

令和元年6月5日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08704

研究課題名(和文) 腫瘍内ミエロイド系免疫細胞の機能転換を起点とする新たな抗がん免疫応答の解析

研究課題名(英文) Anti-tumor immune responses mediated by TLR-activated tumor-associated myeloid cells

研究代表者

志馬 寛明 (Shime, Hiroaki)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：70372133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミエロイド由来抑制性細胞(MDSC)や腫瘍随伴マクロファージ(TAM)でのToll-like receptor (TLR) 2、TLR3シグナルの活性化が、細胞機能と腫瘍成長に与える影響を調べた。TLR3シグナルが活性化したMDSCは、がん細胞に対する細胞障害活性を獲得し、腫瘍の成長を抑制した。また、TLR3リガンドと放射線との併用療法では、活性化したTAMががん細胞の放射線感受性を高め、治療効果を増強した。一方、TLR2シグナルは、MDSCの免疫抑制活性を高め、治療の妨げとなった。TLRシグナルは腫瘍内ミエロイド系免疫細胞の機能を変化させ、がんの進行に対して大きく影響することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんに対する免疫療法のうち、臨床でも効果が認められている薬剤は、免疫チェックポイント阻害剤に限られる。しかし、全てのがんに有効ではないため、新たな作用機序を持つがん治療薬の開発に向けた基礎研究が必要である。本研究では、腫瘍内の免疫抑制性ミエロイド細胞であるMDSCやTAMの機能制御によるがん治療の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the effects of Toll-like receptor (TLR) 2 or TLR3 signals on myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and tumor-associated macrophages (TAMs) in tumor-bearing mice. TLR3 activation induced cytotoxic activity of MDSCs against cancer cells, leading to tumor growth inhibition. In combination with radiation treatment, TLR3 ligand-stimulated TAMs enhanced the radiosensitivity of cancer cells to potentiate therapeutic effect. In contrast, TLR2 stimulation enhanced the immunosuppressive activity of MDSCs and TAMs, resulted in decreasing therapeutic efficacy. These results suggest that activation of TLR signaling in MDSCs and TAMs has a significant impact on cancer progression.

研究分野：免疫学、腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍免疫 がん免疫 自然免疫 TLR TAM MDSC 免疫抑制 アジュバント

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

がんの新たな治療法は、患者はもとより社会全体から切望されている。近年、次世代がん医療の中核を担う治療法として、がんの免疫療法が注目されている。開発が先行する免疫チェックポイント阻害剤は世界中でがんの治療薬として認可されてきているが、全ての患者に有効ではない。将来的な展望から、新薬開発を目指して別の視点からがん免疫療法の基礎研究を行う意義は大きい。免疫活性化アジュバントは自然免疫シグナルの活性化を引き金として、がん細胞を殺傷できる多種類の抗がんエフェクター免疫細胞を同時に活性化できることから、多様性のある様々ながんを対象とした新規治療薬の候補として有望である。がん患者の特殊な免疫状態の下で、どの種類の免疫細胞をどのシグナル経路を介して刺激するのが治療に効果的なのか、明確に定義されていることが医薬品開発を行う上で重要であると考えられるが、その作用機序には不明な点が多い。

近年、腫瘍は単なるがん細胞の塊ではなく、特殊な機能を獲得したミエロイド系免疫細胞が多く集積して、がん細胞の増殖に有利な微小環境を形成することが分かってきた。代表的なミエロイド系免疫細胞は、腫瘍随伴マクロファージ(tumor-associated macrophages, TAM)、ミエロイド由来抑制細胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSC)である。腫瘍の退縮には細胞傷害性を持つT細胞(cytotoxic T lymphocytes, CTL)の活性化をいかに強く誘導できるかが重要であると考えられているが、これらのミエロイド系細胞は共通して免疫抑制活性が特に強く、腫瘍内に集積してきたCTLの活性を弱めることでがん細胞を免疫系による攻撃から逃避させる。がんの進行に伴ってこれらのミエロイド系細胞は数が増えて優勢となり、腫瘍の成長は促進される。がん患者では、同じ働きをもつ細胞の増加が予後不良と相関する。免疫抑制性のいわば”悪玉”ミエロイド系細胞の機能を抗がん性の”善玉”へと転換できれば、がん治療の新手法となる可能性がある。

