

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17478

研究課題名（和文）MSS大腸癌におけるNKcell耐性獲得のメカニズム解明

研究課題名（英文）NK cell resistance acquisition in MSS colorectal cancer

研究代表者

鈴木 伸三（Suzuki, Nobumi）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30723746

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、大腸癌がNKcell（ナチュラルキラー細胞）に耐性を獲得するメカニズムを解明するために、MSS大腸癌およびMSI-H大腸癌を模倣する遺伝子改変マウス大腸オルガノイドをCRISPR/Cas9技術にて作成した。癌化オルガノイドをNKcellと共培養したところ、MSSオルガノイドはNKcellに感受性を示しMSI-H癌化オルガノイドはNKcellに耐性を獲得していた。耐性獲得にTGF/Smad経路の関与がないかを検証するために、MSSオルガノイドにTGF/Smad経路に異常を来たす遺伝子改変を追加したが、NKcellへの感受性は維持されたままであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、免疫チェックポイント阻害剤の実用化に伴い、大腸癌でも同阻害剤の使用が進んでいる。しかし、既存の免疫チェックポイント阻害剤は、固形癌ではMSI-Hに分類される一部の癌にしか奏功しないことが、近年明らかになった。大腸癌でMSI-Hと分類されるのはおおよそ10%以下とされており、多くの大腸癌には無効である。本研究では、MSS、MSI-HのB6マウス大腸癌オルガノイド株を作成した。生物学研究において最も頻用されているB6近交系マウス由来のオルガノイド株を作成できたことは、NKcellに関連する免疫研究においては、MHCclass1が同一であることが重要であることが、今後の研究に有用と考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we created genetically modified mouse colorectal organoids that mimic MSS and MSI-H colorectal cancer by CRISPR / Cas9, in order to elucidate the mechanism which colorectal cancer acquires resistance to NK cells (natural killer cells). When cancerous organoids were co-cultured with NK cells, MSS organoids were sensitive to NK cells. MSI-H cancerous organoids had acquired resistance to NK cells. To verify the involvement of the TGF / Smad pathway in resistance acquisition, we added genetic modifications to MSS organoids that cause abnormalities in the TGF / Smad pathway, but susceptibility to NK cells remained maintained.

研究分野：消化管癌

キーワード：大腸癌 NKcell

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、免疫チェックポイント阻害剤の実用化に伴い、大腸癌でも同阻害剤の使用が進んでいる。しかしながら、PD-1 阻害剤、CTLA4 阻害剤といった既存の免疫チェックポイント阻害剤は、固形癌では MSI-H に分類される一部の癌にしか奏功しないことが、近年明らかになった。大腸癌で MSI-H と分類されるのはおおよそ 10%以下とされており、多くの大腸癌には無効である。本研究では、新たな癌免疫療法のターゲットとして NKcell (ナチュラルキラー細胞) に着目した。大腸癌において NKcell 耐性獲得のメカニズムは、未だ不明点が多い。

### 2. 研究の目的

免疫チェックポイント剤への感受性から、大腸癌は、MSS 型と MSI-H 型に大別されており、本研究では、それぞれの型が NKcell にどのような感受性を示すかを検証することで、大腸癌の NKcell 耐性化のメカニズムの解明を目指すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### ①マウス MSS および MSI-H 大腸癌オルガノイドの作成

MSS 大腸癌には、古典的なものは Apc, Kras, p53 変異を特徴とし進行に伴い Tgfbr2 ないし Smad4 変異も起きるとされる。また、MSI-H 型としては、Serrated Pathway モデルとされる Braf, p16 変異を特徴とするものがある。マウス正常粘膜より、これらを模倣する癌化オルガノイドとして以下を CRISPR-Cas9 技術にて樹立した。

AKP: (Apc-KO; Kras G12D; p53-KO)

AKPT: (Apc-KO; Kras G12D; p53-KO; Tgfbr2-KO)

AKPS: (Apc-KO; Kras G12D; p53-KO; Smad4-KO)

ΔTRIZI: (Braf V599E; Tgfbr2-KO; RNF43-KO; ZNRF3-KO, p16-KO)

#### ②NKcell・癌化オルガノイド共培養による MSS 大腸癌株の NKcell 耐性評価

①にて作成した大腸癌オルガノイドと共培養するために、正常マウスより磁気ビーズを使用して NKcell を分離・初代培養し、癌化オルガノイドと共培養を行った。事前に癌化オルガノイドを Luciferase+RFP 安定発現株へ改変し Luciferase を測定することで癌化オルガノイドの Cell variability を、蛍光顕微鏡にて RFP シグナルを観察し形態変化を評価した。これにより、NKcell とオルガノイドの混在下においても両者を識別し、癌化オルガノイドの NKcell 耐性評価を行うことができた。

