

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06008

研究課題名(和文) GPER標的薬と遺伝子導入用高分子材料を用いた抗イヌ腫瘍自然免疫活性化の検討

研究課題名(英文) Investigation of activated innate immunity on anti-tumor effect: the effect of polymers on cellular uptake of apoptotic-cells induced by GPER-target drug

研究代表者

岡本 まり子 (Okamoto, Mariko)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：30415111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：樹状細胞は代表的な抗原提示細胞である。近年、樹状細胞が腫瘍細胞を貪食すること、そして腫瘍細胞由来のDNAが樹状細胞内のDNAセンサーを活性化することが報告された。しかし樹状細胞が腫瘍由来抗原を持続的に過剰に提示するといった「抗原過多」の状態ではT細胞の疲弊化を誘導し、その結果獲得免疫系が効率良く機能せず腫瘍排除が困難になる。そこで、腫瘍細胞に効率良く細胞死を誘導し抗原量が過多にならないようにすること、次に死んだ腫瘍細胞を取り込んだ樹状細胞内で安定的に腫瘍由来DNAを存在させることで樹状細胞を活性化させる、ことが解決法となりうるか検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト腫瘍悪性度との関連性やこれまでの我々の知見から標的分子としてGPERに着目し、イヌ肥満細胞腫細胞においてGPERの発現が高いことを明らかにした。GPER標的薬をイヌ肥満細胞腫細胞に投与すると細胞死を誘導した。さらにCD117分子の発現が低下しているイヌ肥満細胞腫細胞でGPER発現が高いことを見出した。これはCD117発現低下によりCD117標的薬の効果が低いイヌ肥満細胞腫でのGPER標的薬の可能性を示唆する。一方、遺伝子導入用高分子材料による取り込みをマウス樹状細胞を用いて検討したが、核酸・タンパク質は取り込みを促進したが、死細胞の効率的な取り込みは现阶段では認められず現在も検討中である。

研究成果の概要(英文)：Dendritic cells are typical antigen-presenting cells. It has recently been reported that dendritic cells phagocytose tumor cells and that tumor cell DNA activates DNA sensors inside dendritic cells. However, states of "antigen excess/antigen overload", when dendritic cells are persistently presented with excess amounts of tumor antigens, can induce T cell exhaustion, resulting in an inefficiently functioning acquired immune system; this makes it more difficult to eliminate tumors. In this study, we examined whether it might be possible to (1) induce tumor cell death efficiently without creating excess of antigens and (2) activate dendritic cells by ensuring a stable presence of tumor DNA in dendritic cells that have phagocytosed dead tumor cells.

研究分野：獣医免疫学

キーワード：Gタンパク質結合エストロゲン受容体 膜型エストロゲン受容体 イヌ肥満細胞腫 アポトーシス 遺伝子導入剤 樹状細胞 自然免疫活性化

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍は、T細胞に持続的な機能障害(「疲弊化」とよばれる)を促しT細胞の腫瘍排除機能を抑制する。T細胞の疲弊化誘導には自然免疫活性化状態も関与している。すなわち、腫瘍の「自然免疫回避機構」によって自然免疫から獲得免疫への橋渡しが上手くいかないと、抗原過多の状態となりT細胞の疲弊化が起こり腫瘍排除が困難になる。したがって腫瘍に対する自然免疫系を効率良く活性化させることが重要である。

2. 研究の目的

腫瘍に対する自然免疫系を効率良く活性化させ獲得免疫に繋げていくことについては、ヒトのみならずイヌなどの腫瘍を免疫系が排除する場合も同様に重要である。抗原過多の状態を避け、T細胞に疲弊化を誘導させないためには、腫瘍細胞に細胞死を誘導し抗原量が過多にならないようにする、死んだ腫瘍細胞や一部生き残った腫瘍細胞を取り込んだ樹状細胞内で安定的に腫瘍由来DNAが存在し抗腫瘍反応活性化が効率よく行われる、という2点が必要なのではないかと考えた。本研究ではイヌの腫瘍免疫に対するさらなる理解そして治療への礎となることを最終的な目的として、この2点を満たす方法について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

