

令和 5 年 6 月 6 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：20K07295

研究課題名(和文)腫瘍微小環境改善薬による抗腫瘍免疫応答制御機構の解明

研究課題名(英文)Improve of tumor microenvironment regulate anti-tumor immune response

研究代表者

松永 慎司(Matsunaga, Shinji)

大阪公立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30704910

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)：本研究では腫瘍移植モデルマウスに対しプロリン水酸化酵素(PHD)阻害薬の投与により、腫瘍内マクロファージ(M₁)による腫瘍増大抑制が生じる機序の検討を行った。PHD阻害薬の投与により腫瘍組織内M₁のHIF-1が優位になることが腫瘍増大抑制に関与することが示唆された。HIF-1が優位になることは貪食能の亢進や、炎症性サイトカインの発現上昇を誘導すると考えられた。また、HIF-1優位なM₁に誘導され、かつ腫瘍抑制に関与する候補遺伝子を見出し、腫瘍抑制に寄与することが推察された。PHD阻害薬による腫瘍抑制機序の一端として、HIFを介してこの遺伝子の発現上昇が生じると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的にHIF-1は腫瘍進展に働くとされるが、本研究からは生体内において、マクロファージHIF-1の優位な発現は腫瘍抑制性に作用することが示唆された。PHD阻害薬の腫瘍への影響の一端を明らかにしたと考える。また、治療抵抗性腫瘍などマクロファージ多く存在する癌種ではHIF-1を優位にすることが治療戦略の1つ候補となる可能性が考えられる。また、HIF-1下流の遺伝子とその腫瘍抑制に関与していることが示唆されたことから、今後これらの遺伝子機能についてその詳細を解析することで、腫瘍内マクロファージによる腫瘍抑制機序の一端が明らかになるものと考えられる。新規の創薬標的に繋がるものとする。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanism by which administration of prolyl hydroxylase (PHD) inhibitor suppresses tumor growth by tumor infiltrating macrophages (M₁) in tumor bearing mice. It was suggested that HIF-1 of M₁ in tumor tissue becomes dominant by administration of PHD inhibitor, which is involved in suppressing tumor growth. dominance of HIF-1 in M₁ was induced enhancing phagocytosis and increasing expression of inflammatory cytokines. In addition, we found a candidate gene that is induced by HIF-1-dominant M₁ and is involved in tumor suppression. It was implied that upregulation of this gene was mediated by HIF as part of the tumor suppression mechanism by PHD inhibitors.

研究分野：薬理学

キーワード：腫瘍微小環境 低酸素誘導因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織内は異常な血管形成に起因する血流障害ならびに低酸素、低栄養といった腫瘍特異的な組織環境を形成している。このような組織環境が種々の治療抵抗性の原因となることから、腫瘍血管を正常化することは腫瘍内環境を改変し治療抵抗性を改善すると報告されている()。申請者らはこれまでに酸素依存性酵素であるプロリン水酸化酵素 (PHD) を阻害することで低酸素誘導因子 (HIF) を介した血管新生を促進し、腫瘍血管正常化・微小環境改善がなされるとともに薬物動態が改善し抗癌剤感受性が向上することを報告してきた()。

HIF は低酸素環境下などでその分解が抑制され転写因子として働き、その機能・役割は免疫、線維芽、血管内皮細胞など細胞により異なる。種々の細胞によって構成される腫瘍組織では、機能・表現型はより多様となる。特に腫瘍細胞においては増殖、転移において重要な役割を果たしているとされる()。しかしながら、T細胞など免疫細胞においては免疫活性化を誘導するとされている()。低酸素環境である腫瘍内では T 細胞などの免疫細胞の活性化が生じるはずである。しかし、これまでの報告を鑑みると細胞障害性 T 細胞や NK 細胞は免疫抑制因子等によりその活性化は抑制されている()と考えられるが詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究目的は PHD 阻害薬が生体内で腫瘍内マクロファージ (M ϕ) を腫瘍増大抑制性 M ϕ へと変化させる詳細機序を明らかにすることである。in vitro における HIF の亜型である HIF-1、HIF-2 発現レベルを変えることで M ϕ を炎症性および抗炎症性に極性化させる報告はなされているが、生体腫瘍内 M ϕ において HIF-1、HIF-2 の発現状態を変えることによる M ϕ の表現型を変えるという報告はほとんどない。また、本研究における PHD 阻害薬の影響は腫瘍細胞と免疫細胞への治療的影響・効果は正反対と考えられるが、治療効果という側面からすると腫瘍増大の抑制として現れる。薬理学的見地からは非常に興味深い作用機序である。本研究では腫瘍進展因子とされる M ϕ が PHD 阻害薬により腫瘍抑制性に変化する機序ならびに腫瘍抑制因子を明らかにすることを試みる。