自然免疫受容体のToll-like receptor (TLR) 2またはTLR3の精製リガンド(アジュバント)とがん細胞の目印となるがん抗原と一緒に投与すると、感染防御と類似した強い免疫応答が惹起されて樹状細胞(dendritic cells, DC)が活性化し、CTLやNK細胞活性化による腫瘍退縮が導かれる。その一方で、免疫抑制性の腫瘍内ミエロイド系細胞にもTLRが発現しているが、アジュバントを投与した時にどのように作用するのかは不明であった。我々は、RNAアジュバントによるTLR3の活性化により、TAMが細胞傷害活性のある抗がんエフェクター細胞に機能転換することで、腫瘍成長を抑制することを見出し、免疫アジュバント療法の新たな一面を明らかにした。すなわち、腫瘍内のミエロイド系免疫細胞は、アジュバントがん免疫療法において、がん治療に必須の細胞となると考えられた。これは、腫瘍内ミエロイド系細胞を除去してがんを治療しようとする従来の概念と異なるため、大きなインパクトを与えた(北大プレスリリース2012、新聞報道など)。これらのことから、TLRリガンドの投与は、腫瘍内のミエロイド系免疫細胞の機能を変化させ、腫瘍の成長に影響することが示唆された。

2. 研究の目的

TLRファミリーは、分子ごとに発現細胞や細胞内シグナル伝達経路が異なる。TLR3はアダプター分子TICAM-1(TRIF)を介して細胞内にシグナルを伝達し、主に1型インターフェロンの産生を誘導する。一方、TLR2は、MyD88を介して炎症性サイトカインの産生を誘導する。TLR2、TLR3の刺激がそれぞれ腫瘍内ミエロイド系免疫細胞で起こった場合に細胞機能に与える影響が異なる可能性について様々な角度から調べ、がん細胞に対する細胞傷害活性、CTL活性化や腫瘍成長にどのように影響するのか明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

がん細胞株のマウス腫瘍移植モデルと精製 TLR リガンドを用いた。腫瘍内ミエロイド系免疫細胞の各サブセットを対象とし、TLR 発現パターンと応答性について調べた。TLR リガンド投与後の腫瘍内ミエロイド系免疫細胞における機能分子の変化の包括的解析を行った。TLR シグナルで活性化した腫瘍内ミエロイド系免疫細胞ががん抗原特異的な CTL 誘導に与える影響を調べた。TLR 刺激が免疫抑制 (CTL 活性化の阻害) に与える影響とその分子メカニズム、および放射線療法の治療効果に与える影響について解析した。抗酸化アミノ酸エルゴチオネインとの併用が TLR2 リガンドの治療効果に与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1) TLR3 シグナルによる MDSC の抗がん活性誘導

TLR3 リガンドである二本鎖 RNA アナログ polyI:C を投与すると、EL4 がん細胞のマウス移植モデルでは、腫瘍内の CD11b⁺Ly6G⁺細胞 (顆粒球型ミエロイド由来抑制性細胞 granulocytic myeloid-derived suppressor cells, G-MDSCs または腫瘍随伴好中球 tumor-associated neutrophils, TANs と呼ばれる) から活性酸素種/活性窒素種が強く産生され、がん細胞にカスパーゼ 8/3 経路を介したアポトーシスを誘導して腫瘍の成長を抑えることを見出した。すなわち腫瘍内に浸潤した CD11b⁺Ly6G⁺細胞は、腫瘍の成長過程ではサポートに働くが、自然免疫シグナルの活性化によって抗がん活性を付与できることを明らかにした。これらの効果は他のがん細胞株でも同様に見られ、程度の差はあれ多くのがんで有効なメカニズムであると考えられた。

(2) TLR2 シグナルによる MDSC、TAM の免疫抑制活性増強

TLR2 リガンドを EG7 がん細胞の担がんマウスに投与すると、DCs の活性化により CTLs が活性化して腫瘍の成長が阻害される一方で、MDSCs の増加が全身性に見られた。TLR2 刺激は、単球型 MDSCs (M-MDSCs) の免疫抑制活性を増強し、細胞傷害性 T 細胞の増殖を強く抑制した。免疫抑制の増強には、マクロファージへの分化と生存が増強されることと誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible NO synthase, iNOS) による NO 産生が重要であった。M-MDSCs による免疫抑制を解除するために iNOS の阻害剤を TLR2 リガンドと共に投与すると治療効果は増強した。以上のことから、TLR2 シグナルが M-MDSCs に作用すると、その免疫抑制活性を増強して、樹状細胞を介した治療効果に負の影響を与えることがわかった。

(3) TLR3 特異的リガンド ARNAX の抗がん作用機序の解明

TLR3 特異的リガンド ARNAX とがん抗原の投与は、MHC class I の発現が高く、PD-L1 の発現が低く、免疫抑制性ミエロイド系細胞が少ない腫瘍に対して強い治療効果を誘導できること、メモリー T 細胞を誘導して長期にわたる治療効果が期待できることを明らかにした。