まず対象とするイヌ腫瘍細胞としてイヌ乳癌細胞、イヌ肥満細胞腫細胞を選択した。理由としてはこれらの腫瘍細胞上にはGPER(G protein coupled estrogen receptor)が高発現している可能性が高いからである。GPERは様々なヒト癌で発現が高いことが明らかとなり、特にヒト乳癌との関連性については報告が多い。GPERの選択的アゴニストを使用した研究から、一部の乳癌や膀胱上皮癌などにおいてGPERからのシグナルは細胞増殖抑制・細胞死が誘導されることが明らかとされており、GPERアゴニスト(GPER標的薬)の腫瘍治療への応用も期待されている。我々はこれまでに、マウス肥満細胞腫由来細胞をGPERアゴニストで処理すると細胞死が誘導されることを明らかにし2014年の獣医学会で発表している。これらより、イヌ乳癌細胞、イヌ肥満細胞腫細胞をGPERアゴニストで処理すると細胞死が誘導され、抗原量が過多になるのを防ぐことが可能なのではないかと考えた。そこで、まずイヌ腫瘍細胞におけるGPER発現を調べ、次にGPERアゴニストでGPERシグナルを活性化させ細胞死誘導について解析を行った。

細胞死が誘導された腫瘍細胞および一部生き残った腫瘍細胞はマクロファージや樹状細胞に認識され、貪食されて最終的には細胞内で消化される。特に樹状細胞内では、消化されて露出された腫瘍由来のDNAをcGAS(cyclic GMP-AMP synthase) - STING(stimulator of interferon genes)経路が認識し、cGAS-STING経路が活性化され、インターフェロン(IFN)やIL-12などの「抗腫瘍サイトカイン」の産生および貪食能や抗原提示能の亢進が起こることが報告されている。そこで、遺伝子導入試薬として利用されている高分子材料を使用して樹状細胞内への核酸・タンパク質の取り込み能について検討し腫瘍由来DNAの生成・安定化が可能となるかどうかについて調べた。

4. 研究成果

まず、標的細胞上のGPER発現検討およびGPERアゴニストによる細胞死の誘導の検討を行った。イヌ肥満細胞腫細胞、イヌ乳癌腫瘍細胞株細胞、イヌ尿路上皮癌由来細胞株細胞、イヌ正常腎細胞株細胞からRNAを抽出し、cDNAを合成しRT-qPCRによりGPERの発現量について測定した。GPER mRNAの発現量の測定にはCt法を用いた相対定量を行い、RPS18発現をサンプル間の補正に用いた。その結果、イヌ肥満細胞腫細胞において、他のイヌ細胞株細胞に比べてGPERの発現が高いことがわかった。予想に反してイヌ乳癌腫瘍細胞株細胞でのGPER発現は低かった。そのため、イヌ肥満細胞腫細胞に焦点を当てて研究を遂行することにした。次にイヌ肥満細胞腫細胞における従来型エストロゲン受容体(古典的エストロゲン受容体/核内エストロゲン受容体)ERalpha, ERbetaの発現を同様の方法で調べたところ、従来型エストロゲン受容体の発現は低いことが明らかとなった。イヌ肥満細胞腫細胞でGPERの発現が高いことから、この細胞にGPERアゴニストを投与し細胞増殖抑制・細胞死が誘導されるかどうかについて検討した。イヌ肥満細胞腫細胞を96 well plateに 2×10^4 cells / wellとなるように播種し、最終濃度 $0.12 \sim 90 \mu\text{M}$ となるようにGPERアゴニスト(G-1とよばれるアゴニストを使用した)を添加した。コントロールにはG-1の溶媒であるDMSOをG-1と同量添加しものを用いた。24、48、72時間37℃、5% CO₂で培養した後、Cell Proliferation Kit (Roche)のXTT標識混合液を調製し細胞に添加して37℃、5% CO₂で4時間インキュベートした。その後450 nmの吸光度を測定した。検量線作成用のウェルの吸光度値から検量線を作成し、サンプルの生細胞数を算出した。その結果、GPERアゴニスト濃度依存的、投与時間依存的に細胞増殖/生存率の低下が認められ、GPERアゴニスト投与はイヌ肥満細胞腫細胞の増殖/生存を抑制することが明らかとなった。次にGPERアゴニスト投与によりイヌ肥満細胞腫細胞の細胞死が増えているかどうかについて検討した。イヌ肥満細胞腫細胞を96 well plateに 2×10^4 cells / wellとなるように播種し、

