

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21901

研究課題名(和文) マイクロ電流刺激による腫瘍関連マクロファージの動態制御方法の構築

研究課題名(英文) Development of the regulation of tumor macrophages dynamics using microcurrent stimulation

研究代表者

松永 直哉 (Matsunaga, Naoya)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：10432915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究により、マイクロ電流刺激(MCS)が、体内時計の本体である時計遺伝子の発現を増加させ、崩れた睡眠覚醒の行動リズムを正常に整えることが出来るシステムを構築している。これら成果は、海外誌への掲載(BBRC, 2019)また、特許出願(特願2019-028425)、九大発ベンチャー起業の支援に至っている。申請者は新たにマイクロ電流刺激が、腫瘍の増殖に関連する、腫瘍関連マクロファージ(TAM)の動態に影響をおよぼすことを明らかにした。またPD1の発現リズム制御機構を明らかにした(Matsunaga N et al., Molecular Cancer Research 2022)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌は未だに死因1位であり、アンメットメディカルニーズの高い疾患である。近年、ノーベル賞受賞者の本庶 佑先生が開発したPD-1を標的とする癌免疫療法は、これまでの抗癌剤と比較し有効性が高いとされている。しかし、PD-1阻害剤の奏効率は単剤で20-30%であり、併用療法においても30-50%とまだまだ改善の余地が残る。また治療中に起こる免疫活性化に関連する副作用は、体内における半減期が長い抗体医薬品では、コントロールしにくい点も注目されている。そこで本研究ではマイクロ電流刺激による新たな癌免疫療法の開発につながった。現在、ベンチャー企業を立ち上げ臨床応用に向けた取り組みに進んでいる。

研究成果の概要(英文)：Previous research has shown that microcurrent stimulation (MCS) can increase the expression of clock genes, the body's internal clock, and normalize the disrupted sleep-wake behavioral rhythm.

The company is building a system that can These results have been published in an overseas journal (BBRC, 2019), a patent application (Patent Application 2019-028425), and support for a Kyushu University venture start-up. The applicant has newly demonstrated that microcurrent stimulation affects the dynamics of tumor-associated macrophages (TAMs), which are associated with tumor growth. They also revealed a mechanism for the rhythmic regulation of PD1 expression (Matsunaga N et al., Molecular Cancer Research 2022).

研究分野：医療機器開発

キーワード：マイクロ電流 体内時計 PD-1 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

癌は未だに死因 1 位であり、アンメットメディカルニーズの高い疾患である。近年、ノーベル賞受賞者の本庶 佑先生が開発した PD-1 を標的とするがん免疫療法は、これまでの抗がん剤と比較し有効性が高いとされている。しかし、PD-1 阻害剤の奏効率は単剤で 20-30% であり、併用療法においても 30-50% とまだまだ改善の余地が残る。また、治療中に起こる免疫活性化に関連する副作用は、体内における半減期が長い抗体医薬品では、コントロールしにくい点も注目されている。そこで本研究では、新たな視点からとして、生体の免疫機能を制御する体内時計機構と、申請者が発明した簡便さを備えた体内時計を活性化するマイクロ電流刺激装置を用い、新たながん免疫療法が出来ないか否か検証する。癌免疫に関するマイクロ電流刺激の影響について基礎研究を積み重ね、臨床応用を目指す。

2. 研究の目的

申請者は、これまでに体内時計を基盤に、癌の病態を様々な視点から解析し、がんの新たな治療方法を世界に提案してきた (Cancer Res 2018, 2017, 2014, 2013, 2012, 2010、抗炎症薬：国内外特許出願、企業導出済み)。体内時計は、地球の自転に伴う環境変化に生体が適応するために 35 億年前から備わっている「生体の恒常性維持機構」であり、イオンタンパク質-細胞-組織-臓器-生体に至る生体機能を「階層的」に制御している。体内時計の視点から癌の病態を解析すると、癌細胞の増殖、分化、転移など様々な機能に関与していることを明らかにし、既存の抗がん剤を最適な投薬時刻に投与することで、効果の増強、副作用の軽減が可能となった。また、マウスおよびヒトの免疫細胞の数や機能にも日周リズムが認められ、臨床では、これらリズムを考慮し試験的に抗がん剤の至適投与(時間治療)が行われ、成果が上がっている(NHK取材)。すなわち生体、特に癌の免疫機構についてより簡便にコントロールできるようなシステム(最適なマイクロ電流刺激と処置タイミング)を構築できれば、がんの免疫療法をより安全に効果的に実施できるかもしれない。そこで本研究では、3つの研究**研究1)**腫瘍マクロファージのPD-1発現リズム機構解析、**研究2)**腫瘍マクロファージに発現するPD-1発現リズムに及ぼす、マイクロ電流刺激の影響解析、**研究3)**腫瘍移植マウスを対象とした、マイクロ電流刺激の至適タイミング解析を実施し、システム構築を目指す。

