

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07025

研究課題名（和文）分泌因子Neudesinの免疫抑制メカニズムの解明と新規がん免疫療法の開発

研究課題名（英文）Immunosuppressive Mechanism of Secreted Factor Neudesin and Development of Novel Cancer Immunotherapy

研究代表者

増田 有紀（Masuda, Yuki）

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：40421284

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、neudesinの腫瘍免疫抑制メカニズムについて検討した。neudesinはがんの成長を促進すると考えられたが、この作用にはCD8陽性T細胞と、樹状細胞が重要であることがわかった。また、腫瘍組織中では、樹状細胞のneudesin発現が増加しており、免疫抑制環境を誘導すると考えられた。さらに、neudesinは樹状細胞自身に作用し、解糖系の抑制を介して樹状細胞機能を調節することが示唆された。以上より、neudesinは樹状細胞機能の抑制を介してCD8陽性T細胞による腫瘍排除を低下させ、免疫回避を誘導する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

樹状細胞は、自然免疫と適応免疫をつなぐ司令塔であり、T細胞に抗原提示することにより全体的な免疫機能を活性化することが可能である。がん免疫に関しても、樹状細胞の役割が重要であることは明らかにされているが、現在臨床で用いられている免疫チェックポイント阻害薬は、いずれもT細胞を活性化するものであり、樹状細胞の機能抑制を解除する免疫療法薬は現時点で存在しない。したがって、本研究によってneudesinによる樹状細胞の機能抑制を介した腫瘍成長メカニズムや、その医療応用の可能性について明らかにされれば、全く新しいがん治療法の開発につながる可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the tumor immunosuppressive mechanism of neudesin. It has been previously demonstrated that neudesin promotes cancer growth. In the present study, it was shown that neudesin promotes cancer growth by suppressing CD8-positive T cells and dendritic cells (DCs). In addition, neudesin expression in dendritic cells was increased in tumor tissues, suggesting that neudesin induces an immunosuppressive environment. Furthermore, it was suggested that neudesin acts on dendritic cells themselves and modulates DC function through suppression of the glycolysis. These results suggest that neudesin may induce immune evasion by reducing tumor exclusion by CD8-positive T cells through suppression of DC function.

研究分野：がん免疫

キーワード：がん免疫 樹状細胞 CD8陽性T細胞

1. 研究開始当初の背景

免疫システムは、がんを異物として認識し排除しようとするが、がん細胞自身は、免疫抑制細胞や免疫チェックポイント分子を誘導してがん免疫応答を抑制し、生存増殖する。新しいがん免疫療法の一つである免疫チェックポイント阻害薬は、がんによる免疫抑制を解除することで治療効果を得るものであるが、現時点で多くのがんでの奏効率は 10~30%であり、より効果をあげるための研究が世界中で進められている。治療効果が得られない要因の一つに、生体内には免疫を抑制する因子が複数存在するため、特定の因子のみを治療標的とするだけでは効果が得られにくいことが示唆されている。

一方で、現在のがん治療の主流である抗がん剤は、全身のがんに効果を示すが、造血器官などへの副作用が問題となる。造血器官の障害は免疫機能の抑制につながり、その結果、感染リスクの増大だけでなく、がん免疫の低下による再発の可能性も高まることが懸念される。以上のように、現在のところ、がんに対する決定的な治療法が無いことから、新しい治療標的分子を同定し、新規がん治療法を開発することが強く求められている。

2. 研究の目的

Neudesin は、神経栄養活性を有する分泌たんぱく質として同定された。一方で、neudesin は免疫組織でも発現し、特に抗原提示細胞で強く発現していることから、免疫系で neudesin が何らかの役割を有する可能性が示唆された。そこで申請者は、野生型 (*neudesin*^{+/+}) と neudesin ノックアウト (*neudesin*^{-/-}) マウスに B16 メラノーマ細胞を移植し、宿主の免疫系が腫瘍成長に及ぼす影響を調べた (図 1)。その結果、*neudesin*^{-/-} マウスでは *neudesin*^{+/+} と比較して有意に腫瘍の成長を抑制し、生存率を改善した。さらに *neudesin*^{-/-} マウスや培養細胞への組換え neudesin たんぱく質の添加実験などにより、樹状細胞 (DC) から産生された neudesin は、自己分泌的に自身の活性を抑制することで、がん免疫を抑制し、腫瘍の成長を促進していると考えられた。

