

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19564

研究課題名（和文）生体を反映したがん免疫微小環境ミニ臓器培養系の樹立

研究課題名（英文）A mini-organ culture system with cancer immune microenvironment recapitulating in vivo

研究代表者

清木 誠（Seiki, Makoto）

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50226619

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：現在のがん治療は、標準治療を試し効果を確認しながら手探りで進められる。あらかじめ有効薬剤を同定してから治療が開始できれば、予後改善、苦痛の低減が期待できる。そこで、私たちが見いだした臓器の力学制御機構であるYAP-メカノホメオスタシスのメカニズムを活用し、抗がん剤への抵抗性の源であるがん免疫微小環境の培養系を構築するために、(1)簡便なミニ腸管と、(2)人工毛細血管を持つヒトミニ肝臓プラットフォームを作製し、(3)その自己組織化による力学制御を評価するために非接触・非標識に時空間的力学測定法を導入した。本法は、免疫細胞を持つミニ臓器作製を可能とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(1)患者ごとの生体を反映したがん免疫微小環境培養系を創出する：本研究で創出するがん免疫微小環境培養系を用いて、治療前に有効な薬剤を予測できれば、患者の予後を改善し、身体的負担、医療費削減につながることから、挑戦的研究として大きな意義がある。(2)臓器の力学制御による新しい視点からの治療開発：慢性炎症などによる線維化は組織を硬くしてYAPを活性化する。YAPは、細胞の増殖・分化だけでなく代謝にも変化を与え、免疫抑制、がん進展を起こす。そこで、本がん免疫微小環境培養系は、“がん免疫組織の力学制御”という新しいコンセプトの治療創出へも役立つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Current cancer treatment often proceeds by trial and error, testing standard therapies and confirming their efficacy as treatment progresses. If effective drugs could be identified in advance, it would be possible to initiate treatment with improved prognosis and reduced suffering. Therefore, utilizing the mechanism of YAP-mechanohomeostasis, which we discovered as an organ-level mechanical control mechanism, we aim to establish a culture system for the cancer immune microenvironment, which is the source of resistance to anticancer drugs. To achieve this, we (1) created simplified mini-intestines, (2) developed a human mini-liver platform with artificial capillaries, and (3) introduced a novel method for spatiotemporal mechanical measurements that are non-contact and label-free to evaluate its self-organizing mechanical control. This method enables the creation of mini-organs containing immune cells.

研究分野：がん生物学

キーワード：YAP メカノホメオスタシス 力学恒常性 がん免疫

1. 研究開始当初の背景

現在のがん治療の問題点:現在のがん治療は、多くの患者に効果があった標準治療を試して、効果を確認しながら手探りで進められる。しかし効果が無い場合には、がんはその間に進行し治癒しにくくなる。あらかじめ最も効果のある薬剤を同定して治療に取りかかることができれば、患者の負担を低減し予後を改善でき医療費削減にもつながる。

抗がん剤や免疫チェックポイント阻害剤(immune checkpoint inhibitor: ICI)への抵抗性の源は、がん免疫微小環境であり、多彩ながん細胞・免疫細胞と細胞外環境の“場”や腸管細菌叢からの影響も受ける。前もった有効薬剤同定と、ICI 抵抗性出現のメカニズムを解明するためには、がん免疫微小環境で起こるがん細胞と免疫細胞のダイナミックな相互作用を *in vitro* で解析できる解析系が必須である。

最新の大腸がんオルガノイドと免疫細胞の2週間の共培養系では、がん細胞殺傷性 T 細胞を増殖できるが、がん免疫微小環境の再現はできていない。

2. 研究の目的

私たちは、場の“力学的”制御が機能を持った3次元臓器構築に必須であることを見出し、YAP-メカノホメオスタシス(YAP mechano-homeostasis; YAP-MH)と名付けた(Porazinski, & Furutani-Seiki, *Nature* 2015)。従来腸管オルガノイドの形態は腸管とは大きく異なり、そのままでは1週間以上培養できない。しかし、生体のYAP-MHを反映するように、マイクロデバイスに注入した細胞外基質(ECM)に作成した腸陰窩の形をした管腔に、腸管オルガノイド細胞を播種して作成したマウスミニ腸管(Nikolaev... & Lutolf, *Nature*, 2020)は、再生能を持ち1ヵ月以上維持できる。

腸内細菌叢を管腔に持ち、現在、最も生体に近い機能を持つ臓器培養系と考えられ、ライブイメージングも可能である本研究では、より簡便な方法を用いて血管・免疫系を導入後ヒト化し、手術検体を用いて患者ごとに異なるがん免疫微小環境培養系を創出する。

3. 研究の方法

(1)当初計画していた方法は、特殊なレーザー顕微鏡を用いなくてはならず煩雑であり歩留まりも低いため、腸管の自己組織可能を活用したより簡便なミニ腸管作成プラットフォームを作成した。(2)その自己組織可能やがん免疫微小環境の力学特性を評価するための新規時空間的力学測定法を導入した。これまでに樹立してきた2つの生体組織の力学測定法を用いる予定であったが、がん免疫微小環境の力学特性は、時空間的にダイナミックであることが想定された。そこで、最近開発された、非接触・非標識で時空間的な計測が可能な画期的な方法を導入した。

4. 成果

(1)簡便なミニ腸管作成法の樹立: 腸管オルガノイド幹細胞を、人工マトリクス中で5mm程度のソーセージ状にすると、自己組織化により腸管ができるよう最適化を行った。生体内と同じようなパターンでYAP活性化とIgr5+腸管幹細胞ができるように、人工マトリクスを最適化するために、

YAP活性を *in vivo* でモニターできるYAP-RFPノックインマウスを作製し、腸管幹細胞を可視化するIgr5-GFPと交配したマウスから腸管幹細胞オルガノイドを作製した。このYAP-RFP; Igr5-

GFP 腸幹細胞をソーセージ状にして、YAP の活性化状態、Igr5+腸幹細胞の分布だけでなく、(2) の時空間的力学測定法を用いて最適化することで、より簡便なヒト人工腸管作出を可能にした。

現在、血管内皮を持ち血管壁から細胞遊走も起こる人工血管マイクロデバイス AngioTube 作製法を確立し、これを用いてミニ腸管へ免疫細胞を持続的に供給する系の樹立を進めている。

(2) 時空間的力学測定系の導入: (1)のソーセージのYAP活性化パターンの最適化のために、最近開発された非標識・非接触でより簡便かつ正確に行える時空間的力学測定系である Brillouin顕微鏡を導入した(東北大学薬学部 梶本先生との共同研究)。以上の方法を用いて、免疫微小環境の力学特性を生体に近づけることにより、免疫系を持つヒトミニ腸管作製を進めて行く。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	永野 浩昭 (Nagano Hiroaki) (10294050)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究分担者	浅岡 洋一 (Asaoka Yoichi) (10436644)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (15501)	
研究分担者	宮本 達雄 (Miyamoto Tatsuo) (40452627)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究分担者	碓 彰一 (Hazama Shoichi) (50253159)	山口大学・医学部・特別医学研究員 (15501)	
研究分担者	柴田 健輔 (Shibata Kensuke) (50529972)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (15501)	

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