

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H00498

研究課題名(和文) プロスタグランジンによる腫瘍免疫抑制：標的細胞とメカニズムの解明

研究課題名(英文) Prostaglandin-mediated cancer immunoevasion; identification of target cell populations and elucidation of their mechanisms

研究代表者

成宮 周 (Narumiya, Shuh)

京都大学・医学研究科・寄附講座教員

研究者番号：70144350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスLLC1腫瘍とヒト腫瘍の浸潤免疫細胞をscRNAseqで解析、腫瘍微小環境の免疫回避におけるPGE2-EP2/EP4受容体経路の役割を解析した。その結果、前者では、本経路が浸潤骨髓系細胞に働いて炎症、血管新生を活性化する一方で制御性T細胞を誘引、活性化して、炎症活性化と免疫抑制を両立させていることを見出した。更に、後者では、本経路が浸潤免疫細胞でc-Mycを抑制してリボソーム生成を阻害するとともに解糖経路とミトコンドリア電子伝達系の両方に働きエネルギー代謝を抑制していること、この結果、CD8+ T細胞の増幅、遊走、腫瘍殺傷活性を阻害して免疫抑制を発揮していることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は2つある。一つは、アスピリンなどのPG合成阻害薬の抗腫瘍作用のメカニズムをPGの腫瘍微小環境での作用から明らかにしたことである。これはアスピリンがどうして腫瘍死のリスクを軽減するかという永年の謎の一つの回答を与えたことになる。もう一つは、浸潤免疫細胞でのPGE2依存性のエネルギー代謝抑制を明らかにして、腫瘍微小環境には既知の免疫check pointや物理的バリアーに加えて、代謝バリアーという新しいバリアーが存在することを示したことである。社会的には、本研究は、現在実施されているEP2/EP4拮抗薬の抗腫瘍作用の臨床治験に理論的根拠を与え、促進すると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed immune cells infiltrating mouse LLC1 tumor as well as human tumors by scRNAseq and examined the roles prostaglandin E2 (PGE2)-EP2/EP4 signaling plays in immune evasion in tumor microenvironment (TME). In the former, we found that this signaling recruits and activates regulatory T cells in tumor, while the same signaling acts on myeloid cells to stimulate inflammation and angiogenesis, thus recapitulating the feature of TME, that is, the simultaneous presence of immune-evasion and inflammation. In the latter, we found that the PGE2-EP2/EP4 signaling impairs bioenergetics and ribosome biogenesis in various tumor-infiltrating immune cells by suppressing both glycolysis and mitochondrial respiration as well as c-Myc signaling, making, for example, CD8+ T cells ineffective in their expansion, migration and tumoricidal activity.

研究分野：薬理学、生化学

キーワード：prostaglandin E2 PGE receptor EP2 PGE receptor EP4 腫瘍微小環境 腫瘍浸潤骨髓系細胞 腫瘍浸潤T細胞 bioenergetics scRNAseq

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

がんの微小環境では、炎症と免疫抑制が同時に起こり、前者はがん細胞の増殖を助長、後者はがん細胞に対する免疫監視を回避し、相俟って腫瘍進展を促進する。抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-1 抗体などの免疫チェックポイント薬のある種のがんに対する目覚ましい治療効果は、改めて、がん細胞に対する免疫監視の重要性を認識させ、この強化によるがん治療のさらなる進展が期待されている。但し、現今の免疫チェックポイント薬は、有効性のあるがんでも奏効率が 30 %程度にとどまり、無効ながん種も多い。このことは、癌微小環境に免疫チェックポイント阻害薬の効果を阻害するメカニズム、また、免疫チェックポイント以外の免疫抑制メカニズムが存在することを示唆する。この中で我々が注目しているのがプロスタグランジン (PG) である。PG は、その産生酵素である COX-2 や PGE 合成酵素ががん組織で高発現しており、アスピリンなどの PG 合成阻害薬が大腸がんを始めとする様々ながんの発症、再発を抑制しがん死のリスクを低下させることから、癌の発症・進展で critical な作用を発揮しているとされている。しかし、PG のがんでの役割、とくに腫瘍微小環境での免疫回避における役割は不明のままである。

