

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15179

研究課題名（和文）がん微小環境を制御する新規自己由来免疫調節分子の同定

研究課題名（英文）Identification of self-derived molecules that orchestrate tumor microenvironment

研究代表者

半谷 匠（Hangai, Sho）

東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教

研究者番号：50785350

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：申請者が同定した、新規Damage-associated molecular pattern (DAMP) が腫瘍微小環境 (tumor microenvironment; TME) を制御し、がん増殖を促進するメカニズムを同定した。一連の解析により、新規DAMPは自然免疫受容体であるToll-like receptor 2 (TLR2) を介してCXCL1ケモカインを誘導することを明らかにした。さらに、このCXCL1が強力な免疫抑制活性をもつ骨髄由来免疫抑制細胞をTMEにリクルートし、抗腫瘍免疫応答を抑制することで、がん増殖を促進することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりがん細胞より放出される新規DAMPが、TMEを制御しがん増殖を促進するメカニズムの概要が明らかになった。申請者は新規DAMPが、CXCL1/2を誘導し、MDSCを誘導することで抗腫瘍免疫応答を抑制し、がん増殖を促進することを明らかにした。また、ヒト検体の解析により、ヒトにおいても新規DAMPがTME制御によりがん進展を促進している可能性が示唆された。本研究は近年進展が著しい、自己由来分子によるTME制御メカニズムに新たな視点を提供したものと考えられる。今後、新規DAMP中和抗体の抗腫瘍効果の検討を進めることで、新規DAMPの治療標的としての役割が明らかになることが期待される

研究成果の概要（英文）：We have identified a mechanism by which a novel damage-associated molecular pattern (DAMP), identified by the applicant, regulates the tumor microenvironment (TME) and promotes cancer growth. Through a series of analyses, we found that the novel DAMP induces CXCL1 chemokines via the innate immune receptor Toll-like receptor 2 (TLR2). Furthermore, we found that CXCL1 in turn recruits myeloid-derived suppressor cells, which have potent immunosuppressive activity, to the TME and suppresses the anti-tumor immune response thereby promoting tumor growth.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：がん微小環境 DAMPs 骨髄由来免疫抑制細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、がんの増殖を制御する重要な因子として、がん微小環境 (Tumor microenvironment; TME) が注目されている (Nat. Immunol.; 10: 1014-22, 2013)。がん周囲の微小環境において、サイトカインや種々の増殖因子などにより、抗腫瘍免疫応答抑制や、血管新生の促進など、がんの増殖、転移に有利な環境がもたらされる。TME においては、多様な免疫細胞が癌の増殖に寄与しているが、中でも、骨髄由来免疫抑制細胞 (Myeloid derived suppressor cells; MDSCs) と呼ばれる、骨髄由来の未熟な骨髄球系細胞集団は、IL-10、TGF- $\beta$  などの免疫抑制性サイトカインや PD-L1 などの免疫チェックポイント分子を発現することで、T 細胞や NK 細胞による抗腫瘍免疫応答を強力に抑制することが知られている。

一方、細胞障害関連分子 (Damage-associated molecular patterns; DAMPs) は傷害を受けた細胞や死細胞から放出される自己由来分子群であり、Toll-like receptors (TLRs) などの自然免疫受容体の活性化により、炎症反応や免疫応答を惹起する作用があることが知られている。がん内部では恒常的に細胞死が起こっており、大量の DAMPs が、がん内部あるいは周囲に放出されていると考えられている。したがって、がん細胞から放出される DAMPs は、炎症・免疫反応の調節を通じて、TME に影響を及ぼし、腫瘍の促進あるいは排除に寄与するのではないかと考えられており注目を集めている (Krysko DV et al., Nat. Rev. Cancer, 12:860-75, 2012)。実際、DAMPs の代表例として知られている High-mobility group box 1 (HMGB1) は、傷害を受けたメラノーマ細胞から放出され、TLR4 を介した炎症反応、血管新生の促進により、転移を亢進させることが知られている (Nature ;507(7490):109-13, 2014)。

