

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02695

研究課題名(和文) 抗腫瘍免疫に应答し癌細胞が免疫耐性変異する分子機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms underlying acquired resistance of tumor cells responding to anti-tumor immunity

研究代表者

竹田 和由 (TAKEDA, KAZUYOSHI)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80272821

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗腫瘍免疫に应答して癌細胞が免疫抵抗性を獲得し悪性度を増強する分子機構の解明を目的に研究し、その過程で以下のことを明らかにした。1) 癌細胞および宿主ミエロイド系細胞でのCD155の新規発現は、癌細胞の抗腫瘍免疫反応からのエスケープに関与する。2) 細胞死誘導レセプターDR5の核内移行の阻害による細胞表面での発現増強が、細胞死抵抗性の癌に対しても腫瘍治療効果を発揮させる。3) 転移の初期に起きる炎症の場での骨芽細胞によるThymic stroma lymphopoietin (TSLP)の産生は破骨細胞の分化を抑制し、骨転移形成に関与する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌特異的免疫反応に应答して起きる癌細胞自体の変化こそが、癌細胞が治療抵抗性となる本質的機序であり、この克服なしには治療効果には限界がある。すなわち、発癌、増殖、転移の過程における癌細胞の形質転換が癌細胞の治療抵抗性獲得の原因であることが示されている。本研究により、癌増殖過程での新たな免疫抑制分子の発現や細胞死抵抗性の新規獲得、さらには骨転移初期の炎症惹起による骨代謝制御が起きていることが示され、これらの克服が免疫療法を含む癌治療法の奏効率の向上に繋がることが示された。

研究成果の概要(英文)：Biological characters of cancer cells are altered responding to host responses including immune responses, and this is the essential mechanism by which cancer cells acquire resistance against various therapies. The purpose of this study is to elucidate the mechanisms that induce adaptive immune resistance by immune responses, and I have reported the following findings.

1) CD155 expressed on cancer cells and/or myeloid cells plays important role to escape anti-tumor immune responses. 2) Augmentation of DR5 surface expression overcomes the resistance against cell-death inducing cancer therapy. 3) TSLP produced by osteoblasts in inflamed micro metastasis would play roles for bone metastasis formation.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：抗腫瘍免疫 免疫抵抗性 CD155 TRAIL/DR5 Importin 1 骨転移 炎症

1. 研究開始当初の背景

免疫源性の低い癌細胞が、免疫エフェクター細胞に殺傷されずに選択され増殖するという概念が immunoediting として提言されている¹。一方で、癌特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)が産生する TNF に反応し、癌細胞が標的となっている癌抗原の発現を可逆的に低下させることが報告されている²。また、癌特異的 CTL の産生する IFN- γ に癌細胞が反応して PD-L1 を発現し、PD-L1/PD-1 シグナルにより癌特異的 CTL の活性を抑制しており、この解除が抗 PD-L1/PD-1 抗体治療の作用機序であることも示されている³。これらの知見は、癌特異的免疫反応にตอบสนองして起きる癌細胞自体の変化こそが、癌細胞が免疫抵抗性となる本質的機序であることを示しており (adaptive immune resistance)、この克服なしには癌免疫療法の治療効果には限界があることを示唆している。すなわち、抗腫瘍免疫療法においては、治療による新たなエスケープバリエーションが発生が治療の妨げとなっている。それにもかかわらず、抗腫瘍免疫反応が癌細胞に与える影響を解析した研究はほとんどない。

一方で、point mutation の頻度が免疫チェックポイント抑制剤による治療応答性と相関するのに対し、染色体レベルでの変異の数が免疫治療抵抗性と相関していることがヒトサンプルの解析により明らかにされている⁴⁻⁶。従って、遺伝子の変異は抗腫瘍免疫の標的となる一方で、抗腫瘍免疫抵抗性となる原因でもある。研究代表者は、癌微小環境で癌特異的な CTL の産生する IFN- γ にตอบสนองして癌細胞の遺伝子不安定性が増強し、癌細胞に抗原遺伝子の欠損等の新たな遺伝子変異が誘導され、その結果、癌細胞が免疫抵抗性となり免疫治療をエスケープし増殖することを世界で初めて報告した(cancer genome immunoediting)⁷。

