

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22715

研究課題名(和文) 腫瘍随伴マクロファージを標的とした抗腫瘍免疫賦活化を制御するがん創薬

研究課題名(英文) Activation of anti-tumor immunity by targeting tumor associated macrophages

研究代表者

青木 啓将 (Aoki, Hiromasa)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・助教

研究者番号：70881845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：予備検討によりin vivoマウスモデルの腫瘍を縮小する事が明らかとなっていたM-chlorin e6を用いた光線力学療法(PDT)に対してさらなる検討を行ったところ、腫瘍組織内のがん促進的なM2-TAMの割合を減少させ、腫瘍抑制的なM1-TAMの割合を増加させることを見出した。また、M-chlorin e6 PDTによりがん細胞表面へのCRTの表出が促進され、マクロファージによる貪食の増加が確認された。以上より、M-chlorin e6 PDTはM2-TAMの減少を含む複数の経路による腫瘍免疫賦活化能を有する事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PDTは局所療法で侵襲性が低いため、次世代のがん治療法として注目されている。M2-TAMが発現するマンノースレセプターを標的とするように設計されたM-chlorin e6 PDTが直接的な抗腫瘍効果に加え、M2-TAMの減少を含む複数の経路によって腫瘍環境を抗腫瘍的に改変する能力を有する事が明らかとなった。本研究によりM-chlorin e6 PDTの有用性やPDTの腫瘍免疫賦活化剤としての新たな可能性を示すことが出来たと考える。

研究成果の概要(英文)：M-chlorin e6 PDT decreased the proportion of cancer-promoting M2-TAMs and increased the proportion of tumor-suppressing M1-TAMs in the mouse tumor tissue. In addition, M-chlorin e6 PDT promoted the expression of CRT on the surface of cancer cells and increased phagocytosis by macrophages. These results indicate that M-chlorin e6 PDT activates tumor immunity through multiple pathways, including the reduction of M2-TAMs.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：腫瘍免疫 光線力学療法 腫瘍随伴マクロファージ 腫瘍内微小環境

1. 研究開始当初の背景

腫瘍のなかには免疫細胞や線維芽細胞、血管内皮細胞など非がん細胞が多く存在し、がん進展に深く関与している。これらの細胞や環境を総称して腫瘍内微小環境 (TME) と呼ぶ。TME に存在する主要な免疫細胞である腫瘍随伴マクロファージ (TAM) は、がんの進展に対して抑制的に働く M1-TAM と促進的に働く M2-TAM に分類される。M2-TAM は TME において細胞傷害性 T 細胞 (CTL) などが担う抗腫瘍免疫を強力に抑制するだけでなく、がん細胞自身の増殖・生存を直接支えるとともに、局所の血管新生を助けることでがん進展に大きく関与する (図 1)。以上のことから、M2-TAM が TME から排除されることはがん寛容の破綻に重要であるとされている。

我々はこれまで光照射による局所的治療法である PDT に関する研究を精力的に行ってきた。我々は M2-TAM がマンノースレセプターを発現することに着目し、光感受性物質およびがん集積性を併せ持つ chlorin e6 にマンノースを連結させた mannose-conjugated chlorin e6 (M-chlorin e6) (図 2) を作製し、PDT に用いることで腫瘍マウスモデルにおける腫瘍サイズの縮小に成功している。一方で、M-chlorin e6 が TME にどのような影響を与えるかは未だ明らかになっておらず、TME の変化と腫瘍縮小との関連性も不明である。そこで本研究では、M-chlorin e6 PDT による TME 構成細胞の割合や性質の変化について詳細に解析し、抗腫瘍免疫システムの変化を明らかにすることを目的とした。

