

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670183

研究課題名(和文)がん細胞の代謝特性を介した恒常的免疫攪乱による腫瘍進展機構の解明

研究課題名(英文)The mechanisms of immune-mediated tumor progression triggered by cancer metabolism

## 研究代表者

地主 将久(Jinushi, Masahisa)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：40318085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：代表的なCancer Metabolite pathwayであるIDH1/2変異陽性グリオーマを焦点に、腫瘍内免疫プロファイルに及ぼすインパクトについて検証した。その結果IDH1/2変異は腫瘍内M2マクロファージやMDSC浸潤、PD-1陽性T細胞浸潤、腫瘍細胞のPD-L1/2陽転化等、腫瘍内微小環境の免疫原性を高め、いわゆる「Inflamed Phenotype」誘導に寄与していることが判明した。この所見はIDH変異腫瘍への免疫チェックポイント分子阻害剤の適応を考慮するうえで貴重な所見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：I focused the role of most notable cancer metabolic pathway, IDH1/2 mutation in gliomas on tumor immunogenic phenotypes, I found that IDH1/2 in glioma cells contribute to generation of immunosuppressive microenvironments, which are manifested by the infiltration of M2 macrophages, MDSCs, and PD-1-positive T cells with transformation of PD-L1-positive glioma cells from PD-L1-negative ones. Thus, IDH-1/2 mutation triggers "inflamed phenotypes" of gliomas, and our study provides scientific rationale that immunocheknckpoint blockade may be useful for targeting IDH-mutated tumors.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍代謝

## 1. 研究開始当初の背景

Warburg 効果による解糖系活性など細胞内代謝カスケード変化が発癌活性に寄与することが明らかとなり注目されている (Ward PD and Thompson CB, Cancer Cell. 2012)。たとえば、急性骨髄性白血病の一部や悪性膠芽腫の大部分で認められるイソクエン酸脱水素酵素 (IDH) 活性ドメインに相当するアルギニン基活性変異 (R132H) は -Ketoglutarate (KG) への還元反応を迂回することで、2-hydroxyglutamate (2HG) 産生に貢献する。2-HG は TET2 抑制を介してグローバルながん関連遺伝子メチル化に貢献することで、腫瘍発症・活性プロセスに重要な役割を果たすことが示唆されている (Caims RA and Mak TW, Cancer Discov, 2013)。また同じく Warburg 効果に寄与する代謝酵素であるピルビン酸 M2 分画 (PKM2) は、ペントースリン酸経路やセリン合成経路を介した生体高分子産生に重要な他、Wnt- $\beta$ -catenin、EGF 経路や HIF1 活性を促進することで、がん細胞活性増強に寄与している (Chaneton B and Gottlieb E, Trends Biochem Sci, 2012)。上記のように Warburg 効果は内因性発がん活性に貢献しているが、最近になり 2-HG による collagen 遺伝子活性と繊維芽細胞活性など、腫瘍微小調節機能を有することがわかってきた (Xu W, Cancer Cell, 2011)。ただし、がん特異的な代謝特性が、腫瘍微小環境に及ぼす分子機構の全体像、およびその臨床的意義については不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、IDH(R132H)や PKM2 など、がん特異的な代謝酵素活性が腫瘍内免疫応答や炎症シグナル活性を制御することで、発がん制御を司るとの仮説を基盤として、その分子機構について検証する。具体的には、腫瘍細胞が Warburg 効果を介した特異的な代謝活性、その下流の炎症・免疫調節因子の恒常的産生を介して、腫瘍内ミエロイド細胞や T 細胞活性を負に制御することで、発がん活性に多大な貢献をしているとの仮説を証明することで、がん代謝特性が免疫微小環境に及ぼす影響を世界に先駆けて明らかにしていくことを目的とする。

## 3. 研究の方法

がん細胞代謝特性による腫瘍免疫応答、炎症発癌への影響を端的に検証するため、本研究課題では、がん細胞に特異的な代謝酵素活性産物として IDH(R132H)による 2-HG、およ