2. 研究の目的

上述のような背景下、本研究では、マウス移植腫瘍と手術時に得られるヒト腫瘍を用い、これらに浸潤する免疫細胞で腫瘍における主たる PG である PGE₂ とその受容体 EP2 と EP4 に関連する遺伝子発現を抽出、その因果関係を *in vitro* の系で解析することにより、PGE₂-EP2/EP4 経路が腫瘍微小環境で免疫回避に働くメカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス LLC1 腫瘍モデルを用い、担がんマウスを EP2/EP4 阻害薬で処理することにより、EP2/EP4 阻害が腫瘍増殖に与える効果を検定、同時に、採取した腫瘍より CD45+免疫細胞をソートし、これらを scRNAseq にかけることにより、各免疫細胞クラスターの遺伝子発現シグナチャーと EP2/EP4 阻害による増減を同定した。ついで、これから想定される各クラスターでの PGE₂ 作用を培養細胞などを用いて検証した。

(2) 手術時に得られたヒト腫瘍標本より CD45+免疫細胞をソートし、これらを scRNAseq にかけることにより、浸潤免疫細胞で EP2, EP4 発現に相関して発現が変動する遺伝子群を同定した。ついで、これらの因果関係と機能的意義をマウス実験腫瘍での EP2/EP4 選択的阻害薬による *intervention* 実験と浸潤免疫細胞の scRNAseq 解析、並びに、培養マウス・ヒト T 細胞及び骨髄細胞を用いた *in vitro* での PGE₂ 作用の解析で検証し、これらの結果を統合した。

4. 研究成果

本研究の成果はマウス LLC1 腫瘍モデルを用いて得た初期の研究の成果とヒト腫瘍の解析を基とし、これをマウスモデル、*in vitro* 実験で検証した後期の研究の成果に分かれるので以下順に記載する。

(1) マウス LLC1 腫瘍モデルを用いた研究成果。

本研究では、免疫チェックポイント阻害薬である抗 PD-1 抗体が無効な LLC1 肺がんの同種移植マウスモデルを用いて、EP2/4 阻害薬による抗腫瘍効果及びそのメカニズム解明を行った。まずは、LLC1 腫瘍に対して、EP2/EP4 阻害薬の投与が有意に腫瘍増大を抑制するこ

とを確認した。ついで、EP2、EP4 受容体のノックアウトマウスを用いて検討を行い、同様の腫瘍増大の抑制効果を観察した。その結果、EP2 及び EP4 の阻害はがん細胞そのものではなく、宿主由来の細胞を介して働いていることが示唆された。

上記のメカニズムを調べるために、LLC1 担がんマウスに対して EP2/EP4 阻害薬投与を行い、腫瘍を摘出し、宿主由来の CD45+ 腫瘍浸潤免疫細胞を FACS sorting 法により回収した後、scRNA-seq 法で総計 31,971 個の腫瘍浸潤免疫細胞の遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現のパターンにより clustering 解析を行い、腫瘍浸潤免疫細胞を骨髄系細胞やリンパ球など 15 の細胞集団に分類した。T 細胞集団については、さらに subclustering を行い、CD8 T 細胞、CD4 Treg 細胞、Treg 以外の CD4T 細胞と増殖 T 細胞の 4 つの亜集団に分類した。

次に、これらの細胞集団のそれぞれで EP2/EP4 阻害による遺伝子発現変化を解析した。その結果、EP2/EP4 経路が、骨髄系細胞集団(TAN s1-s2, Mono s1-s4 及び TAM)で NF- κ B 経路を活性化して炎症・血管新生関連遺伝子の発現誘導を起こしていること、他方で、mregDC 細胞(免疫制御分子に富む腫瘍内成熟樹状細胞)と CD4 Treg 細胞に働くことで、Treg の腫瘍へのリクルートと活性化を促進していることを見出した。PGE₂-EP4 経路の Treg 活性化作用は in vitro の Treg 刺激実験で確認した。