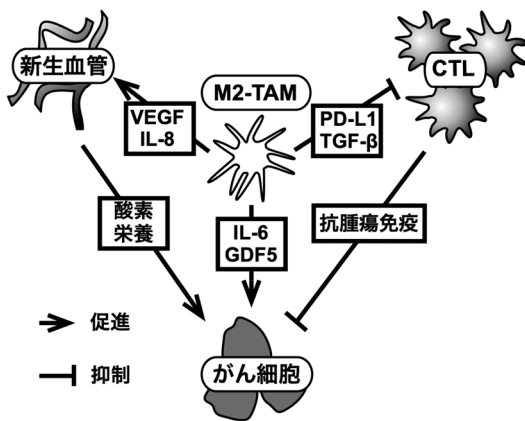


図 1: M2-TAM のがん進展における役割

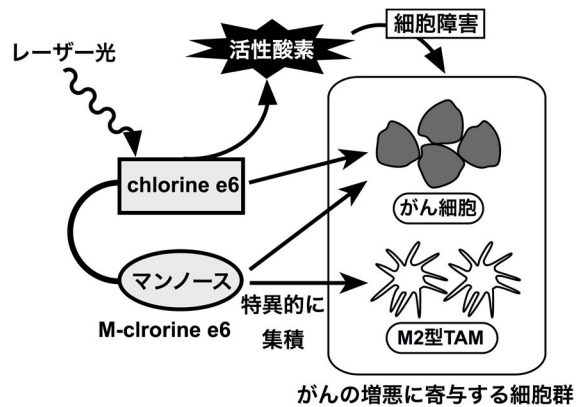


図 2: M-chlorin e6 を用いた PDT の概要

2. 研究の目的

本研究の目的は M2-TAM 障害作用を有する M-chlorin e6 PDT の腫瘍免疫賦活化能を検証し、有用性を明らかにすることである。そのため本研究では、M-chlorin e6 PDT によって、腫瘍免疫システムに深く関わりのある M1-TAM、M2-TAM、CTL および制御性 T 細胞 (Treg) の分布や機能にどのような変化が起きるかを詳細に解析し、抗腫瘍免疫システムの変化を明らかにすることを目指した。

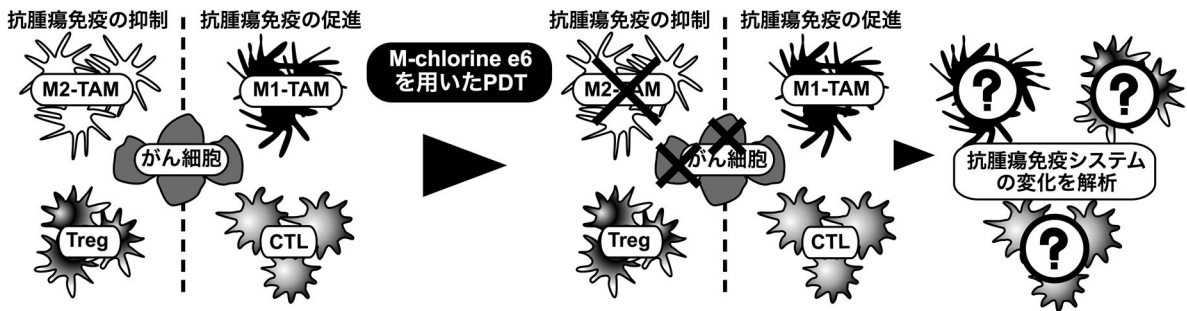


図 3: 本研究の目的

3. 研究の方法

本研究では PDT 後の腫瘍組織における M1-TAM、M2-TAM、CTL、Treg、ヘルパー T 細胞 (Th) の割合および性質の変化をフローサイトメトリーや RT-qPCR 法によって解析した。PDT のがん細胞に対する直接効果の評価は WST-8 アッセイにより行った。がん細胞における CRT の細胞表出はフローサイトメトリー解析により行った。マクロファージによるがん細胞の貪食率は共焦点顕微鏡により評価した。

#### 4. 研究成果

M-chlorin e6 は、talaporfin sodium よりも速やかに組織外に排泄され、腫瘍への集積率が高い  
TME に存在する M2-TAM や細胞膜に CD206 を高発現するがん細胞をターゲットとするため、M-chlorin e6 を作製した。M-chlorin e6 の腫瘍部位における蓄積量を、他の薬剤と比較した。その結果、既に臨床現場で用いられている talaporfin sodium は腫瘍部位への明確な集積は見られなかったが、M-chlorin e6 は glucose-conjugated chlorin e6 (G-chlorin e6) と同様に腫瘍部位に正常皮膚組織よりも高い集積性を示した。さらに、talaporfin sodium では観察時間内に完全な薬物排泄は認められなかったが、G-chlorin e6 および M-chlorin e6 は薬物投与後 6 時間までに組織からほぼ完全に排泄された。