このように TME および DAMPs はがん増殖に対して重要な役割を果たしていると考えられているが、DAMPs による TME の制御、およびそれが腫瘍増殖に与える影響について、全貌は明らかになっていない。特に TME において中心的な役割を果たす MDSCs を制御する DAMPs の存在は全く不明である。申請者は、がん死細胞から放出される新規 DAMPs の候補分子を同定した。これを端緒とし、がん病態を増悪させる DAMPs の解析を行う。

### 2. 研究の目的

本研究は、MDSCs のリクルートを介して、がん病態を増悪させる DAMPs 分子の同定、機能解析を行う。申請者はこれまで死細胞から放出され、炎症性サイトカインを免疫細胞に誘導する分子のスクリーニングを行った。SL4 細胞 (マウス大腸癌由来細胞株) に対し、代表的な細胞死であるネクローシスを起こし、その際放出される分子をイオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーを用いて分画した。この分画のうち、免疫細胞に炎症性サイトカインを誘導するものに対し、質量分析を行うと、複数の候補分子が得られた。申請者はこれら候補分子のうち、分子量 20kDa 程度と比較的小さいひとつの分子に着目した。CRISPR/Cas9 システムにより、この分子を欠損した SL4 細胞を作成したところ、*in vitro* においてはその増殖に変化がないものの、*in vivo* の皮下増殖モデルにおいては欠損 SL4 細胞において、顕著な増殖遅延が認められた。また、腫瘍内に浸潤する免疫細胞を flow cytometry によって解析したところ、抗腫瘍免疫応答を抑制し、がんを増悪させることが知られている多形核細胞系 MDSCs (polymorphonuclear MDSC; PMN-MDSC) の顕著な減少が見られた。これはこの新規 DAMP が、細胞外に放出される DAMPs としてその周囲環境、すなわち TME に対し何等かの影響を及ぼし、MDSCs を動員することでがんを増悪させることを示唆している。

本研究ではこれらの知見に基づき、この新規 DAMP による、TME を介したがん増殖促進メカニズムについて解明を行う。DAMPs による TME、特に MDSCs の制御、およびがん増殖との関係については殆ど分かっておらず、本研究は高い学術的独自性、創造性を有すると考えられる。また、本研究ではこの新規 DAMP を標的とした、悪性腫瘍の治療法開発にもチャレンジする。DAMPs をターゲットとし、TME の修飾を行うような治療法はこれまで実現しておらず、本研究は極めて高い学術的独自性を有すると言える。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新規 DAMP が TME を介し、がん病態を促進するメカニズムの検討

まず新規 DAMP が実際に MDSCs の動員を通じて腫瘍の促進をするか否か確認するため、MDSCs を *in vivo* において、抗 Gr-1 抗体あるいは抗 Ly-6G 抗体などを用いて除去した際に、新規 DAMP 欠損によるがん増殖の減弱が消失するかどうか、検討する。MDSCs の関与が明らかとなった場合、MDSCs 動員促進のメカニズムについて検討する。主に下記 3 つの可能性を念頭に置き、解析を行う。細胞外に放出された新規 DAMP が MDSCs の遊走を直接促進するか否か、新規 DAMP の遺伝子組み換え体を用いて検討する。具体的には腫瘍内より MDSCs を調製し、transwell を用いた migration assay を行い、新規 DAMP の遺伝子組み換え体が MDSCs の遊走活性を有するかどうか、検討する。これが見られなかった場合、新規 DAMP 欠損 SL4 細胞から放出される液性因子が MDSCs の誘導を活性化するか否か、同様に migration assay を行い、評価する。また、新規 DAMP が TME を構成する MDSCs 以外の細胞に作用し、ケモカインなどの遺伝子誘導を介して MDSCs の遊走を行う可能性もあるため、マクロファージなどの細胞に新規 DAMP の遺伝子組み換え体を作用させた際の遺伝子発現変化を検討する。新規 DAMP の MDSCs に対する機能が ~ のいずれ

