

研究報告書
令和3年度：A課題

令和5年3月31日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 金沢大学がん進展制御研究所

住 所 石川県金沢市角間町

研究者氏名 平田 英周

(研究課題)

グリアがん免疫チェックポイント制御機構の解明

令和4年3月10日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【目的】

本研究の目的は中枢神経系における局所自然免疫としてのがん免疫ネットワークを明らかにすることである。申請者は先行研究において画期的なグリア細胞共培養法（Mixed-glia culture on/in soft-substrate : MGS 培養法）を確立することに成功し、これによりがん細胞とグリア細胞との相互作用を長期安定的に解析することが可能となった。この MGS 共培養系を用いた 3 次元ライブイメージングおよび薬剤スクリーニングにより、脳微小環境中には強い腫瘍細胞傷害性と腫瘍細胞貪食能を有するマイクログリアが存在すること、この腫瘍細胞傷害性マイクログリアの制御が脳組織におけるがん細胞生存のカギを握っていることを示唆するデータを得た。興味深いことに、脳転移指向性を強めたがん細胞ではこのマイクログリアによる細胞死誘導を回避するシステムが成立しており、この攻撃回避はアストロサイトを介して制御されていることも明らかとなった。

そこで本研究提案ではがん細胞を排除する局所自然免疫としてのグリアがん免疫に着目し、その制御機構を解明することに挑戦した。

【研究方法】

(1) MGS 共培養系におけるアストロサイト・マイクログリアの 1 細胞遺伝子発現解析

MGS 共培養系では細胞の形態や運動能など、極めて多様性に富んだグリア細胞が観察される。そこで MGS 共培養系からがん細胞を除去して混合グリア細胞を抽出し、1 細胞遺伝子発現解析を行った。またマイクログリアに関してはその貪食能を指標とした比較遺伝子発現解析も行った。

(2) MGS 共培養系における腫瘍細胞傷害性マイクログリアの解析

腫瘍細胞傷害性マイクログリアによって誘導される細胞死の分類とその分子機構解明を目的として、MGS 共培養系を用いた細胞増殖アッセイおよびライブイメージングによる評価を行った。

【結果】

(1) アストロサイト多様性の描出と腫瘍細胞貪食に関わるシグナル経路の同定

MGS-EGFP および PC9-Luc-mCherry の共培養系からアストロサイトを単離し、1 細胞遺伝子発現解析を行った。その結果、MGS 共培養系に存在するアストロサイトはその遺伝子発現パターンから複数の細胞集団に分類されることが明らかとなった。また細胞貪食能を指標としたマイクログリア遺伝子発現解析により、がん細胞の貪食に関与する複数のシグナル伝達経路を同定することに成功した。現在、これらのデータと下記に示す細胞死の分子機構との統合的解析により、マイクログリアによるがん細胞死誘導とエフェロサイトーシスの分子機構、およびこれらの制御に関与する“制御性アストロサイト”の同定とその分子機構に関して更なる研究を進めている。

(2) マイクログリアはがん細胞に caspase-1 依存性の細胞死を誘導する

マウス脳組織内および MGS 共培養系のいずれにおいても、がん細胞は速やかにアストロサイトとマイクログリアに捕捉され、その多くが死滅することが明らかとなっている。MGS 共培養系を用いた解析により、この細胞死がマイクログリアによって誘導されていることが明らかとなっていたが、ライブイメージングによる詳細な解析と Fucci (Sakaue-Sawano A, et al., Cell 2008) を用いた細胞周期の可視化により、がん

細胞死のほとんどが M 期もしくは分裂直後（G1 期開始 2 時間以内）に観察されることが明らかとなった。さらに各種阻害剤および siRNA を用いた実験により、この細胞死が caspase-1 依存性であること、そのトリガーがある特定の DNA センサー分子を介したがん細胞内でのインフラマソームの活性化であることも明らかとなった。これらの結果は腫瘍細胞傷害性マイクログリアが未知なる機構を介して積極的にがん細胞に細胞死を誘導していることを示唆しており、現在、その詳細な分子機構の解析を行っている。

【考察と今後の課題】

研究提案の段階で予定していたグリアがん免疫“チェックポイント分子”の同定には至らなかったため、がん脳転移マウスモデルを用いた検証実験まで施行することはできなかった。しかしながら MGS 共培養系を構成するグリア細胞集団の基礎データが取得されたこと、およびマイクログリアによるがん細胞死誘導の分子機構の理解に関して大きな進展があったことから、令和 5 年度以降も引き続きグリアがん免疫制御機構の全貌解明を目指した研究を進め、最終的にはそのネットワークを標的とした新規治療戦略の開発を目指す。

【謝辞】

本研究は和歌山県立医科大学 橋本 真一 先生、岩淵 禎弘 先生、金沢医科大学 新井田 要 先生、礪 澄仁 先生、浦 大樹 先生のご協力のもと遂行されました。ここに深く御礼申し上げます。また本研究の遂行に多大なるご支援を賜りました公益財団法人がん研究振興財団に改めまして心より御礼を申し上げます。