更に、ヒトがんデータベースを解析し扁平上皮肺癌、卵巣漿液性嚢胞腺がん、浸潤性乳がん及び肝細胞がんなどのヒトがんにおいて、EP2/EP4 の発現が、上記 2 つの過程(骨髄系細胞による炎症・血管新生及び Treg による免疫抑制)に関連する遺伝子の発現と相関し、これらがんの予後予測因子となりうることを見出した。

これらの結果は、PGE₂-EP2/EP4 シグナルが骨髄系細胞での炎症の活性化と Treg 細胞を介する免疫抑制という 2 つの相反する現象に作用していることを示唆するもので、新しい概念を提示できたと考えている。これらの結果を論文として Cell Rep. 2022 Jun 7;39(10):110914. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110914. PMID: 35675777 に発表した。

(2) ヒト腫瘍の解析から出発した研究成果。

ヒト大腸がん、乳がん、卵巣がん、各 5 例、合計 15 例の手術標本を得て、これより CD45+ 免疫細胞を単離し、これについて scRNAseq を行った。得られた 86,613 個の細胞の遺伝子発現解析より、これらを、まず、9 個のクラスターに分類、これらに於いて、COX-1/2, EP1~EP4 の発現解析を行った。その結果、COX-1/2 は主として骨髄系細胞で、また、4 種の PGE 受容体のうち、EP4 がリンパ球、骨髄系細胞に広く発現されていること、程度は低いが EP2 も同様の発現分布をとること、これに対して、EP1, EP3 の発現は殆ど検出できないことが明らかとなった。但し、CD8 T 細胞など一つの細胞クラスターでも EP4 発現には高発現、中間発現、低発現、無発現の集団があり、EP4 が細胞の状態によって context 依存性に発現制御されていることが示唆された。

ついで、CD8 T 細胞で EP4 高発現集団と低発現集団で DEG 解析を行い、EP4 発現が、T 細胞の活性化遺伝子と相関すること、反対に IL-2 経路やミトコンドリアの酸化的リン酸化経路の OXPHOS 遺伝子群、さらに、多数のリボゾームタンパク質群(RP) の遺伝子発現とは逆相関することが明らかになった。EP4 に特有のこの遺伝子発現シグナチャーは CD4 T 細胞でも確認できた。さらに、浸潤骨髄系細胞でも同様の解析を行い、EP4 が AP-1 などの細胞活性化遺伝子と相関すること、一方、OXPHOS や RP 遺伝子発現と逆相関していることが認められた。更に、EP2 についても同様の解析を行い、EP2 が T 細胞においても骨髄系細胞に

においても、EP4 と同様の遺伝子発現プロフィールをとることがわかった。

以上のヒト腫瘍浸潤免疫細胞での解析結果を受け、この因果関係を明らかにするために、LLC1 腫瘍マウスにおいて EP2 拮抗薬、EP4 拮抗薬の投与を行い、その効果を浸潤免疫細胞を scRNAseq に供することにより解析した。その結果、EP2/EP4 拮抗薬投与により、LLC1 腫瘍に浸潤した T 細胞、骨髄系細胞など免疫細胞の OXPHOS 発現と RP 遺伝子発現が目覚ましく上昇することが認められ、腫瘍微小環境 (TME)での免疫細胞のこれら遺伝子発現の抑制が EP2/EP4 拮抗で解除されることが明らかになった。OXPHOS 遺伝子発現は転写因子 PGC-1 α で誘導されミトコンドリアの膜電位の維持に関係し、RP 遺伝子発現は転写因子 c-Myc によって誘導され細胞増殖に関係している。実際、EP2/EP4 拮抗薬投与により、LLC1 腫瘍に浸潤している各種免疫細胞のミトコンドリア膜電位、PGC-1 α 発現、c-Myc 発現が上昇することが flow cytometry により確認できた。以上の結果より、TME では、PGE₂による免疫細胞の EP2/EP4 活性化がミトコンドリア機能の抑制、タンパク合成の抑制を起こしていることが示唆された。