本研究は以上の検討結果をさらに発展させ、neudesin の、DC を介したがん免疫抑制作用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. *neudesin*^{-/-} マウスの腫瘍成長抑制における各免疫細胞の役割

K0 マウスで観察された腫瘍成長抑制に、どの免疫細胞が寄与するか検証するために、T 細胞、抗原提示細胞をそれぞれ除去した場合の腫瘍成長を比較した。T 細胞の除去には抗 CD4 抗体 (GK1.5, 0.3 mg/mouse)、抗 CD8 抗体 (H35-17.2, 0.3 mg/mouse)、マクロファージと DC など抗原提示細胞の除去にはクロドロン酸リポソーム (25 μ l/mouse) を、がん細胞接種 2 日前から、3 日おきに腹腔内投与した。腫瘍は B16 メラノーマ細胞 (2.0×10^5 cells/mouse) を皮下投与した。腫瘍生着後から腫瘍体積を測定した。また生存率の検討にあたっては腫瘍の辺りが 20mm に達した時点エンドポイントとして測定した。

2. 腫瘍細胞による DC の neudesin 発現調節

C57BL/6 マウスの腹側部皮下に、悪性黒色腫である B16 メラノーマ細胞 (2×10^5 cells) を接種した。3 週間後、同マウスより摘出した脾臓、腫瘍流入リンパ節、腫瘍組織からフローサイトメーターを使用して DC を単離し、neudesin の発現量を RT-PCR 測定した。20mm に達した時点エンドポイントとして測定した。

3. Neudesin による DC 機能抑制メカニズム

neudesin^{+/+} と *neudesin*^{-/-} マウスから採取した骨髓細胞を GM-CSF (20 ng/mL)、IL-4 (10 ng/mL) 存在下で 7 日間培養し DC へ分化させた。その後、両マウス由来の DC を LPS (10, 25, 100 ng/mL)、組換え neudesin タンパク質 (200 ng/mL)、解糖系阻害剤である 2-DG (2.5 mM) を用いて刺激し、24 時間後に培養上清と細胞を回収した。培養上清からグルコース消費量と乳酸産生量を測定し、刺激後の細胞から解糖系関連因子とサイトカイン、共刺激分子の遺伝子発現を RT-qPCR で解析した。

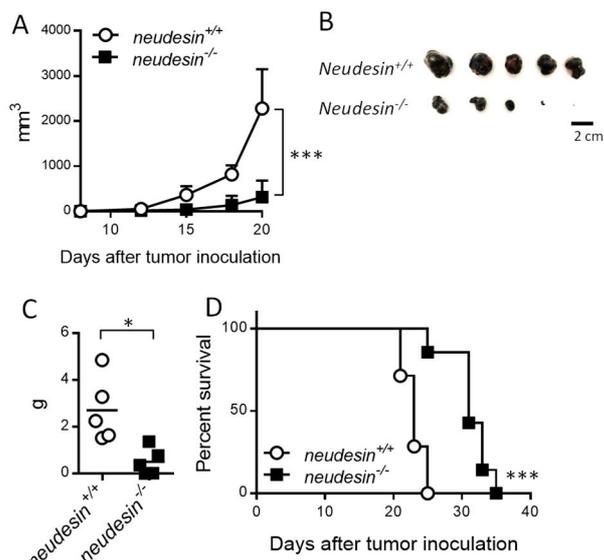


図 1. Neudesin 欠損による腫瘍成長抑制作用
B16メラノーマ細胞移植後、腫瘍体積 (A) と、生存率 (D) を測定した。
腫瘍移植3週間後に腫瘍組織を摘出した (B, C)。Mean±SD. *P<0.05, ***P<0.001