3. 研究の方法

(1) M ϕ 特異的な HIF-1、HIF-2 欠損・過剰発現マウスの作製

M ϕ 特異的 HIF-1、HIF-2 欠損マウスにおける腫瘍増殖の評価・検討を行うために、M ϕ 特異的 HIF-1 (*Hif-1*^{flox/flox} *LysM-Cre*)、HIF-2 (*Hif-2*^{flox/flox} *LysM-Cre*) および HIF-1・HIF-2 欠損マウスをこれらのマウスを交配することによりそれぞれの遺伝子型マウスの作製を行う。また、同時にマクロファージ特異的 HIF-1、HIF-2 過剰発現マウスにおける腫瘍増殖の評価・検討を行うために M ϕ 特異的 HIF-1 および HIF-2 過剰発現 (*Hif-1*^{flox/flox} *Vh1*^{flox/flox} *LysM-Cre* および *Hif-2*^{flox/flox} *Vh1*^{flox/flox} *LysM-Cre*) マウスを交配によりそれぞれの遺伝子型マウスの作製を行う。

(2) 各種遺伝子改変マウスへの腫瘍移植モデルを作製と、病態・組織の評価・解析

作製された遺伝子改変マウスに対し Lewis 肺癌細胞株を皮下に移植し、腫瘍モデルマウスを作製した。病態評価は腫瘍体積、生存率を用いて行った。腫瘍内の M ϕ や免疫細胞の活性化状態を貪食アッセイにて解析・評価を行い、HIF 欠損・過剰による M ϕ への影響の評価を行う。

(3) 腫瘍抑制性 M ϕ における網羅的遺伝子発現解析および候補遺伝子の評価

PHD 阻害薬による腫瘍抑制性 M ϕ 集団における遺伝子発現解析を行うため、マウス腫瘍組織より腫瘍抑制性 M ϕ 集団をセルソーターを用いて分離・分取し、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行った。見出された、候補遺伝子について、腫瘍内 M ϕ での発現および腫瘍抑制性の評価を行い妥当性を評価する。

4. 研究成果

また、併せて M ϕ 特異的 HIF-1、HIF-2 欠損腫瘍移植モデルマウスに対し PHD 阻害薬を投与し腫瘍に対する影響の検討を行った。これらの検討結果より、M ϕ 特異的 HIF-1 欠損 (*Hif-1*^{flox/flox} *LysM-Cre*) マウスに対し PHD 阻害薬を投与した腫瘍において、PHD 阻害薬による腫瘍増大抑制作用は観察されず、また有意な腫瘍増大などの変化も認められなかった。一方、M ϕ ならびに M ϕ 特異的 HIF-2 欠損 (*Hif-2*^{flox/flox} *LysM-Cre*) マウスに対し PHD 阻害薬を投与した腫瘍においてその増大抑制が観察された(図 1)。このことから腫瘍内 M ϕ において HIF-1 発現上昇させることが腫瘍増殖抑制に寄与する可能性が示唆された。そこで M ϕ 特異的 HIF-1 過剰発現 (*Hif-2*^{flox/flox} *Vh1*^{flox/flox} *LysM-Cre*) マウスにおける腫瘍増大曲線を確認したところ腫瘍増大の抑制および生存期間の延長が観察された(図 2)。