最終濃度 10 μM となるように GPER アゴニストを添加した。24、48、72 時間 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 で培養した後、細胞を回収しトリパンブルー（ナカライテスク）で細胞を 2 倍希釈で染色し、正細胞数 / 死細胞数をそれぞれカウントした。カウント後各 well の総細胞数を算出した。また、イヌ肥満細胞腫株細胞を 24 well plate に 1×10^5 cells / well となるように播種し、最終濃度 10 μM となるように GPER アゴニストを添加した。48、72 時間 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 で培養した後、細胞を回収し Annexin V -FITC (TONBO biosciences)、PI (e Bioscience) で細胞を染色した。染色後フローサイトメトリー測定を行い、測定後のドットプロットデータから Annexin V-FITC、PI の蛍光を示す細胞数の割合を解析した。これらの結果、GPER アゴニスト濃度依存的、投与（刺激）時間異存的に、GPER アゴニストはイヌ肥満細胞腫細胞の細胞死を促進させた。そして GPER アゴニスト投与により Annexin V で染色される細胞が増加した。このことより GPER アゴニスト投与により誘導される細胞死はアポトーシスであることが明らかとなった。イヌ肥満細胞腫は細胞上に存在する CD117(C-KIT)分子の変異により CD117 からの恒常的な増殖シグナルが細胞内に伝達されることにより細胞が増殖することにより発生するため、GPER アゴニストの投与が CD117 の細胞表面発現を抑えるかどうかについて検討した。イヌ肥満細胞腫株細胞を 24 well plate に 5×10^5 cells / well となるように播種し、最終濃度 10 μM となるように GPER アゴニストを添加した。48、72 時間 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 で培養した後、細胞を回収し APC- CD117 (BD Biosciences) で細胞を染色した。染色後フローサイトメトリー測定を行い、測定後のヒストグラムデータから CD117 細胞表面発現の変化を解析した。その結果、フローサイトメトリーのヒストグラムの結果では、GPER アゴニストの投与の有り無しで CD117 の細胞表面発現量に差は認められなかった。すなわち GPER アゴニストによるイヌ肥満細胞腫株細胞の増殖/生存の低下やアポトーシス誘導は、GPER アゴニストが CD117 の細胞表面発現を抑制することによるものではないことが推察された。さらに GPER アゴニストを前述と同じ方法でイヌ正常腎細胞株細胞に投与し細胞増殖抑制・細胞死が誘導されるかどうかについて検討したが、GPER アゴニスト投与によりイヌ正常腎細胞株細胞では細胞死が誘導されなかった。以上の結果より、GPER アゴニストは GPER 発現が高いイヌ肥満細胞腫細胞に特異的に細胞死を誘導できる可能性がある。イヌ肥満細胞腫の中には CD117 の細胞表面の発現が低下あるいは無くなるものもある（おそらく他の増殖因子受容体の活性化により増殖していると考えられる）。我々はプレリミナリーな結果であるが、CD117 細胞表面発現陰性のイヌ肥満細胞腫細胞において GPER の発現が、CD117 陽性のイヌ肥満細胞腫細胞よりも高いことを見出している。このことは、CD117 分子を標的とした薬剤が効かないイヌ肥満細胞腫細胞においても GPER アゴニストがイヌ肥満細胞腫の治療薬となりうる可能性を示唆する。さらに、イヌ肥満細胞腫細胞における GPER アゴニストの細胞死誘導に關する細胞内キナーゼについて調べた。細胞を 24 well plate に 1×10^6 cells / well となるように播種し、最終濃度 10 μM となるように GPER アゴニストを投与し 48 時間後に細胞を回収した。細胞から可溶化上清を回収した後、一部を使用してタンパク濃度の定量を行い、一定タンパク量の可溶化上清を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、PVDF メンブレンに転写した後、リン酸化キナーゼに対する抗体を用いてウェスタンブロットングを行った。リン酸化状態の補正にはキナーゼ自体に対する抗体を用いた。Image Quant LAS 4000 (サイティバ) を使用し目的バンドの検出後、検出されたバンドのシグナル強度を数値化したところ、プレリミナリーな結果ではあるが、キナーゼ A (論文作成準備中のため具体的名称を避けた。以下同様) のリン酸化が GPER アゴニスト投与によって認められた。キナーゼ B については GPER アゴニスト投与異存的な明らかなリン酸化は認められなかった。これはマウスで得られた結果とは異なりイヌ肥満細胞腫細胞における細胞死分子機構がマウスと異なる可能性があるがさらなる検証が必要である。GPER アゴニストは生存を促進するシグナル伝達に関わるキナーゼ C の活性化を抑制すると予測されたが、GPER アゴニスト投与によってキナーゼ C のリン酸化が亢進しており予想とは逆に GPER シグナルはキナーゼ C の活性化を誘導していた。イヌ肥満細胞腫細胞独特の分子機構であるかどうかについてさらなる検証が必要である。

