

令和元年6月17日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08752

研究課題名(和文) 腫瘍内浸潤骨髄由来免疫抑制細胞の特徴解析に基づく化学免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of chemo-immunotherapy based on the characterization of tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells

研究代表者

青木 一教 (Aoki, Kazunori)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：60270675

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：効果的な化学免疫療法の開発を目指し、化学療法や免疫療法の抵抗因子となる骨髄由来抑制細胞(MDSC)に着目してその特徴を検討した。具体的には、マウス腫瘍モデルを用いて、腫瘍内に浸潤するMDSCの特徴的なサブタイプを同定、その遺伝子発現の特徴を明らかにするとともに、腫瘍内のがん関連間質線維芽細胞がMDSCを腫瘍内にリクルートする機序を解明した。さらに、化学療法とMDSCを除去する阻害剤を併用することにより相乗的抗腫瘍免疫が誘導できることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤が多くのがん種に対して有効性を示すが、70-80%が抵抗性を示す。そこで、現在、化学療法と免疫療法の併用などの複合的免疫療法の開発が期待されている。本研究では、化学免疫療法の抵抗因子である骨髄由来抑制細胞(MDSC)に着目して、腫瘍内に浸潤する特徴的なサブタイプを同定、またMDSCの腫瘍への浸潤機構を明らかとした。さらに、MDSCを抑制することにより化学免疫療法の効果が増強できることを示した。これらの研究成果は、今後有効な化学免疫療法の開発に結びつけるうえで重要な基礎データとなる。

研究成果の概要(英文)：To develop the effective chemo-immunotherapy, we focused on the characterization of tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells (MDSC), which are considered as a major resistance factor against the antitumor induction by chemo-immunotherapy. We identified a specific subtype in tumor-infiltrating MDSCs and elucidated the characteristics of the gene expression profile. Then, we found that the cancer-associated fibroblasts recruited the MDSC into tumors by production of MDSC-related cytokines such as CXCL6. Finally, we showed that the combination of chemotherapy and the depletion of MDSC enhanced antitumor immunity and induce synergistic antitumor effect in mouse model.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：化学免疫療法 骨髄由来抑制細胞 サイトカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、抗がん剤による腫瘍免疫誘導が抗腫瘍効果に重大な役割を果たしていることが明らかとなり、「化学免疫療法」という治療概念が登場した。これは、単に化学療法と免疫療法の併用療法を意味するものではなく、特定の抗がん剤により腫瘍免疫が誘導され、この免疫反応が抗腫瘍効果に重要な役割を担っていることを意味する。

我々は、これまでに、大腸がんの標準的化学療法施行症例の血中リンパ球の解析により、腫瘍特異的免疫が誘導されていることが腫瘍縮小効果に直結すること、そして免疫因子も含めた各種臨床病理学的因子のなかでも、血中や腫瘍組織中の骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC: myeloid-derived suppressor cells) が、抗腫瘍免疫効果を抑制し生存率の低下と有意に相関していることを見出し、MDSC を抑制することが腫瘍免疫において重要であることを示した。

しかし、この MDSC は、骨髄球系前駆細胞に由来する不均一な細胞集団であり、どのような特徴を持つ MDSC が腫瘍内に浸潤し腫瘍免疫を抑制する機能を発揮しているかは明らかとなっていない。そこで、本研究では、特に腫瘍内に浸潤する MDSC に着目して、その特徴や機能および腫瘍組織内への浸潤機序を解明し、MDSC に対する阻害剤を探索・同定することにより、化学免疫療法の一層の強化に結び付けることを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍内の MDSC の腫瘍免疫抑制環境における役割を明らかとし、MDSC の機能を阻害することで抗腫瘍免疫を強く誘導する新たな化学免疫療法開発の基盤となる研究を行う。具体的には、以下のことを明らかとする。

- 1) マウス大腸がんモデルを用いて、腫瘍部における MDSC を単一細胞レベルで発現解析し、末梢の MDSC と比較することによって、腫瘍内に浸潤しているか MDSC 細胞亜集団の特徴を明らかとする。
- 2) 誘導したヒト MDSC を用いて、腫瘍組織内での MDSC とがん細胞・がん関連繊維芽細胞との相互作用を解析し、特に MDSC が腫瘍内に浸潤する機序を明らかとする。
- 3) 低分子化合物ライブラリーから、ヒト MDSC を用いて、腫瘍組織内へのホーミング関連分子等を抑制する化合物を探索する。MDSC 阻害剤が、抗がん剤や免疫療法により誘導される腫瘍免疫を持続的に強化できることを明らかとする。