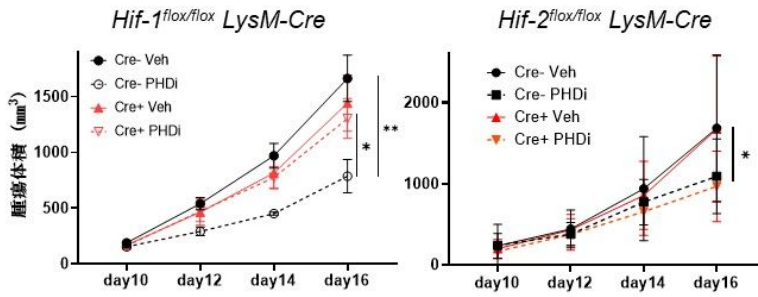


図 1 . 各種遺伝子改変マウス腫瘍モデルにおける腫瘍増大曲線

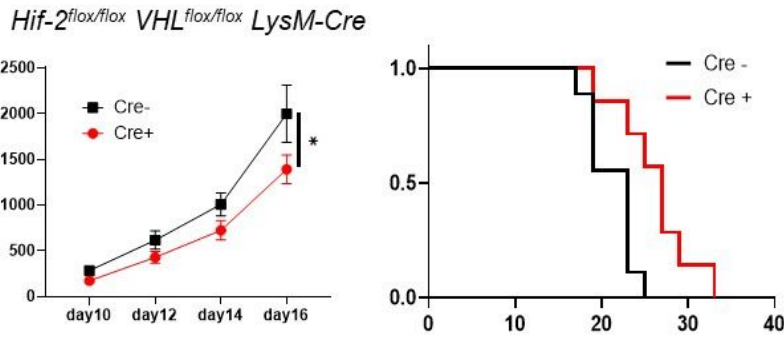


図 2 . Mφ 特異的 HIF-1 過剰発現マウスにおける腫瘍増大曲線と生存曲線

PHD 阻害薬の腫瘍増大抑制効果がマクロファージの HIF-1 を介することから、マクロファージの HIF-1 がマクロファージの食食活性に影響を与えるか否かについて骨髄由来マクロファージを用いて検討を行った。マクロファージ特異的 HIF-2 欠損マウスでは PHD 阻害薬投与により食食活性が上昇した。しかしながら、マクロファージ特異的 HIF-1 欠損マウスでは PHD 阻害薬投与によって、食食活性の上昇は認められなかった(図 2)。このことから HIF-1 の発現上昇が食食活性に寄与すると考えられた。このことから、マクロファージ特異的 HIF-1 および HIF-2 過剰発現マウスより骨髄由来マクロファージを作製し、食食活性評価を行った。その結果、HIF-1 過剰発現マクロファージにおいては食食活性の優位な上昇が認められたのに対し、HIF-2 過剰発現マクロファージにおいては食食活性の上昇は認められなかった。(図 3)これらの結果からマクロファージ HIF-1 の発現上昇が腫瘍抑制性に寄与していることが示唆された。

