

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20797

研究課題名（和文）合成ポリマーを用いた脳腫瘍免疫微小環境の構成的解明

研究課題名（英文）Synthetic polymer-based constructive approach to elucidate immune microenvironments in brain tumor

研究代表者

室田 吉貴（Murota, Yoshitaka）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：40909602

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：神経膠腫（グリオーマ）に対する免疫療法の開発が進んでいるが、臨床試験における有効性は未だ立証されていない。この現状は免疫微小環境の特性に未解明な部分が残されていることを示唆しており、従来の解析法に加えた新たな視点による取り組みが道を拓くと考えられる。本研究は、合成ポリマーを用いて腫瘍微小環境を構成的に解明することを目的として実施した。マウスグリオーマモデル末梢血の解析を行い、骨髄由来ミクログリア前駆細胞の割合が担がんマウスで有意に上昇していることを明らかにした。このような腫瘍随伴細胞の活性や生存、増殖に影響する合成ポリマーを同定するためのスクリーニング系を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は研究代表者自身が立ち上げる合成ポリマーのスクリーニング系を用いて、腫瘍免疫微小環境の新たな特性について構成的解明を目指す異分野融合研究である。本研究で立ち上げた、細胞の活性や生存、増殖に影響する合成ポリマーのスクリーニング系は、癌のみならず細胞異常に起因する他疾患群の病態解明、治療標的探索に有効な研究手法であると考えられる。従来の還元的手法ではとらえることのできなかつた腫瘍免疫微小環境の新たな特性を標的とする治療法の開発によりグリオーマ根治が達成できるかもしれない点で社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The efficacy of immunotherapy for gliomas in clinical trials has not yet been demonstrated. This situation suggests that the immune microenvironment remain to be fully elucidated, and therefore an innovative approach from new perspectives in addition to conventional methods may pave the way for the development of successful immunotherapy. In this study, a constructive approach using synthetic polymers was conducted to elucidate the tumor immune microenvironment. In vivo analysis revealed that the percentage of bone marrow-derived microglial progenitor cells is significantly elevated in the peripheral blood of tumor-bearing mice. To identify chemical probes that affect the activity, survival, and proliferation of tumor cells and tumor-associated immune cells, we established a screening system of synthetic polymers that recapitulate their microenvironments.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：グリオーマ 合成ポリマー 微小環境 構成的解明 腫瘍随伴免疫細胞 末梢血

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫(グリオーマ)は脳の実質に発生する難治性のがんである。グリオーマ微小環境で見られる抗腫瘍性細胞の不活化や骨髄由来細胞の浸潤は、腫瘍の進展を支持する重要な要素として理解されており、これらを標的とした免疫療法が盛んに研究されているが、十分な治療効果は得られていない。この現状は免疫微小環境の特性に未解明な部分が残されていることを意味しており、オミクス解析やマササイトメトリー解析などの従来の手法に加えた新たな視点による取り組みが道を拓くと考えられる。

グリオーマの進展に関与する免疫細胞は末梢造血器官の遠隔制御を介して脳内へと動員されることから、末梢血中免疫細胞の特性を解明することはがん発症前の早期診断や再発リスク・予後の予測、がん幹細胞の特性を加味した治療法を開発する上で重要と考えられる。しかしながら、がん研究の多くは術後の患者検体を用いたものであることから、腫瘍形成初期における免疫細胞の関与に関しては未だ不明な点が多い。

一方、合成ポリマーはモノマーが連結して形成される高分子化合物である。生体適合性を有する合成ポリマーは、医療分野において細胞の足場や薬剤のキャリアとして用いられている。ポリマーの性質や機能性はその組成や重合条件などに大きく影響を受け、モノマーの組み合わせや混合比を考慮すると、ポリマーは理論上無限に合成可能であると考えられるが、機能性ポリマーを同定するためにはハイスループット手法を確立することが重要である。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究では以下を目的とした。