古典的 MSS 大腸癌モデルの AKP 株、Serrated Pathway モデルの ΔTRIZI 株を共培養したところ、AKP 株は NKcell 感受性であったが ΔTRIZI 株は耐性を示した。このことは、古典的 MSS 大腸癌が NKcell 耐性を獲得するには、追加の遺伝子変異が必要なことを示唆している。正常 vs AKP 株 vs ΔTRIZI 株の RNAseq データでは、AKP 株では MHCclass1 発現を FACS にて評価した。続いて、AKP 株の Tgfbr2 ないし Smad4 を①にて KO し、NKcell に対する刺激性膜リガンドとして機能しているとされう、necl2 と ICAM1 の発現を評価した。

### 4. 研究成果

#### ①マウス MSS および MSI-H 大腸癌オルガノイドの作成

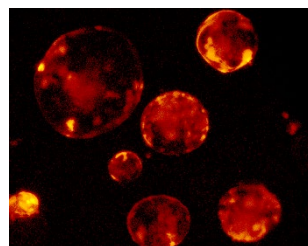
まず、遺伝子改変オルガノイドを作成するために、WT の近交系 B6 マウスより大腸オルガノイドを採取し、Cas9 発現レンチウイルスを感染させ、Cas9 安定発現株を作成した。

次に、KrasG12D 変異および BrafV600E 変異を挿入するための、sgRNA とホモロジーアームを持ったレンチウイルスを再度感染させることで、KrasG12D 変異および BrafV600E 変異を持った大腸癌オルガノイドを作成した。続いて、APC および p53 のノックアウトをするための sgRNA を発現するレンチウイルス、続いて Tgfbr2 もしくは、Smad4 をノックアウトするためのレンチウイルスを順に感染させることで、AKP 株、AKPT 株、AKPS 株の作成に成功した。

ΔTRIZI 株についても、Tgfbr2、RNF43、ZNRF3、p16 をノックアウトするためのレンチウイルスを順に感染させていき作成した。

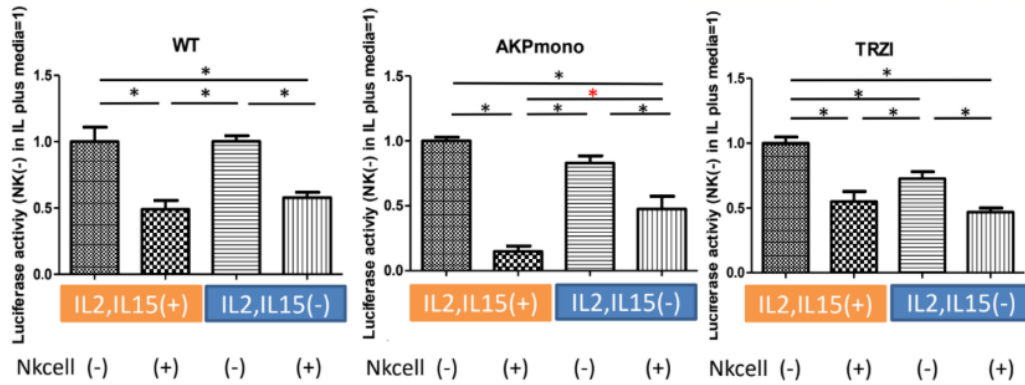
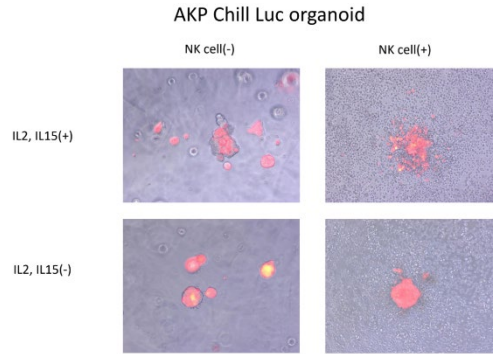
#### ②NKcell・癌化オルガノイド共培養による MSS 大腸癌株の NKcell 耐性評価

①にて作成したオルガノイドと NKcells を共培養した状態で、大腸癌オルガノイドの variability を評価するため、UBCpromoter 化ホタルルシフェラーゼを発現するレンチウイルスを感染させ、ルシフェラーゼの発光を測定することで、NKcell を除いた variability を測定することができた (右図)。



