

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07970

研究課題名（和文）マイクロRNAを用いた複合癌免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of miRNA-based immunotherapy in cancer

研究代表者

西田 尚弘（Naohiro, Nishida）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50588118

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：腫瘍免疫は、癌の進展において重要な役割を持つことがわかっている。本研究では、現行の免疫治療の治療効果を向上させるために、腫瘍免疫に重要な役割を果たすマイクロRNAの同定と、その機能の解析を行った。大腸癌細胞株の実験と大規模オープンデータベースの解析から、間質においてがん免疫を抑制し、癌進展に関わるマイクロRNA、ならびに遺伝子候補群の同定に成功、これらが癌組織で高発現していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、腫瘍免疫に重要な役割を果たすマイクロRNAの同定と、その機能の解析を行った。大腸癌細胞株の実験と大規模オープンデータベースの解析から、間質においてがん免疫を抑制し、癌進展に関わるマイクロRNA、ならびに遺伝子候補群の同定に成功、これらが癌組織で高発現していることを確認した。現行の免疫チェックポイント阻害剤をはじめとする免疫治療に加えて、今回同定した分子を抑制することは、今後の大腸癌治療戦略において、重要な選択肢となり得る。

研究成果の概要（英文）：Immune escape is a key feature of cancer survival and progression. In our study, we aimed to identify microRNAs that plays a key role in inhibiting the tumor immunity and contribute to cancer progression. We successfully discovered microRNAs and genes that strongly overexpressed in cancer stromal tissues and confirmed that these molecules functions as crucial inhibitors of tumor immune system. Combinational use of inhibitors to these molecules and conventional immunotherapy could be a promising treatment strategy in colorectal cancer.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 免疫治療 マイクロRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年注目されている複合癌免疫療法は、免疫治療に抗癌剤や分子標的治療薬を併用することで、免疫療法の感受性増加を目指すもので、世界中で数多くの治験が進行している。しかしながら、その多くは、免疫治療に抗癌作用を有する既存薬を組み合わせたものが主流で、必ずしも作用メカニズムに裏打ちされたものが多いとは言えない。われわれが研究を続けてきたマイクロ RNA は、癌細胞・免疫細胞それぞれの形質変化に深く関わるだけでなく、細胞外小胞(エクソソーム)を担体として細胞外に移動し、癌微小環境の構築に重要な役割を果たす。具体的には、癌細胞においては PD-L1 を始めとする免疫疲弊シグナルの増強や抗原提示の抑制、免疫細胞(細胞障害性 T 細胞や樹状細胞)では不活化や分化抑制、炎症性サイトカインの分泌抑制などに働く。また癌細胞から分泌されたマイクロ RNA は、レシピエントである宿主側の遺伝子発現変化を誘導し、免疫応答に大きな影響を与えることが知られている(Okoye et al. Immunity 2014 他)。さらに、樹状細胞に発現する Toll-Like Receptor 8 (TLR8)は、1 本鎖/2 本鎖 RNA を広く認識、外来ウイルスの排除に効果的に作用するが、TLR8 は癌細胞が分泌するマイクロ RNA をも認識し免疫機構の調整に関わることがわかってきた(Fabrizi et al. PNAS 2012)。これらの知見は、マイクロ RNA が癌を排除しようとする免疫の抑制に深く関わっていることを示している。免疫チェックポイント阻害剤に不応性の症例に対して、特定のマイクロ RNA の発現を誘導または抑制するという戦略は、耐性克服への重要なアプローチとなるかもしれない。癌免疫複合治療の治験は世界中で進行しているが、マイクロ RNA を併用するアプローチに関しては、まだ十分な検討がなされていない。核酸医薬品としてのマイクロ RNA は、すでに他用途では臨床試験が多数進行しており、人への投与した場合の安定性・安全性を示すデータが豊富に蓄積されている。安全面に関しては個々のマイクロ RNA に対して検証が必要ではあるものの、現行の免疫複合治療の主流である小分子化合物や抗体医薬と比して、臨床試験までの開発期間が大幅に短縮できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