- (1) グリオーマ進展過程に関連する末梢血中の腫瘍随伴免疫細胞を明らかにする。特に腫瘍形成初期の免疫微小環境特性に着目する。
- (2) 腫瘍随伴免疫細胞の生存や増殖などの性質に影響するバイオ機能性ポリマーを同定するためのスクリーニング系を確立する。

3. 研究の方法

グリオーマの進展に伴い変遷する免疫細胞の種類を明らかにするため p53^{-/-}マウス大脳由来アストロサイト(AS)に変異型 Ras^{V12} 遺伝子を導入した人工グリオーマ細胞(AS-Ras^{V12})を同系野生型マウス大脳線条体に移植した免疫適合性マウスグリオーマモデルの末梢血を解析した。AS あるいは AS-Ras^{V12} 細胞の移植後 6、12、18 日目における末梢血を眼窩静脈叢から採取し溶血後、各種細胞表面マーカー抗体とフローサイトメトリーを用いて血中免疫細胞のプロファイリングを行った。

バイオ機能性ポリマーのスクリーニング系を確立するため、100%ガラス製マルチウェルプレートにアクリル基を付与し、その上で調製した各種アクリル系モノマー混合液を UV クロスリンカーにより重合した。

ポリマースクリーニングプレートで実際にバイオ機能性ポリマーが同定可能かを検証するため、蛍光標識した AS 細胞と AS-Ras^{V12} 細胞を同数混合して、ポリマースクリーニングプレート上に播種し共培養した。イメージサイトメーター搭載の蛍光顕微鏡(BioRevo, BZ-X800)を用いて、培養開始後 24 時間と 96 時間の蛍光強度をもとに細胞の増殖率を算出した。

4. 研究成果

(1) 免疫適合性マウスグリオーマモデルを用いた末梢血免疫細胞の経時的プロファイリング
まずは腫瘍形成初期における免疫微小環境特性を解析するため生体適合性モデルの作製に取り組んだ。本研究で使用するマウスグリオーマモデルは同系野生型マウス大脳線条体に移植後、約 3 週間で腫瘍を形成することが確認されているため、AS 細胞と AS-Ras^{V12} 細胞の移植から 6 日目、12 日目、18 日目でマウスを安楽死させ、移植部位を観察した。その結果、ネクローシス・偽柵状配列は無く、微小血管新生の頻度は少ないものの、初期の腫瘍が 6 日目の時点から確認でき、その後、経時的に腫瘍が拡大している様子が確認されたため、このモデルは腫瘍形成初期(移植後 6 日目)、腫瘍進展末期(移植後 18 日)の腫瘍の特性や腫瘍進展に伴う免疫細胞の挙動を解析する上で有用であると考えられた。

担がんマウス末梢血におけるリンパ球系細胞を解析した。その結果、細胞移植後 6 日目および 12 日目のマウスにおいては CD8(+)細胞、CD4(+)細胞、B220(+)細胞のいずれにおいてもそれら細胞の存在比に変化は無かった。移植後 18 日においては CD4(+)細胞と B220(+)細胞の割合に変化は無かったが、CD8(+)細胞が担がんマウスにおいて割合が増加する傾向が観察された ($p=0.086$)。この結果から、腫瘍発生初期、中期においてはリンパ球系免疫細胞に少なくとも量的な変化は起きておらず、進展末期において末梢血中 CD8(+)リンパ球が増えていることが示唆された。

