

令和 5 年 5 月 14 日現在

機関番号：24405
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20K07072
研究課題名（和文）PHD阻害薬による自然免疫活性化に基づく抗腫瘍メカニズムの解明と治療標的の探索

研究課題名（英文）Elucidation of anti-tumor mechanisms based on innate immune activation by PHD inhibitors and exploration of therapeutic targets

研究代表者
富田 修平（Tomita, Shuhei）

大阪公立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00263898
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）：申請者は、腫瘍移植モデル動物実験において、HIFシグナルを増強するHIF-PH阻害薬が、腫瘍内のM²亜集団に直接作用することにより腫瘍増殖を抑制して生存期間を延長させることを見出した。本研究の目的は、PHD-HIFシグナルの活性化による腫瘍内Ly6Cl⁺ M²の貪食作用の促進機序の解明を目指した。その結果として、その鍵となる関連する機能性分子を検索し、PHD-HIFシグナルの活性化により腫瘍内Ly6Cl⁺ M²に誘導される貪食作用促進に寄与する候補分子としてHIF-induced Phagocytosis Factor（HiPAF）を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行は、現在の腫瘍免疫療法では難治性を示すがんに対して、自然免疫の活性化過程を標的とした新しい腫瘍免疫療法を創出する可能性を有しており、新規創薬研究分野にも繋がること期待される。

研究成果の概要（英文）：We found that HIF-PH inhibitors, which enhance HIF signaling, inhibit tumor growth and prolong survival by directly acting on the M² subpopulation within the tumor in an animal model of tumor transplantation. The aim of this study was to elucidate the mechanism by which PHD-HIF signaling activation promotes phagocytosis of Ly6Cl⁺ M² in tumors. As a result, we screened for the key relevant functional molecules and identified HIF-induced Phagocytosis Factor (HiPAF) as a candidate molecule that contributes to the promotion of phagocytosis induced in Ly6Cl⁺ M² in tumors by the activation of PHD-HIF signaling.

研究分野：薬理学

キーワード：HIF-PH阻害薬 低酸素 腫瘍免疫 マクロファージ 自然免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織における低酸素誘導転写因子 (HIF) の恒常的な活性化は、がんの進展や転移を促進する。また、腫瘍内マクロファージ (M ϕ) は、がん微小環境により腫瘍増殖や転移を促進する形質を付与される。その一方で、LPS や IFN γ による M ϕ の活性化は腫瘍進展に対して抑制的作用を示す。申請者は、腫瘍移植モデル動物実験において、HIF シグナルを増強する HIF-PH 阻害薬が、腫瘍内の M ϕ 亜集団に直接作用することにより腫瘍増殖を抑制して生存期間を延長させることを見出した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PHD-HIF を基軸とした詳細な分子解析を通して、HIF-PH 阻害薬により形質変換した腫瘍内 M ϕ が抗腫瘍効果をもたらす機序を明らかにすることを第一目的とする。すなわち、PHD-HIF シグナルの活性化による腫瘍内 Ly6CloM ϕ の貪食作用の促進機序の解明を目指す。とくに貪食開始の引き金となる腫瘍細胞の認識機序には深く着目する。また、M ϕ を介する細胞障害性 T 細胞などの獲得免疫機能の賦活化に対する影響を検証する。