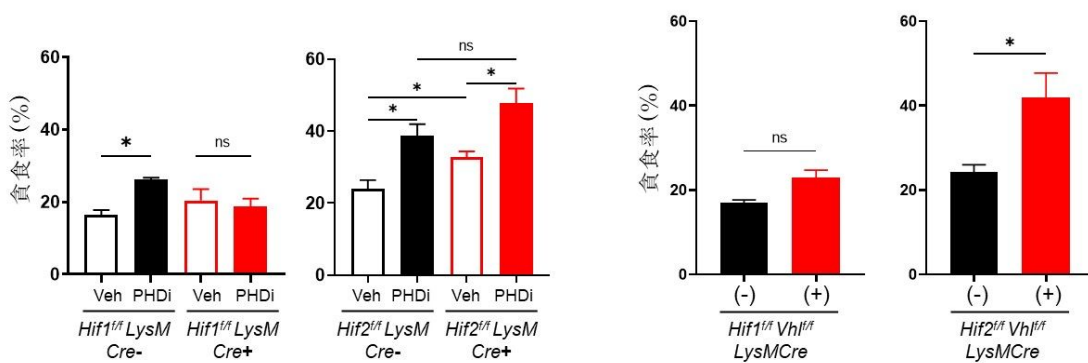


図 3 . 骨髄由来マクロファージによる食食活性評価

PHD 阻害薬を投与した腫瘍移植モデルマウスの腫瘍組織ならびに遺伝子改変マウスに移植した腫瘍組織より Mφ を単離し、網羅的遺伝子発現解析を行った。高発現遺伝子群の中から、HIF-1 により発現調節され、かつ PHD 阻害薬投与により腫瘍増殖抑制に寄与する可能性のある遺伝子を探索し、候補遺伝子 X として見出した。この遺伝子 X について腫瘍内 Mφ での mRNA 発現解析を行ったところ PHD 阻害薬投与後の腫瘍抑制性 Mφ 内では腫瘍進展性 Mφ と比較し発現上昇していた。また、対照群と比較してもその発現は高値であった。(図 4)。見出された遺伝子について、精製タンパク質を担癌モデルマウスに投与すると、腫瘍増大抑制が認められた。(図 5)これらの結果より見出された遺伝子は PHD 阻害薬による腫瘍増大抑制に寄与する可能性が

示唆された。また、これらの作用機序を詳細に解析することで新規治療標的分子の創出が期待される。

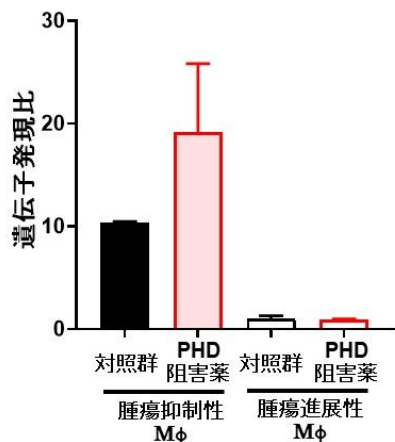


図 4 . 見出された候補遺伝子の腫瘍内マクロファージにおける mRNA 発現

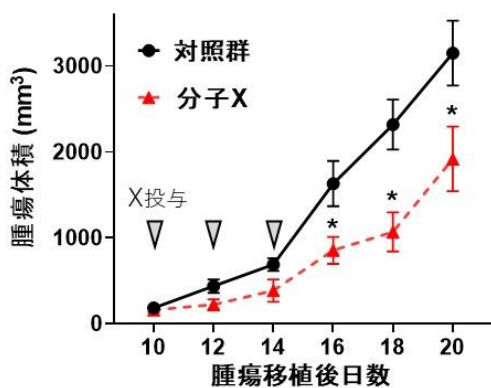


図 5 . 候補分子投与による担癌腫瘍の腫瘍増大曲線

< 引用文献 >

Jain R.K. Science. 2005, 307(5706):58-62.
 Jain R.K. cancer cell. 2014, 26(5):605-22.
 Matsunaga S. et al. Sci. Rep. 2017, 7:45621
 Massague J. et al. Nature. 2016, 529(7586):298-306.
 Pollizzi K.N. et al. Nat. Rev. Immunol. 2014, 14(7):435-46.
 Wing K. et al. Science. 2008, 322(5899):271-5.

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 松永慎司、山口一行、平川遼、徳留健太郎、山口雄大、富田修平
2. 発表標題 担癌モデルマウスにおけるプロリン水酸化阻害剤の腫瘍組織に対する効果検討
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 松永慎司、山口一行、平川遼、徳留健太郎、山口雄大、富田修平
2. 発表標題 腫瘍増殖に対する腫瘍浸潤マクロファージの低酸素誘導因子の影響
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松永慎司、富田修平
2. 発表標題 PHD阻害薬によるがん微小環境と腫瘍免疫への影響
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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
研究協力者	富田 修平 (Tomita Shuhei)		

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