3. 研究の方法

研究方法・計画

研究1) 腫瘍マクロファージのPD-1発現リズム機構解析

申請者は、腫瘍から単離した腫瘍マクロ

ファージのPD-1発現に、日周リズムがあることを世界で初めて証明した。しかし、この日周リズムの制御機構は不明である。そこで、PD-1発現の日周リズムの制御機構を解析する。PD-1のプロモーターをコンピューターで解析し、制御領域に関する情報を得る。さらに、このプロモーター領域をクローニングシグナルシフェラーゼレポータープラスミドに挿入しバイオルミネセンス法を用いてリズム制御領域を同定する。同定したプロモーター領域を対象に、リアルタイムバイオルミネセンス法(経時的に発光を測定)を用い、プロモーター活性のリズムを測定する。さらに、腫瘍移植マウスから単離した腫瘍マクロファージを対象にPD-1の日周リズム転写因子Xについて、クロマチン免疫沈降法を用いて、PD-1プロモーターへの転写因子Xの結合量の日周リズムを解析する。

研究2) 腫瘍マクロファージに発現するPD-1発現リズムに及ぼす、マイクロ電流刺激の影響解析

申請者は、これまでに腫瘍から単離した腫瘍マクロファージのPD-1発現リズムを、マイクロ電流刺激することで、低下させることに成功している。しかし、このPD-1発現の日周リズムをどのようにマイクロ電流刺激が変容させるか否か不明である。そこで、研究2では、PD-1発現の日周リズムに及ぼすマイクロ電流刺激の影響の機構解明を行う。

研究1)より腫瘍マクロファージに発現するPD-1の日周リズムが転写因子Xにより制御されることが明らかとなった。そこで、転写因子Xの発現をマイクロ電流刺激が変容させるか否か検証する。腫瘍マクロファージに、マイクロ電流刺激を施し、経時的に細胞を採取し、転写因子Xの発現量をウエスタンブロットにより測定する。変化が認められた後、転写因子Xの発現リズムに及ぼすマイクロ電流刺激についても検証する。その後、転写因子Xの発現制御を研究1)と同様の手法を用い解析し、マイクロ電流刺激がどのようなシグ

ナルを介し、転写因子 X に影響を及ぼしているか検討する。

研究 3) 腫瘍移植マウスを対象とした、マイクロ電流刺激の至適タイミング解析
申請者は、これまでに正常なマウスや体内時計が変容したマウスに適切な時刻にマイクロ電流刺激を処置すると、体内時計を構成する時計遺伝子の発現を効率的に、増加させ、行動のリズムを整えることが出来た (BBRC, 2019. 特許出願)。そこで、腫瘍(ルシフェラーゼ発現 B16 メラノーマ細胞)を移植したマウスに対して、マイクロ電流刺激を腫瘍部に、6 時点 (9:00, 13:00, 17, 21:00, 1:00, 5:00) 処置する。腫瘍へ遊走される腫瘍マクロファージの数、また抗腫瘍効果を測定し、至適な電流量、および処置する至適タイミングを解析する。腫瘍マクロファージの解析は、FCM で行い、腫瘍径の測定は、In vivo イメージング装置を用いる (Cancer Res, 2018)。また、研究 1, 2 より同定した転写因子 X のマクロファージ特異的コンディショナルノックアウトマウスに、上記同様の腫瘍を移植した腫瘍移植モデルマウスを対象に、マイクロ電流刺激の効果を検証することで、転写因子 X の重要性を検証する。

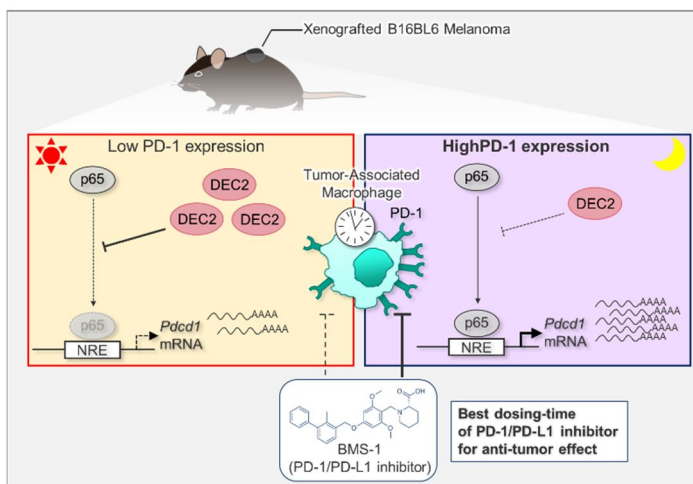
4. 研究成果

本研究では、研究 1) 腫瘍マクロファージの PD-1 発現リズム機構解析、研究 2) 腫瘍マクロファージに発現する PD-1 発現リズムに及ぼす、マイクロ電流刺激の影響解析、研究 3) 腫瘍移植マウスを対象とした、マイクロ電流刺激の至適タイミング解析の研究をおこなった。