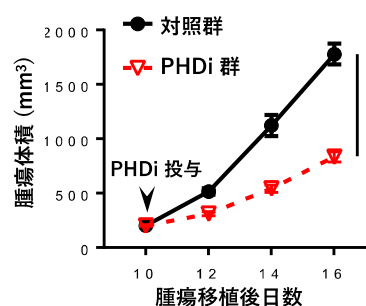
3. 研究の方法

HIF-PH 阻害薬の処置したマウス、M ϕ において HIF シグナルが増強される遺伝子改変マウス (Vhl $^{flox/flox}$;Hif-1 α $^{flox/flox}$;LysM-Cre および Vhl $^{flox/flox}$;Hif-2 α $^{flox/flox}$;LysM-Cre) を用いて、Lewis 肺癌細胞株、B16 メラノーマ細胞株などを担がんした動物モデルを作製する。その腫瘍組織から Ly6CloM ϕ 画分の採取を行い、また BMDM を調製して HIF を介する発現変動遺伝子群の探索実験に使用した。まず、Ly6CloM ϕ 画分あるいは BMDM を採取・調製して、網羅的遺伝子発現解析を行った。腫瘍組織より採取される M ϕ 画分には、貪食された腫瘍細胞も含まれており、その遺伝子発現背景も含めて、HIF-PH 阻害薬処置の有無あるいは各 HIF 発現増強マウスの発現差分を解析した。同時に、腫瘍細胞を含まない BMDM についても同様の実験を行う。Gene Set Enrichment 解析などの結果からどのような機能性遺伝子の発現変動があるのかを解析した。また、経時的顕微鏡観察の予備実験より、貪食開始の引き金には M ϕ と腫瘍細胞の物理的な接触が必要と考えられるので、上述と同様に準備された M ϕ から膜分画を調製してプロテオーム解析を実施した。その機能的発現差分解析により候補遺伝子 HiPAF を抽出した。得られた HiPAF-1 についてリコンビナントを作製し、腫瘍増殖モデル動物における解析では増殖抑制効果、また細胞培養実験における M ϕ の腫瘍細胞貪食作用の促進を認めた。さらに、HiPAF-1 遺伝子マウス及び改変 M ϕ を作製・利用し当該分子の機能の解明を進めている。

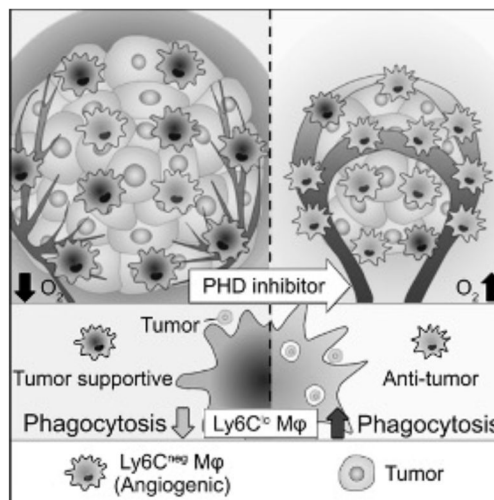
4. 研究成果

申請者は、腫瘍移植モデル実験において、HIF-PH 阻害薬が脆弱な腫瘍血管を形態的および機能的に正常様血管に変化させ、腫瘍組織内の灌流を改善することにより抗がん剤の腫瘍殺細胞性の増感効果をもたらすことを示した (Koyama S, et al. Sci Rep 2017)。さらに、HIF-PH 阻害薬が腫瘍内の Ly6CloM ϕ 集団に直接作用して腫瘍細胞に対する貪食活性を促進し、腫瘍増殖を抑制して生存期間を延長させることを示した (【図 1】、【図 2】)。

上述の先行研究で特筆すべきことは、HIF-PH 阻害薬は、腫瘍増殖に寄与すると考えられる腫瘍内の一部の M ϕ の形質を貪食作用の増強された抗腫瘍性のもにに変換することである。このことは、現在臨床応用されている獲得免疫過程を標的とした腫瘍免疫療法とは異なる自然免疫系の活性化による新規抗腫瘍薬として抗腫瘍効果が期待できる。さらに言えば、HIF-PH 阻害薬による自然免疫系の活性化は、難治性のがん病態に観察される腫瘍免疫抑制メカニズム (抗腫瘍に働く細胞障害性 T 細胞を腫瘍組織内に浸潤させない M ϕ や MDSC (myeloid-derived suppressor cells) が存在すること) の機能を解除する可能性もある。すなわち、HIF-PH 阻害薬は他の殺細胞性抗がん剤や免