ニボルマブ(オプジーボ®)を始めとする免疫チェックポイント阻害剤はこれまでほとんど治療効果の期待出来なかった転移性癌の消退・維持を可能にし、癌治療に革新をもたらした。しかしながら、この治療が奏効する症例は、全体の 15~30%に過ぎず、残りのノンレスポンドーをいかに救済するかが、大きな課題となっている。非レスポンドーにとっては、他の治療の機会を逸するのみならず、高額な薬価は医療経済的にも問題である。感受性予測のためのバイオマーカーの開発と同時に、本治療の効果増強のためのアプローチが急務であると考えた。またマイクロ RNA は、癌細胞の悪性形質に関わるのみならず、間質に分泌され免疫系にも大きな影響を及ぼすことから、複合免疫療法の標的として最適と考えた。本研究では、癌微小環境の構築に重要な役割を果たすマイクロ RNA に着目、培養細胞を用いて約 7000 のマイクロ RNA 遺伝子をターゲットとしたスクリーニングを行い、癌細胞の免疫回避に中心的な役割を果たすマイクロ RNA を同定する。これらを標的化し、免疫チェックポイント阻害剤との併用による複合癌免疫治療を行うことで、この治療に抵抗性だった集団への免疫チェックポイント阻害剤の適応拡大を目指す。

### 3. 研究の方法

効率的な進捗のために、研究の段階を 4 つに区切り、それぞれに関して目標を設定した。  
<PHASE 1> in vitro での網羅的スクリーニング(期間:平成 30 年度~平成 31 年度前半)  
目標)シンプルな in vitro 免疫アッセイ系を構築し、高精度スクリーニングを実現する。  
癌細胞と末梢血を用いた実験系では、内因性のサイトカイン等の影響により、再現性の高いデータが得られにくい可能性もあるため、可能な限り細胞株を用いた共培養の実験系を用いて行う。消化器癌細胞株(HCT116、HT29、DLD1 等)と、CD8 要請細胞としてレンチウイルスにより PD-1 を安定的に発現する Jurkat 細胞株、さらに免疫提示細胞として THP-1 細胞を共培養することで、擬似的な免疫微小環境を構築する。CRISPR/Cas9 ライブラリーに関しては、Human CRISPR Knockout Pooled Library (GeCKO v2) (Sanjana et al. Nat Methods. 2014) をカスタマイズして使用、1 細胞あたりに導入されるガイド RNA を 1 分子になるように最適化を行う。

<PHASE 2> 候補マイクロ RNA の機能解析(期間:平成 30 年度後半~平成 32 年度前半)  
目標)治療標的候補となるマイクロ RNA の機能を解明、癌微小環境へ与える影響を明確にする。  
候補マイクロ RNA の CRISPR/Cas9 を用いたノックアウト細胞株、レンチウイルスによる強制発現細胞株を作成、細胞内での浸潤能など形質変化に関わるターゲットの同定、並びに細胞外に分泌されるサイトカインの変化、T 細胞賦活化への影響を調べる。

<PHASE 3> In vivoでの抗腫瘍効果の検討(期間:平成31年度後半~平成32年度後半)  
目標)候補マイクロRNAの生体免疫環境における作用を明らかにする。  
以上で同定されたマイクロRNAに対し、B16やマウス結腸癌細胞株を用い、候補マイクロRNAのノックアウト並びに強制発現細胞株でC57BL/6Jマウスにxenograftを作成、マイクロRNA発現変化による抗腫瘍効果を観察、また抗PD1抗体・高PD-L1抗体との併用効果を明らかにする。  
<PHASE 4> 臨床検体でのProof of Conceptの取得(期間:平成32年度前半~後半)  
目標)臨床検体での各マイクロRNAの発現と、免疫治療感受性との関わりを明らかにする。  
大腸癌臨床検体を始めとする消化器癌の手術摘出サンプルから抽出したRNAを用いて、RT-PCRにより注目するマイクロRNAの発現と、治療感受性の関係を調べる。一部のサンプルではホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)並びに凍結切片を用いて、標的マイクロRNAのin situ hybridization (ISH)を行い、各マイクロRNAの発現由来が、癌細胞か、宿主側であるかを確認する。

#### 4. 研究成果

免疫治療の標的としてのマイクロRNAの重要性を示すため、癌間質に存在するマイクロRNAを同定することを目的とし、間質部の組織をlaser microdissectionにより分離、マイクロRNAを抽出し、正常部でのマイクロRNAと比較した網羅的解析を行った。以上から、がん間質において、免疫抑制を介して、癌進展に関わるマイクロRNAを同定することに成功した。これまでにin vitroの実験とThe Cancer Genome Atlas (TCGA)をはじめとするデータベースの解析から、間質においてがん免疫に関わるマイクロRNA、ならびに遺伝子候補群の同定に成功している。次にこれらの分子が、癌に発現することによって、腫瘍免疫にどのような影響を果たしているのかを調べたところ、これらの候補分子は免疫疲弊シグナルの増強や抗原提示の抑制、免疫細胞(細胞障害性T細胞や樹状細胞)では不活化や分化抑制、炎症性サイトカインの分泌抑制などに重要な役割を有することが分かってきた。腫瘍免疫が高度に活性化されているMSI陽性大腸癌に着目し、これらで発現が亢進する分子に着目し、これらが細胞の遊走能や薬剤耐性など癌細胞の悪性形質にどのように関わるかを明らかにした。また注目した分子に対して、大腸癌臨床サンプルを用いた免疫組織化学染色を行ったところ、これらの分子は、癌組織において有意に高発現し、その発現は、特に浸潤性の高い腫瘍先進部で亢進していることが示された。これらの知見は、免疫チェックポイント阻害剤との併用による複合癌免疫治療の開発に向けた重要な足がかりとなる。