かであるか判明した場合、新規 DAMP がどの受容体を介してその機能を発揮するかどうか、解析を行う。DAMPs は Toll like receptors (TLRs) や RIG-I like receptors (RLRs) などの自然免疫受容体を介してシグナル伝達を行うことが多い。当研究室はこうした自然免疫受容体のシグナル伝達に必須のアダプター分子の遺伝子欠損マウスを多数有しており、これらのマウス由来の細胞を使用した場合に、新規 DAMP の作用が見られなくなるかどうか検討する。これらの検討を行い、新規 DAMP ががん病態を促進するメカニズムの解析を行う。MDSCs の関与が明らかでなかった場合、免疫細胞以外の TME を構成する要素、すなわち新生血管などの異常の有無を病理組織学的に検討し、標的細胞を同定する。この場合においても、～と同様、新規 DAMP が直接、あるいは他の免疫細胞や液性因子を介して標的細胞に作用するか否かの検討を行う。

#### (2) 新規 DAMP をターゲットとした治療法の開発

新規 DAMP はタンパク質であるため、中和抗体の作製を行う。まず、新規 DAMP の MDSCs に対する作用が、中和抗体で減弱するか検討する。新規 DAMP に対する中和作用が認められた場合、これが *in vivo* における腫瘍病態の改善を行うかどうか検討する。これらの解析により、TME に働きかけ、がん病態を増悪させる新規 DAMP の機能を明らかにし、その治療応用の可能性を検討する。

### 4. 研究成果

本研究では新規 DAMP が、TME の制御を介して腫瘍増殖を促進するメカニズムおよびの治療標的としての可能性を検討した。

#### (1) 新規 DAMP が TME を介し、腫瘍病態を促進するメカニズムの検討

まず新規 DAMP が実際に PMN-MDSCs の TME へのリクルートを通じて腫瘍の促進をするか否か確認するため、PMN-MDSCs を SL4 担癌マウスの脾臓および骨髄より採取し、SL4 細胞を皮下移植したマウスに養子的に移入した。PMN-MDSCs の養子移入により SL4 の皮下増殖は有意に亢進し、新規 DAMP が実際に PMN-MDSC のリクルートを通じて腫瘍増殖を促進することが示唆された。興味深いことに、皮下増殖した新規 DAMP の野生型 (WT) および欠損 (KO) SL4 腫瘍中のケモカイン濃度を測定すると、PMN-MDSC のリクルートを促進する代表的なケモカインである CXCL1、CXCL2 の濃度が新規 DAMP KO 腫瘍中で顕著に低下していた (図 1)。従って、新規 DAMP の MDSC 動員メカニズムは、「3. 研究の方法」で述べた の可能性が高いと考えられた。さらに、新規 DAMP の遺伝子組み換え体をマウス腹腔マクロファージに作用させると、顕著な CXCL1/2 誘導が見られた。従って新規 DAMP がこれらのケモカイン誘導を行い、PMN-MDSCs の TME へのリクルートを促進している可能性が示唆された。

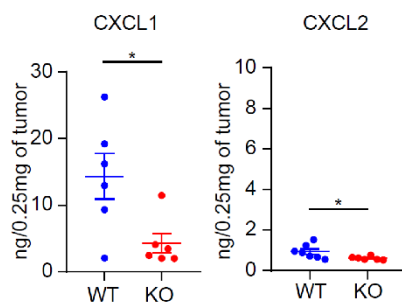


図1 新規DAMP WTあるいはKO SL4 cellを C57BL/6マウスに皮下移植し、21日後に腫瘍の溶解液を採取した。溶解液中のCXCL1/2濃度をELISA法で測定した。