2. 研究の目的

本研究の目的は、発癌・増殖の過程を通じて、癌微小環境で抗腫瘍免疫反応にตอบสนองして癌細胞の遺伝子不安定性が増強し、その結果として、癌細胞が免疫抵抗性を獲得し悪性度を増強する分子機構を明らかにすることである。癌増殖過程での遺伝子不安定性に基づくゲノムの変異の積み重ねは、転移能等を獲得し悪性度が増強する機構の一つである (genetic evolution)⁸。さらには、癌細胞のゲノム不安定性は癌細胞の heterogeneity を形成する基盤であり、癌幹細胞とともに癌が化学療法薬や分子標的薬に抵抗性を獲得する重要な機構である。従って、本研究の目的が達成されれば、癌成立に重要な新規の分子機構を示すこととなる。さらに、この免疫耐性を獲得する機構を作動させない免疫療法の開発や、この分子機構を阻害する新規治療薬・治療法の開発により、免疫療法の効果を飛躍的に増強させることを最終目標とする。

3. 研究の方法

本研究では、網羅的遺伝子解析 (染色体、DNA および RNA レベルでの解析)と細胞生物学的解析を並行して行う。癌細胞の免疫エスケープ機構には未知の部分が多いため、網羅的解析から始める分子生物学的解析と、これまでの知見に基づく機能的解析から始める細胞生物学的解析を同時進行的に進め、それぞれの知見を総合しながら分子機構を絞り込み、癌細胞が抗腫瘍免疫にตอบสนองして遺伝子不安定が増強し、免疫回避能を獲得する分子機構を明らかにする。

(1) 内在性癌抗原と遺伝子不安定性を増強させる遺伝子を同時に発現した癌細胞の樹立

B6 rasH2 トランスジェニックマウス(C57BL/6J-TgrasH2@Jcl)に抗 NK1.1/CD8/CD4 抗体を継続的に投与して免疫細胞を除去しつつ、メチルコランソレン (methylchoranthrene: MCA を投与して遺伝子変異により化学発癌させ、新規に癌細胞を樹立する。コントロールとして、免疫抑制処理をしていない B6 rasH2 トランスジェニックマウスからも癌細胞を樹立する。この neoantigen を発現すると考えられる rasH2

発現癌細胞から、sorting と single cell cloning により single cell 由来クローンを樹立する。さらにこの中から、免疫不全の RAG ノックアウトマウスでの増殖能に比較して、正常 wild type (WT) マウスでの増殖能が有意に低い、抗腫瘍免疫を発動させうる癌細胞を選択する。

(2) single cell 解析が可能な癌細胞の作製

癌の移植時と増殖後で同一の一細胞由来の癌細胞の変化を解析するため、特徴的な遺伝子配列を持つバーコード遺伝子を導入し、single cell 解析の可能な neoantigen/rasH2 発現癌細胞を(1)で樹立した癌細胞から作製する。

(3) immunoediting 実験と網羅的遺伝子解析・生物学的解析

(1) および(2)で得られた neoantigen/rasH2 発現癌細胞を、WT マウスまたは RAG ノックアウトマウスに皮下移植し、その増殖過程を追いながら癌細胞を単離する。また、直径が約 5 mm 程度に達してから免疫チェックポイント阻害抗体(抗 CTLA4 抗体や抗 PD-L1/PD-1 抗体)や、申請者の樹立した trimAb による治療⁹を施し、治療抵抗性を獲得し増殖する癌細胞も取得する。それらの癌細胞から DNA および RNA を抽出し、種々の遺伝子解析法を用いて、抗腫瘍免疫により誘導された免疫抵抗性に関する遺伝子の変化やゲノムの不安定化、癌幹細胞化に関連する分子等の発現変化を解析する。複数の分子に発現変化が見られると考えられ、パスウェイ解析により分子間の上下関係も明らかにする。同時に、免疫系を含む宿主側の細胞およびその遺伝子も取得し、コホスト側の細胞の反応性の変化も並行して解析する。