上記の仮説を細胞レベルで確認、検証するために、骨髄系細胞のモデルとしてヒト THP-1 細胞、T 細胞のモデルとしてマウス CD8 T 細胞を用いて in vitro 実験を行った。その結果、まず、EP2 と EP4 発現が、THP-1 細胞で PMA 刺激依存性に、また、CD8 T 細胞で TCR 刺激依存性に上昇すること、即ち、各々で細胞活性化に伴い誘導されることが明らかとなった。さらに、THP-1 細胞ではこのように誘導された EP2/EP4 に PGE₂が働いて c-Myc の誘導を抑制したり、PGC-1 依存性に OXPHOS を抑制したりすること、また、CD8 T 細胞では、これらの抑制が PGE₂-EP2/EP4 経路が IL-2-STAT5 経路を抑制することで招来していることが明らかになった。また、長時間の PGE₂暴露によって CD8 T 細胞がミトコンドリアのみならず解糖経路の障害も受けることが見出され、解糖経路遺伝子の発現抑制がヒト腫瘍に浸潤している様々な免疫細胞でも起こっていることが確認できた。更に、EP2/EP4 によるこれらの代謝経路の障害が抗原依存性の抗腫瘍活性や細胞移動、細胞増幅の抑制に繋がっていることを、MC38-OVA と OT-I 細胞を用いた in vitro の tumoricidal assay と担がんマウスを用いた in vivo の adoptive transfer 実験で確認した。

以上の結果は、免疫細胞が腫瘍に浸潤すると、その場で PGE₂に暴露され、EP2/EP4 受容体依存性にエネルギー代謝とタンパク合成抑制の抑制を受け不活化されることを明らかにしたもので、腫瘍微小環境にはこれまで知られていた免疫 check point や物理的バリアーに加えて、代謝バリアーという新しいバリアーが存在することを示したことで大きな意義があると考えている。本成果は 2024 年 6 月 21 日現在、論文審査中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Thumkeo D, Punyawatthanakool S, Prasongtanakij S, Matsuura R, Arima K, Nie H, Yamamoto R, Aoyama N, Hamaguchi H, Sugahara S, Takeda S, Charoensawan V, Tanaka A, Sakaguchi S, Narumiya S.	4. 巻 39(10)
2. 論文標題 PGE2-EP2/EP4 signaling elicits immunosuppression by driving the mregDC-Treg axis in inflammatory tumor microenvironment.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110914	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 該当する

1. 著者名 Wong LR, Zheng J, Wilhelmsen K, Li K, Ortiz ME, Schnicker NJ, Thurman A, Pezzulo AA, Szachowicz PJ, Li P, Pan R, Klumpp K, Aswad F, Rebo J, Narumiya S, Murakami M, Zuniga S, Sola I, Enjuanes L, Meyerholz DK, Fortney K, McCray PB Jr, Perlman S.	4. 巻 605(7908)
2. 論文標題 Eicosanoid signalling blockade protects middle-aged mice from severe COVID-19.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 146-151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-04630-3.	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 該当する

1. 著者名 Siriwach R, Ngo AQ, Higuchi M, Arima K, Sakamoto S, Watanabe A, Narumiya S, Thumkeo D.	4. 巻 25(4)
2. 論文標題 Single-cell RNA sequencing identifies a migratory keratinocyte subpopulation expressing THBS1 in epidermal wound healing.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104130.	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 該当する

1. 著者名 Kremer KN, Buser A, Thumkeo D, Narumiya S, Jacobelli J, Pelanda R, Torres RM.	4. 巻 119(15)
2. 論文標題 LPA suppresses T cell function by altering the cytoskeleton and disrupting immune synapse formation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 e2118816119.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2118816119.	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 該当する

1. 著者名 Siriwach R, Ngo AQ, Narumiya S, Thumkeo D.	4. 巻 3(4)
2. 論文標題 An optimized protocol to identify keratinocyte subpopulations in vitro by single-cell RNA sequencing analysis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 STAR Protoc.	6. 最初と最後の頁 101906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2022.101906.	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 該当する

