

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501336

研究課題名(和文) 解糖系をターゲットにした抗がん免疫増強療法の開発

研究課題名(英文) Development of anticancer immunoadjuvant therapy against glycolysis

研究代表者

井上 徳光 (INOUE, Norimitsu)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・研究所・部門長

研究者番号：80252708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：がん関連遺伝子の異常によって、解糖系を更新し、がんの微小環境に多量の乳酸を排出する。今回、我々は、乳酸イオンがIL-23/IL-17炎症経路を、酸性化がT細胞増殖の抑制に関わるアルギナーゼ1の発現を増強し、ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ阻害剤であるジクロロ酢酸(DCA)は、IL-23/IL-17経路の活性化とアルギナーゼ1の発現誘導の両方を抑制した。さらに、DCAは、担がんマウス個体においても、免疫状態を改善し、免疫療法の効果を増強した。今後、乳酸イオンとプロトンシグナルに関わるセンサーを同定したい。

研究成果の概要(英文)：The activation of oncogenic signaling pathways induces the reprogramming of glucose metabolism in tumor cells and increases lactic acid secretion into the tumor microenvironment. Here, we show that lactic anion and acidification increased IL-23/IL-17 pathway and arginase 1 (ARG1) expression, respectively. The IL-23/IL-17 pathway promotes inflammation in the tumor microenvironment. The overexpression of ARG1 inhibits T cell proliferation and activation. We show that dichloroacetate (DCA), an inhibitor of pyruvate dehydrogenase kinases, targets macrophages to suppress activation of the IL-23/IL-17 pathway and the expression of ARG1 by lactic acid. Furthermore, lactic acid-pretreated macrophages inhibited CD8+ T cell proliferation, but CD8+ T cell proliferation was restored when macrophages were pretreated with lactic acid and DCA. DCA increased antitumor immunotherapeutic activity in tumor-bearing mouse models. We would like to identify lactic anion and proton-responsible factors.

研究分野：腫瘍免疫と代謝

キーワード：乳酸 プロトン IL-23 IL-17 アルギナーゼ1 ジクロロ酢酸 がん免疫療法 解糖系

## 1. 研究開始当初の背景

がんの第4の治療法として免疫療法が期待され、抗チェックポイント阻害剤やペプチド療法など臨床応用に向け、活発に臨床研究や治験が行われている。しかしながら、がん患者、特に外科療法に加えて化学療法や放射線療法を必要とする患者や外科治療をすることが困難な患者においては、多くの場合、抗がん剤の影響やがんによる免疫状態の変調により、免疫状態は悪く、効果的な免疫療法を行う事を困難にしている。それ故、第4番目のがんの治療法として免疫療法を確立する為には、がん患者における免疫状態を改善する治療法を開発する事が必須である。Oftらは、がん微小環境には、炎症性疾患や自己免疫疾患の発症や増悪に深く関連する IL-23 や IL-17 などの炎症性サイトカインが多量に分泌され、がん組織に炎症を誘導する事により、がんの進展を促進している事を明らかにした(Nature 442, 461-465, 2006)。我々は、これらの炎症性サイトカインの産生を増強するがん由来物質を探索し、単なる解糖系の終末代謝産物であると考えられていた「乳酸」が、マクロファージに働き、IL-23 または未知のサイトカイン依存的にメモリーヘルパーT細胞からの IL-17 産生を強力に誘導する自然炎症メディエーターとして働く事を明らかにした (Shime, H., *J. Immunology* 2008, Yabu, M., *Intl Immunology* 2011)。がん細胞では、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常により、解糖系が亢進し、多量の乳酸が、がん微小環境に分泌されている事が知られており(Warburg 効果)、がんの治療ターゲットとして、注目されている。それ故、これらの解糖系をターゲットにした治療法は、がん細胞だけでなく、免疫細胞にも影響し、がん微小環境に引き起こされている炎症を制御し、がん患者における免疫状態を改善する可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