4. 研究成果

(1) 癌細胞に後天的に発現しうる分子の一つとして既に見出していた (未発表) CD155 の免疫エスケープにおける役割を検討した。CD155 は宿主由来のミエロイド系の細胞にも発現することから、CD155 ノックアウトマウスを用いて実験を行ったところ、DNAM-1 の発現増強を伴う細胞傷害性 CD8T 細胞と NK 細胞の活性化により、癌の増殖と転移の抑制が示された。癌細胞における CD155 の発現も同様の結果を示し、抗 PD-1 抗体治療への感受性が高まった。CD155 ノックアウトマウスに移植した CD155 発現癌細胞は、さらに抗腫瘍免疫への感受性が増強した。以上の結果から、癌細胞および宿主ミエロイド系細胞での CD155 の発現は、癌細胞の抗腫瘍免疫反応からのエスケープに関する分子の一つであることが示された¹⁰。

(2) 研究代表者は、TRAIL/DR5 による癌細胞の細胞死誘導が発癌サーベイランスや癌転移抑制機構において重要であること、さらには TRAIL/DR5 による細胞死誘導を応用した強力な癌治療も報告している^{9, 11-13}。さらに、ヒト癌細胞は DR5 の細胞表面への発現を低下させることと TRAIL や抗 DR5 抗体による細胞死誘導に対して耐性を獲得することを見出しており、その発現抑制メカニズムの解析を進めてきていた。今回、この DR5 の細胞表面への発現低下による細胞死への耐性獲得を克服する新規治療法の開発研究を行った。具体的には、癌細胞は Importin 1 の発現により DR5 を核内に移行させ細胞表面の発現を減弱させるのを抑制するために、atelocollagen を用いた shRNA による Importin 1 発現の生体内でのノックアウト、又は Importin 1 の特異的抑制剤である importazol の投与を抗 DR5 抗体治療と併用することが、細胞死抵抗性の癌に対して非常に強力な腫瘍治療効果を発揮できることを報告した¹⁴。

(3) TRAIL 感受性のマウス乳癌細胞 4T1 は、TRAIL や抗 DR5 抗体による細胞死誘導治療時にも骨転移を起こす場合がある。骨組織内での癌細胞と宿主細胞間のクロストークが骨転移を制御している可能性を示唆する結果を得たため、骨転移に関する研究を行った。その結果、転移の初期に起こる炎症の

場では、骨芽細胞が Th2 や Th17 の反応に関与する Thymic stroma lymphopoietin (TSLP)を産生し、この TSLP が receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)の刺激 を受けて起きるマクロファージから破骨細胞への分化を抑制する事を見出した。これは、乳癌細胞の転移が骨芽細胞および破骨細胞の機能および分化に関与する可能性を示しており、この機構の解析や骨転移初期の炎症の制御が骨転移の制御に繋がる可能性を示している¹⁵。