次に新規 DAMP がどの受容体を介してケモカイン誘導を行うか、検討した。DAMPs は Toll like receptors (TLRs) や RIG-I like receptors (RLRs) などの自然免疫受容体を介してシグナル伝達を行うことが多い。そこで、まずこれらの受容体のシグナル伝達に必須のアダプター分子の遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージに新規 DAMP の遺伝子組み換え体を作用させ、CXCL1 の遺伝子誘導を測定した。興味深いことに、TLRs の主要なアダプター分子である MyD88 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージにおいては新規 DAMP による CXCL1 の遺伝子誘導が全く見られなかった。TLRs のうち、TLR2 および TLR4 は DAMP 分子、とくにタンパク質の DAMP 分子の主要な受容体である。そこで、TLR2 および TLR4 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージに新規 DAMP を作用させたと、TLR4 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージでは CXCL1 遺伝子誘導が野生型と同様に見られたのに対し、TLR2 遺伝子欠損マウス由来の腹腔マクロファージでは遺伝子誘導が全く見られなかった (図 2)。上記の結果により、新規 DAMP は TLR2 を介して CXCL1 遺伝子誘導を行っていることが示された。

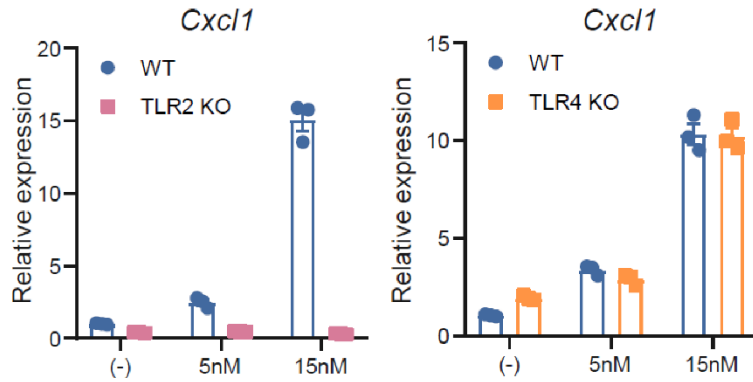


図2 野生型、およびTLR2あるいはTLR4遺伝子欠損マウスより腹腔内マクロファージを採取し、新規DAMPの遺伝子組み換え体で刺激した。2時間後、total RNAを採取し、RT-qPCR法でCxcl1 mRNAを定量した。

さらに新規 DAMP によるがん増殖促進作用が普遍的な事象であることを確認するため、B16F10、Meth-A 細胞といった SL4 細胞以外の代表的ながん細胞株に対して、新規 DAMP KO 細胞を作成し、マウス皮下における腫瘍増殖、また TME 中の免疫細胞の解析を行った。興味深いことに SL4 細胞と同様、いずれの細胞株でも新規 DAMP KO 細胞において腫瘍増殖の低下、また腫瘍中の PMNMDSC の低下が見られた。さらに、The Cancer Genome Atlas (TCGA) の大腸癌患者のデータセットにおいては 5 %程度の患者で新規 DAMP のコピー数の増加、および予後との負の相関がみられた。また、大腸癌組織切片において新規 DAMP および PMN-MDSC の免疫組織化学染色を行ったところ、正常大腸粘膜と比較して大腸癌組織で新規 DAMP タンパクの発現上昇、および PMN-MDSC 数との正の相関がみられた。

#### (2) 新規 DAMP をターゲットとした治療法の開発

新規 DAMP の治療標的としての可能性を検討するため、新規 DAMP 中和抗体の作製を行った。Human の新規 DAMP のペプチドを BALB/c マウスに免疫し、ハイブリドーマを作成した。ウェスタンブロッティング、および免疫沈降法でのスクリーニングにより、新規 DAMP を認識し、また免疫沈降能を持つ複数の抗体クローンを得ることが出来た。今後、これらのクローンの *in vivo* における抗腫瘍活性を検討していく予定である。

