

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430103

研究課題名(和文) 腫瘍環境における慢性炎症・免疫細胞の機能解析と癌治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of inflammation and immune cells in tumor microenvironment.

研究代表者

城田 英和 (Shirota, Hidekazu)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50451555

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)：癌の進展と転移には腫瘍微小環境における免疫細胞が重要な役割を示す。本研究は患者サンプルと担癌マウスモデルを用い腫瘍細胞に浸潤している免疫細胞に注目し、腫瘍内炎症パターンや免疫細胞の種類、または様々な炎症反応の発現レベルを解析し、腫瘍の進展に伴って誘導される慢性炎症の役割を明らかにしていく。(1)大腸癌患者より得られたマイクロアレイの解析から3つの炎症細胞浸潤のパターンが存在することが明らかになりそれぞれの治療効果、予後、再発率に差が認められた。(2)マウスのMDSCはTLR9 LigandであるCpG DNAの刺激により抗腫瘍効果を持つマクロファージに分化すること発見し報告した。

研究成果の概要(英文)：Tumor infiltrate leukocytes play an important role in tumor growth and metastasis. This study focused on these cells, examining tumor inflammation and classified the pattern of inflammation in colon cancer and clarified a role in tumor promotion. For example, (1) There are three classes of inflammation in colon cancer, due to a difference of tumor infiltrate leukocyte and cytokines. (2) We have reported that murine mMDSC express TLR9 and respond to stimulation by the TLR9 agonist CpG oligodeoxynucleotide (ODN) by differentiating into tumoricidal macrophages and human mMDSC respond to TLR7/8 agonists to differentiate into tumoricidal M1-like macrophages.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：腫瘍免疫 腫瘍微小環境 T細胞 マクロファージ MDSC

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織の内部は免疫細胞に富んだ環境であることが知られている。腫瘍内には CD8 キラー T 細胞 (CTL) が腫瘍を攻撃し拒絶する一方で、これらの免疫を弱めるような抑制性の免疫細胞も存在する。抑制系の免疫環境は腫瘍周辺における慢性的な炎症によって生み出され、そして血管新生を促し、腫瘍の浸潤・転移を促進させることが報告されている。さらに腫瘍内における抑制性の環境が癌免疫療法の効果を弱める大きな障壁であることが示唆されている。これらの免疫環境は患者の予後にも関連することが報告されており、アスピリンなど抗炎症薬の長期投与が腫瘍の発生、成長を抑えることが大規模な臨床データより証明されている。さらにこの抑制系をブロックする分子標的薬剤 (抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-1 抗体) が癌の臨床治験において優れた成績が報告されている。このような背景の下、腫瘍環境における慢性炎症の役割を明らかにし、治療の新しいターゲットの発見につながると考えられるがその詳細なメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

近年の癌化学療法は新規抗癌剤・分子標的薬の開発導入などめざましい進歩を遂げており、以前には考えられない程の延命が可能になってきている。最近では腫瘍周辺環境における慢性的な炎症が腫瘍の進展、転移に影響を与えることが報告されており、これらの分子をターゲットにした薬剤開発が急がれている。本研究は癌と免疫の関係を研究し、(1) 腫瘍周辺環境における炎症のパターンを解析、(2) 慢性炎症を誘導するメカニズム、(3) さらに、その役割を明らかにしていく。具体的には当科で集められた乳癌、大腸癌の臨床検体と癌モデルマウスを使用し基礎的な実験を行っていく。これらの炎症の仕組みが解明されれば、患者予後因子として

の新しいマーカーの発見や癌免疫療法の新規ターゲット開拓等、直接的な応用が期待できる。

3. 研究の方法

本研究では

(1) 当科で集められマイクロアレイで解析されたデータベース、外部データベースである遺伝子発現バンク (GEO) または、マウス癌モデルの検体を使用し、遺伝子発現レベルの解析や炎症パターン・浸潤している免疫細胞を解析する。

(2) (1) の結果をもとにターゲットとする免疫細胞を癌患者の検体、もしくはマウス癌モデルよりより単離し腫瘍進展に伴う役割について解析する。

(3) (1) と (2) の結果より得られたから予後不良因子、腫瘍進展を促進させる免疫細胞、因子を解明し実際にマウスモデルを用い、これらをブロックし治療効果が現れるか検討する。