本研究では、まず初めに腫瘍関連マクロファージ (Tumor associated macrophages ; TAMs) における PD-1 の発現リズムの制御機構を解析し、その分子機構に基づいた免疫チェックポイント阻害薬の至適投与方法について検討を行った。マウスメラノーマ様細胞 B16/BL6 担癌モデルマウスを対象に腫瘍中の TAMs に占める PD-1 陽性マクロファージ数の割合および *Pdcd1* mRNA 発現量を測定した結果、いずれにおいても明期をトラフ、暗期をピークとする概日リズムが認められ、TAMs の *Pdcd1* 発現リズムは転写レベルで制御されることを明らかにした。

そこでマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 およびマウス繊維芽細胞 NIH3T3 を用いて *Pdcd1* の転写開始点 (Transcription Start Site ; TSS) の上流 2,050 bp を対象にプロモーターアッセイを行った結果、TSS 上流 1,540 bp - 913 bp の領域が *Pdcd1* mRNA 転写リズムに重要であることが明らかとなった。また、*Pdcd1* 転写活性に及ぼす各種時計遺伝子の過剰発現の影響を検討した結果、DEC2 が *Pdcd1* の発現を抑制することを明らかにした。そこで、B16/BL6 担癌モデルマウスに対して、PD-1 発現がトラフまたはピークを示した ZT6、ZT18 に PD-1/PD-L1 inhibitor BMS-1 を腫瘍内投与したところ、ZT6 投与群と比較して ZT18 投与群でより腫瘍増殖が抑制された。

以上の結果は、2022 年に筆頭著者として Molecular Cancer Research に掲載され、TAMs に発現する PD-1 を指標とした PD-1/PD-L1 inhibitor の投与はより有用な免疫チェックポイント阻害薬の薬物治療へ応用するための新たな方策を提案した。また現在もなお、これら研究成果を基盤として研究を進めマイクロ電流による TAM の制御について解析し、成果を得ている。近い将来に論文で報告する予定である。



Reference

Tsuruta A#, Shiiba Y#, Matsunaga N#, Fujimoto M, Yoshida Y, Koyanagi S, Ohdo S. Diurnal Expression of PD-1 on Tumor-Associated Macrophages Underlies the Dosing Time-Dependent Antitumor Effects of the PD-1/PD-L1 Inhibitor BMS-1 in B16/BL6 Melanoma-Bearing Mice. Mol Cancer Res. 2022, 3;20(6):972-982.

#: Equal contribution

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 Akito Tsuruta*, Yuki Shiiba*, Naoya Matsunaga*(#: equal contribution), Marina Fujimoto, Yuya MCR-21-0786-E.2021. Yoshida, Satoru Koyanagi, Shigehiro Ohdo | 4. 巻 MCR-21-0786-E.2021. |
| 2. 論文標題 Diurnal expression of PD-1 on tumor-associated macrophages underlies the dosing time-dependent 2022年 anti-tumor effects of the PD-1/PD-L1 inhibitor BMS-1 in B16/BL6 melanoma-bearing mice | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Mol Cancer Res . | 6. 最初と最後の頁 0786-E |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-21-0786 | 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 Yuya Yoshida #, Naoya Matsunaga #(#: equal contribution), Takaharu Nakao, Kengo Hamamura, Hideaki Kondo, Tomomi Ide, Hiroyuki Tsutsui, Akito Tsuruta, Masayuki Kurogi, Michio Nakaya, Hitoshi Kurose, Satoru Koyanagi, Shigehiro Ohdo # | 4. 巻 12(1):2783. |
| 2. 論文標題 Alteration of circadian machinery in monocytes underlies chronic kidney disease-associated cardiac inflammation and fibrosis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nat Commun . | 6. 最初と最後の頁 12(1):2783. |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23050-x | 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 Takashi Ogino #, Naoya Matsunaga # (#: equal contribution), Takahiro Tanaka, Tomohito 10:e66155. Tanihara, Hideki Terajima, Hikari Yoshitane, Yoshitaka Fukada, Akito Tsuruta, Satoru Koyanagi, Shigehiro Ohdo | 4. 巻 10:e66155. |
| 2. 論文標題 Post-transcriptional repression of circadian component CLOCK regulates cancer-stemness in 2021年 murine breast cancer cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Elife . | 6. 最初と最後の頁 10:e66155. |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.66155. | 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0件

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|