4. 研究成果

1. *neudesin*^{-/-}マウスの腫瘍成長抑制における各免疫細胞の役割

マウスにおける CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞を除去した際、CD4⁺T 細胞を除去した場合は *neudesin*^{-/-}マウスの腫瘍成長抑制に影響は見られなかったが、CD8⁺T 細胞を除去した場合、*neudesin*^{-/-}マウスの腫瘍成長抑制は大きく損なわれた (図 2A, B)。さらにクロドロン酸により、マクロファージと DC を含む抗原提示細胞を除去した際、*neudesin*^{-/-}マウスの腫瘍成長抑制は大きく損なわれた (図 2C, D)。これらのことから、*neudesin*^{-/-}マウスの腫瘍成長抑制には CD8⁺T 細胞並びに抗原提示細胞が重要であることが示唆された。

2. 腫瘍細胞による DC の *neudesin* 発現調節

予備検討より、担がんマウスの腫瘍流入リンパ節で *neudesin* の発現が上昇することを確認した。*Neudesin* による DC 活性の抑制は、がんで誘発される免疫回避機構である可能性があるため、腫瘍微小環境で DC の *neudesin* 発現が誘導されるか検証した。担がんマウスの腫瘍とリンパ節 (LN)、脾臓の DC を単離し、*neudesin* の発現を正常マウス由来 DC と比較した。脾臓 DC はがん接種の有無による *neudesin* 発現の差は見られなかった。リンパ節 DC は、がん接種によって有意ではないが増加した。さらに、腫瘍 DC においては、他の DC と比較して *neudesin* は有意に高値を示した (図 3)。このことから腫瘍微小環境においては、DC が何らかの影響を受け、*neudesin* 発現が増加したことが示唆された。

3. *Neudesin* による DC 機能抑制メカニズム

近年、DC の活性化には酸化的リン酸化から解糖系への代謝転換が重要であることが報告されたため、*neudesin* の DC 機能抑制における解糖系の関与について検討した。LPS 刺激によって濃度依存的にグルコース消費、乳酸産生量の増加が見られたが、それぞれ *neudesin*^{+/+} と比較して *neudesin*^{-/-} で有意に増加していた。低濃度 (25 ng/mL) の LPS 刺激に対して同時に *neudesin* の添加を行うと KO での増加が抑制されたことから、*neudesin* が解糖系を抑制する可能性が示唆された。そこで、低濃度 LPS 刺激条件において解糖系関連遺伝子 *Glut1*、*Ldha* について検討したところ、*neudesin*^{+/+} と比較して *neudesin*^{-/-} で有意な増加が見られ、*neudesin* 添加によって抑制された。サイトカイン *Il12a*、*Tnfa*、*Ifnb*、*Il10*、共刺激分子 *Cd86*、NO 合成酵素 *Nos2* についても同様の結果が得られた。また 2-DG を添加することで、*neudesin*^{-/-} で認められた LPS によるサイトカイン発現の増加が失われた。以上より、DC 由来の *neudesin* は自己分泌的に作用し、LPS 刺激による解糖系の亢進を抑制することが示唆された。この抑制効果により、抗原提示能やサイトカイン産生を抑制することで、がん免疫を制御すると考えられる。

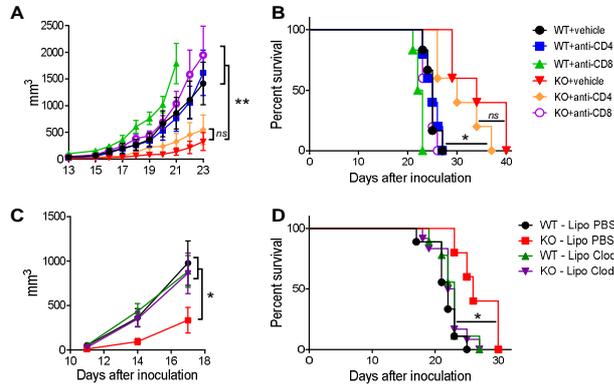


図 2. *neudesin* 欠損による腫瘍成長抑制作用における各免疫細胞の役割 (A, B) CD4 または CD8 中和抗体 (0.3 mg)、(C, D) クロドロン酸リソソームを 50 μ L、3 日おきに腹腔内投与した。初回投与 2 日後に B16メラノーマ細胞を移植し、腫瘍体積 (A, C) と、生存率 (B, D) を測定した。Mean \pm SD. * P < 0.05, ** P < 0.01

