

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：81303

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16433

研究課題名（和文）非小細胞肺がんの新たな免疫抑制メカニズム—Ex vivo系を用いた解明

研究課題名（英文）Exploring a novel mechanism for immune-suppression in non-small cell lung cancer

研究代表者

佐藤 卓（Sato, Taku）

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）・がん薬物療法研究部・共同研究員

研究者番号：90814541

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）：腫瘍細胞は、正常組織・細胞と比べ、大量のグルコースを取り込むが、それを完全には酸化しない傾向がある。同時に乳酸産生が高い。この特徴的な代謝形質はワールブルグ効果と呼ばれ、現象としては広く知られているが、その意義は未だ定まっていない。本研究では、ワールブルグ効果が腫瘍微小環境に及ぼす影響を解析し、腫瘍細胞に非自律的なワールブルグ効果のがん促進作用を明らかにすることを目的として、検討を行った。その結果、腫瘍細胞の代謝に、免疫系による自身への攻撃を和らげる作用があ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

今回得られた結果は、腫瘍ワールブルグ効果をターゲットする新規イムノセラピー開発への途を拓くとともに、自身に対する免疫寛容の誘導こそがワールブルグ効果が腫瘍にもたらす真のメリットであることを示唆している。腫瘍学分野にて長年の謎となっていたワールブルグ効果の真の意義解明の端緒となる成果を得るとともに、新規イムノセラピーの開発にも通じる重要な知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）： Many tumors including non-small cell lung cancer exhibit the Warburg effect, a metabolic state in which glucose oxidation is limited even in the presence of oxygen. However, the role(s) for the Warburg effect in carcinogenesis remains controversial. In this study, we asked potential mechanism in which the Warburg effect promotes tumor progression in non-cell-autonomous manner via reprogramming their microenvironment. Our results suggest that the Warburg effect-like metabolism of tumor cells mediates immune-suppression.

研究分野：呼吸器外科学、腫瘍学

キーワード：肺がん 代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害 (ICB: immune-checkpoint blockade) 療法の成功により、腫瘍免疫の賦活化で、扁平上皮がんを中心に、肺がんを治療できることが示された。しかし、i)ICB 不応答症例の方がむしろ多いこと、ii)耐性獲得がんの出現、などが課題である。いずれの場合でも、ICB によっても解除できない免疫寛容の状態に陥っていると想定されている。逆に言えば、チェックポイントタンパク (PD-1/PD-L1 など) 以外の免疫寛容メカニズムを明らかにできれば、それを標的とする新規イムノセラピーへの展開が望めるとともに、ICB との併用による相乗効果も期待できる。そのようなブレークスルーが、待望されている。

一方、研究代表者が属するグループは、がん代謝研究の分野で、数年来、世界的にも先導的な研究をすすめてきた。がんはグルコースを大量に取り込みつつ、それを乳酸へと、非効率的に代謝してしまう (ワールブルグ効果)。このような代謝特性は、現象としては広く知られつつ、その意義は未だ定まっておらず、当該分野における最重要の謎の 1 つとなっていた。最近我々が報告したように、実は、腫瘍細胞の自律的な増殖にとってワールブルグ効果はむしろ不利に働く。したがって、ワールブルグ効果に、もし腫瘍促進的な役割があるのなら、それは腫瘍細胞に非自律的なものだろうと思われた。この仮説に沿い、腫瘍細胞に非自律的なワールブルグ効果の意義について明らかにすべく、本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

研究代表者が開発した「マウスにて非小細胞肺がんを効率よく再現する新規 “ex vivo” システム」を活用し、ワールブルグ効果の非細胞自律的な意義の解明をおこなう。肺がんが免疫系の攻撃を回避する新規メカニズムを明らかにするとともに、がん代謝という普遍性の高い特性をターゲットして腫瘍免疫を賦活する “新規イムノセラピー” への展開に向け、その基礎となるデータを収集する。

## 3. 研究の方法

遺伝子改変によって、代謝ネットワークをワールブルグ型 (W 型) および反ワールブルグ効果型 (AW 型) の代謝特性をもたせたマウスモデルを作製した。採取したマウス肺を組織消化液にて処理し、血球細胞除去を行った。得られた細胞を培地に懸濁し、EGF および ROCK 阻害剤 Y27632 存在下のマトリゲル三次元培養により、肺上皮細胞を単離・増幅した。

肺上皮細胞に SV40 T 抗原および活性化変異型 Kras (KrasG12V) をレトロウイルスベクターを使って遺伝子導入し、薬剤選択 (puromycin) を行った。薬剤耐性細胞を形質転換肺上皮細胞として、以後の実験に供した。アログラフト実験では、細胞とマトリゲルの 1 : 1 混合液を作製してマウスへの皮下移植を行った

形質転換肺上皮細胞を移植して得られた腫瘍を採取し、RNA を精製して、バルク腫瘍の遺伝子発現解析 (RNA-seq 法) を行った。得られたデータをもとに、主成分解析や GO 解析、GSEA 解析を行った。また、腫瘍内に浸潤した非腫瘍細胞 (血球系細胞) について、フローサイトメトリーによって解析した。

