

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09579

研究課題名(和文)リンパ節抗原提示細胞に着目した新たながん免疫療法の開発

研究課題名(英文)Development of new cancer immunotherapy focusing on lymph node antigen-presenting cells

研究代表者

矢津田 旬二 (Yatsuda, Junji)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師

研究者番号：20749626

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)：本研究では免疫チェックポイント阻害剤(ICI)の抗腫瘍効果におけるCD169陽性リンパ節マクロファージの機能的役割をCD169-DTRマウスを用いて検証した。CD169陽性細胞を欠損させると、ICIの抗腫瘍効果が消失したことから、ICIによる抗腫瘍作用にはCD169陽性リンパ節マクロファージが重要な役割を担っていることを明らかにした。次に、CD169陽性リンパ節マクロファージを誘導するナリンジンは腫瘍免疫の活性化することで抗腫瘍効果を発揮した。さらに、ICI単剤では抗腫瘍効果の乏しかった膀胱癌移植モデルにおいても、ナリンジンとの併用がICIの抗腫瘍効果を増強することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は膀胱癌のリンパ節における腫瘍免疫に着目し、リンパ節洞にてCD169陽性マクロファージの活性化を誘導する天然化合物であるナリンジンが腫瘍免疫を賦活化することでがん治療に有効である可能性を明らかにした。ゆえに、本研究成果は、リンパ節洞におけるCD169陽性マクロファージを標的とした治療法が腫瘍免疫を賦活化することで膀胱癌に対して有効であることを明らかにすると共に、既存の免疫チェックポイント阻害剤の治療成績を向上させる可能性も明らかにしたことから、膀胱癌に対する新たな治療戦略の一助となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the functional role of CD169-positive lymph node macrophages in the antitumor effect of immune checkpoint inhibitors (ICIs) was examined using CD169-DTR mice. Deletion of CD169-positive cells abolished the antitumor effect of ICIs, indicating that CD169-positive lymph node macrophages play an important role in the anti-tumor effect of ICI. Second, naringin, which induces CD169-positive lymph node macrophages, exerted its antitumor effect by activating tumor immunity. Furthermore, we found that the combination with naringin enhanced the antitumor effect of ICI in a bladder cancer transplantation model, where ICI alone had poor antitumor effect.

研究分野：泌尿器科腫瘍

キーワード：腫瘍免疫 マクロファージ CD169 ナリンジン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転移性膀胱癌治療は 30 年ほどシスプラチンを主体とした化学療法のみが治療の中心であった。近年、新たに免疫チェックポイント阻害剤が登場し、二次治療として使用可能となった。しかしながら、免疫チェックポイント阻害剤の奏効率は 20%前後であり、更なる治療法の開発が望まれる。我々は、「免疫の関所」として働くリンパ節に着目した研究を行なっている。リンパ節には樹状細胞のみならず多数のマクロファージが存在しており、リンパ節に存在する CD169 陽性マクロファージががん免疫サイクルにおいて重要な役割を担うことが明らかとなってきた。例えば、臨床研究において膀胱癌を含めたあらゆる癌腫では、リンパ節洞マクロファージにおける CD169 発現が高いほど、腫瘍浸潤 CD8 陽性 T リンパ球が多く、予後が良いことが明らかとなっている[1-3]。つまり、リンパ節における CD169 陽性マクロファージは CD8 リンパ球の活性化誘導を介して抗腫瘍作用を発揮すると考えられる。また、CD169 陽性細胞を薬剤投与で欠損させることができるマウス (CD169-DTR マウス) が開発され、がんワクチン実験で CD169 陽性細胞ががん免疫誘導に関与していることが示された[4]。しかしながら、免疫チェックポイント阻害剤の抗腫瘍作用におけるリンパ節洞 CD169 陽性マクロファージの機能的意義については明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

上記の背景から、リンパ節における CD169 陽性マクロファージを増加させることによる腫瘍免疫の賦活化が新たな癌治療戦略につながると考え、天然化合物ライブラリーを用いてヒトマクロファージにおいて CD169 の発現を上昇させる候補化合物としてナリンジン (Naringin) を同定した[5]。