<引用文献>

- ¹ Schreiber, R.D. et al. Science 2011;331:1565-1570.
- ² Landsberg, J. et al. Nature 2012;490:412-416.
- ³ Wolchok, J.D. et al. Nature 2014;515:496-498.
- ⁴ Davoli, T. et al. Science 2017;355:eaaf8399.
- ⁵ Zanetti, M. Science. 2017;355:249-250.
- ⁶ Roh, W. et al. Sci. Trans. Med. 2017;9:eaah3560.
- ⁷ Takeda, K. et al. Nat. Comm. 2017;8:14607.
- ⁸ Swanton, C. et al. Cancer Discov. 2015;5:704-712.
- ⁹ Uno, T. et al. Nat. Med. 2006;6:693-698.
- ¹⁰ Li, X. Y. et al. J. Clin. Invest. 2018;128: 2613-2625.
- ¹¹ Takeda, K. et al. Nat. Med. 2001;7:94-100.
- ¹² Smyth, M.J. et al. J. Exp. Med. 2001;193 :661-670.
- ¹³ Takeda, K. et al. J. Exp. Med. 2002;195:161-169.
- ¹⁴ Kojima, Y. et al. Mol. Cancer Ther. 2020;19:1123-1133
- ¹⁵ Ohno, T. et al. Biochem. Bioph. Res. Co. 2020;530:508-512.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mittal, D., Lepletier, A., Madore, J., Aguilera, A. R., Stannard, K., Blake, S. J., Whitehall, V. J. L., Liu, C., Bettington, M. L., Takeda, K., Long, G. V., Scolyer, R. A., Lan, R., Siemers, N., Korman, A., Teng, M. W. L., Johnston, R. J., Dougall, W. C., and Smyth, M. J.	4. 巻 7
2. 論文標題 CD96 is immune checkpoint that regulated CD8+ T-cell antitumor function.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Immunol. Res.	6. 最初と最後の頁 559-571
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-18-0637	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takeda, K., and Okumura, K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Effect of oral consumption of Panax ginseng aqueous extract on natural killer cell cytotoxicity in human.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pers. Medi. Univers.	6. 最初と最後の頁 20-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pmu.2018.09.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumura, Y., Ito, Y., Mezawa, Y., Sulidan, K., Daigo, Y., Hiraga, T., Mogushi, K., Wali, N., Polanska, U., Suzuki, H., Itoh, T., Miyagi, Y., Yokose, T., Shimizu, S., Takano, A., Terao, Y., Saeki, H., Ozawa, M., Abe, M., Takeda, S., Okumura, K., Habu, S., Hino, O., Takeda, K., Hamada, M., and Orimo, A.	4. 巻 2
2. 論文標題 Stromal fibroblasts induce metastatic tumor cell clusters via epithelial-mesenchymal plasticity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Sci. Alliance	6. 最初と最後の頁 e201900425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.201900425	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yasuda, T., Nishiki, K., Hiraki, Y., Kato, H., Iwama, M., Shiraishi, O., Yasuda, A., Shinkai, M., Kimura, Y., Sukegawa, Y., Chiba, Y., Imano, M., Takeda, T., Satou, T., Shiozaki, H., and Nakamura, Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Phase II adjuvant cancer-specific vaccine therapy for esophageal cancer patients curatively resected after preoperative therapy with pathologically positive nodes; possible significance of tumor immune microenvironment in its clinical effects.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000003880	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kojima, Y., Nishina, T., Nakano, H., Okumura, K., and Takeda, K.	4. 巻 19
2. 論文標題 Inhibition of Importin 1 Augments the Anticancer Effect of Agonistic Anti-Death Receptor 5 Antibody in TRAIL-resistant Tumor Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol. Cancer Ther.	6. 最初と最後の頁 1123-1133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-19-0597	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takeda, K., Kitaura, K., Suzuki, R., Owada, Y., Muto, S., Okabe, N., Hasegawa, T., Osugi, J., Hoshino, M., Tsunoda, T., Okumura, K., and Suzuki, H.	4. 巻 67
2. 論文標題 Quantitative T cell repertoire analysis of peripheral blood mononuclear cells from lung cancer patients following long-term cancer peptide vaccination.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Immunol. Immunother.	6. 最初と最後の頁 946-964