(4) TLR3 リガンドと放射線照射との併用によるがん治療効果の増強メカニズム

腫瘍への放射線照射によって免疫応答が活性化されることから、TLR3 シグナルとの相乗効果を期待し、併用療法の可能性を検討した。LLC-OVA がん細胞の移植モデルにおいて、TLR3 シグナルで活性化した TAM から産生された TNF- α が、がん細胞の放射線感受性を高めることによって相乗的な治療効果をもたらすことが示唆された。

(5) TLR2 リガンドとエルゴチオネインとの併用が TAMs に与える影響

TLR シグナルの強さは、様々な刺激によって影響を受けるため、生理活性の異なる他の薬剤と併用することにより、TLR リガンドのがん治療効果が増強される可能性がある。抗酸化アミノ酸であるエルゴチオネイン(L-ergothioneine, EGT)は、マクロファージや樹状細胞などのミエロイド系免疫細胞において TLR シグナル伝達機構に影響を与える。EGT が TLR リガンドの抗がん作用に影響するかどうかを、TAMs の機能変化に着目して解析した。LLC-OVA がん細胞の移植モデルで、TLR2 リガンドとがん抗原の投与による抗がん効果は、EGT と の併用によって増強された。TLR2 リガンドと EGT を投与したマウスの TAMs は、その数が減少するとともに、免疫抑制活性が低下していた。すなわち、EGT は腫瘍内微小環境での TLR2 シグナル伝達機構に影響を与え、TAMs の免疫抑制機能を抑えて細胞傷害性 T 細胞の活性を増強することがわかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 14 件)

1. Yoshida S, Shime H, Matsumoto M, Kasahara M, Seya T. An anti-oxidative amino acid L-ergothioneine modulates tumor microenvironment to facilitate adjuvant vaccine immunotherapy *Frontiers in Immunol* 10:671, 2019. doi: 10.3389/fimmu.2019.00671 査読あり
2. Ikumi K, Odanaka M, Shime H, Imai M, Osaga S, Taguchi O, Nishida E, Hemmi H, Kaisho T, Morita A, Yamazaki S. Hyperglycemia is associated with psoriatic inflammation in both humans and mice. *J Invest Dermatol* 139: 1329-1338, 2019
3. Takeda Y, Yoshida S, Takashima K, Ishii-Mugikura N, Shime H, Seya T, Matsumoto M. Vaccine immunotherapy with TLR3 adjuvant induces tumor-specific memory T cells and durable anti-tumor immunity in mouse tumor models. *Cancer Sci* 109: 2119-2129, 2018. doi: 10.1111/cas.13649 査読あり
4. Takeda Y, Azuma M, Funami K, Shime H, Matsumoto M, Seya T. Type I interferon-independent dendritic cell priming and antitumor T cell activation induced by a Mycoplasma fermentans lipopeptide. *Front Immunol* 9:496, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.00496. eCollection 2018 査読あり
5. Yoshida S, Shime H, Takeda Y, Nam JM, Takashima K, Matsumoto M, Shirato H, Kasahara M, and Seya T. Toll-like receptor 3 signal augments radiation-induced tumor growth retardation in a murine model. *Cancer Sci* 109: 956-965, 2018. doi: 10.1111/cas.13543 査読あり
6. Shime H, Maruyama A, Yoshida S, Takeda Y, Matsumoto M, Seya T[#]. Toll-like receptor 2 ligand and interferon- γ suppress anti-tumor T cell response by enhancing immunosuppressive activity of monocytic myeloid-derived suppressor cells *Oncoimmunol* 7(1): e1373231, 2018 doi:10.1080/2162402X.2017.1373231 査読あり
7. Yamazaki S, Odanaka M, Nishioka A, Kasuya S, Shime H, Hemmi H, Imai M, Riethmacher D, Kaisho T, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A. Ultraviolet B-induced maturation of CD11b-type Langerin⁻ dendritic cells controls the expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells in the skin. *J Immunol* 200(1): 119-129, 2018. doi: 10.4049/jimmunol.1701056 査読あり
8. 志馬寛明、松本美佐子、山崎小百合、瀬谷 司 TLR アゴニストを用いた抗癌免疫アジュバント療