我々のこれまでの研究から、解糖系の終末

代謝産物である「乳酸」は、がん細胞におけるエネルギー代謝の変調 (Warburg 効果) により、がん細胞から多量にがん微小環境に分泌され、がん組織の炎症誘導に影響を与えている事が予想される。本研究では、免疫細胞への乳酸の影響を調べ、がん細胞における乳酸産生等の解糖系を制御する事により、担がん状態における免疫状態を改善し、効果的な免疫療法を行う事ができる環境を作る事ができるかどうかを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) MHC クラス II に提示されたオプアルブミンペプチドを認識する T細胞受容体を発現する OT-II マウスの脾臓細胞や骨髄由来マクロファージを用いて、乳酸による IL-23/IL-17 経路やアルギナーゼ 1 産生の増強に対する解糖系に影響を与える薬剤の影響を調べた。

(2) オプアルブミンを発現する EG7 腫瘍やメラノーマ腫瘍細胞を移植したマウスモデルを用いて、ジクロロ酢酸 (DCA: ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ阻害剤) を経口投与して、担がん個体における免疫状態の評価を行った。さらに、Poly(I:C)による免疫治療に対する DCA の影響を調べた。

(3) 乳酸イオンおよびプロトンシグナル経路を明らかにするために、IL-23p19 遺伝子のプロモーター領域を調べた。

## 4. 研究成果

(1) IL-23 や IL-17 産生は、乳酸イオンにより増強されたが、アルギナーゼ 1 の発現は、プロトンによって増強された。

(2) これらの異なる作用機序による発現増強は、驚くべき事に共に DCA によって、濃度依存的に抑制された。

(3) プロトンは、骨髄由来マクロファージを T細胞の増殖を抑制するマクロファージに変換した。また、この抑制性マクロファージへの誘導は、DCA によって抑制された。

(4) DCA は、インターフェロン 産生 CD8 陽性 T細胞や NK細胞を増加した。さらに、DCA

は、Poly(I:C)による免疫療法の効果を増強した。

(5) IL23p19 遺伝子上流のプロモータ領域 2.6kbp に、乳酸に応答する領域を2カ所同定した。今後、さらに解析を進め、乳酸及び酸に応答する因子を同定したい。

#### 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10件)

1. Inoue, N., Akazawa, T. IL17A (interleukin 17A) Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology 19(1) 18-27, 2015  
DOI: 10.4267/2042/5537
2. Akazawa, T. Ohashi, T., Nakajima, H., Nishizawa, Y., Kodama, K., Sugiura, K., Inaba, T. and Inoue, N. Development of a dendritic cell-targeting lipopeptide as an immunoadjuvant that inhibits tumor growth without inducing local inflammation. *Int. J. Cancer* 135(12) 2847-2856, 2014  
DOI: 10.1002/ijc.28939
3. Kodama, K. Higashiyama, M., Okami, J., Tokunaga, T., Fujiwara, A., Inoue, N., Akazawa, T. and Seya, T. A possible abscopal effect of post-irradiation immunotherapy in two patients with metastatic lung tumors. *Int. Cancer Conf. J.* 3(2) 122-127, 2014  
DOI: 10.1007/s13691-013-0130
4. Chiyonobu, T., Inoue, N., Morimoto, M., Kinoshita, T., Murakami, Y., Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor deficiency caused by mutations in PIGW is associated with West syndrome and hyperphosphatasia with mental retardation syndrome. *J Med Genet.* 51(3) 203-207, 2014

DOI: 10.1136/jmedgenet-2013-102156.

5. Wijewardana, V., Sugiura, K., Yahata, M., Akazawa, T., Wijesekera, D. P. H., Imamoto, S., Hatoya, S., Inoue, N., and Inaba, T. Production of canine soluble CD40 ligand to induce maturation of monocyte derived dendritic cells for cancer immunotherapy. *Veterinary immunology and immunopathology* 156 (1-2) 121-127, 2013  
DOI: 10.1016/j.vetimm.2013.09.016.
6. Kuki, I., Takahashi, Y., Okazaki, S., Kawawaki, H., Ehara, E., Inoue, N., Kinoshita, T, and Murakami, Y. Vitamin B6-responsive epilepsy due to inherited GPI deficiency. *Neurology* 81(16) 1467-1469, 2013  
DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182a8411a.
7. Ohashi, T., Akazawa, T., Aoki, M., Kuze, B., Mizuta, K., Ito, Y. and Inoue, N. Dichloroacetate improves immune dysfunction caused by tumor-secreted lactic acid and increases antitumor immunoreactivity *Int. J. Cancer* 133 1107-1118, 2013  
DOI: 10.1002/ijc.28114
8. Horiuchi, T., Ohi, H., Ohsawa, I., Fujita, T., Matsushita, M., Okada, N., Seya, T., Yamamoto, T., Endo, Y., Hatanaka, M., Wakamiya, N., Mizuno, M., Nakao, M., Okada, H., Tsukamoto, H., Matsumoto, M., Inoue, N., Nonaka, M. and Kinoshita, T. Guideline for Hereditary Angioedema (HAE) 2010 by the Japanese Association for Complement Research. *Allergology International* 61 (4) 559-562 2012  
DOI: 10.2332\_allergolint.12-RAI-0471
9. Shime, H., Matsumoto, M., Oshiumi, H., Tanaka, S., Nakane, A., Iwakura, Y.,

Tahara, H., Inoue, N. and Seya, T. Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (6) 2066-2071, 2012  
DOI: 10.1073/pnas.1113099109

10. Murakami, Y., Inoue, N., Shichishima, T., Ohta, R., Noji, H., Maeda, Y., Nishimura, J., Kanakura, Y. and Kinoshita, T. Deregulated expression of *HMG2* is implicated in clonal expansion of PIGA deficient cells in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Brit. J. Haematology* 156 (3), 383-387 2012  
DOI: 10.1111/j.1365-2141.2011.08914.x

[学会発表](計 21 件)

1. 井上徳光, 赤澤隆 Analyses of lactate anion and proton signaling pathways in immune cells 第43回日本免疫学会学術集会 2014. 12 (京都)
2. 井上徳光 Development of CR4-targeting anti-tumor immunoadjuvant. XXV International Complement Workshop. 2014.Sep (Rio de Janeiro, Brazil)
3. 赤澤隆, 井上徳光 がん細胞の微生物成分修飾とワクチン応用 第 73 回日本癌学会学術総会 2014. 9 (横浜)
4. 井上徳光, 赤澤隆 がん微小環境における高乳酸が免疫応答にもたらす影響 第 51 回補体シンポジウム 2014. 8 (神戸)
5. 井上徳光, 大橋敏充, 赤澤隆 がんから放出される乳酸による免疫炎症応答の制御機構 第 2 回がん代謝研究会 2014. 7 (東京)
6. 井上徳光, 大橋敏充, 赤澤隆 乳酸によるがん微小環境における免疫炎症応答の制御機構 第 18 回日本がん免疫学会総会 2014. 7 (松山)
7. Viskam Wijewardana, Sugiura K., Akazawa T., Dalthgamage-Pathy Wijesekera,

Imamoto S., Inoue N., Inaba T. Improvement of dendritic cell-based immunotherapy for enhancing systemic immune responses against cancer. 第 42 回日本免疫学会 2013.12 (幕張)

8. 赤澤隆, 大橋敏充, 井上徳光 アジュバントの人工設計:樹状細胞標的化リポペプチドは局所炎症を起こさない理想的なアジュバントとして働く 第 72 回日本癌学会学術総会 2013.10 (横浜)
9. 井上徳光, 大橋敏充, 青木光広, 久世文也, 水田啓介, 伊藤八次, 赤澤隆 乳酸は免疫制御メディエーターである. 第 1 回がん代謝研究会 2013.10 (鶴岡)
10. 井上徳光, 赤澤隆 低侵襲性抗がん免疫アジュバント .BioJapan2013 World Business Forum 2013. 10 (横浜)
11. 赤澤隆, 井上徳光 CR4 サブユニットを標的とした抗がん免疫アジュバント 第 50 回補体シンポジウム 2013. 7 (旭川)
12. 大橋敏充, 赤澤隆, 青木光広, 久世文也, 水田啓介, 伊藤八次, 井上徳光 ジクロロ酢酸は乳酸による免疫変調状態を改善し、抗腫瘍免疫応答を増強する. 日本耳鼻咽喉科学会総会 2013. 5 (札幌)
13. Inoue N., T Ohashi, M Aoki, B Kuze, K Mizuta, Y Ito, T Akazawa, Dichloroacetate acts on myeloid cells to suppress IL-23/IL-17 pathway activation and arginase 1 expression caused by tumor-secreted lactic acid. Tumor Metabolism meets Immunology 2013. 4 (Regensburg, Germany)
14. Inoue N., Akazawa T. Analysis of the signaling pathway activated by lactic acid. 第 41 回日本免疫学会学術集会 2012.12 (神戸)
15. Inoue N., Ohashi T., Akazawa T. Effect of regulation of glycolysis on tumor inflammation and immunestatus. XXIV