1. 著者名 Siriwach Ratklao, Ngo Anh Quynh, Higuchi Makio, Arima Kentaro, Sakamoto Satoko, Watanabe Akira, Narumiya Shuh, Thumkeo Dean	4. 巻 25
2. 論文標題 Single-cell RNA sequencing identifies a migratory keratinocyte subpopulation expressing THBS1 in epidermal wound healing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104130 ~ 104130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104130	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 該当する

1. 著者名 Robb Calum T., Zhou You, Felton Jennifer M., Zhang Birong, Goepp Marie, Jheeta Privjyot, Smyth Danielle J., Duffin Rodger, Vermeren Sonja, Breyer Richard M., Narumiya Shuh, McSorley Henry J., Maizels Rick M., Schwarze J?rgen K. J., Rossi Adriano G., Yao Chengcan	4. 巻 78
2. 論文標題 Metabolic regulation by prostaglandin E2 impairs lung group 2 innate lymphoid cell responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 714 ~ 730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.15541	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 該当する

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 成宮 周
2. 発表標題 がん微小環境のトランスレーション・リバーストランスレーション研究の薬理学的アプローチ
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Thumkeo Dean, Siwakorn Punyawatthanakool, 成宮周
2. 発表標題 PGE2-EP2/EP4シグナルの阻害は炎症を伴う腫瘍微小環境におけるmregDC-Treg軸を抑制する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松浦竜真 Dean Thumkeo, 成宮周
2. 発表標題 Activation of regulatory T cells through PGE2-EP4 signaling.
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Dean Thumkeo
2. 発表標題 Elucidation of the role of PGE2-EP2/4 pathway in cancer immunity utilizing scRNA-seq technology.
3. 学会等名 The Human Cell Atlas 2022 Asia meeting, Bangkok, Thailand (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shuh Narumiya
2. 発表標題 Prostaglandins in tumor microenvironment as revealed by scRNAseq analysis
3. 学会等名 14th Meeting of the Asia Pacific Federation of Pharmacologists (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村田紘規、Thumkeo Dean、成宮 周
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害剤非感受性LLC1腫瘍に対するPGE2-EP2/4阻害剤の抗腫瘍効果及び作用機序の解明
3. 学会等名 第139回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松浦 竜真、Thumkeo Dean、成宮 周
2. 発表標題 制御性T 細胞に対するプロスタグランジンE2 の作用および分子制御機構の解明
3. 学会等名 第140回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Thumkeo Dean, 成宮 周
2. 発表標題 PGE2-EP2/EP4 signaling mediates immunosuppression in tumor microenvironment through the facilitation of mregDC-Treg axis
3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Anh Quynh Ngo, Ratklao Siriwach, Dean Thumkeo, Shuh Narumiya
2. 発表標題 Single cell RNA sequencing identifies a novel LPA-induced THBS1-positive keratinocyte subpopulation that is involved in wound healing
3. 学会等名 第138回日本薬理学会近畿支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Makio Higuchi, Dean Thumkeo, Shuh Narumiya
2. 発表標題 New compounds for atopic dermatitis promote selective AHR-induced Filaggrin transcription in NHEK cells
3. 学会等名 第137回日本薬理学会近畿支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuh Narumiya
2. 発表標題 Roles of PGE2-EP2/EP4 signaling in immune landscape of tumor microenvironment-comparative scRNAseq analysis.
3. 学会等名 The 19th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shuh Narumiya
2. 発表標題 PGE2-EP4 signaling induces immunosuppression in human cancers by impairing bioenergetics and ribosome biogenesis in infiltrating immune cells
3. 学会等名 ITMAT-Kyoto University Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>EP2/4阻害薬による抗腫瘍作用の機序解明 新しいがん免疫治療薬の開発に向けて https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2022-06-08-1 京都大学医学研究科メディカルイノベーションセンター創薬医学講座 http://www.mic.med.kyoto-u.ac.jp/index.php 京都大学医学研究科創薬医学講座 http://www.mic.med.kyoto-u.ac.jp/dddm/</p>

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