

平成 31 年 4 月 14 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 H29

受付番号 416

氏 名 西田 奈央 西田 奈央

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： シアトル (国名： アメリカ合衆国)
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
腫瘍組織由来エクソソームの解析とがん微小環境の形成における役割
3. 派遣期間：平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 20 日
4. 受入機関名及び部局名
Fred Hutchinson Cancer Research Center, Human Biology Division
Taran Gujral, Assistant Member
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入也可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10—別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

【研究目的】

腫瘍組織内のがん細胞と正常細胞間の情報伝達機構を解明する。特に、がん細胞からの働きかけで腫瘍抑制性マクロファージが腫瘍促進性マクロファージへ変化する分子機構を解明する。

【背景】

腫瘍組織はがん細胞に加えて、50%以上の正常細胞と、構造を支持する細胞外基質から構成されている。正常細胞の内訳は、マクロファージ、T細胞、B細胞、樹状細胞、NK細胞などの免疫細胞、繊維芽細胞、血管内皮細胞などである。がん細胞は様々な増殖因子、サイトカイン、代謝産物に加え、エクソソームと呼ばれる 100 nm ほどの細胞外小胞を分泌する。エクソソームにはタンパク質、mRNA, miRNA などの情報伝達物質が詰まっており、エクソソームを受け取った細胞内でこの情報伝達物質が働くことにより細胞の状態を変化させる。がん細胞はこれらの分泌成分を通じて周囲の細胞に働きかけ、周囲の細胞に増殖因子を分泌させ、血管新生を促進し、免疫反応を抑制するなど、自身の増殖や浸潤・転移に有利な方向に変化させている。このがん細胞に有利に変化したがん細胞周囲の環境を「がん微小環境」と呼ぶ。

腫瘍内の正常細胞のうち最も豊富に存在するのはマクロファージである。マクロファージは貪食作用で知られ、死細胞や異物を除去したり炎症を促進し、他の免疫細胞を誘導・活性化する。この状態は M1 マクロファージと分類される。マクロファージにはもう一つ M2 マクロファージと呼ばれる状態があり、損傷した組織の修復を促進するため炎症を抑制し修復を促進するサイトカインを分泌する。

マクロファージは、血液中から腫瘍組織中に誘導された直後は炎症促進性であり、従って腫瘍抑制性で、M1 マクロファージに近いと考えられている。しかし、がん細胞による働きかけを受けた後には炎症抑制性となり、腫瘍促進性に変化し、がん細胞の増殖や浸潤、転移を直接的・間接的に様々な方向から促進することが分かってきた。この腫瘍内のマクロファージは腫瘍関

連マクロファージ、Tumor-associated Macrophage (TAM)と呼ばれ、機能的には M2 マクロファージに近いと言われている。実際に、臨床研究では乳がんや卵巣がん、皮膚がんなど様々な固形がん、腫瘍組織中のマクロファージの量が多いと予後不良であることが示されている。近年、TAM はがんの新たな治療標的として着目されている。

【問題点】

腫瘍関連マクロファージ (TAM) を治療標的とするには、TAM の分極化機構を調べる必要がある。しかし、現在は M1、M2 マクロファージ研究から適用された限られた情報しかない。その原因は、実験系の制約にあると考えられる。

現在の *in vitro* 実験は、既知の数種類のサイトカインで分極化した M2 マクロファージを使用して行われている。In vitro 実験系は分子機構の解析には最適であり、それぞれのサイトカインに対する受容体及びシグナル経路は研究されている。しかし、実際の腫瘍組織中は様々なサイトカイン、エクソソームを含めた多様な刺激が同時に起こっていると予想される。マクロファージは微妙な環境変化に対し柔軟に細胞の状態を変化させる。従来の数種類のサイトカインによる *in vitro* 誘導系では複雑ながん微小環境を反映しておらず、*in vitro* で誘導された M2 マクロファージは実際の TAM とはかい離していると予想でき、実際に TAM は M2 マクロファージとは異なる点も多数見つかっている。従って M2 マクロファージの研究を TAM に適用するには限界がある。