続いて右図のように NKcells と共培養したところ、AKP 株では、NKcells の刺激サイトカインである IL2 ないし IL15 を加えた状態では、癌化オルガノイドが貪食される像を確認することができた。

さらに、ルシフェラーゼ活性を測定したところ、AKP 株では、特に variability の低下が観察され、貪食像と一致する結果が得られた。



この結果より、MSS 株では、MSI-H 株に比べ NKcell への感受性が維持されていることが示唆された。まずは、NKcell が自己抗原提示を認識する際に必要となる MHCclass1 の発現を、各癌化オルガノイド作成過程で得られた RNA を用いて RNAseq にて評価したところ、MSS 株を模倣した、APC-KO、KrasG12D 変異株にて特に、MHCclass1 の発現が低下していることがわかった。一方、Braf 変異を有する MSI-H 株の系統においては、MHCclass1 の低下はわずかなものとなった。

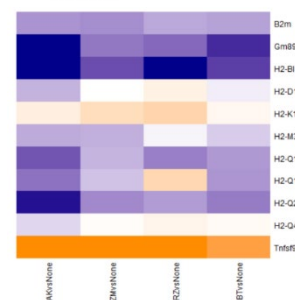
FACS を使用し AKP 株、ΔTRIZI 株での MHCclass1 の発現を比較したが、同様に AKP 株で発現の低下が観察された。

続いて、MSS 株と MSI-H 株の差異が、Tgf/Smad 経路の差異によるものの可能性を考慮し、①にて AKP 株に Smad4-KO 変異を加えた株を利用し、NKcell との共培養を施行したところ、AKP 株に比して、感受性の低下が観察された。

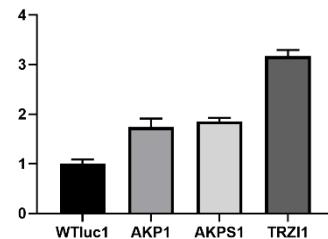
RNAseq の結果より、NKcell に対する刺激膜表面リガンドである、Nec12 と ICAM1 の発現変化を原因メカニズムとして挙げ、qPCR にて解析したところ、逆に NKcell に対する感受性が低下している ΔTRIZI 株にて発現が高く、WT に比して AKP 株も発現の上昇が見れるものの、AKPS 株への改変では、発現量に変化はないとの結果となり、仮説とは逆の結果となった。

これらのことより、MHCclass1 の発現変化が、MSI-H 株での NKcell 耐性化に寄与していることが示唆された一方、刺激膜表面リガンドの変化は、逆に NKcell の活性化を予想する結果となった他、Tgf/Smad 経路の関与は示唆されなかった。

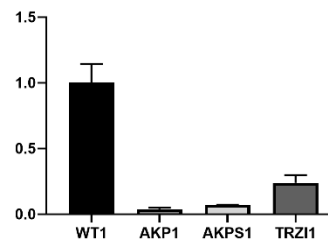
Tumor derived from tumoroids RNA seq



Nec12



ICAM1



#### 参考文献

Ichinose M, Suzuki N, et al Delineating proinflammatory microenvironmental signals by ex vivo modeling of the immature intestinal stroma. *Sci Rep.* 2021 Mar 30;11(1):7200.  
 Ichinose M, Suzuki N, et al Stromal DLK1 promotes proliferation and inhibits differentiation of the intestinal epithelium during development. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2021 Apr 1;320(4):G506-G520