本研究では、CD169 陽性マクロファージによる腫瘍免疫の賦活化に着目し、免疫チェックポイント阻害剤の抗腫瘍作用におけるリンパ節洞 CD169 陽性マクロファージの機能的意義を明らかとすること、また膀胱癌に対する新たな治療戦略のひとつとして CD169 陽性マクロファージを誘導するナリンジンの抗腫瘍効果を検討することを目的とし、下記の基礎研究を行うこととした。

- CD169-DTR マウスを用いた膀胱癌皮下移植モデルに免疫チェックポイント阻害剤を投与し、免疫チェックポイント阻害剤の抗腫瘍作用とリンパ節洞 CD169 陽性マクロファージの機能的関連性を解析
- CD169 陽性マクロファージを誘導するナリンジンの膀胱癌皮下移植モデルマウスにおける有効性の検討

3. 研究の方法

- (1) 抗 PD-L1 抗体療法における CD169 リンパ節マクロファージの重要性の評価：野生型マウス (C57BL/6 マウス) および CD169-DTR マウスを用いた腫瘍移植モデルに抗 PD-L1 抗体を投与し、腫瘍重量を比較することで抗腫瘍効果を評価した。
- (2) マウスマクロファージにおけるナリンジンの CD169 発現作用の評価：ナリンジンをマウス腹腔マクロファージに添加し、CD169 の発現をフローサイトメトリーによって評価した。また、ナリンジンをマウスへの経口投与後にリンパ節を採取し、マクロファージの CD169 発現をフローサイトメトリーによって評価した。
- (3) ナリンジンの膀胱癌細胞株 (MB49 細胞) およびマウスマクロファージに対する細胞毒性の評価：ナリンジンを MB49 細胞ならびに腹腔マクロファージに 0, 30, 50, 100, 150, 200 μ M の濃度で添加し、それらに対する直接的な細胞障害性を WST8 アッセイで評価した。
- (4) 腫瘍皮下移植モデルマウスに対するナリンジンの抗腫瘍効果と腫瘍微小環境の評価：C57BL/6 マウスに MB49 細胞を移植したモデルマウスにナリンジン投与を投与し、腫瘍重量を非投与群と比較することで抗腫瘍効果を評価した。また、皮下腫瘍を用いて CD8 の免疫染色を行い、腫瘍浸潤リンパ球数を測定した。さらにリンパ節、腫瘍のフローサイトメトリー解析により、リンパ球の活性化 (CD69, GzmB) を評価した。
- (5) 腫瘍皮下移植モデルマウスに対するナリンジンの抗腫瘍効果ならびに CD169 陽性マクロファージの抗腫瘍作用における重要性の評価：リンパ球が欠損しているヌードマウスに MB49 細胞を移植したモデルマウスにナリンジン投与を投与し、腫瘍重量を非投与群と比較することで抗腫瘍効果を評価した。また、CD169 陽性細胞が欠損している CD169-DTR マウスに MB49 細胞を移植したモデルマウスにナリンジン投与を投与し、腫瘍重量を比較することで抗腫瘍効果を評価した。さらに、皮下腫瘍を用いて CD8 の免疫染色を行い、腫瘍浸潤リンパ球数を測定した。
- (6) 腫瘍皮下移植モデルに対するナリンジンと抗 PD-L1 抗体の併用による抗腫瘍効果と腫瘍微小環境における作用の評価：C57BL/6 マウスに MB49 細胞を移植したマウスにナリンジン投

与と抗 PD-L1 抗体を投与し、腫瘍重量を非投与群および抗 PD-L1 抗体単独投与群と比較することで抗腫瘍効果を評価した。また、皮下腫瘍における CD8 の免疫染色を行い、腫瘍浸潤リンパ球数を測定した。