(1) については申請者はすでにマウスとヒトの検体を使用し解析が進められておりいくつかの予後不良因子をピックアップしている。初年度は次のステップである (2) と平行してさらに解析を進める予定である。

(2) に関しては具体的にはミエロイド系の未熟な細胞群 (いくつかのサブセットがある) IL-4 を産生するヘルパー T 細胞のある集団、そしてマクロファージのある細胞集団をターゲットにこれらの細胞をヒトとマウスから単離し解析する。翌年にはこれらの細胞群と産生されるサイトカインの腫瘍進展における役割を明らかにし (3) のマウス癌モデルを用いて癌の免疫療法の開発につながるようなトランスレーショナルな研究を行っていく。

4. 研究成果

癌の進展と転移には腫瘍微小環境におけ

る免疫細胞が重要な役割を示す。本研究の目的は患者サンプルと担癌マウスモデルを用い腫瘍細胞に浸潤している免疫細胞に注目し、腫瘍内炎症パターンや免疫細胞の種類、または様々な炎症反応の発現レベルを解析し、腫瘍の進展に伴って誘導される慢性炎症の役割を明らかにしていく。(1) 大腸癌患者より得られたマイクロアレイの解析から3つの炎症細胞浸潤のパターンが存在することが明らかになりそれぞれの治療効果、予後、再発率に差が認められた。(2) マウスの MDSC は TLR9 Ligand である CpG DNA の刺激により抗腫瘍効果を持つマクロファージに分化すること発見し報告した。(3) マウスを用いたトランスレショナルな研究から癌細胞を早期に認識し、IL-4 を産生するユニークな T 細胞群を発見した。この T 細胞群が腫瘍微小環境を形成するのに重要な役割を果たしていることも判明した。この実験から抗 IL-4 抗体が癌免疫療法に使用できることを確認した。

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 11 件)

1. Imai H, Komine K, Takahashi S, Saijo K, Okada Y, Kobayashi A, Okita A, Chikamatsu S, Kasahara Y, Takahashi M, Oishi T, Shirota H, Takahashi M, Shimodaira H, Ishioka C. Efficacy and Safety Assessment of Paclitaxel in Patients with Docetaxel-Resistant Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Chemotherapy*. 2016;61(5):262-8. 査読有
2. Kobayashi A, Takahashi M, Imai H, Akiyama S, Sugiyama S, Komine K, Saijo K, Takahashi M, Takahashi S, Shirota H, Sato N, Fujishima F, Shuin T, Shimodaira H, Ishioka C. Attainment of a Long-term Favorable Outcome by Sunitinib Treatment for Pancreatic Neuroendocrine Tumor and Renal Cell Carcinoma Associated with von Hippel-Lindau Disease. *Intern Med*. 2016;55(6):629-34. 査読有
3. Imai H, Shirota H, Okita A, Komine K, Saijo K, Takahashi M, Takahashi S, Takahashi M, Shimodaira H, Ishioka C. Efficacy and Safety of Carboplatin and Etoposide Combination Chemotherapy for Extrapulmonary Neuroendocrine Carcinoma: A Retrospective Case Series. *Chemotherapy*. 2015 Dec 5;61(3):111-116. 査読有
4. Shirota H, Tross D, Klinman DM. CpG Oligonucleotides as Cancer Vaccine Adjuvants. *Vaccines* 2015, 3(2), 390-407 査読有
5. Wang J, Shirota Y, Bayik D, Shirota H, Tross D, Gulley JL, Wood LV, Berzofsky JA, Klinman DM. Effect of TLR Agonists on the Differentiation and Function of Human Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells. *J Immunol*. 2015 May 1;194(9):4215-21. 査読有
6. Shirota H, Klinman DM. TLR-9 Agonist Immunostimulatory Sequence Adjuvants Linked to Cancer Antigens. *Methods Mol Biol*. 2014;1139:337-44. 査読有
7. Hodge DL, Berthet C, Coppola V, Kastenmüller W, Buschman MD, Schaugency PM, Shirota H, Scarzello AJ, Subleski JJ, Anver MR, Ortaldo JR, Lin F, Reynolds DA, Sanford ME, Kaldis P, Tessarollo L, Klinman DM, Young HA. IFN-gamma AU-rich element removal promotes chronic IFN-gamma expression and autoimmunity in mice. *J Autoimmun*. 2014 Sep;53:33-45. 査読有
8. Shirota H, Klinman DM. Recent Progress Concerning CpG DNA and Its Use as a Vaccine Adjuvant. *Expert Rev Vaccines*. 2014 Feb;13(2):299-312. 査読有
9. Tewary P, de la Rosa G, Sharma N, Rodriguez LG, Tarasov SG, Howard OM, Shirota H, Steinhagen F, Klinman DM, Yang D, Oppenheim JJ. -Defensin 2 and 3 Promote the Uptake of Self or CpG DNA, Enhance IFN- Production by Human Plasmacytoid Dendritic Cells, and

- Promote Inflammation. *J Immunol.* 2013 Jul 15;191(2):865-74. 査読有
10. **Shirota H**, Klinman DM. Use of CpG Oligonucleotides for cancer immunotherapy and their effect on immunity in the tumor microenvironment. *Immunotherapy* 2013 Aug;5(8):787-9. 査読有
 11. Kobayashi N, Hong C, Klinman DM, **Shirota H** Oligodeoxynucleotides Expressing Poly-G Motifs Promote Anti-Tumor Activity through the Up-Regulation of IL-2. *J Immunol.* 2013 Feb 15;190(4):1882-9. 査読有

〔学会発表〕(計 9 件)

1. **Shirota H** Oligodeoxynucleotides Expressing Poly-G Motifs Promote Anti-Tumor Activity through the Up-Regulation of IL-2. *Keystone Symposia, Immune Evolution in Cancer.* Wistler, Canada 2014/3/9
2. **Shirota H** Intratumoral injection of CpG oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. 第 72 回日本癌学会学術集会 パシフィコ横浜 (横浜市) 2013/10/3
3. **城田英和** R848 induces Human Myeloid-Derived Suppressor Cells into Non-Suppressor M1-like Macrophages. 第 11 回日本臨床腫瘍学会 仙台国際センター (仙台市) 2013/8/29
4. **Shirota H** Intratumoral injection of CpG oligonucleotides induces the differentiation and reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells. *AACR annual Meeting 2013 Washington DC, U.S.A.* 2013/4/6
5. **城田英和** Effect of TLR Agonists on the Differentiation and Function of Human Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells. 第 73 回日本癌学会学術集会 パシフィコ横浜 (横浜市) 2014/9/25
6. **Shirota H** Effect of TLR Ligation on the differentiation and Function of Human

- mMDSC. 第 19 回日本がん免疫学会総会、第 23 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム 伊藤国際学術研究センター (東京都) 2015/7/9
7. Ito S, **Shirota H** IL-4 modulate the tumor microenvironment and response to CpG DNA immunotherapy. 第 19 回日本がん免疫学会総会、第 23 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム 伊藤国際学術研究センター (東京都) 2015/7/9
 8. **Shirota H** IL-4 derived from Tfh cells in tumor draining LNs. 第 74 回日本癌学会学術集会 名古屋国際会議場 (名古屋市) 2015/10/8
 9. Ito S, **Shirota H** IL-4 modulate the tumor microenvironment and response to CpG DNA immunotherapy. 第 74 回日本癌学会学術集会 名古屋国際会議場 (名古屋市) 2015/10/8

〔図書〕(計 3 件)

1. **城田英和** 横紋筋融解症 抗がん剤の副作用と支持療法 株式会社日本臨牀社 2015 p499-502
2. **Shirota H** and Klinman DM. Chapter "CpG ODN as adjuvants for clinical use", *Immunopotentiators in Modern Vaccines Second Edition*, edited by Dr. Virgil Schijns and Dr. Derek O'Hagan. Science & Technology Books, Life Science Academic Press/Elsevier. *In press* 2016
3. **Shirota H** and Klinman DM. Chapter "Vaccine Adjuvants", *Inflammation / From Molecular and Cellular Mechanisms to the Clinic* (J.-M. Cavillon, M. Singer, eds.) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, *In press* 2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城田 英和 (Hidekazu Shirota)
 東北大学・医学系研究科・講師
 研究者番号：50451555

(2) 研究分担者

伊藤 弘康 (Hiroyasu Ito)
 岐阜大学・医学系研究科・准教授
 研究者番号：50451555