臨床で汎用される免疫染色では、腫瘍内での TAM の検出、分布、発現量の大きな評価はできるが、TAM の分子機構を調べるのは困難である。また腫瘍組織を分散させ、セルソーターで TAM を回収する方法では、網羅的な分子解析が可能だが、表面の既知のマーカーの有無で分離するため、TAM のうち既知のマーカーを発現している一部の集団の解析に限られる。TAM は不均一な集団である可能性が高く、未知の集団は調べられない。また、腫瘍組織中に存在するマクロファージは既に分極化しており、TAM の分極過程を観察することが出来ない。

【解決方法】

本実験では、腫瘍組織から回収した馴化培地を使用し、複雑ながん微小環境を *in vitro* 系で再現することで、マクロファージの TAM への分極における分子機構へのアプローチを可能にする。腫瘍から回収した馴化培地には腫瘍からの分泌物、エクソソームも全て含まれているため、がん微小環境の再現が可能だと考えた。In vitro で TAM の分極化を再現することにより、マクロファージの分極化の過程を、経時的に分子レベルで詳細に調べることが可能だ。また、TAM への分極化に関わる分子機構を調べる方法として、研究室主催者である Gujral 博士が以前開発したキナーゼ阻害剤のスクリーニングによる細胞応答モデル構築を用いた (Gujral, Peshkin et al. 2014 Proc Natl Acad Sci U S A)。この手法は 31 種類程度のキナーゼ阻害剤への細胞の応答を調べることで、300 種類以上のキナーゼ阻害剤への応答モデルを作成でき、さらに目的の現象 (今回は TAM への分極) に関わるキナーゼを予測できるものである。