4. 研究成果

- (1) 抗 PD-L1 抗体療法における CD169 リンパ節マクロファージの重要性の評価：野生型マウス (C57BL/6 マウス) を用いた膀胱癌細胞株 (MB49 細胞) の移植モデルマウスにおいては、抗 PD-L1 抗体療法はコントロール群 (非投与群) と比べ、抗腫瘍効果が認められなかった ($P=0.93$)。一方で、抗 PD-L1 抗体療法が奏功することが知られている大腸癌細胞株 (MC38 細胞) や乳癌細胞株 (E0771 細胞) を移植したモデルマウスでは、既報通り抗 PD-L1 抗体投与において有意な腫瘍重量の減少を認めた (MC38 移植モデル: $P<0.001$, E0771 移植モデル: $P<0.001$)。また、同様の実験を CD169-DTR マウス用いた腫瘍移植モデルにて評価したところ、全ての細胞株の移植モデルにて抗 PD-L1 抗体療法の効果が認められなかった (MB49 移植モデル: $P=0.69$, MC38 移植モデル: $P=0.48$, E0771 移植モデル: $P=0.26$)。ゆえに、抗 PD-L1 抗体療法の抗腫瘍効果の発現には CD169 陽性マクロファージが重要な役割を担っていることが示唆された。
- (2) マウスマクロファージにおけるナリンジンの CD169 発現作用の評価：in vitro 実験において、ナリンジンはマウス腹腔マクロファージの CD169 の発現をタンパクレベルで有意に増加させた ($P=0.029$)。また、マウスを用いた in vivo 実験においても、ナリンジンの経口投与は、リンパ節におけるマクロファージの CD169 発現を有意に増加させた ($P=0.041$)。つまり、ナリンジンはマウスマクロファージの CD169 発現を上昇させる作用があることを明らかにした。
- (3) ナリンジンの膀胱癌細胞株 (MB49 細胞) およびマウスマクロファージに対する細胞毒性の評価：ナリンジンは膀胱癌細胞株 (MB49 細胞) に対して、 $200\mu\text{M}$ の高濃度であっても直接的な抗腫瘍作用は示さなかった。また、ナリンジンは正常細胞である腹腔マクロファージに対しても毒性は示さなかった。ゆえに、ナリンジンは腫瘍細胞ならびにマクロファージに対して直接的な細胞毒性を有しないことを明らかにした。
- (4) 腫瘍皮下移植モデルマウスに対するナリンジンの抗腫瘍効果と腫瘍微小環境の評価：MB49 移植モデルマウスでは、ナリンジン投与により有意に腫瘍重量の減少を認めた ($P<0.001$)。また、皮下腫瘍を用いた免疫染色の結果から、ナリンジン投与群では CD8 陽性リンパ球の浸潤が有意に増加していた ($P<0.001$)。さらに、フローサイトメトリーによる解析から、マウスリンパ節においてナリンジン投与群ではリンパ球活性化マーカーである CD69 の発現増加を認め、リンパ球の活性化が確認された。加えて、皮下腫瘍組織を用いたフローサイトメトリーによる解析によって、ナリンジン投与群では腫瘍組織内の CD8 陽性細胞において細胞傷害タンパクであるグランザイム B の発現が有意に上昇していることを明らかにした ($P<0.001$)。ゆえに、ナリンジンは腫瘍免疫を賦活化することで抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。
- (5) 腫瘍皮下移植モデルマウスに対するナリンジンの抗腫瘍効果ならびに CD169 陽性マクロファージの抗腫瘍作用における重要性の評価：ヌードマウスを用いた MB49 移植モデルでの検討では、ナリンジン投与による腫瘍重量の減少は認められなかった ($P=0.96$)。ゆえに、ナリンジンの抗腫瘍作用は腫瘍細胞に対する直接的な細胞毒性作用ではなく、T 細胞に関連する腫瘍免疫の賦活化による抗腫瘍作用であると考えられた。さらに、CD169-DTR マウスを用いた腫瘍移植モデルにおいても、ナリンジン投与により野生型 (C57BL/6) マウスにて認められた腫瘍重量の減少は認められず ($P=0.52$)。皮下腫瘍を用いた免疫染色においても腫瘍組織への CD8 陽性リンパ球の浸潤増加も認められなかった ($P=0.70$)。ゆえに、ナリンジンはリンパ節における CD169 陽性マクロファージの誘導を介した腫瘍免疫の活性化により抗腫瘍効果を発揮していると考えられた。つまり、リンパ節における CD169 陽性マクロファージの活性化が膀胱癌に対する新たな治療戦略になりうる可能性が示唆された。
- (6) 腫瘍皮下移植モデルに対するナリンジンと抗 PD-L1 抗体の併用による抗腫瘍効果と腫瘍微小環境における作用の評価：MB49 移植モデルマウスにおいて、ナリンジン単剤投与群に比べ、ナリンジンと抗 PD-L1 抗体の併用群では有意に腫瘍重量の減少を認めた ($P=0.019$)。また、皮下腫瘍を用いた免疫染色では、腫瘍内への CD8 陽性リンパ球の浸潤もナリンジン単剤投与群に比べ、有意に増加していた ($P=0.018$)。このことから、ナリンジンによる CD169 陽性マクロファージの活性化は既存の免疫チェックポイント阻害剤の治療成績を向上させる可能性が示唆された。