次にミエロイド系細胞を解析した。この解析では CD45 と CD11b の発現レベルの違いにより定義される 4 つの細胞集団 (I : CD45^{High}CD11b^{Low}、II : CD45^{High}CD11b^{High}、III : CD45^{Middle}CD11b^{High}、IV : CD45^{Nega}CD11b^{High}) が末梢血中を循環していることが明らかとなった。各種細胞の量的な変化を解析した結果、細胞移植後 6 日目および 12 日目のマウスにおいてはいずれの細胞集団でも変化は見られなかった。興味深いことに移植後 18 日においては I の細胞集団の割合が担がんマウスで有意に減少し ($p=0.006$)、II の細胞集団の割合も担がんマウスにおいて減少する傾向が見られた ($p=0.067$)。一方、IV の細胞集団の割合が担がんマウスにおいて顕著に増加していた。この CD45^{Nega}CD11b^{High} を示す細胞に骨髄性マイクログリア前駆細胞が存在するという報告があるが、グリオーマ進展への関与は報告されていない (Stem Cells Transl. Med. 2021)。今後は本事業で新規にグリオーマ関連免疫細胞として同定したこれら細胞分画のグリオーマ進展への寄与を共移植や共培養実験により明らかにする必要がある。

(2) バイオ機能性ポリマースクリーニング系の確立

(2)-1 ポリマースクリーニングプレートの作製

モノマー混合液の組成により様々な物性を有するポリマーが合成されるため、各種アクリル系モノマーの組み合わせ、反応容量、UV 照射による重合条件、残存モノマー洗浄条件などを検討した。16 種類のアクリル系モノマーから計 94 種類のポリマーを各ウェルに固相した「ポリマースクリーニングプレート」を作製した。

(2)-2 蛍光モノマーを用いたウェル底ポリマー固相の確認

フルオレセインで標識したアクリルモノマーを用いた実験により、同プレートのガラス底面においてポリマーが固相化されていることを確認した。

(2)-3 細胞増殖制御性ポリマーの同定

固相化したポリマー群のバイオ機能性に多様性があることを検証するため、蛍光標識した AS 細胞と AS-Ras^{V12} 細胞を同数混合して、ポリマースクリーニングプレート上に播種し培養した。培養開始後 24 時間と 96 時間の蛍光強度をもとに細胞の増殖率を算出したところ、異なるポリマー上において細胞は接着や増殖などの観点から様々な挙動を呈することが明らかとなった。24 時間後に多くの細胞が接着していたにもかかわらず 96 時間後には細胞接着が見られない細胞死の誘導を示唆するものも見られた。今後はこのスクリーニング系をグリオーマ随伴免疫細胞に応用する。同細胞の活性や生存、増殖に影響する微小環境を人為的に構築し、細胞への作用機序を解明することでグリオーマ免疫微小環境の新たな特性の解明と治療標的の同定を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Murota Yoshitaka, Tabu Kouichi, Taga Tetsuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Cancer Stem Cell-Associated Immune Microenvironment in Recurrent Glioblastomas	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2054~
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11132054	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 永根まり子、梶康一、室田吉貴、田中真二、田賀哲也
2. 発表標題 ヒト肺癌幹細胞の特性解明のためのニッチ擬態ポリマーの開発と最適化
3. 学会等名 第42 回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshitaka Murota, Kouichi Tabu Tetsuya Taga
2. 発表標題 Establishment of a high-content polymer array screening system to explore niche mimics for cancerous cells
3. 学会等名 The 17th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Science International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 室田 吉貴, 梶 康一, 田賀哲也
2. 発表標題 固相化マイクロウェルアレイプレートを用いた人工微小環境ポリマーハイコンテンツスクリーニングシステムの確立
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 チョウ テイテイ, 楠 康一, 室田 吉貴, 秀 拓一郎, 小倉 俊一郎, 田賀哲也
2. 発表標題 高浸潤性かつ5-ALA光線力学診断回避性細胞特異的に発現するグリオーマ再発関連遺伝子群の探索
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 楠 康一, 室田 吉貴, 永根 まり子, 田中 真二, 田賀 哲也
2. 発表標題 がん幹細胞ニッチ擬態性ハイドロゲルを用いた隣がん治療標的分子の探索
3. 学会等名 第43回日本炎症・再生医学会
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

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