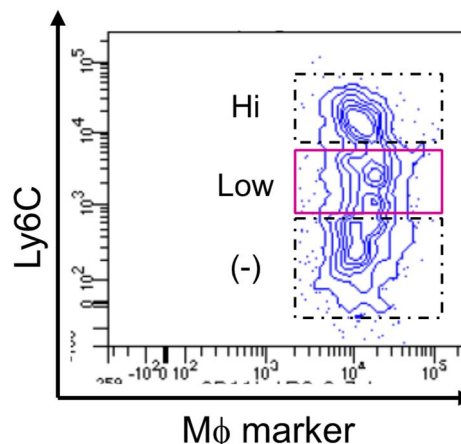
【図1】 HIF-PH阻害薬による腫瘍増大抑制効果



【図2】 HIFシグナルの活性化による腫瘍内Ly6CloM ϕ の貪食作用の促進

疫チェックポイント阻害薬との併用の治療効果も期待できる。

しかし一方で、腫瘍細胞における HIF シグナルの増強は腫瘍増殖を促進することも報告されている。また、HIF-PH 阻害薬が腫瘍内 Mφ に与える全てのシグナルが抗腫瘍効果に寄与するかどうか明確でない。したがって、HIF-PH 阻害薬による腫瘍内 Mφ の抗腫瘍効果を導く鍵となる執行分子群を同定することで HIF-PH 阻害薬の HIF シグナルを介した抗腫瘍機能を明確にすることができると考えられる。その結果として抗腫瘍効果を利用した治療応用への研究基盤の一つとして重要な研究と考える。



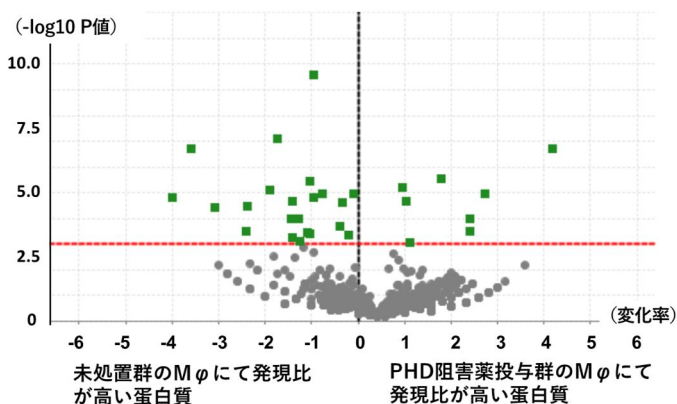
【図3】 Ly6CloMφ 分画の採取

本研究は先行研究をさらに進展させるものであり、網羅的解析を進めるための標的となる腫瘍内 Ly6CloMφ 画分の採取方法や、経時的顕微鏡下での貪食活性測定方法などは確立している。動物モデルより摘出した腫瘍組織を酵素処理により単一細胞に分散させた後に Mφ マーカーと Ly6C 表面マーカーで Ly6CloMφ 集団をフローサイトメーターで検出し、ソーターにて分取する方法を確立した(図3)。分取した Mφ 画分を用いてプロテオーム解析とトランスクリプトーム解析を行った。プロテオーム解析の結果、HIF-PH 阻害薬投与群で貪食促進を示す妥当な分子が得られた(【図4】)。

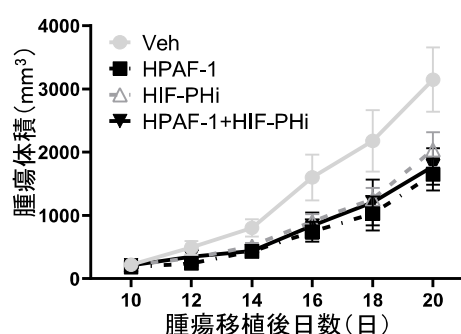
【HIF シグナルの増強は、腫瘍内 Mφ 亜集団を抗腫瘍形質に変化させる】

申請者らは、腫瘍移植モデル実験において HIF シグナルを増強する HIF-PH 阻害薬が、腫瘍内の Ly6CloMφ 集団の貪食活性を促進することにより腫瘍増殖を抑制して生存期間を延長させることを報告した(Nishide S, et al. *iScience* 2019 graphical abstract 改、【図3】)。現在、腫瘍内 Ly6CloMφ を単離採取し、HIF 活性化により誘導される分子群を抽出、さらに *in vivo* および *in vitro* の貪食活性解析を行うことにより、HIF によって誘導される Mφ の貪食作用に関連する機能性分子 (HPAF: HIF-induced Phagocytosis Activating Factor (仮名)) を同定して解析中である。