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-018-2152-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Li, X. Y., Das, I., Lepletier, A., Addala, V., Bald, T., Stannard, K., Barkauskas, D, Liu, J., Aguilera A. R., Takeda, K., Braun, M., Nakamura, K., Jacquelin, S., Steven W. Lane, S. W., Teng, M. W. L., Dougal, W. C., and Smyth, M. J.	4. 巻 128
2. 論文標題 CD155 loss enhances tumor suppression via combined host and tumor-intrinsic mechanisms.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Clin. Invest.	6. 最初と最後の頁 2613-2625
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI98769.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yan, J., Allen, S., Vijayan, D., Li, X. Y., Harjunpaa, H., Takeda, K., Liu, J., Cua, D. J., Smyth, M. J., and Teng, M. W. L.	4. 巻 6
2. 論文標題 Experimental lung metastases in mice are more effectively inhibited by blockade of IL-23R than IL-23.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Immunol. Res.	6. 最初と最後の頁 978-987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-18-0011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ohno, T., Nakamura, T., Nakae, S., Morita, H., Matsumoto, K., Takeda, K., Okumura, K., and Azuma, T.	4. 巻 530
2. 論文標題 TSLP is a negative regulator of RANKL-induced osteoclastogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem. Bioph. Res. Co.	6. 最初と最後の頁 508-512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yin, E., Fukuhara, T., Takeda, K., Kojima, Y., Fukuhara, K., Ikejima, K., Bashuda, H., Kitaura, J., Yagita, H., Okumura, K., and Uchida, K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Anti-CD321 antibody immunotherapy protects liver against ischemia and reperfusion-induced injury.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85001-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 鈴木正敏、竹田和由、Shek, P. N., Shephard, R. J., 奥村康
2. 発表標題 Mobilization and Fc γ -Receptor Expression of Six Cell Subsets, During and After Acute Exercise. American College of Sports Medicine
3. 学会等名 the 66th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 折茂彰、伊藤恭彦、目澤義弘、醍醐弥太郎、樋野興夫、竹田和由、浜田道昭、松村優子
2. 発表標題 CAF-induced partial epithelial-mesenchymal transition mediated formation of metastatic human breast cancer clusters.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小島裕子、仁科隆史、中野裕康、奥村康、竹田和由
2. 発表標題 Importin 1 inhibition augments anticancer effect of anti-DR5 agonistic antibody in TRAIL resistant tumor cells.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川鍋（松田）啓誠、中村真梨枝、竹田和由、狩野宏、奥村康
2. 発表標題 大腸癌モデルにおいてL.bulgaricus OLL1073R-1の菌体外多糖がもたらすCTLA-4阻害治療の効果増強と腫瘍浸潤T細胞解析
3. 学会等名 第32回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 折茂彰、伊藤恭彦、目澤義弘、Kaidiliavi Sulidan、醍醐弥太郎、Nadia Wali、樋野興夫、竹田和由、浜田道昭、松村優子
2. 発表標題 CAFs induce formation of metastatic human breast tumor cell clusters with partial epithelial-mesenchymal transition
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤恭彦、松村優子、目澤義弘、ソリタン カディア、ワリ ナディラ、寺尾保久、竹田省、奥村康、竹田和由、樋野興夫、折茂彰
2. 発表標題 Activation of Src signaling mediates carcinoma-associated fibroblast-promoted metastasis in human breast cancers
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安田卓司、錦耕平、平木洋子、加藤寛章、白石治、安田篤、新海政幸、木村豊、助川寧、千葉康敬、今野元博、竹田和由、佐藤隆夫、塩崎均、中村祐輔
2. 発表標題 Phase II adjuvant peptide vaccine for postoperative esophageal cancer patients with pathologically positive nodes
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	鈴木 隆二 (SUZUKI RYUJI) (70373470)	独立行政法人国立病院機構（相模原病院臨床研究センター）・診断・治療研究室・室長 (82710)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オーストラリア	QIMR Berghofer Medical Research Inst.	University of Queensland		
フランス	Institut Pasteur			