#### <引用文献>

Immunity.2014 Jul 17;41(1):89-103. doi: 10.1016/j.immuni.2014.05.019.  
MicroRNA-containing T-regulatory-cell-derived exosomes suppress pathogenic T helper 1 cells.  
Isobel S Okoye 1, Stephanie M Coomes 1, Victoria S Pelly 1, Stephanie Czieso 1, Venizelos Papayannopoulos 1, Tanya Tolmachova 2, Miguel C Seabra 2, Mark S Wilson 3  
Proc Natl Acad Sci U S A.2012 Jul 31;109(31):E2110-6. doi: 10.1073/pnas.1209414109. Epub 2012 Jul 2.  
MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response  
Muller Fabbri 1, Alessio Paone, Federica Calore, Roberta Galli, Eugenio Gaudio, Ramasamy Santhanam, Francesca Lovat, Paolo Fadda, Charlene Mao, Gerard J Nuovo, Nicola Zanesi, Melissa Crawford, Gulcin H Ozer, Dorothee Wernicke, Hansjuerg Alder, Michael A Caligiuri, Patrick Nana-Sinkam, Danilo Perrotti, Carlo M Croce

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hokonohara K, Nishida N, Miyoshi N, Takahashi H, Haraguchi N, Hata T, Matsuda C, Mizushima T, Doki Y, Mori M.	4. 巻 54
2. 論文標題 Involvement of MAF1 homolog, negative regulator of RNA polymerase III in colorectal cancer progression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1001-1009
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 M, Koseki J, Takahashi H, Miyoshi N, Nishida N, Nishimura J, Hata T, Matsuda C, Mizushima T, Yamamoto H, Ishii H, Doki Y, Mori M, Haraguchi N.	4. 巻 79
2. 論文標題 Disruption of Endolysosomal RAB5/7 Efficiently Eliminates Colorectal Cancer Stem Cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Res	6. 最初と最後の頁 1426-1437
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Hokonohara K, Nishida N, Miyoshi N, Takahashi H, Haraguchi N, Hata T, Matsuda C, Mizushima T, Doki Y, Mori M.	4. 巻 54
2. 論文標題 Involvement of MAF1 homolog, negative regulator of RNA polymerase III in colorectal cancer progression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1001-1009
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2019.4678.	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ryohei Yukimoto, Naohiro Nishida, Shiki Fujino, Takayuki Ogino, Hidekazu Takahashi, Norikatsu Miyoshi, Mamoru Uemura, Chu Matsuda, Tsunekazu Mizushima, Hirofumi Yamamoto, Koshi Mimori, Masaki mori, Yuichiro Doki
2. 発表標題 MiR-125b expression is associated with colorectal cancer prognosis through regulation of TP53
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryohei Yukimoto, Naohiro Nishida, Shiki Fujino, Takayuki Ogino, Hidekazu Takahashi, Norikatsu Miyoshi, mamoru Uemura, Chu Matsuda, Tsunekazu Mizushima, Hirofumi Yamamoto, Koshi Mimori, Masaki mori, Yuichiro Doki
2. 発表標題 miRNAs in cancer stroma are associated with colorectal cancer progression
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西田尚弘
2. 発表標題 Sequential expression of epithelial to mesenchymal transition related genes in cancer epithelium and stroma
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naohiro Nishida, Satoshi Ishikawa, Daisuke Sakai, Toshifumi Yamaguchi, Shiki Fujino, Takayuki Ogino, Norikatsu Miyoshi, Hidekazu Takahashi, Mamoru Uemura, Tsunekazu Mizushima, Taroh Satoh, Masaki Mori, Hidetoshi Eguchi, Yuichiro Doki
2. 発表標題 Identification of novel EMT regulators in colorectal cancer
3. 学会等名 日本癌学会
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
研究分担者	水島 恒和  (Mizushima Tsunekazu)  (00527707)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授   (14401)	

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
---------	---------