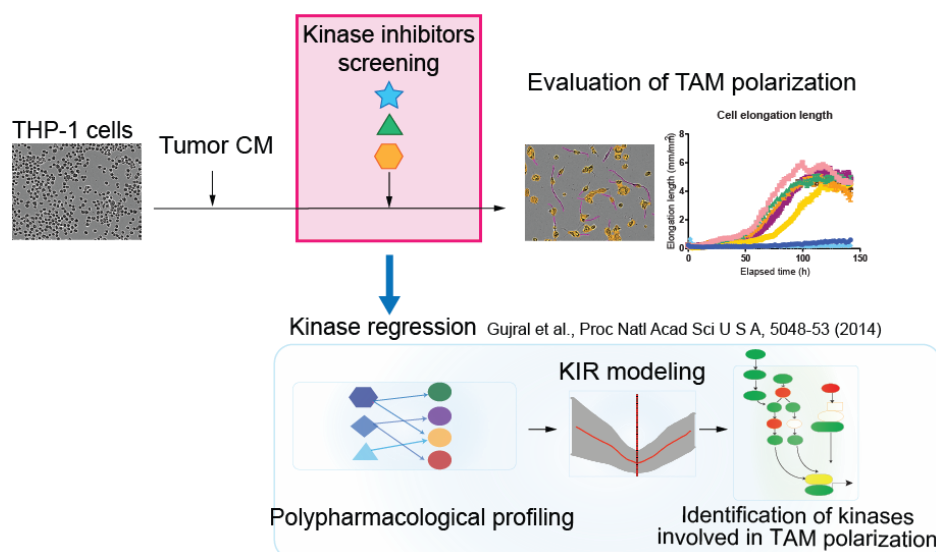


図1 *in vitro* 腫瘍関連マクロファージモデルのキナーゼ阻害剤への応答モデル作成

【結果】

①腫瘍関連マクロファージ(TAM)の in vitro モデルの確立

ヒトの単級細胞株 THP-1 からマクロファージを分化し、腫瘍の馴化培地を添加することでがん微小環境を再現し、in vitro での腫瘍関連マクロファージ(TAM)のモデルを確立した。 THP-1 は急性単級性白血病由来の細胞株であり容易に増殖するので、マクロファージの豊富な供給源となる。THP-1 を Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)で刺激しマクロファージに分化させた。また、マウス乳がん細胞株である 4T1 を免疫応答性である Balbc マウスに移植して腫瘍を形成し、腫瘍を培地中にて 24 時間インキュベートし、馴化培地を回収した。この馴化培養を THP-1 に添加し、がん微小環境を再現した状態で 5-6 日間培養し、TAM の in vitro モデルとした。このモデルの妥当性を調べるため、既知の TAM マーカー遺伝子の発現を調べたところ、複数のマーカー遺伝子の発現が上昇していた。また、このマーカー遺伝子の発現の経時変化を調べたところ、時間による発現ピークの違いが見られ、TAM の分極化過程を反映していることが示唆された。この TAM モデルはまた、TAM で上昇しているサイトカインを分泌し、TAM の性質である血管新生作用、がんの浸潤促進作用があることを確かめた。以上の結果より、この in vitro TAM モデルは、実際の TAM の機能を反映していることが確認された。

さらに様々ながん由来の馴化培地を使用して同様の実験を行った。これまでに免疫不全マウスに 4T1 細胞を移植して作成した腫瘍、in vitro で培養した 4T1 細胞、複数のヒト乳がん細胞株由来、ヒト肝細胞がん細胞株、ヒト・マウス神経膠芽腫細胞株、また肝細胞がんの臨床検体、乳がんの PDX(Patient-derived xenograft, 患者腫瘍をマウスに移植して維持・増殖させた腫瘍)などの馴化培地を試し、TAM 様の細胞を分極化できる・できないものを見い出した。肝細胞がんの臨床検体・乳がんの PDX という臨床に近い腫瘍由来の馴化培地で TAM の性質を持つ細胞を分極化できたことは、この TAM モデルの有用性を裏付けている。

また TAM 分極化の過程で、細胞の劇的な伸長が見られた。この細胞の伸長は M2 マクロファージの特徴の一部であり、腫瘍促進性サイトカインの分泌と関連する。そこで、この細胞の伸長を TAM の分極化の指標として使用することにし、ライブセルイメージングと画像認識ソフトによる細胞の伸長度合いの定量化法を確立した。

今後は、乳がんの PDX 由来の馴化培地を使用し、遺伝子発現の経時的な変化を調べ、このモデルが TAM の分極化の過程をどの程度再現しているかどうかを調べる予定である。

②in vitro 腫瘍関連マクロファージ(TAM)モデルに対するキナーゼ阻害剤のスクリーニング

腫瘍促進性マクロファージの分極化(polarization)の機構を調べるため、キナーゼ阻害剤のスクリーニングを行った。 4T1 細胞の馴化培地を THP-1 細胞由来のマクロファージに添加し、同時に 31 種類のキナーゼ阻害剤を段階希釈にて添加した。TAM モデルの分極化の度合いは上記の手法で定量化し、細胞伸長の阻害度合いによりそれぞれのキナーゼ阻害剤の効果を評価した。

既知の M2 マクロファージ分極化の阻害剤である Sorafenib に関しては、濃度依存的な細胞伸長の阻害が見られた。この結果は、この実験系が TAM の分極化をスクリーニングする目的に沿って機能していることを示している。さらに、複数のキナーゼ阻害剤に関して細胞の伸長抑制が見られたが、驚いたことに、細胞伸長を促進するキナーゼ阻害剤も複数発見された。これらの結果から、キナーゼ阻害剤に対する in vitro TAM モデルの応答モデルを作成した。TAM の分極化を阻害すると予想されたキナーゼ阻害剤の効果を実験で確認し、このモデルの有用性を確認した。さらに、応答モデルから、TAM 分極化に関わると思われるキナーゼの候補を挙げた。今後は、予測されたキナーゼの関与を実験的に確かめ、そこから TAM 分極化に関わるシグナル経路を特定する。さらにがん細胞から分泌された分子（エクソソームや炎症因子など）のうち、TAM の分極化に関わる分子の特定、特にエクソソームの寄与の度合いを調べる。以上の実験より TAM の分極化過程の分子機構を明らかにすることで、最終的に TAM を標的としたがん創薬にも貢献すると期待している。