引用文献

- [1] Ohnishi K, Komohara Y, Saito Y, et al. CD169-positive macrophages in regional lymph nodes are associated with a favorable prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer Sci.* 2013;104(9):1237-44.
- [2] Saito Y, Ohnishi K, Miyashita A, et al. Prognostic Significance of CD169+ Lymph Node Sinus Macrophages in Patients with Malignant Melanoma. *Cancer Immunol Res.* 2015;3(12):1356-63.

- [3] Asano T, Ohnishi K, Shiota T, et al. CD169-positive sinus macrophages in the lymph nodes determine bladder cancer prognosis. *Cancer Sci.* 2018;109(5):1723-1730.
- [4] Asano K, Nabeyama A, Miyake Y, et al. CD169-positive macrophages dominate antitumor immunity by crosspresenting dead cell-associated antigens. *Immunity.* 2011;34(1):85-95.
- [5] Fujiwara Y, Saito Y, Shiota T, Natural compounds that regulate lymph node sinus macrophages: Inducing an anti-tumor effect by regulating macrophage activation. *J Clin Exp Hematop.* 2018;58(1):17-23.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Komohara Y, Anami T, Asano K, Fujiwara Y, Yatsuda J, Kamba T.	4. 巻 1
2. 論文標題 Anti-Cancer Immune Reaction and Lymph Node Macrophage; A Review from Human and Animal Studies.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immuno.	6. 最初と最後の頁 223-230
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/immuno1030014	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 -
1. 著者名 Anami T, Komohara Y, Miura Y, Yamanaka K, Kurahashi R, Segawa T, Motoshima T, Murakami Y, Yatsuda J, Yamaguchi T, Sugiyama Y, Jinnouchi Y, Kamba T.	4. 巻 54
2. 論文標題 High T-cell infiltration in tumor tissue and younger age predict the response to pembrolizumab in recurrent urothelial cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Med Mol Morphol.	6. 最初と最後の頁 316-323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00795-021-00292-8	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 -
1. 著者名 Yamamoto Y, Yatsuda J, Shimokawa M, Fuji N, Aoki A, Sakano S, Yamamoto M, Suga A, Tei Y, Yoshihiro S, Kitahara S, Nagao K, Takai K, Kamiryo Y, Akao J, Yamaguchi S, Oba K, Shimabukuro T, Matsumoto H, Kamba T, Matsuyama H.	4. 巻 26
2. 論文標題 Prognostic value of pre-treatment risk stratification and post-treatment neutrophil/lymphocyte ratio change for pembrolizumab in patients with advanced urothelial carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 169-177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-020-01784-w.	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Toshiki Anami, Yoshihiro Komohara, Takanobu Motoshima, Junji Yatsuda, Tomomi Kamba
2. 発表標題 High T-cell infiltration in tumor tissue predict the response to pembrolizumab in recurrent urothelial cancer
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toshiki Anami, Yukio Fujiwara, Cheng Pan, Takanobu Motoshima, Junji Yatsuda, Yoshihiro Komohara, Tomomi Kamba
2. 発表標題 Antitumor effect of naringin, a natural compound, via activating CD169-positive macrophages in lymph nodes
3. 学会等名 日本癌学会
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
研究分担者	神波 大己 (Kamba Tomomi) (20402836)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	
研究分担者	菰原 義弘 (Komohara Yoshihiro) (40449921)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	
研究分担者	杉山 豊 (Sugiyama Yutaka) (40709292)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教 (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	元島 崇信 (Motoshima Takanobu) (60726355)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教 (17401)	
研究分担者	村上 洋嗣 (Murakami Yoji) (70735703)	熊本大学・病院・助教 (17401)	
研究分担者	倉橋 竜磨 (Kurahashi Ryoma) (80867945)	熊本大学・病院大学院生命科学研究部(医)・助教 (17401)	

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