#### M-chlorin e6 PDT は腫瘍の成長を抑制する

M-chlorin e6 PDT の治療効果を確認するために、マウス大腸がん細胞株である CT26 細胞を BALB/c マウスに皮下投与して腫瘍モデルマウスを作製した。腫瘍がある程度大きくなったところで、マウスに M-chlorin e6 を注射し、腫瘍に放射線を照射した。M-chlorin e6 PDT 後、2 週間腫瘍の成長を観察した。その結果、M-chlorin e6 PDT 群では、コントロール群に比べ腫瘍体積が有意に減少した。さらに、M-chlorin e6 PDT 群では、腫瘍重量がコントロール群に比べ有意に減少していることを確認した。

#### M-chlorin e6 PDT は M2-TAMs を選択的に損傷する

次に、フローサイトメトリー分析を用いて、TME における M2-TAM の割合を決定した。腫瘍モデルマウスに M-chlorin e6 PDT を施行し、2 日後に腫瘍を摘出し、解析を行った。M-chlorin e6 PDT 群における全腫瘍組織細胞中の CD11b<sup>+</sup>細胞の割合は、コントロール群と同等であった。また、本研究で CD11b<sup>+</sup>、CD80<sup>-</sup>または CD86<sup>-</sup>、CD206<sup>-</sup>と定義した M0-TAMs の割合は、M-Chlorin e6 PDT 群でコントロール群に比べ増加した。さらに、M1-TAM (CD11b<sup>+</sup>、CD80<sup>+</sup> or CD86<sup>+</sup>、CD206<sup>-</sup>) の割合は、コントロール群に比べ PDT 群で増加した。また、M2-TAM (CD11b<sup>+</sup>、CD206<sup>+</sup>) の割合が、コントロール群に比べ PDT 群で減少した。FACSAria を用いて分取した TAM (CD11b<sup>+</sup>) における M1 マーカー (iNOS、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ ) および M2 マーカー (Arginase、TGF- $\beta$ 、IL-10) の遺伝子発現量を RT-qPCR により評価した。代表的な M1 マーカーである iNOS の発現が増加する傾向が見られたが、両群間において iNOS 含め解析した全ての遺伝子発現に有意差は認められなかった。また、M-chlorin e6 PDT 群における CTL および Treg の割合は、コントロール群と同等であった。

#### M-chlorin e6 PDT はがん細胞に直接的に障害を与える

M-chlorin e6 と G-chlorin e6 を用いた PDT が、がん細胞に直接障害を与えるかどうかを WST-8 アッセイにより検討した。その結果、M-chlorin e6 PDT は、G-chlorin e6 PDT と同程度に CT26 細胞の数を減少させた。また、M-chlorin e6 の IC<sub>50</sub> 値は、G-chlorin e6 の IC<sub>50</sub> 値とほぼ同等であることが明らかとなった。さらに M-chlorin e6 PDT は、ヒト大腸がん細胞株である HCT116 細胞に対しても細胞毒性を示した。

#### M-chlorin e6 PDT は、がん細胞の細胞表面の calreticulin (CRT) を増加させ、マクロファージによるがん細胞の貪食を活性化させる

以降は M-chlorin e6 PDT 処理によってがん細胞が貪食を受けやすくなるのではないかとの仮説を元に実験を進めた。M-chlorin e6 PDT で処理したがん細胞の CRT の細胞表面への表出をフローサイトメトリーで解析した。CRT の蛍光強度は、コントロール群に比べ PDT 群で有意に増加した。続いて M-chlorin e6 PDT がマクロファージによるがん細胞の貪食を促進するかどうかを検討するため、M-chlorin e6 PDT 処理した CT26 細胞とマウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 を共培養した。共培養 24 時間後、PDT 群ではコントロールと比較して貪食の割合が有意に高かった。

#### M-chlorin e6 PDT は CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>マクロファージの比率を増加させる

24 時間の共培養後、CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> RAW264.7 細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。その結果、CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>細胞の割合は、コントロール群に比べ PDT 群で有意に高かった。