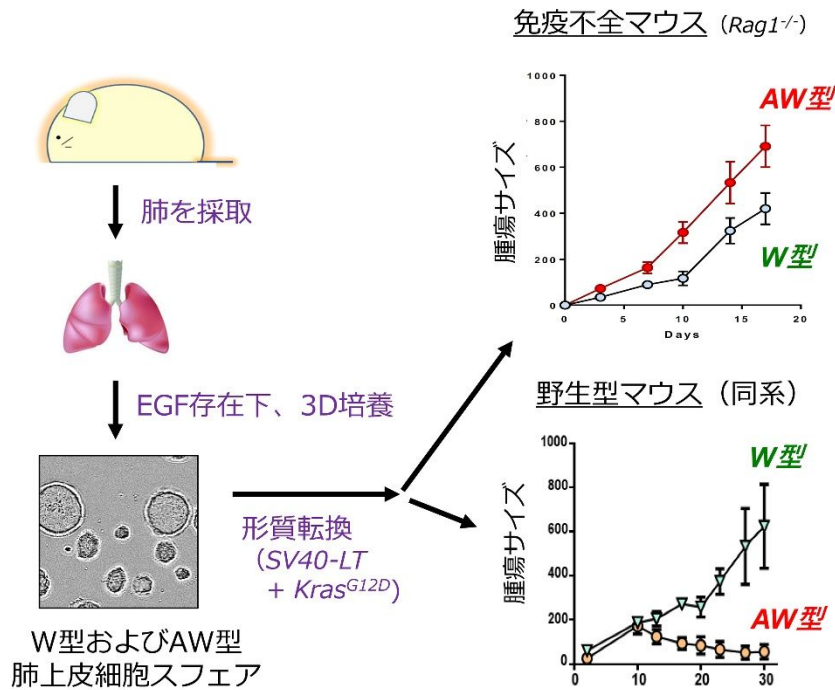
## 4. 研究成果

(1) 遺伝子改変によって作製したワールブルグ効果型 (以下、W 型) および反ワールブルグ効果型 (以下、AW 型) の肺上皮細胞 (形質転換済み) の移植実験を行った。細胞を免疫不全マウス (同系コンジェニックの Rag1 欠損 (Rag1-KO) マウス) に移植した場合、我々の以前の報告

に一致して、AW型肺上皮細胞の方が、W型細胞よりも、より早い腫瘍増大を示した。

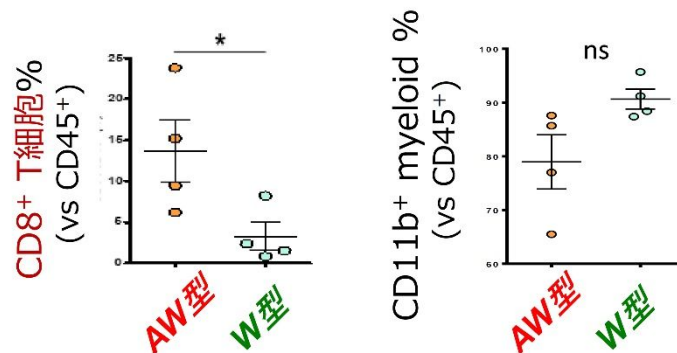
ところが、同様の移植実験を野生型シンジェニックマウスにて行ったところ、Rag1-KOの場合とは異なり、AW効果型肺上皮細胞に由来する腫瘍は、移植後しばらく（一週間程度）すると自然退縮を引き起こすことが分かった。

これら結果の比較から、ワールブルグ効果に、腫瘍細胞非自律的な腫瘍促進効果があることが示唆された。



(2) ワールブルグ効果の腫瘍細胞非自律的な腫瘍促進作用の詳細を探るため、W型およびAW型肺上皮細胞を野生型マウスに移植し、7日後の腫瘍を採取して遺伝子発現解析を行った。Nanostring解析およびRNA-seq解析のいずれにおいても、AW型肺上皮の腫瘍では、いくつかの腫瘍免疫促進的な遺伝子発現シグネチャーの亢進、および、上皮組織分化プログラムの減弱がみとめられた。

遺伝子発現解析の結果、AW型腫瘍細胞が、免疫系による攻撃を受け易くなっていることが示唆された。この点を確認するため、移植後7日目の腫瘍を単離し、フローサイトメトリーを行った(図2)。遺伝子発現解析の結果に対応するように、AW型腫瘍には、W型腫瘍と比べ、浸潤しているCD8陽性の細胞障害性T細胞が有意に多いことが分かった。一方、CD11b陽性ミエロイド細胞の数は、AW型腫瘍の方が若干多い傾向がみとめられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sato T, Morita M, Nomura M, Tanuma N	4. 巻 5
2. 論文標題 Revisiting glucose metabolism in cancer: lessons from a PKM knock-in model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Cell Oncol.	6. 最初と最後の頁 1472054
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----