本研究によりがん細胞より放出される新規 DAMP が、TME を制御し、腫瘍増殖を促進するメカニズムの概要が明らかになった。申請者は、新規 DAMP が、がん細胞より放出され、TME 中で CXCL1/2 を誘導し、PMN-MDSC を誘導することで抗腫瘍免疫応答を抑制し、腫瘍増殖を促進することを明らかにした。また、TCGA データセットや大腸癌組織切片の免疫染色により、ヒトにおいても新規 DAMP が TME 制御によるがん進展を促進している可能性が示唆された。本研究は近年進展が著しい、自己由来分子による TME 制御メカニズムに新たな視点を提供したものと考えられる。今後、新規 DAMP 中和抗体の抗腫瘍効果の検討を進めることで、新規 DAMP の治療標的としての役割が明らかになることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Eto Shotaro, Yanai Hideyuki, Hangai Sho, Kato Daiki, Nishimura Ryohei, Nakagawa Takayuki	4. 巻 11
2. 論文標題 The impact of damage-associated molecules released from canine tumor cells on gene expression in macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8525
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-87979-1	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 Hangai Sho, Kimura Yoshitaka, Taniguchi Tadatsugu, Yanai Hideyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Signal transducing innate receptors in tumor immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	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) 10.1111/cas.14848	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 Senda Naoyuki, Yanai Hideyuki, Hibino Sana, Li Lei, Mizushima Yu, Miyagaki Tomomitsu, Saeki Mai, Kishi Yusuke, Hangai Sho, Nishio Junko, Sugaya Makoto, Taniguchi Tadatsugu, Sato Shinichi	4. 巻 118
2. 論文標題 HMGB1-mediated chromatin remodeling attenuates IL24 gene expression for the protection from allergic contact dermatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	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) 10.1073/pnas.2022343118	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 Negishi H, Endo N, Nakajima, Nishiyama T, Tabunoki Y, Nishio J, Koshiba R, Matsuda A, Matsuki K, Okamura T, Negishi-Koga T, Ichinohe T, Takemura S, Ishiwata H, Iemura S, Natsume T, Abe T, Kiyonari H, Doi T, Hangai S, Yanai H, Fujio K, Yamamoto K, Taniguchi T	4. 巻 116
2. 論文標題 Identification of U11snRNA as an endogenous agonist of TLR7-mediated immune pathogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 23653 ~ 23661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1915326116	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 Yanai Hideyuki, Chiba Shiho, Hangai Sho, Kometani Kohei, Inoue Asuka, Kimura Yoshitaka, Abe Takaya, Kiyonari Hiroshi, Nishio Junko, Taguchi-Atarashi Naoko, Mizushima Yu, Negishi Hideo, Grosschedl Rudolf, Taniguchi Tadatsugu	4. 巻 115
2. 論文標題 Revisiting the role of IRF3 in inflammation and immunity by conditional and specifically targeted gene ablation in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 5253 ~ 5258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1803936115	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 Kimura Yoshitaka, Negishi Hideo, Matsuda Atsushi, Endo Nobuyasu, Hangai Sho, Inoue Asuka, Nishio Junko, Taniguchi Tadatsugu, Yanai Hideyuki	4. 巻 109
2. 論文標題 Novel chemical compound SINCRO with dual function in STING-type I interferon and tumor cell death pathways	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2687 ~ 2696
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13726	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 半谷 匠
2. 発表標題 Role HMGB1 in regulation of stem cell homeostasis
3. 学会等名 第48回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sho Hangai, Hideyuki Yanai, Tadatsugu Taniguchi
2. 発表標題 PROSTAGLANDIN E2 IS AN INHIBITORY DAMAGE ASSOCIATED MOLECULAR PATTERN WHICH CRITICALLY REGULATES STERILE INFLAMMATION-RELATED DISEASES INDUCED BY DEAD CELLS
3. 学会等名 Cytokines 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 がん免疫微小環境の調節物質およびそれによる予防・診断・治療的利用	発明者 谷口維紹、半谷匠、 柳井秀元	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-147222	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

自然免疫応答を活性化する新たな自己RNAを同定 <a href="https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/release/20191105.html">https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/release/20191105.html</a>
--

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

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