

2021 年度臨床研究推進研究費報告書

申請年月日: 2021 年 6 月 16 日

代表者	氏名	前川 直也	所属	先端創薬分野		
	内線	5274	e-mail	maekawa@vetmed.hokudai.ac.jp		
研究課題	細胞診サンプルを用いた犬腫瘍の免疫回避機構の解析					
研究チーム 参加者	氏名	所属		役割		
	前川 直也	先端創薬分野		実験全般、データ解析		
	出口 辰弥	動物病院		採材、実験全般、データ解析		
研究期間	2020 年 7 月 ~ 2021 年 3 月					
研究目的と 成果の概要 (400 字以内)	腫瘍の免疫回避機構は、免疫療法だけでなく放射線治療などの従来の治療法においても治療効果を減弱すると考えられる。しかし、培養細胞やマウスを用いた実験では腫瘍微小環境の再現が困難であるため、犬腫瘍の免疫回避機構の解析は進んでいない。申請者らは、犬の自然発生腫瘍から細胞診（針生検）によって得たサンプルを解析する手法を新たに確立することで、犬腫瘍の腫瘍微小環境における免疫回避機構の解析を目指した。犬腫瘍細胞株移植マウスモデルや附属動物病院で治療した腫瘍罹患犬から FNA による採材を行ったところ、多数の生細胞を単離できた。さらに単離した細胞はフローサイトメトリーにより免疫抑制因子 PD-L1 の発現量の評価が可能であった。本手法は比較的非侵襲的であるため、治療前後などの様々なタイミングで採材が可能となり、腫瘍微小環境中の変化をリアルタイムに検出して免疫回避機構のより深い解明につながる事が期待される。					

研究方法、結果、考察、成果の公表（上記書式、図表を含めて 3 ページ以内に纏めて下さい）

【方法】

腫瘍の微小環境の評価には通常、腫瘍組織の採材が必要であり、外科的に切除するか麻酔下でのトウルーカット生検やパンチ生検等の手法が用いられる。一般的には得られる組織の量に比例して痛みや出血を伴い侵襲的であることから、通常の診断に必要な分量以外に研究用の採材を行うには満たすべき条件が多く存在する。特に時間的経過を追って解析を行いたい場合、何度も侵襲的な方法で採材をすることは難しい場合が多い。そこで本研究では、診療で一般的に用いられる技術でありながらこれまで研究への応用があまり検討されていなかった細胞診（針生検、fine needle aspiration: FNA）に着目し、これを用いてフローサイトメトリー法などの解析手法で腫瘍微小環境に存在する免疫抑制因子の発現解析等を行うことができるかを検討することとした。上皮系の腫瘍は細胞間接着が強く FNA では生きた細胞の単離が難しいと考えられたため、特に悪性黒色腫や骨肉腫等の非上皮系腫瘍を対象とした。

まずは FNA により解析に適した生細胞を組織から単離できるかを検討するために、ヌードマウスの大腿部に犬骨肉腫細胞株 (HMPOS) を移植した。腫瘍が生着・増大し、体積が 100 mm³ となった時点で無処置群と放射線照射群 (各群 $n = 3$) に分け、放射線照射群には 20 Gy の照射を行った。その 48 時間後に、FNA による細胞の採取を行い、PBS 内でよくピペティングをして単細胞浮遊液を調製した。得られた細胞について、トリパンブルー染色により生細胞と死細胞を染め分け、生存率を算出した。また回収した細胞に対して抗 PD-L1 抗体と allophycocyanin (APC) 標識二次抗体を用いて染

