

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659599

研究課題名(和文) 固形がんの免疫逃避機構におけるオートファジーの意義

研究課題名(英文) Role of autophagy in immunoescape of solid tumor

研究代表者

北山 丈二 (KITAYAMA, JOJI)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20251308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：GFP発現マウス大腸癌細胞colon26細胞を足部皮下に接種し、所属リンパ節内の免疫細胞の発現様式、機能を検討するマウスモデルを作成した。このモデルにてmTOR阻害剤Temsirrolimusにautophagy阻害剤クロロキンを併用することによって大腸癌抑制作用が増強されることをIn Vivoにて確認した。また、ヒト腹腔内から、強い免疫抑制作用を有する間葉系幹細胞の性質を持つ細胞を樹立、本細胞がHypoxia, Hypoglycemiaにて著明に抑制されることを確認した。以上の結果から、autophagy抑制ががん治療の新たなターゲットとなりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We established a mouse model to investigate the local immune reaction in regional lymphnodes. Using this model, we found that Chloroquine, an autophagy inhibitor, significantly potentiated the antitumor activity of Temsirrolimus in vitro and in vivo. The combination therapy triggered enhanced apoptosis, which corresponded to an increased Bax/Bcl-2 ratio. In human, we also found that a minor subset of intraperitoneal free cells with CD90(+)/CD45(-) phenotype vigorously grow in culture with mesothelial-like morphology. Interestingly, these cultured cells were similar to mesenchymal stem cells (MSC), and were designated as intraperitoneal MSC (pMSC). The growth of pMSC is strongly inhibited by hypoxia or hypoglycemia possibly through autophagy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学消化器外科学

キーワード：低酸素 低栄養 autophagy

### 1. 研究開始当初の背景

がんの免疫逃避現象のメカニズムは十分に解明されていない。固形がんの組織内に浸潤した免疫細胞は、癌細胞と同様に低酸素や低栄養などの環境ストレスに曝されているため、その反応としてオートファジーが惹起されている事が予想される。しかし、癌細胞に比べて、免疫細胞におけるオートファジーの生物学的意義についての情報は少ない。そこで、固形がん特有な内部環境が、樹状細胞、Helper T 細胞、細胞障害性T細胞の機能に如何なる影響を及ぼすか？それがオートファジーを制御する事によってどう変化するか？については不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

免疫細胞が起こす個々の細胞現象を低酸素や低栄養の環境下において再解析し、がんに対する免疫反応が固形がんの内部環境によってどう変化し、どのような分子機序で制御されているか？特に、近年様々な生物学的現象に深く関わっていると考えられてきているオートファジー機構がこの機序にどう関与するか？さらに、その知見ががんの免疫逃避機構とどう関わっているか？という点を解明する。その結果、オートファジー阻害剤による免疫能の変化が、固形がんの病態、特に、薬剤の抗腫瘍効果にどう影響を及ぼすのか？を明らかにすることを最終目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) GFPを導入したマウス大腸癌 colon26細胞を作成し、同系のマウスへの足部皮下腫瘍作成モデルを確立し、リンパ節細胞を採

取し、低酸素、低栄養下で培養し、その免疫能の変化を検討する。また、様々な Autophagyの抑制薬を用いて、免疫能の変化、mTOR阻害剤Temsirrolimusに対する感受性に対する影響をIn vitro, In vivo両面から検討する。

(2) ヒト腹腔内遊離細胞のうちCD90(+)細胞に注目し、播種患者における腹腔内免疫抑制機構を検討する。CD90(+)細胞の低酸素、低栄養環境における機能変化を検討し、オートファジーがどう関与するかをIn vitroにて検討する。

### 3. 研究成果

(1) colon26皮下腫瘍作成後所属リンパ節を採取し、その中の腫瘍細胞を同定するとともに、免疫細胞(リンパ球、抗原提示細胞)のphenotypeをFACSにて測定した。担癌マウスのリンパ節はコントロールマウスと比べ、CD11b+Gr1+のmyeloid derived suppressor cells (MDSC),およびCD19(+)B細胞の分画が59%~120%程度に有意に増加しており、逆にCD3(+)CD4(+)のhelper T細胞の比率が約1/4に低下していた。しかし、CD4(+)CTLA-4(+)の制御性T細胞の比率には変化がなかった。

次に、リンパ節から分離したCD4リンパ球を、CD3抗体CD28抗体を用いて刺激する実験系にて、低酸素、低栄養の影響を検討した。CD4(+)細胞の増殖は、0.1% O2条件で約50%、glucose除去条件で20%程度に有意に低下した。FACSを用いた細胞内サイトカインの測定では、IL-4産生細胞の比率は変化を認めなかったが、IFN-gの発現はglucose除去条件でほぼ完全に消失した。以上より、低酸素、低栄養が、腫瘍局所での細胞性免