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Lannagan TRM, Lee YK, Wang T, Roper J, Bettington ML, Fennell L, Vrbanac L, Jonavicius L, Somashekar R, Gieniec K, Yang M, Ng JQ, Suzuki N, Ichinose M, Wright JA, Kobayashi H, Putoczki TL, Hayakawa Y, Leedham SJ.....Mukherjee S, Tejpar S, Leggett BA, Whitehall VLJ, Worthley DL, Woods SL.	4. 巻 68(4)
2. 論文標題 Genetic editing of colonic organoids provides a molecularly distinct and orthotopic preclinical model of serrated carcinogenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 GUT	6. 最初と最後の頁 684-692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2017-315920.	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 Nakagawa H, Suzuki N, Koike K.	4. 巻 1905
2. 論文標題 Mouse Model for Cholangiocarcinoma from Peribiliary Glands.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 237-245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-8961-4_21.	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 Fujiwara H, Tateishi K, Misumi K, Hayashi A, Igarashi K, Kato H, Nakatsuka T, Suzuki N, Yamamoto K, Kudo Y, Hayakawa Y, Nakagawa H, Tanaka Y, Ijichi H, Kogure H, Nakai Y, Isayama H, Hasegawa K, Fukayama M, Soga T, Koike K.	4. 巻 11;9(1)
2. 論文標題 Mutant IDH1 confers resistance to energy stress in normal biliary cells through PFKP-induced aerobic glycolysis and AMPK activation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 18859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55211-w.	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 Suzuki N, Niikura R, Ihara S, Hikiba Y, Kinoshita H, Higashishima N, Hayakawa Y, Yamada A, Hirata Y, Nakata R, Okamoto M, Sano M, Kushiyama A, Ichinose M, Woods SL, Worthley D, Iwamoto Y, Koike K.	4. 巻 12(3)
2. 論文標題 Alpha-Blockers As Colorectal Cancer Chemopreventive: Findings from a Case-Control Study, Human Cell Cultures, and In Vivo Preclinical Testing.8 Alpha-Blockers As Colorectal Cancer Chemopreventive: Findings from a Case-Control Study, Human Cell Cultures, and In Vivo Preclinical Testing.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Prev Res (Phila)	6. 最初と最後の頁 185-194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1940-6207.CAPR-18-0288.	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 Ichinose Mar, Suzuki Nobumi, ....Worthley Daniel L., Woods Susan L.	4. 巻 320
2. 論文標題 Stromal DLK1 promotes proliferation and inhibits differentiation of the intestinal epithelium during development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology	6. 最初と最後の頁 G506 ~ G520
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpgi.00445.2020	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 Hayata Yuki, Nakagawa Hayato, Kurosaki Shigeyuki, Kawamura Satoshi, Matsushita Yuki, Hayakawa Yoku, Suzuki Nobumi, Hata Masahiro, Tsuboi Mayo, Kinoshita Hiroto, Miyabayashi Koji, Mizutani Hiroya, Nakagomi Ryo, Ikenoue Tsunee, Hirata Yoshihiro, Arita Junichi, Hasegawa Kiyoshi, Tateishi Keisuke, Koike Kazuhiko	4. 巻 160
2. 論文標題 Axin2+ Peribiliary Glands in the Periapillary Region Generate Biliary Epithelial Stem Cells That Give Rise to Ampullary Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 2133 ~ 2148.e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2021.01.028	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 Ichinose Mari, Suzuki Nobumi, Wang Tongtong, Wright Josephine A., Lannagan Tamsin R. M., Vrbanc Laura, Kobayashi Hiroki, Gieniec Krystyna, Ng Jia Q., Ihara Souzaburo, Mavrangelos Chris, Hayakawa Yoku, Hughes Patrick, Worthley Daniel L., Woods Susan L.	4. 巻 11
2. 論文標題 Delineating proinflammatory microenvironmental signals by ex vivo modeling of the immature intestinal stroma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 72000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-86675-4	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 Hayakawa Yoku, Hirata Yoshihiro, Hata Masahiro, Tsuboi Mayo, Oya Yukiko, Kurokawa Ken, Abe Sohei, Arai Junya, Suzuki Nobumi, Nakagawa Hayato, Fujiwara Hiroaki, Tateishi Keisuke, Maeda Shin, Koike Kazuhiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Dysregulated Immune Responses by ASK1 Deficiency Alter Epithelial Progenitor Cell Fate and Accelerate Metaplasia Development during <i>H. pylori</i> Infection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1995 ~ 1995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms8121995	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 Kobayashi Hiroki, Gieniec Krystyna A. Wright Josephine A. Wang Tongtong, Asai Naoya, Mizutani Yasuyuki, Lida Tadashi, Ando Ryota, Suzuki Nobumi, . . . . . Rustgi Anil K., Mukherjee Siddhartha, Wang Timothy C., Enomoto Atsushi, Takahashi Masahide, Worthley Daniel L., Woods Susan L.	4. 巻 160
2. 論文標題 The Balance of Stromal BMP Signaling Mediated by GREM1 and ISLR Drives Colorectal Carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1224 ~ 1239.e30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2020.11.011	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 Fujiwara Hiroaki, Tateishi Keisuke, Misumi Kento, Hayashi Akimasa, Igarashi Kaori, Kato Hiroyuki, Nakatsuka Takuma, Suzuki Nobumi, . . . . . Koike Kazuhiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Mutant IDH1 confers resistance to energy stress in normal biliary cells through PFKP-induced aerobic glycolysis and AMPK activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-55211-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 -

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Nobumi Suzuki
2. 発表標題 A novel mouse model of Gastric Adenocarcinoma and Proximal Polyposis of the Stomach (GAPPS) mimics the human disease.
3. 学会等名 AGITG Annual Scientific Meeting, 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------