3. 研究の方法

1) 腫瘍内浸潤 MDSC の特徴の解明

マウスがん移植腫瘍モデルを用いて、腫瘍内に浸潤した MDSC の分子細胞的特徴を解析する。まず、マウス肺がん・大腸がん移植腫瘍モデルの脾臓と腫瘍部を単一細胞に分離した後、CD11b⁺Gr-1⁺の MDSC 細胞分画をフローサイトメトリーにより回収する。ついで、単一細胞レベルでの発現解析を行い、脾臓と腫瘍から分離した MDSC を比較し、腫瘍部浸潤 MDSC に特徴的な遺伝子発現や signature を明らかにする。

2) がん細胞・がん関連繊維芽細胞による腫瘍内への MDSC ホーミング機序の解明

MDSC は、腫瘍組織からの何らかの働きかけで腫瘍内に浸潤すると考えられるが、その詳しい機序は不明な点が多い。そこで、ヒト大腸がん・肺がん細胞株や肺がん関連繊維芽細胞 (Cancer-associate fibroblast; CAF) 株及び正常組織繊維芽細胞株と、我々がヒト末梢血単核細胞 (PBMC) より IL-6 と GM-CSF を用いて誘導した誘導 MDSC (iMDSC) を用いて、CAF による MDSC ホーミング機序を明らかとする。特に、腫瘍内 MDSC に発現しているケモカインレセプターに着目して、がん細胞や CAF がそれに対するケモカインを分泌するか検討

する。さらに、ケモカインとレセプター系を介してがん細胞や CAF が iMDSC の浸潤能や運動性に影響を及ぼしているか、in vitro での共培養により検討する。

3) 腫瘍内浸潤 MDSC の PD-L1 発現等を阻害する化合物のスクリーニング

PD-L1 や免疫抑制活性を担う ARG や NOS、および上記検討にて同定する MDSC の腫瘍内ホーミングに関連する分子を標的に、それらの発現を抑制する化合物の探索を国内企業と連携して行う。また、動物モデルにおいて、MDSC の免疫抑制活性や腫瘍内浸潤を抑制することで、抗がん剤による腫瘍免疫誘導を増強できるか検討する。具体的には、CT26 皮下腫瘍マウスモデルで、MDSC 阻害剤単独、抗がん剤 (5-FU) 単独、MDSC 阻害剤と抗がん剤併用療法の抗腫瘍効果を比較する。

4 . 研究成果

本研究は、腫瘍内に浸潤する骨髄由来抑制細胞(MDSC)に着目して、その特徴や腫瘍組織内での機能を解明、MDSC に対する阻害剤を探索し新たな化学免疫療法の開発につなげることを目的とした。具体的な研究成果としては、

1) 腫瘍部に浸潤する MDSC の分子細胞的特徴の理解

腫瘍内に浸潤した MDSC の分子細胞的特徴を解析するために、Lewis Lung carcinoma マウス肺がん移植腫瘍モデルから、脾臓と腫瘍部を採取して顆粒球系と単球系の MDSC を分取し、シングルセルレベルで RNA-Seq を行った。クラスタリング解析により、顆粒球系と単球系の MDSC のどちらも脾臓の MDSC と腫瘍浸潤 MDSC では遺伝子発現プロファイルがかなり異なっていること、また腫瘍浸潤 MDSC に特徴的な亜集団が存在することを同定し、その特徴的な遺伝子発現を明らかとした。

2) がん細胞・間質細胞が MDSC を腫瘍組織にホーミングする機序の解明

肺がん由来の 11 種類のがん関連線維芽細胞(CAF)と同じ患者の正常線維芽細胞(NF)における MDSC に関連したサイトカインを網羅的に検討し、CAF では MDSC の増殖能を活性化する IL-6 や HGF、遊走能を促進する CCL2 や CXCL6 の発現が亢進していることを明らかとした。さらに、CXCL6 が高い CAF は、MDSC を共培養すると明らかに遊走性を上昇させるが、一方で NF は CXCL6 の産生がなくまた MDSC の遊走能を上昇させる作用はないことから、CAF が産生する CXCL6 が腫瘍内浸潤 MDSC サブセットのホーミングに関連していることを見出した。

3) MDSC の阻害剤と抗がん剤と組み合わせた化学免疫療法の基礎開発

低分子化合物ライブラリーから MDSC の阻害剤を探索するために、標的分子となる MDSC の免疫抑制活性機序を検討し、探索の準備を進めた。また、動物モデルにおいて、5-FU と Ly6G 抗体による MDSC 除去が、腫瘍内の腫瘍特異的 CD8⁺T 細胞と NK 細胞の頻度や活性化状態を亢進することにより相乗的な抗腫瘍免疫を誘導することを示し、MDSC 除去の重要性を明らかとした。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Narumi K, Miyakawa R, Shibasaki C, Henmi M, Mizoguchi Y, Ueda R, Hashimoto H, Hiraoka N, Yoshida T, Aoki K. Intratumoral delivery of GITR agonistic antibody induces an antitumor immunity stronger than systemic delivery. Sci Rep 9:5562, 2019. doi:

- 10.1038/s41598-019-41724-x.
2. Henmi M, Shibasaki C, Mizoguchi Y, Hirata A, Sawai E, Narumi K, Aoki K. Pre-immunization of donor lymphocytes by G1TR agonistic antibody enhances antitumor immunity of autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 09:96-101, 2019. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.12.069.
 3. Hirata A, Hashimoto H, Shibasaki C, Narumi K, Aoki K. Intratumoral IFN- α gene delivery reduces tumor-infiltrating regulatory T cells through the down-regulation of tumor CCL17 expression. *Cancer Gene Ther* 2018 Nov 12. doi: 10.1038/s41417-018-0059-5.
 4. 青木一教, 中釜 齊. *がん免疫療法開発のガイダンス 2016*. *臨床免疫・アレルギー科*. 62: 207-211, 2018.
 5. Shoji H, Heike Y, Tada K, Kitano S, Nishimura T, Shimada Y, Nagashima K, Aoki K, Hiraoka N, Honma Y, Iwasa S, Takashima A, Kato K, Boku N, Honda K, Yamada T, Hamaguchi T. The peripheral immune status of granulocytic myeloid-derived suppressor cells correlates the survival in advanced gastric cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. *OncoTarget* 8:95083-95094, 2017. doi: 10.18632/oncotarget.18297.
 6. 青木一教, *がん免疫微小環境のシングルセル解析で何がわかってきたか*. *実験医学*. 35; 552-556, 2017.
 7. Tada T, Kitano S, Shoji H, Nishimura T, Shimada Y, Nagashima K, Aoki K, Hiraoka N, Honma Y, Iwasa S, Okita N, Takashima A, Kato K, Yamada Y, Katayama N, Boku N, Heike Y, Hamaguchi T. Pretreatment immune status correlates with progression-free survival in chemotherapy-treated metastatic colorectal cancer patients. *Cancer Immunol Res* 4:592-599, 2016. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0298.

[学会発表](計 10件)

1. Eri Sawai, Makiko Yamashita, Aya Hirata, Yukihiro Mizoguchi, Makoto Miyazaki, Genichiro Ishii, Kazunori Aoki. The role of cancer-associated fibroblasts in immune suppressive microenvironment of lung cancer. 11th AACR-JCA Joint Conference. 2019
2. Aya Hirata, Eri Sawai, Yukihiro Mizoguchi, Kenta Narumi, Kazunori Aoki. Imatinib mesylate induced antitumor effect by increased infiltration of effector T cells in tumor. 第 47 回日本免疫学会総会. 2018
3. Eri Sawai, Makiko Yamashita, Marina Henmi, Aya Hirata, Yuria Sawada, Chihiro Shibasaki, Yukihiro Mizoguchi, Makoto Miyazaki, Genichiro Ishii, Kazunori Aoki. The role of cancer associated fibroblasts in immune suppressive microenvironment of lung cancer. 第 77 回日本癌学会総会. 2018.
4. Yuria Sawada, Makiko Yamashita, Eri Sawai, Marina Henmi, Aya Hirata, Chihiro Shibasaki, Hironori Fukuda, Yukihiro Mizoguchi, Kazunori Aoki. The immunological role of pancreatic cancer-associated fibroblasts to construct immunosuppressive microenvironment. 第 77 回日本癌学会総会. 2018.
5. Kazunori Aoki. Tumor immune microenvironment in pancreatic cancer. ACIS symposium 2018.

6. Kenta Narumi, Reina Miyakawa, Chihiro Shibasaki, Kazunori Aoki. Local Delivery of GITR Agonistic Antibody Induces a Stronger Antitumor Immunity than Systemic Administration. AACR Annual meeting. 2018.
7. Aya Hirata, Chihiro Shibasaki, Marina Henmi, Yukihiro Mizoguchi, Hajime Takizawa, Kazunori Aoki. Effect of Imatinib mesylate to immunosuppressive microenvironment in tumor. 第46回日本免疫学会総会. 2017.
8. Chihiro Shibasaki, Kenta Narumi, Marina Henmi, Kazunori Aoki. Mechanism of Antitumor Immunity Induced by Intratumoral injection of GITR Ab (Poster presentation). 第76回日本癌学会総会. 2017.
9. Marina Henmi, Yukihiro Mizoguchi, Aya Hirata, Kazunori Aoki. The priming of donor cells by GITR agonist antibody enhances the antitumor immunity of hematopoietic stem cell transplantation against solid cancer. 第76回日本癌学会総会. 2017.
10. Kazunori Aoki, Chihiro Shibasaki, Hisayoshi Hashimoto. Interferon- α reduces trafficking of regulatory T cells into tumor by inhibition of CCL17 expression. AACR Annual meeting 2017.

〔図書〕(計 1件)

1. 青木一教, 講談社, 「がん」はなぜできるのか(第3章がんがしぶとく生き残る術), 2018, p115-146

〔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 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし