

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249064

研究課題名(和文) CD47-SIRP シグナルを介した癌細胞免疫回避機構の解明とその制御法の開発

研究課題名(英文) The CD47-SIRPa signaling blockade accelerates macrophage phagocytic activity against cancer cells

研究代表者

大段 秀樹 (Ohdan, Hideki)

広島大学・医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号：10363061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,100,000円、(間接経費) 11,130,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞が生体防御機構を掻い潜り免疫抑制環境を構築する機構として、CD47-阻害受容体シグナル制御蛋白(SIRP)におけるシグナル伝達の有意性を解明した。すなわち、マクロファージのSIRPが腫瘍に発現するCD47を認識し貪食活性を減弱することが証明された。また、抗SIRP抗体によりシグナルを遮断すると、マウス同種同系in vitroおよびin vivoモデルにおいて有意なマクロファージの貪食能が亢進し、抗腫瘍効果を確認し得た。さらに、大腸癌自然発生マウスモデルにおいて、抗SIRP抗体が癌の発生・増殖を抑制可能である事が確認された。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether inhibition of CD47-SIRPa signaling increases macrophage phagocytic activity against cancer cells by using in vitro and in vivo mouse syngeneic models. CD47 knock down Hepa1-6 cells were significantly more sensitive to macrophage phagocytosis than parental Hepa1-6 cells in both of in vitro and in vivo phagocytosis assays, indicating the pivotal role of CD47-SIRPa interaction in restricting tumor cell killing. Addition of anti-SIRPa mAbs markedly enhanced the phagocytic activity of peritoneal cavity macrophage against Hepa1-6 and CMT93 compared with the isotype-matched Ab treatment in both of the in vitro and in vivo phagocytosis assays. Thus, our results suggest that CD47-SIRPa signaling interaction is a therapeutic target for inhibiting the growth of cancer cells.

研究分野：腫瘍免疫

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：腫瘍免疫 免疫回避

1. 研究開始当初の背景

ブタをドナーとする異種臓器移植では、ブタ細胞上に表出する Gal 1,3Gal(Gal)糖鎖抗原がヒトマクロファージ、ナチュラルキラー(NK)細胞、B細胞の標的となり、激しい拒絶反応を被る。近年、Gal 合成酵素遺伝子をノックアウトしGal 抗原を欠いたブタが作製されて以来、異種移植の臨床応用に現実性が増してきた。しかし、Gal を除去したブタ細胞に対しても、ヒトマクロファージは、なお激しい貪食能を示すことや、ブタ細胞上に表出する糖脂質 N-グリコシルノイラミン酸(NeuGc)が抗体性拒絶の標的になりうることを我々は解明した。さらに、マクロファージ、NK 細胞、B 細胞に表出する阻害受容体シグナル制御蛋白 (SIRP)が、ブタ細胞上に表出するインテグリン関連蛋白質(CD47 分子)を認識できず免疫カスケードが促進され、異種細胞が激しい拒絶応答を被ることを明らかにした。これらの免疫応答は、ブタ細胞にヒト CD47 分子を遺伝子導入することで、SIRP を介してヒトマクロファージに抑制シグナルが伝達され拒絶を回避できることが明らかとなった。

一方、癌細胞は、異好性抗原として異種細胞と共通の糖脂質 (N-グリコシル型シアル酸) を表出しているにも関わらず、CD47-SIRP シグナル伝達による抑制機構によって免疫回避している可能性を我々は確認した。また、抗 CD47 や抗 SIRP ブロッキング抗体の存在下では、ヒト肝癌細胞や乳癌細胞がヒトマクロファージに激しく貪食され、あるいはヒト NK 細胞による傷害を被ることを確認した。この現象は、CD47-SIRP シグナルを介した自己寛容機構は、癌細胞表面に表出する特異的分子を標的とする免疫応答に対する抑制機構と関わる可能性を示唆する。

2. 研究の目的

本研究では、癌細胞が生体防御機構を掻い潜り免疫抑制環境を構築する機構として、CD47-SIRP シグナル伝達の有意性を解明し、その制御により分子標的治療や細胞療法の効果を増強する新規抗腫瘍治療戦略を開発することである。

3. 研究の方法

研究は、以下のように実施した。

ヒト消化器癌細胞株の CD47 発現多様性の評価および肝内マクロファージによる貪食能評価

インテグリン関連タンパク質、CD47 の発現強度は、組織や細胞種によって異なる。ヒト消化器癌細胞株(肝癌: Huh-7 および HepG2、胃癌: MKN28、胆管癌: TFK-1、大腸癌: HCT116)について、CD47 表出をフローサイトメトリー(FCM)で定量した。また、健康人ボランティア末梢血中における各種免疫担当細胞上の

SIRP 表出強度を解析した。

同種同系腫瘍移入マウスモデルを用いた腫瘍細胞 CD47 発現多寡によるマクロファージ抗腫瘍活性能の評価

腫瘍細胞の生着モデルとして異種移植モデルが汎用されるが、免疫不全マウスといえども既知及び未知の異種抗原が標的となり、癌細胞の免疫回避機構は再現し得ない。そこで本研究では、腫瘍と宿主が同種同系であるモデルシステムを確立した。すなわち、C57/BL6J(B6)マウスと同系の2種類の腫瘍株(CMT93:大腸癌、Hepa1,6:肝臓癌)を用いて、B6 マウス腹腔内(PerC)マクロファージによる抗腫瘍効果を *in vitro* および *in vivo* 貪食試験で評価した。また、sh-RNA transfection 法により CD47 遺伝子をノックダウンした Hepa1-6 および CMT93 を標的として行った。*In vitro* 貪食試験では、B6 マウスの腹腔内マクロファージを採取後ディッシュで2時間培養し接着性細胞をマクロファージとして回収した。腫瘍株は CFSE 色素で蛍光標識して、マクロファージとともに混合培養し、4時間後に細胞を回収して F4/80(マクロファージマーカー)と CFSE の蛍光強度についてフローサイトメトリーを用いて解析し、貪食能を評価した。*In vivo* 貪食試験では、CFSE 色素標識した各腫瘍細胞株を B6 マウス腹腔内に移入し、4時間後に腹腔内細胞を採取し、*in vitro* 試験と同様にフローサイトメトリーによる解析を行った

同種同系腫瘍移入マウスモデルを用いた抗 CD47 抗体、抗 SIRP 抗体による *in vivo* 抗腫瘍抑制効果の解析

CD47 分子あるいは SIRP を標的としたブロッキング抗体を用いて、*in vitro*でのマクロファージ貪食能に与える影響について解析した。さらに、同種同系マウスモデルを用いて、抗 CD47 抗体、抗 SIRP 抗体投与が、肝癌細胞株(Hepa1-6)や大腸癌細胞株(CMT93)の腹腔内移入におけるマクロファージ貪食への増強効果があるかを評価した。

大腸癌自然発生マウスモデルを用いた抗 SIRP 抗体による免疫細胞治療の腫瘍制御効果解析

マウス大腸上皮細胞で特異的に転写活性をもつ CDX2 のプロモーター領域(CDX2P)の下流に Cre recombinase 遺伝子を結合させたトランスジェニックマウス CDX2P-Cre を作製した。CDX2P-Cre マウスを APC のエクソン 14 を loxP によって挟まれた染色体をもつ遺伝子改変マウス ApcloxP と交配してできたコンディショナルノックアウトマウス CDX2P-Cre;Apc+/loxP (CPC;Apc)では、大腸に多数のポリープが認められ、生後数ヶ月後

には浸潤癌になることが観察できる。この CPC;Apc マウスを用い、抗 SIRP 抗体の投与が腫瘍増勢に如何に影響するか解析した。

4. 研究成果

ヒト消化器癌細胞株の CD47 発現多様性の評価および肝内マクロファージによる貪食能評価

CD47 発現は、癌種によって多様性に富むことがわかった(図1)。また、末梢血免疫細胞で SIRP を表出する細胞群を解析したところ、全マクロファージおよび樹状細胞で SIRP の表出を認めた。B 細胞では、B-1 細胞亜群(CD11b⁺CD19⁺)に SIRP の高発現を認め、NK 細胞では一部の CD56^{dim} 細胞に発現を認めた。

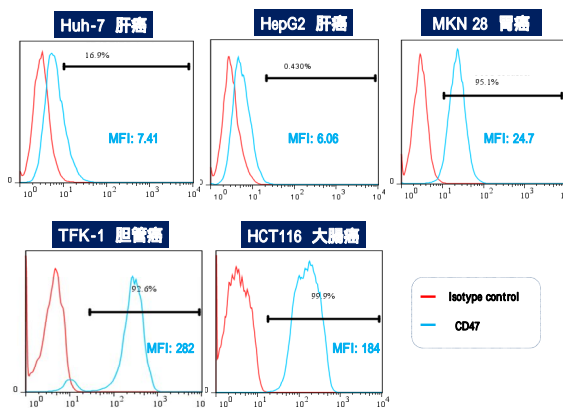


図1. ヒト各癌細胞株の CD47 の表出強度。

同種同系マウスモデルを用いた腫瘍細胞 CD47 発現多寡によるマクロファージ抗腫瘍活性能の評価

マウス腫瘍株の CD47 発現を解析した結果、CMT93 が CD47 高発現株である一方、Hepa1,6 は CD47 中発現株であることが分かった(図2)。

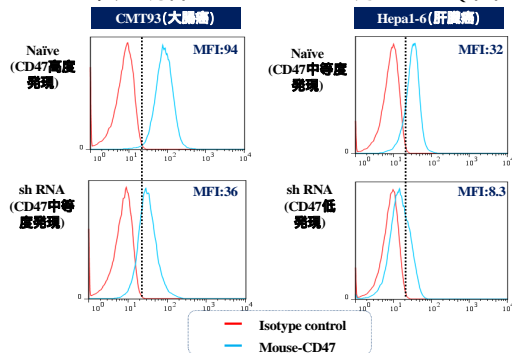


図2. マウス各癌細胞株の CD47 の表出強度。

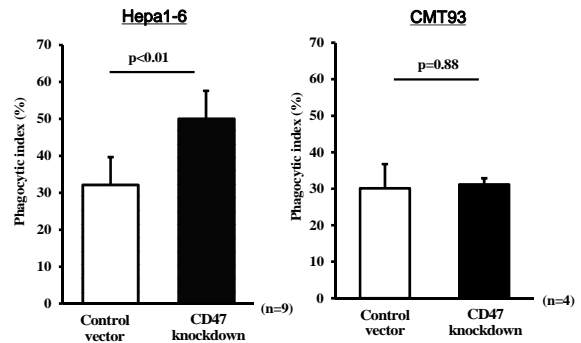


図3. sh-RNA transfection 法による癌細胞 CD47 遺伝子ノックダウン株に対するマクロファージ貪食活性の変化。左: Hepa1-6, 右: CMT93

次に、各細胞株に対する腹腔内マクロファージの抗腫瘍活性を貪食能試験で評価した。Hepa1-6 は、CD47 ノックダウン (CD47-KD) によってマクロファージによる貪食活性の有意な増強を確認した(図3)。一方で、CMT93 は CD47-KD によっても CD47 発現が中等度に維持され、有意な貪食亢進は認めなかった(図3)。In vivo の貪食試験においても、同様に CD47 発現を抑制することで抗腫瘍効果の増強を認めた。

同種同系腫瘍移入マウスモデルを用いた in vivo 抗腫瘍抑制効果および抗 CD47 抗体、抗 SIRP 抗体による分子標的治療および免疫細胞治療の効果の解析

抗 SIRP 抗体投与は、in vitro, in vivo 実験ともにマクロファージの腫瘍貪食活性の増強を認めた。抗 CD47 抗体で処理した癌細胞は、マクロファージによる貪食能を強く受けたが、マクロファージ自体が抗 CD47 抗体と結合する状況下では、貪食の亢進は認められなかった。(図4)。

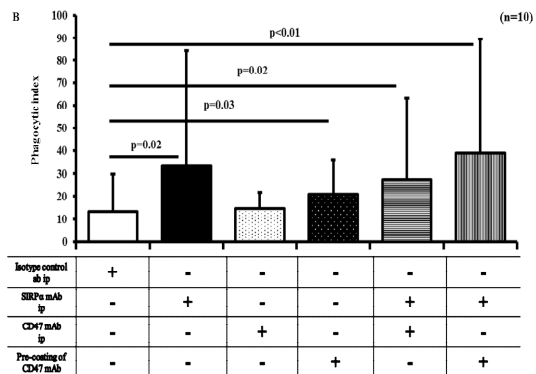


図4. 同種同系腫瘍移入マウスモデルを用いた抗 CD47 抗体、抗 SIRP 抗体による in vivo 抗腫瘍抑制効果の解析。

SIRP はマクロファージなど骨髄系や一部の細胞にのみ発現しているが、CD47 はほぼすべての生体細胞に発現している。したがって、抗 CD47 抗体を生体に投与する場合、腹腔内マクロファージにも CD47 は結合する。その結果、Rac/Cdc42 の活性化および Src リン酸化あるいはチロシンキナーゼリン酸化を介してマクロファージの遊走・貪食能に影響を与えた可能性が考えられる。そこで、抗 CD47 抗体によるマクロファージの遊走能に与える影響についてトランスウェルを用いた migration assay system を用いて評価した。トランスウェル上層のマクロファージは、下層での癌細胞の有無にかかわらず抗 CD47 抗体の添加群でコントロールに比べ有意に遊走能の低下を認めた。抗 SIRP 抗体では、遊走能への影響は認めなかった(図5)。

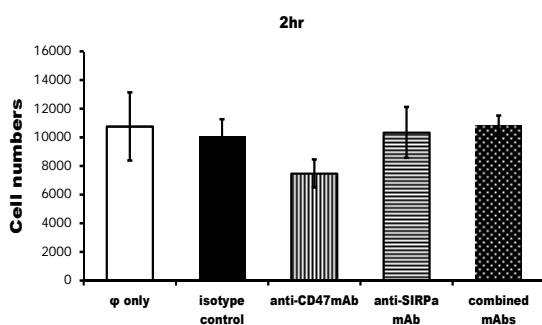


図5.トランスウェルを用いたマウス腹腔内マクロファージ migration assay

大腸癌自然発生マウスモデルを用いた抗 SIRP 抗体による免疫細胞治療の腫瘍制御効果解析

左側結腸癌モデルマウス(CPC;Apc マウス)を用い、抗 SIRP 抗体の発癌制御能を評価した。本マウスは9週齢目以降に腫瘍が自然発生する。1回/週の頻度で抗 SIRP 抗体あるいは isotype control 抗体投与を腹腔内に投与した。細径内視鏡システムを用いてマウスの肛門側から大腸内部を観察し、腫瘍個数・腫瘍径を継時的に評価した。その結果、control 抗体投与群では時間経過とともに腫瘍の総腫瘍径の増大を認める一方、抗 SIRP 抗体投与群では有意差な抑制を認めた(図6)。

以上より、抗 SIRP 抗体により CD47-SIRP シグナルを遮断することで、癌の発生・増殖を抑制可能である事が確認された。

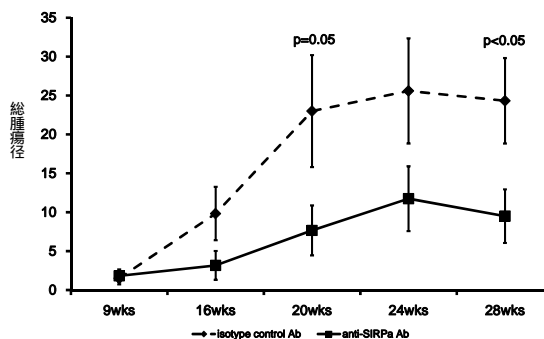


図6.大腸癌自然発生マウスモデル(Cpc/Apc マウス)を用いた抗 SIRP 抗体の腫瘍増勢に与える経時的変化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3件)

1. Kobayashi T, Ishiyama K, Ohdan H. Prevention of recurrence after curative treatment for hepatocellular carcinoma. Surg Today. 2013 Dec;43(12):1347-54. doi: 10.1007/s00595-012-0473-5. 査読有
2. Teraoka Y, Ide K, Morimoto H, Tahara H, Ohdan H. Expression of recipient CD47 on rat insulinoma cell xenografts prevents macrophage-mediated rejection through SIRP inhibitory signaling in mice. PLoS One. 2013;8(3):e58359. doi: 10.1371/journal.pone.0058359. 査読有
3. Kajitani K, Tanaka Y, Ohdan H, Arihiro K, Kataoka T. Mechanistic analysis of the antitumor efficacy of TRAIL-positive human natural killer cells. Nihon Rinsho. 2012 Sep;70 Suppl 7:208-13. Japanese. 査読無

〔学会発表〕(計 9件)