【図4】 腫瘍内 Ly6C^{low}Mφ におけるタンパク発現解析



解析の進んでいる HPAF-1 においては、担がんマウスモデルにおいて HPAF-1 リコンビナントの投与による腫瘍増殖抑制を確認している。さらに、この HPAF-1 投与による腫瘍増殖抑制効果は、HIF-PH 阻害薬と併用しても相加・相乗効果は認められない結果が得られている(【図5】)。このことは、HIF-PH 阻害薬による抑制効果は HPAF-1 の示す抑制効果と共有する抑制分子機序がある可能性を示唆している。なお、腫瘍細胞と Mφ の再構成培養実験においても同様の実験結果が得られている。



【図5】 HPAF-1およびHIF-PHIによる腫瘍増大抑制効果

< 引用文献 >

文献 1 : Koyama S, Matsunaga S, Imanishi M, Maekawa Y, Kitano H, Takeuchi H, Tomita S: Tumour blood vessel normalisation by prolyl hydroxylase inhibitor repaired sensitivity to chemotherapy in a tumour mouse model. *Sci Rep* 7:45621 (2017).

文献 2 : Nishide S, Matsunaga S, Shiota M, Yamaguchi T, Kitajima S, Maekawa Y, Takeda N, Tomura M, Uchida J, Miura K, Nakatani T, Tomita S: Controlling the Phenotype of Tumor-Infiltrating Macrophages via the PHD-HIF Axis Inhibits Tumor Growth in a Mouse Model. *iScience*, 19:940-954 (2019).

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 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamashiro Yoshito, Ramirez Karina, Nagayama Kazuaki, Tomita Shuhei, Kubota Yoshiaki, Yanagisawa Hiromi	4. 巻 -
2. 論文標題 Partial endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) contributes to lumen re-organization after carotid artery ligation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	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） 10.1101/2021.08.13.456319	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 Kabei Kazuya, Tateishi Yu, Shiota Masayuki, Osada-Oka Mayuko, Nishide Shunji, Uchida Junji, Nakatani Tatsuya, Matsunaga Shinji, Yamaguchi Takehiro, Tomita Shuhei, Miura Katsuyuki	4. 巻 142
2. 論文標題 Effects of orally active hypoxia inducible factor alpha prolyl hydroxylase inhibitor, FG4592 on renal fibrogenic potential in mouse unilateral ureteral obstruction model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 93～100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2019.12.002	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 Shimokawa Takaomi, Yoneda Kozo, Yamagata Masayo, Hayashi Kohei, Tomita Shuhei	4. 巻 871
2. 論文標題 Yohimbine ameliorates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 172917～172917
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2020.172917	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 Nishide Shunji, Uchida Junji, Matsunaga Shinji, Tokudome Kentaro, Yamaguchi Takehiro, Kabei Kazuya, Moriya Taiki, Miura Katsuyuki, Nakatani Tatsuya, Tomita Shuhei	4. 巻 143
2. 論文標題 Prolyl-hydroxylase inhibitors reconstitute tumor blood vessels in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 122～126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2020.02.010	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 Kihira Yoshitaka, Fujimura Yoshino, Tomita Shuhei, Tamaki Toshiaki, Sato Eiji	4. 巻 22
2. 論文標題 Hypoxia-inducible factor 1 regulates Lipin1 differently in preadipocytes and mature adipocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 559 ~ 565
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2020.11076	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 Hutami Islamy Rahma, Izawa Takashi, Khurel Ochir Tsendsuren, Sakamaki Takuma, Iwasa Akihiko, Tomita Shuhei, Tanaka Eiji	4. 巻 -
2. 論文標題 HIF-1 controls palatal wound healing by regulating macrophage motility via S1P/S1P1 signaling axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Diseases	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/odi.13856	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3件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 富田修平
2. 発表標題 HIF-PH阻害薬の悪性腫瘍への潜在的影響
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富田修平
2. 発表標題 低酸素シグナル制御ががん微小環境に及ぼす影響
3. 学会等名 第94回日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富田修平
2. 発表標題 低酸素シグナルのがん微小環境に及ぼす影響
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 金井好克、安西尚彦、安藤 仁、浅井 聡、富田修平	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南山堂	5. 総ページ数 303
3. 書名 エース薬理学	

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

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