次に、遺伝子導入試薬として利用されている高分子材料を使用して樹状細胞内への核酸・タンパク質、そして腫瘍細胞ならびに細胞死を誘導した腫瘍細胞の取り込み能について検討した。塩基性アミノ酸のアルギニンが 10 残基ほど結合したオリゴアルギニンはマクロピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれやすいことが知られている。我々はこれまでにオリゴアルギニンを側鎖に結合した高分子材料を使用して細胞内への遺伝子導入についていくつかの細胞で調べてきた。今回の研究においてもこの高分子材料を利用してマウス樹状細胞株細胞の取り込み促進・細胞活性化について検討した。まずタンパク質分子の取り込みについて調べた。指標となるタンパク質分子として FITC 標識されたオボアルブミン (FITC-OVA) を選択した。マウス樹状細胞株細胞を 24 well plate に 1×10^6 cells / well となるように播種し一晩培養後、最終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように FITC-OVA を、最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の高分子材料と共にあるいは FITC-OVA 単独で添加した。2 時間 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 でインキュベートした後、細胞を回収しフローサイトメトリー測定を行い、FITC-OVA の取り込みを解析した。その結果、高分子材料と共に FITC-OVA を投与すると顕著に細胞への FITC-OVA の取り込みが促進された。タンパク質分子取り込み時の活性化マーカーの変動について調べた。マウス樹状細胞株細胞を 48 well plate に 5×10^5 cells / well となるように播種し一晩培養後、最終濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように FITC-OVA を、最終濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の高分子材料と共にあるいは FITC-OVA 単独で添加した。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 で一晩インキュベートした後、細胞を回収しフローサイトメトリー測定を行った。しかし活性化マーカーの細胞表