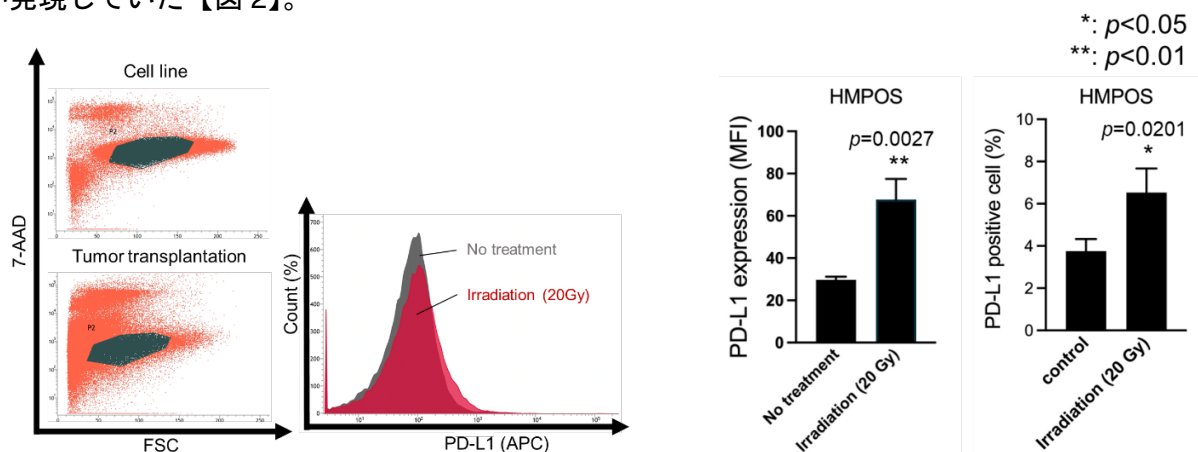
色を行い、7-AAD による死細胞染色を行った後にフローサイトメトリーによる PD-L1 発現解析を行った。

次に、腫瘍症例における本手法の適用可能性を検討するために、北海道大学附属動物医療センターへ来院した腫瘍罹患犬（悪性黒色腫、 $n=4$ ）に対し同様の FNA により細胞の取得を試みた。得られた細胞について PD-L1 染色と死細胞染色を行い、フローサイトメトリーによる PD-L1 発現解析に供した。

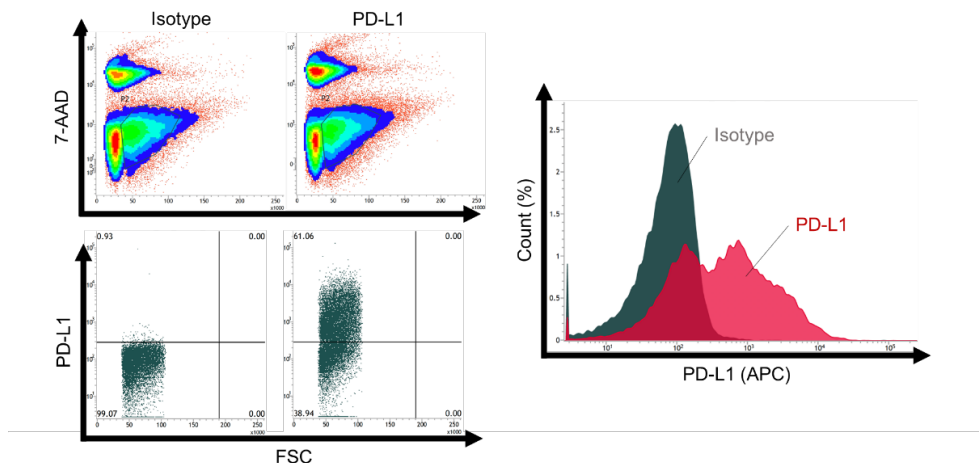
【結果】

HMPOS 移植ヌードマウスに形成された腫瘍塊からの FNA 採材では、フローサイトメトリー解析に十分な数の生細胞 ($0.5 \sim 1 \times 10^7$ 細胞) が得られ、その生存率はおよそ 60%前後であった。単離した細胞はフローサイトメトリー解析で元の細胞株固有の前方散乱光 (forward scatter: FSC) および側方散乱光 (side scatter: SSC) の特徴を示し、7-AAD に染まらなかった生細胞集団について PD-L1 発現 (APC 蛍光強度) の評価が可能であった。無処置群ではごく少数 (3.7%) の細胞が PD-L1 陽性であったが、放射線照射群ではその陽性率が上昇した (6.6%、 $p=0.02$)。細胞集団の PD-L1 発現量の指標である平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity: MFI) でも、放射線照射群は無処置群より高い値を示した ($p=0.003$) 【図 1】。