1. Tomoyuki Abe, Yuka Tanaka, Piao Jinlian, Naoki Tanimine, Kentaro Ide, Hideki Ohdan. The CD47-signaling regulatory protein alpha (SIRP) signaling blockade enhances macrophage phagocytic activity against cancer cells. 2014 World Transplant Congress. 2014.7.26 ~ 31. San Francisco, USA.
2. 安部智之、田中友加、谷峰直樹、朴金連、矢野琢也、坂井寛、佐伯吉弘、清水誠一、森本博司、平田文宏、橋本慎二、大平真裕、田原裕之、井手健太郎、石山宏平、小林剛、田代裕尊、大段秀樹. CD47-SIRP シグナル遮断によるマクロファージ抗腫瘍活性の増強. 第114回日本外科学会定期学術集会. 2014.4.3~5. 京都.
3. Tomoyuki Abe, Yuka Tanaka, Piao Jinlian, Naoki Tanimine, Kentaro Ide, Hideki Ohdan. The therapeutic targeting the CD47-signaling regulatory protein alpha

(SIRP) signaling inhibition enhances macrophage phagocytic activity against cancer cells. 第 22 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム. 2014.6.2~3. 神戸.

4 .Tomoyuki Abe, Yuka Tanaka, Piao Jinlian, Naoki Tanimine, Kentaro Ide, Hideki Ohdan. The CD47-SIRP signaling blockade accelerates macrophage phagocytic activity against hepatocellular carcinoma even under immunosuppressive conditions. 3rd ESOT Basic Science Meeting. 2013.11.3 ~5. Paris, France.

5 .Tomoyuki Abe, Yuka Tanaka, Paku Kinren, Naoki Tanimine, Kentaro Ide, Hideki Ohdan. The CD47-SIRP signaling inhibition enhances macrophage phagocytic activity against hepatocellular carcinoma. 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013.10.3~5. 横浜.

6 . 安部智之、田中友加、谷峰直樹、朴 金連、井手健太郎、佐伯吉弘、清水誠一、森本博司、平田文宏、橋本慎二、山下正博、堀田龍一、寺岡義布史、田澤宏文、石山宏平、田代裕尊、大段秀樹. CD47-SIRP シグナルを介した癌細胞免疫回避機構の解明とその制御法の開発. 第 31 回日本肝移植研究会. 2013.7.4~5. 熊本.

7 .Tomoyuki Abe, Yuka Tanaka, Piao Jinlian, Naoki Tanimine, Kentaro Ide, Hideki Ohdan. Blocking CD47-SIRP signaling promotes the phagocytic activity of macrophages against hepatocellular carcinoma. 14th American Transplant Congress. 2013.5.18 ~22. Seattle, USA.

8 . 安部智之、田中友加、谷峰直樹、朴 金連、佐伯吉弘、清水誠一、森本博司、平田文宏、橋本慎二、山下正博、堀田龍一、寺岡義布史、田澤宏文、井手健太郎、石山宏平、田代裕尊、大段秀樹. CD47-SIRP シグナルを介した癌細胞の免疫回避機構におけるマクロファージの役割. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 2013.4.11~13. 福岡.

9 .Tomoyuki Abe, Yuka Tanaka, Piao Jinlian, Naoki Tanimine, Kentaro Ide, Hideki Ohdan. Blocking CD47-SIRP signaling enhances the phagocytic activity of liver-resident macrophages against hepatocellular carcinoma. 13th American Transplant Congress. 2012.6.2~6. Boston, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大段 秀樹 (Ohdan Hideki)
広島大学 医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号：10363061

(2) 研究分担者

安井 弥 (Yasui Wataru)
広島大学 医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号：40191118

井手 健太郎 (Ide Kentaro)
広島大学 大学病院・病院助教
研究者番号：50511565

小林 孝彰 (Kobayashi Takaaki)
名古屋大学 医学系(医)研究科(研究院)・
寄附講座教授
研究者番号：70314010

田原 栄俊 (Tahara Hidetoshi)
広島大学 医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号：00271065

嶋本 顕 (Shimamoto Akira)
広島大学 医歯薬保健学研究院・准教授
研究者番号：70432713

田中 友加 (Tanaka Yuka)
広島大学 医歯薬保健学研究院・助教
研究者番号：90432666

(3) 連携研究者

()

研究者番号：