面発現には変化が認められなかった。次に、核酸の取り込みについて調べた。指標となる核酸としてまずは Cy3 標識されたプラスミド (Cy3 プラスミド) を選択した。マウス樹状細胞株細胞を 96 well plate に 1×10^5 cells / well となるように播種し一晩培養後、最終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように Cy3 プラスミドを、最終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の高分子材料と共にあるいは Cy3 プラスミド単独で添加した。37 °C、5% CO_2 で一晩インキュベートした後、プレートリーダーで蛍光測定を行い、Cy3 プラスミドの取り込みを解析した。その結果、高分子材料と共に Cy3 プラスミドを投与すると顕著に細胞への Cy3 プラスミドの取り込みが促進された。樹状細胞内の DNA センサーである cGAS はレトロウイルスの二本鎖 DNA を認識してインターフェロン産生など自然免疫活性化を誘導することが知られている。そこで cGAS が認識する DNA 配列を含む二本鎖 DNA (ISD) を用いて、自然免疫活性化状態について細胞表面分子の発現変化を測定することで検討した。マウス樹状細胞株細胞を 48 well plate に 1×10^6 cells / well となるように播種し一晩培養後、最終濃度 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように ISD を、最終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の高分子材料と共にあるいは ISD 単独で添加した。37 °C、5% CO_2 で 24 時間インキュベートした後、細胞を回収しフローサイトメトリー測定を行ったところ、高分子材料と共に ISD を細胞に投与すると活性化マーカーの発現が軽度ではあるが上昇が認められ、マウス樹状細胞株細胞において自然免疫反応が活性化されている可能性が示唆された。樹状細胞内ではウイルス由来の RNA も認識し自然免疫反応が活性化されることから、次は合成 2 本鎖 RNA (poly(I:C)) を用いて、自然免疫活性化状態について細胞表面分子の発現変化を測定することで検討した。マウス樹状細胞株細胞を 48 well plate に 5×10^5 cells / well となるように播種し一晩培養後、最終濃度 1.5 あるいは $15 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように poly(I:C) を、最終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の高分子材料と共にあるいは poly(I:C) 単独で添加した。37 °C、5% CO_2 で 24 時間インキュベートした後、細胞を回収しフローサイトメトリー測定を行ったが活性化マーカーの細胞表面発現は無投与と比べると RNA (poly(I:C)) 投与では若干発現が上昇したものの、高分子材料の有無においては発現に差が認められなかった。市販の RNA 導入薬を使用したときは活性化マーカーの細胞表面発現は無投与と RNA (poly(I:C)) 投与で差が認められなかった。次に細胞死を誘導した腫瘍細胞の取り込みについて調べた。腫瘍細胞としてマウス肥満細胞腫細胞を選択し、腫瘍由来のタンパク質や核酸を識別するためにマウス樹状細胞株細胞に緑色蛍光タンパク質 (GFP) および OVA を恒常的に発現させた安定発現細胞株を樹立した。そしてマウス樹状細胞株細胞を Cell Trace Far RED (サーモフィッシュサイエンティフィック) で染色した後、48 well plate にて染色したマウス樹状細胞株細胞と安定発現細胞株を混合し (このマウス樹状細胞株細胞は他種動物、ヒト腫瘍細胞株細胞を取り込むことが報告されている) 37 °C、5% CO_2 でインキュベートした。また安定発現細胞株を前述の方法と同様に GPER アゴニスト処理により細胞死を誘導後、染色したマウス樹状細胞株細胞と混合し 37 °C、5% CO_2 でインキュベートした。その後細胞を回収しフローサイトメトリー測定を行ったが、Cell Trace Far RED 陽性かつ GFP 陽性の細胞集団は検出されなかった。高分子材料と共にインキュベートした場合も同様の結果であった。これについては CD47 抗体処理やマウスプライマリー樹状細胞での検討を含めたさらなる実験条件の詳細を現在検討中である。

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 0件）

1. 発表者名 藤野唯香, 鷗川真実, 伴野拓巳, 宮田康平, 飛田悦男, 佐久間咲希, 岡本まり子, 佐久間信至
2. 発表標題 D-オクタアルギニン固定化高分子を利用したトランスフェクションにおける細胞内動態の詳細検討
3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐久間咲希, 松下奈央, 鷗川真実, 佐久間信至, 岡本まり子
2. 発表標題 膜透過性ペプチド固定化高分子を用いた細胞内への遺伝子導入・発現効率の検討
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究課題における高分子材料の細胞との相互作用や細胞内への取り込み能のさらなる向上を目指した研究を一部になっていた学部学生が2018年度麻布大学獣医学科の卒業研究優秀ポスター賞を受賞した。さらにこの学生は卒業研究が優秀な学生に贈られる小泉賞も受賞した。また、本研究課題におけるGPER標的薬によるイヌ腫瘍細胞死誘導促進に関する研究を一部になっていた学部学生が2020年度麻布大学獣医学科の卒業研究優秀ポスター賞を受賞した。

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
---------	---------