悪性黒色腫に罹患した犬 ($n=4$) から、同様の FNA 採材を行ったところ 4 症例中 3 症例においてフローサイトメトリー解析上で生きた腫瘍細胞と考えられる細胞集団が認められ、うち 2 症例で PD-L1 が発現していた【図 2】。



【図 1】ヌードマウス犬腫瘍細胞株移植モデルの FNA 材料を用いたフローサイトメトリーによる PD-L1 発現解析。単離した細胞を PD-L1 (APC) 染色および死細胞染色 (7-AAD) し、生細胞 (7-AAD 陰性細胞) 集団における PD-L1 発現を平均蛍光強度 (MFI) および陽性細胞率 (%) によって示した。統計学的検定には Student's t-test を用い、 $p < 0.05$ の場合を統計学的に有意であるとした。



【図 2】犬悪性黒色腫症例の FNA 材料を用いたフローサイトメトリーによる PD-L1 発現解析。症例より単離した FNA 材料について同様の解析を行った。代表的な解析例を示す。

【考察】

ヌードマウスにおける腫瘍移植モデルでは、FNAによる採材ののちに生細胞率を算出したところ60%程度の値を示し、再現性良く生きた細胞を単離することができた。フローサイトメトリー解析においては解析対象の細胞を単離する必要がある、組織由来の細胞を解析するためにはコラゲナーゼ等による酵素処理を行って細胞間結合を消化する過程がよく求められる。しかし、酵素処理は細胞に毒性を示し生細胞率が減少する傾向にあるため、反応条件（酵素濃度、反応温度、反応時間等）の最適化が難しい場合がある。今回用いたFNAおよびその後のピペッティングによる細胞の単離はこれとは対照的に機械的であり、物理的ストレスによる細胞死は一定頻度で起きるものの、生存率は高めに保つことができたと考えられる。同様の手法は犬腫瘍症例においても低侵襲でありながら細胞の単離法として有用であり、その後のフローサイトメトリー解析において死細胞染色により死細胞を除外する手法と組み合わせることで、生きた細胞集団に対し良好にPD-L1発現解析を行うことができることが明らかとなった。

PD-L1は免疫抑制因子の一つであり、T細胞上の受容体であるPD-1と結合するとT細胞の機能を抑制する。種々の腫瘍においてPD-L1の発現亢進が報告されており、腫瘍の免疫回避機構の一つとなっている。一方でPD-L1発現は腫瘍微小環境において様々な制御を受けており、その発現メカニズムや放射線治療／化学療法前後での発現変化などについては犬腫瘍ではほとんどわかっていない。放射線照射後のヌードマウス腫瘍モデルにおいてPD-L1発現が上昇していたことは、犬腫瘍細胞においても放射線照射等の外的要因によって腫瘍微小環境中のPD-L1発現が変化することを示唆している。今後、腫瘍症例の放射線治療前後のPD-L1発現解析を行うことによって、実際の腫瘍微小環境中におけるPD-L1の発現変化をとらえることができるようになると考えられ、PD-L1発現の流動性およびその制御機構の解明につながると期待される。

さらに本手法はほかの腫瘍関連因子の解析や、単離した細胞サンプルに含まれる免疫細胞の解析にも有用である可能性があり、治療前後などの様々なタイミングで採材を行うことで腫瘍微小環境中の標的分子の発現変化をリアルタイムに検出して、犬腫瘍における免疫回避機構の解明の一助となることが期待される。

【成果の公表（代表的なもの）】

- ・論文発表
該当なし（本内容に関する原著論文の投稿予定あり）
- ・学会発表
該当なし