international complement workshop  
2012.10 (Crete, Greece)

16. 赤澤隆, 大橋敏充, 井上徳光 抗がんアジュバントの人工設計: 樹状細胞標的化能を持つトル様受容体 2 リガントの開発. 第 71 回日本癌学会 2012. 9 (札幌)
17. 大橋敏充, 井上徳光, 赤澤隆 がんの微小環境における解糖系の制御は、抗がん免疫状態を改善する. 第 71 回日本癌学会 2012. 9 (札幌)
18. 大橋敏充, 井上徳光, 赤澤隆 腫瘍における乳酸の制御は、抗腫瘍免疫応答を増強する. 第 49 回補体シンポジウム 2012. 8(大阪)
19. 赤澤隆, 大橋敏充, 井上徳光 免疫細胞標的化トル様受容体 2 リガントの人工設計と抗がんアジュバントへの応用. 第 16 回日本がん免疫学会 2012. 7 (札幌)
20. 井上徳光, 大橋敏充, 赤澤隆 乳酸シグナル経路制御による抗がん免疫増強. 第 16 回日本がん免疫学会 2012. 7 (札幌)
21. 大橋敏充, 青木光広, 久世文也, 水田啓介, 伊藤八次, 井上徳光 腫瘍における乳酸産生の抑制は、抗腫瘍免疫応答を増強する. 第 113 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2012.5 (新潟)

〔図書〕(計 4 件)

1. Inoue, N. and Kinoshita, T. Map5: Biosynthetic Pathway of GPI-anchor. In: Taniguchi, N., Honke, K., Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y. and Angata, T. (Ed.) *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*: SpringerReference, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1687-1691 2013  
DOI: 10.1007/SpringerReference\_366652  
2013-05-09 02:10:01 UTC
2. Kinoshita, T. and Inoue, N. GPI mannose extension (PIGM, PIGV, PIGB, PIGZ) In: Taniguchi, N., Honke, K.,

Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y. and Angata, T. (Ed.) *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*: SpringerReference, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1209-1220 2013

DOI: 10.1007/SpringerReference\_332127  
2013-04-16 17:28:14 UTC

3. Inoue, N., Murakami, Y. and Kinoshita, T. Glycosylphosphatidylinositol-N-acetylglucosaminyltransferase (GPI-GlcNAc transferase): A complex comprised of PIGA, PIGC, PIGH, PIGQ, PIGP, PIGY and DPM2. In: Taniguchi, N., Honke, K., Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y. and Angata, T. (Ed.) *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*: SpringerReference, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1193-1208 2013

DOI: 10.1007/SpringerReference\_332126  
2013-04-16 05:20:16 UTC

4. 井上徳光 乳酸による IL-23/UL-17 産生誘導と免疫制御 科学評論社、臨床免疫・アレルギー、60(6) 2013.12. 581-588

〔産業財産権〕  
出願状況(計 1 件)

名称: 新規人工設計リポペプチド  
発明者: 赤澤隆・井上徳光  
権利者: 地方独立行政法人大阪府立病院機構  
種類: 特願  
番号: 2014-508043  
出願年月日: 2014 年 9 月 12 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.mc.pref.osaka.jp/laboratory/department/shuyou/>

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
井上 徳光 (INOUE, Norimitsu)  
地方独立行政法人大阪府立病院機構  
大阪府立成人病センター研究所  
腫瘍免疫学部門 部門長  
井上 徳光  
研究者番号: 80252708