#### 総括

M-chlorin e6 PDT が腫瘍組織内におけるがん促進的な M2-TAM の割合を減少させ、がん抑制的な M1-TAM の割合を増加させることを見出した。一方で、PDT 後の腫瘍組織内の細胞障害性 T 細胞や制御性 T 細胞の割合には変化が見られなかった。PDT 後の時間経過で結果が変わってくる可能性を考慮し、今後さらなる検討を行う必要がある。また、M-chlorin e6 PDT によりがん細胞表面の CRT の表出が促進され、マクロファージによる貪食の増加が確認された。以上より、

M-chlorin e6 PDT は直接的ながん細胞障害作用に加え、M2-TAMs の減少を含む複数の経路による腫瘍免疫賦活化能を有する事が明らかとなった。

## 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 3件）

1. 著者名 Kimura Yuka, Aoki Hiromasa, Soyama Tatsuki, Sakuragi Akira, Otsuka Yuto, Nomoto Akihiro, Yano Shigenobu, Nishie Hirotsada, Kataoka Hiromi, Aoyama Mineyoshi	4. 巻 39
2. 論文標題 Photodynamic therapy using mannose-conjugated chlorin e6 increases cell surface calreticulin in cancer cells and promotes macrophage phagocytosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Oncology	6. 最初と最後の頁 82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12032-022-01674-3	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 Kihara Toshie, Toriuchi Kohki, Aoki Hiromasa, Kakita Hiroki, Yamada Yasumasa, Aoyama Mineyoshi	4. 巻 27
2. 論文標題 Interleukin-1 enhances cell adhesion in human endothelial cells via microRNA-1914?5p suppression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101046 ~ 101046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.101046	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 Kondo Takao, Aoki Hiromasa, Otsuka Yuto, Kawaguchi Yohei, Waguri-Nagaya Yuko, Aoyama Mineyoshi	4. 巻 149
2. 論文標題 Insulin-like growth factor 2 promotes osteoclastogenesis increasing inflammatory cytokine levels under hypoxia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 93 ~ 99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2022.03.007	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 Kondo Takao, Otsuka Yuto, Aoki Hiromasa, Goto Yoh, Kawaguchi Yohei, Waguri-Nagaya Yuko, Miyazawa Ken, Goto Shigemi, Aoyama Mineyoshi	4. 巻 191
2. 論文標題 The Inducible Nitric Oxide Synthase Pathway Promotes Osteoclastogenesis under Hypoxic Culture Conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 2072 ~ 2079
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2021.08.014	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 Mizuguchi Ken, Aoki Hiromasa, Aoyama Mineyoshi, Kawaguchi Yohei, Waguri-Nagaya Yuko, Ohte Nobuyuki, Asai Kiyofumi	4. 巻 404
2. 論文標題 Three-dimensional spheroid culture induces apical-basal polarity and the original characteristics of immortalized human renal proximal tubule epithelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112630 ~ 112630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2021.112630	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 Soyama Tatsuki, Sakuragi Akira, Oishi Daisuke, Kimura Yuka, Aoki Hiromasa, Nomoto Akihiro, Yano Shigenobu, Nishie Hirotsada, Kataoka Hiromi, Aoyama Mineyoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Photodynamic therapy exploiting the anti-tumor activity of mannose-conjugated chlorin e6 reduced M2-like tumor-associated macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 101005 ~ 101005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2020.101005	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大塚勇斗、後藤洋、青木啓将、永谷裕子、宮澤健、後藤滋巳、青山峰芳
2. 発表標題 非破骨細胞でのケモカインとIGF2の発現上昇を介して、IL-1 は破骨細胞の形成を促進する
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大塚勇斗、後藤洋、青木啓将、永谷裕子、宮澤健、後藤滋巳、青山峰芳
2. 発表標題 IL-1 enhances osteoclastogenesis by upregulating the expressions of IGF2 and chemokines in non-osteoclastic cells
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鳥内暉暉、垣田博樹、青木啓将、田村哲也、竹下覚、山田恭聖、青山峰芳
2. 発表標題 Neuroprotective effect of hypothermia by maintaining erythropoietin expression in astrocytes
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳥内暉暉、垣田博樹、青木啓将、田村哲也、竹下覚、山田恭聖、青山峰芳
2. 発表標題 低温培養によるアストロサイトのエリスロポエチン分泌亢進を介した神経保護効果
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2021
4. 発表年 2021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

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