定した正常細胞のタンパク質受容体ECARが、変異細胞において発現亢進するMHC-Iを認識することで、抗腫瘍能応答を惹起することを見出した。

異常発生時を起点として正常上皮細胞は、

- a) がん変異細胞の物性を感知し、プライミングされる(ECARの発現誘導)

- b) 誘導されたECARによる変異細胞のMHC-Iの認識を経て、
- c) 変異細胞に対する排除能を惹起する

という多段階機構であることを示してきた。例えば、正常細胞はがん変異細胞の硬さを感知することで Runx2 を介して、ECAR の発現が促進された状態へとプライミングされる。次に、RasV12 の発現依存的に細胞表面での発現が促進された MHC-I を ECAR が認識する、これにより ECAR は SHP2/ROCK2 経路を介して細胞骨格形成因子を集積させることで変異細胞を上皮細胞層から排除する。加えて、ECAR は Ca^{2+} シグナルを介して、周辺正常細胞群の偏向性移動を誘導することで、変異細胞の排除を促進する（偏向性移動）。このことから、MHC-I/ECAR の相互作用はがん変異細胞に対する排除能を促進することで、がん変異細胞の発がんおよび腫瘍化を抑制していることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato N., Yako Y., Maruyama T., Ishikawa S., Kuromiya K., Tokuoka SM., Kita Y, Fujita Y.	4. 巻 18
2. 論文標題 The COX-2/PGE2 pathway suppresses apical elimination of RasV12-transformed cells from epithelia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 3(1):132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-0847-y	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 該当する
1. 著者名 Yuma Tetsu, Yusuke Kido, Meiting Hao, Shinji Takeoka, Takeshi Maruyama, and Toshinori Fujie	4. 巻 XX
2. 論文標題 Graphene/Au hybrid antenna coil exfoliated with multi-stacked graphene flakes for ultra-thin biomedical devices	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advanced Electronic Materials	6. 最初と最後の頁 XX
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/aelm.201901143	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 該当する
1. 著者名 Kasai Nobuhiro, Kadeer Ailijiang, Kajita Mihoko, Saitoh Sayaka, Ishikawa Susumu, Maruyama Takeshi, Fujita Yasuyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 The paxillin-plectin-EPLIN complex promotes apical elimination of RasV12-transformed cells by modulating HDAC6-regulated tubulin acetylation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-20146-1	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 Takagi Mikio, Ikegawa Masaya, Shimada Takashi, Ishikawa Susumu, Kajita Mihoko, Maruyama Takeshi, Kamasaki Tomoko, Fujita Yasuyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Accumulation of the myosin-II-spectrin complex plays a positive role in apical extrusion of Src-transformed epithelial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 974 ~ 981
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12643	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 Maruyama Takeshi, Sasaki Ayana, Iijima Sayuri, Ayukawa Shiyu, Goda Nobuhito, Tazuru Keisuke, Hashimoto Norikazu, Hayashi Takashi, Kozawa Kei, Sato Nanami, Ishikawa Susumu, Morita Tomoko, Fujita Yasuyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 ZAK Inhibitor PLX4720 Promotes Extrusion of Transformed Cells via Cell Competition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101327 ~ 101327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101327	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 Kozawa Kei, Sekai Miho, Ohba Kenji, Ito Shoko, Sako Hiroaki, Maruyama Takeshi, et al.	4. 巻 xx
2. 論文標題 The CD44/COL17A1 pathway promotes the formation of multilayered, transformed epithelia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 xx
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.04.078	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1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 丸山 剛
2. 発表標題 光照射によるがん変異細胞の誘導と挙動解析
3. 学会等名 日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 細胞競合の促進のための医薬組成物	発明者 丸山 剛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-063594	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 細胞競合の抑制のための医薬組成物	発明者 丸山 剛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-069777	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 細胞競合の制御剤	発明者 丸山 剛	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT450	取得年 2020年	国内・外国の別 外国

〔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
---------	---------