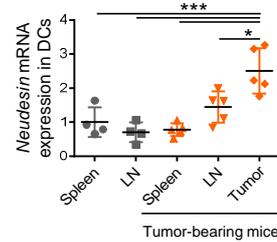


図 3. 担がんマウス各組織の DC における *neudesin* 発現比較
B16メラノーマ細胞を移植し、3週間後に各組織から DC (CD11c⁺MHC II⁺) をフローサイトメトリーで単離した。Mean \pm SD. * P < 0.05, *** P < 0.001

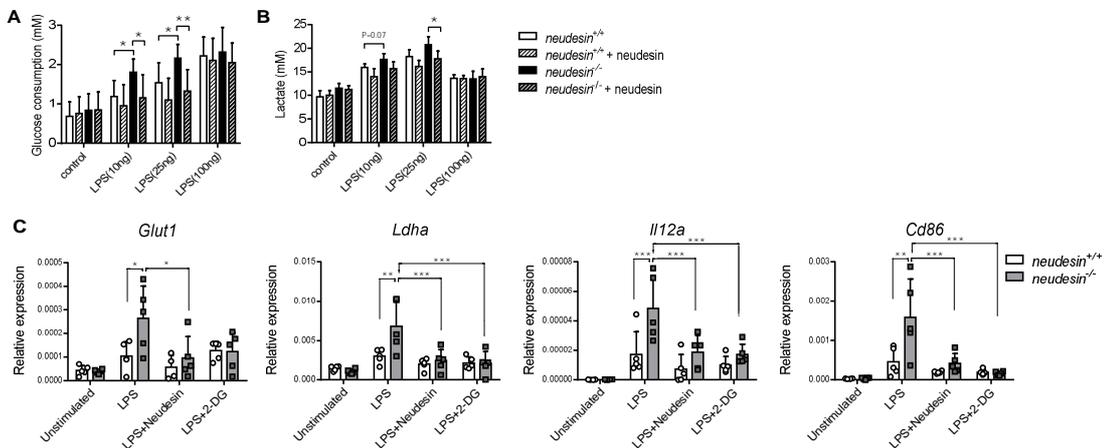


図 4. *neudesin* が DC の活性化と解糖系代謝に与える影響

LPS (10, 25, 100 ng/mL) または *neudesin* (200 ng/mL) 添加 24 時間後の培養上清を用いて、グルコース消費量 (A) と乳酸産生量 (B) を測定した。また、DC を回収し、RT-PCR により解糖系関連遺伝子 (*Glut1*, *Ldha*) とサイトカイン (*Il12a*)、共刺激分子 (*Cd86*) を測定した。Mean \pm SD. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷垣 拓海、高間 哲也、村田 亜津紀、松前 憲幸、阿部 佑亮、増田 有紀、中山 喜明、伊藤 信行、小西 守周
2. 発表標題 分泌因子 Neudesin は樹状細胞の活性を抑制することで、がんの成長を促進する
3. 学会等名 日本薬学会第140 年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高間 哲也、村田 亜津紀、松前 憲幸、阿部 佑亮、増田 有紀、中山 喜明、伊藤 信行、小西 守周
2. 発表標題 分泌因子Neudesinの抗原提示細胞の機能調節を介したがん免疫回避機構
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久永 夏綺、近藤 直人、三浦 健太郎、山下 果鈴、増田 有紀、中山 喜明、伊藤 信行、小西 守周
2. 発表標題 分泌因子neudesinの樹状細胞機能の抑制を介した新規がん免疫回避機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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	小西 守周 (Konishi Morichika) (00322165)	神戸薬科大学・薬学部・教授 (34512)	

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