疫能の低下をきたす誘導することが確認された。

(2) mTOR阻害剤、Temsirrolimus (TEM)は、In vitroでcolon26細胞の増殖を抑制したが、Autophagy inhibitor、クロロキンの併用によってその効果は強く増強された。この効果は、autophagosomeのマーカであるLC3-IIの発現増強を伴い、クロロキンによるautophagyの抑制がcolon26の薬剤感受性を増強することが確認された。また、この抗腫瘍増強作用はIn vivoの皮下腫瘍モデルでも確認され、BAX/BCL2比の増加を伴いアポトーシス増強作用を介していることも確認された。現在、このマウスモデルにおけるクロロキンによる免疫能の変化を検討中である。

(3) ヒト腹腔内より浮遊細胞を分離、collagen をコートした容器で培養すると、中皮細胞の形態を有する間葉系幹細胞の性質を持つ細胞が樹立された。この細胞は多分化能を有し、アルギナーゼ-Iを発現し、固相化抗CD3抗体刺激によるリンパ球の増殖を強く抑制した。この間葉系幹細胞は、リンパ球の1%の細胞数で有意な作用を発揮し、10%でほぼ完全にリンパ球増殖を抑制した。また、ダブルチャンバーで直接接触を避けた形で培養しても、この抑制は有意であった。したがって、この間葉系幹細胞はリンパ球を抑制する何らかのサイトカインを介して腹腔における免疫能を負に制御する事によって播種の成立を促進していることが判明した。さらに、この細胞の増殖は、Hypoxia, Hypoglycemiaにて著明に抑制され、その原因としてautophagyが関与している可能性が考えられた。

以上の結果から、autophagyの抑制は癌治療

の新たなターゲットとして有望であると考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- (1) Kaneko M, Nozawa H, Hiyoshi M, Tada N, Murono K, Nirei T, Emoto S, Kishikawa J, Iida Y, Sunami E, Tsuno NH, Kitayama J, Takahashi K, Watanabe T. Temsirolimus and chloroquine cooperatively exhibit a potent antitumor effect against colorectal cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014 May;140(5):769-81
- (2) 1. Kitayama J, Emoto S, Yamaguchi H, Ishigami H, Watanabe T. CD90+ mesothelial-like cells in peritoneal fluid promote peritoneal metastasis by forming a tumor permissive microenvironment. *PLoS One*. 2014 Jan 21;9(1):e86516
- (3) Kitayama J, Emoto S, Yamaguchi H, Ishigami H, Yamashita H, Seto Y, Matsuzaki K, Watanabe T. CD90(+)CD45(-) intraperitoneal mesothelial-like cells inhibit T cell activation by production of arginase I. *Cell Immunol*. 2014 Mar-Apr;288(1-2):8-14.

〔学会発表〕(計4件)

- (1) 野澤 宏彰, 北山 丈二, 金子 学, 津野 ネルソン, 須並 英二, 高橋 孝喜, 渡邊 聡明 Temsirolimus は複数のメカニズムによって大腸癌の進展を抑制する 第71回日本癌学会 2012年9月30日~2013

年 10 月 2 日 横浜

(2) 北山丈二、江本成伸、山口博紀、石神浩徳、山下裕玄、瀬戸泰之、松崎圭祐、渡邊聡明 胃癌腹膜播種の成立における腹腔内遊離間葉系幹細胞の役割とその臨床的意義 第 86 回日本胃癌学会 2014 年 3 月 20 日～2014 年 3 月 22 日 横浜

(3) 北山丈二、江本成伸、山口博紀、石神浩徳、山下裕玄、瀬戸泰之、松崎圭祐、渡邊聡明 胃癌腹膜播種の成立における腹腔内遊離間葉系幹細胞の役割とその臨床的意義 第 86 回日本胃癌学会 2014 年 3 月 20 日～2014 年 3 月 22 日 横浜

(4) Kitayama J, Emoto S, Yamaguchi H, Ishigami H, Watanabe T. CD90+ mesothelial-like cells in peritoneal fluid promote peritoneal metastasis by forming a tumor permissive microenvironment. 104<sup>th</sup> Annual meeting of American Association of Cancer Research. April 6, 2014 SanDiego CA, USA

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕HP:

<http://all-1su.umin.jp/surgical/>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者 北山丈二

(Kitayama Joji)

東京大学・医学部付属病院・准教授

研究者番号 : 20251308

(2)連携研究者 山下 裕玄

(Yamashita Hiroharu)

東京大学・医学部付属病院・助教

研究者番号 : 50599397

(4) 山口 博紀

(Yamaguchi Hironori)

東京大学・医学部付属病院・助教

研究者番号 : 20376445

(5) 川合 一茂

(Kawai Kazushige)

東京大学・医学部付属病院・助教

研究者番号 : 80571942