③腫瘍組織と 2 次元培養条件下のがん細胞の薬剤応答性の比較

腫瘍組織内の細胞間相互作用や組織構造から形成されるがん微小環境は、腫瘍の増殖や悪性化を促進していることは認知されてきた。しかしながら、このがん微小環境は、従来の研究で多用されるシャーレの中で平面培養されたがん細胞株にはないものである。そのため、従来の 2 次元的に培養された細胞を用いた薬剤スクリーニングはがん微小環境の影響を評価できない。この差は、現在の薬剤候補の臨床試験の成功率の低さの原因の一つである可能性が高い。今回

は、腫瘍組織としてのがん細胞の薬剤応答を調べ、2次元で培養したがん細胞株の薬剤への応答と比較し、腫瘍組織のがん微小環境の影響を評価した。今回はマウスの乳がん細胞株である4T1細胞をモデルとして使用し、4T1をマウスに移植して作成した腫瘍と、4T1をシャーレで2Dで培養した場合とのキナーゼ阻害剤への応答を、生存率を指標に評価した。腫瘍組織の薬剤応答性を効率良く評価するため、腫瘍組織を生きたままマイクロトームで250 μmにスライスした腫瘍組織切片を使用した。組織切片の作成法、培養法、また生存率の評価方法を検討し確立した。結果として、腫瘍組織により有効な阻害剤、逆に2D培養のみで有効な阻害剤を複数特定できた。また、阻害剤への応答モデルから、腫瘍組織により有効と予測された阻害剤の効果を、実際に組織切片および腫瘍移植マウスへの投与実験で確かめた。さらに、現在、特定した腫瘍に有効な阻害剤の作用機序を調べている。現在までに、やはり予想通り、キナーゼ阻害剤はがん微小環境に影響を及ぼしているらしいことが分かってきた。今後は、がん微小環境の機能の低下が、結果としてがん組織の生存率を低下させる機構をより詳細に調べる予定である。

【研究実施状況】

研究は本人が、Fred Hutchinson Cancer Research CenterにおけるTaran Gujral博士の研究室にて行っており、マウスのPDX由来の腫瘍提供をユタ大学、肝細胞がんの組織提供をワシントン大学より受けた。また、研究室が保有していなかった乳がん細胞株、神経膠芽腫の細胞株は、Fred Hutchinson Cancer Research Centerの別の研究室から提供を受けた。また、③の腫瘍組織切片の作成技術はワシントン大学の研究者に習いに行ったのち、自身で改良を加えた。研究は、研究室主催者であるGujral博士との週1の1対1のディスカッション、月1度程度の研究室内ミーティングに加え、日常的な実験結果に関するディスカッションから得た意見を取り入れながら進めている。

【成果の発表・関係学会への参加状況】

2018年12月、アメリカサンディエゴで行われた学会ASCB/EMBO 2018にて、ポスターによる研究発表を行った。この学会はがんに限らず基礎生物学が主眼の国際学会であり、哺乳類に限らず酵母やハエなど様々な生物を用いて、あるタンパク質など生態分子の仕組みを調べる研究が多く、関連学会の中ではアメリカでも最大級の規模である。

その他、研究所内のリトリートにて、*in vitro* 腫瘍促進性マクロファージのモデルに関するポスター発表(2017)、口頭発表(2018)を行った。また、所内の博士課程の学生、ポスドクによる自主的なセミナーなどでも発表を行った。

2019年5月には、成果を研究所内の2分野合同で行われる発表会で発表予定である。年に1度、各研究室が担当し、聴講者も100人は超える。さらに、2019年6月には、研究所内の乳がんの臨床医が多く集まるセミナーでも発表を予定している。

出版としては、2019年1月には、がん微小環境を調べるモデルや技術に関して論じたReviewをOncotarget誌に出版発表した(筆頭著者)。今後の予定としては、2019年4月中には、腫瘍組織切片の実験技術に関する論文を、共著として提出予定であり、さらに共著の論文をもう1報予定している。また、特別研究員の研究内容をまとめた論文を今年度中に2報、来年に1報(いずれも筆頭著者)を発表予定である。