法 Thrombosis Medicine vol.8 (2), p5-12, 2018 査読なし

9. Ono J, Shime H, Takaki H, Takashima K, Funami K, Takeda Y, Yoshida S, Matsumoto M, Seya T. TLR3/TICAM-1 signal constitutively controls spontaneous polyposis through suppression of c-Myc in *Apc^{Min/+}* mice. *J Biomed Sci* 24(1): 79, 2017 doi:10.1186/s12929-017-0387-z 査読あり
10. Shime H, Matsumoto M, Seya T. Double-stranded RNA promotes CTL-independent tumor cytolysis mediated by CD11b⁺Ly6G⁺ intratumor myeloid cells through the TICAM-1 signaling pathway. *Cell Death & Differentiation* 24: 385-396, 2017 doi:10.1038/cdd.2016.131 査読あり
11. Yoshida S, Shime H, Funami K, Takaki H, Matsumoto M, Kasahara M, Seya T. The Anti-Oxidant Ergothioneine Augments the Immunomodulatory Function of TLR Agonists by Direct Action on Macrophages. *PLoS ONE* 12: e0169360–15, 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0169360 査読あり
12. Takashima K, Takeda Y, Oshiumi H, Shime H, Okabe M, Ikawa M, Matsumoto M, and Seya T. STING in tumor and host cells cooperatively work for NK cell-mediated tumor growth retardation. *Biochem Biophys Res Commun* 478(4): 1764-1771, 2016 査読あり
13. Kasamatsu J, Deng M, Azuma M, Funami K, Shime H, Oshiumi H, Matsumoto M, Kasahara M, Seya T. Double-stranded RNA analog and type I interferon regulate expression of Trem paired receptors in murine myeloid cells. *BMC Immunol.* 17(1):9, 2016 doi:10.1186/s12865-016-0147-y. 査読あり
14. Takaoka S, Kamioka Y, Takakura K, Baba A, Shime H, Seya T, Matsuda M. Live imaging of transforming growth factor-β activated kinase 1 activation in Lewis lung carcinoma 3LL cells implanted into syngeneic mice and treated with polyinosinic:polycytidylic acid. *Cancer Sci* 107(5): 644-652, 2016. doi: 10.1111/cas.12923 査読あり

[学会発表] (計 12 件)

1. Hiroaki Shime, Misako Matsumoto, Sayuri Yamazaki, Tsukasa Seya. The TLR3/TICAM-1 signal constitutively controls spontaneous polyposis through suppression of c-Myc in *Apc^{Min/+}* mice. Nagoya Immunology Network in NCU. 2019
2. Hiroaki Shime, Misako Matsumoto, Sayuri Yamazaki, Tsukasa Seya. The TLR3/TICAM-1 signal constitutively controls spontaneous polyposis through suppression of c-Myc in *Apc^{Min/+}* mice. 第 47 回日本免疫学会学術集会. 2018
3. 吉田純人, 志馬寛明, 武田洋平, 松本美佐子, 瀬谷司. トル様受容体 3 リガンドは放射線の増感性免疫アジュバントとして機能する 日本がん免疫学会 2018
4. 志馬寛明, 松本美佐子, 山崎小百合, 瀬谷司. TLR2 シグナルはミエロイド由来抑制性細胞のがん免疫抑制作用を増強する 日本樹状細胞研究会 2018
5. Hiroaki Shime, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya. Toll-like receptor 2 ligand and interferon-γ suppress anti-tumor T cell responses by enhancing the immunosuppressive activity of monocytic myeloid-derived suppressor cells. 第 46 回日本免疫学会学術集会. 2017
6. Hiroaki Shime, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya. Double-stranded RNA induces CTL-independent tumor cytolysis mediated by CD11b⁺Ly6G⁺ intratumor myeloid cells through the TICAM-1 signaling pathway. The 36th Sapporo International Cancer Symposium. 2017
7. Sumito Yoshida, Hiroaki Shime, Misako Matsumoto, Masanori Kasahara, Tsukasa Seya. TLR3 adjuvant enhances tumor regression in concert with radiation therapy in mouse tumor-implant models. The 36th Sapporo International Cancer Symposium. 2017

8. Hiromi Takaki, Hiroaki Shime, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya. PolyI:C-induced, TLR3/RIP3-dependent necroptosis backs up immune effector-mediated tumor elimination in vivo. The 36th Sapporo International Cancer Symposium. 2017
9. Ken Takashima, Yohei Takeda, Hiroyuki Oshiumi, Hiroaki Shime, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya. STING in tumor and host cells cooperatively work for NK cell-mediated tumor growth retardation. The 36th Sapporo International Cancer Symposium. 2017
10. 尾野純也、志馬寛明、松本美佐子、瀬谷司. TICAM-1 シグナルは ApcMin/+マウスの腸ポリープ形成を制御する. 第 39 回日本分子生物学会. 2016
11. Hiroaki Shime, Akira Maruyama, Misako Matsumoto, Tsukasa Seya. CD8+ T cell-derived IFN- γ is a critical factor for enhanced suppressive activity of M-MDSCs induced by TLR2 activation. 第 75 回日本癌学会. 2016
12. 志馬寛明、松本美佐子、瀬谷司. TLR シグナルの活性化による腫瘍内ミエロイド系免疫細胞の機能変化と腫瘍退縮機構. 第 81 回日本インターフェロンサイトカイン学会. 2016

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。