び PKM2 活性に伴う HIF-1 $\alpha$  制御活性による炎症シグナル、解糖系代謝最終産物である乳酸に絞り、これらが腫瘍内ミエロイド細胞の恒常的炎症シグナル誘導に及ぼすインパクトを、特に NLRP3-ASC 経路を介した Inflammasome および IL-1 $\beta$  産生、TH17 分化誘導、腫瘍内 MDSC 浸潤・活性、という主要な免疫抑制、炎症発癌経路に焦点をあてて検証する。また PKM2 遺伝子欠損マウスを対象に、がん代謝が免疫微小環境に与える影響について *in vivo* で検証する。さらに、IDH 変異体や PKM2 を標的化する低分子化合物が available なことより、これら分子標的剤が腫瘍内ミエロイド細胞の inflammasome 活性、MDSC など免疫サブセット、T 細胞ヘルパー機能分化などに及ぼす影響についての検証、さらに T 細胞移入療法や抗 PD-1 抗体など免疫療法との相乗治療効果や抗腫瘍メカニズムについて明らかとする。さらにヒト癌検体における IDH 変異、PKM2 誘導と腫瘍内免疫細胞サブセットや炎症シグナル活性、および予後相関についての解析を施行した。

具体的な研究項目として、下記を研究当時の研究項目として挙げた。

- (1) 癌特異的代謝活性による腫瘍免疫制御機構の検証 (*in vitro* による 1 次スクリーニング)
- (2) 癌特異的代謝活性による腫瘍免疫制御機構の検証 (*in vivo* による検証)
- (3) IDH(R132H)と PKM2 標的剤による腫瘍内免疫応答調節能と抗腫瘍効果の相関についての検証
- (4) ヒト発癌におけるがん代謝酵素活性と腫瘍内免疫プロファイル発現動態、祖語相関についての解析  
うち(4)は、研究進捗とヒト臨床検体使用に関わる倫理審査が遅れたことで、急ぎ別の研究項目を検証することとした。
- (5) 腫瘍内代謝プロファイルの相異が、免疫チェックポイント分子阻害剤による治療効果に及ぼす影響の検証

## 4. 研究成果

(1) ヒトグリオーマ細胞を対象に、腫瘍微小環境における代謝経路の修飾が腫瘍免疫応答に及ぼす影響、とりわけ近年創薬ターゲットとして臨床的に注目が高い IDH1 変異に着目して研究を展開した。IDO 変異、野生型グリオーマ細胞とヒト単球の混合培養、並びにグリオーマ培養上清処理した単球を対象に、Phenotype や活性変化を検証したところ、IDH 変異グリオーマにより、CD14 陽性単球は

CSF-1 レセプター発現、および免疫制御性代謝酵素である Indolamine-dioxygenase1 (IDO1) 活性が大幅に増強することが判明した。ただし炎症性・抑制性サイトカインのプロファイルや CD168、CD204 等 M2 マクロファージマーカー発現の変化は認められなかった。

(2) IDH1 変異による誘導される単球の免疫制御能を検証するために、グリオーマ細胞 Lysate でパルスした樹状細胞による T 細胞活性 (IFN- $\gamma$  産生、グリオーマ細胞の細胞障害活性 (LDH release assay) を施行したところ、CSF1R+IDO1+単球は、コントロールと比較して、優位に抗グリオーマ免疫応答を抑制することを明らかにした。更に IDH1 阻害剤を前処理、あるいは抗 CSF1R 抗体処理を受けたグリオーマ細胞刺激を受けた単球では、抗腫瘍 T 細胞活性の部分的な回復を認めた。以上より、IDH1 変異グリオーマにより誘導される CSF1R+IDO1+ミエロイド細胞は、抗腫瘍免疫抑制に寄与していることを明らかにした。

(3) さらに、マウスグリオーマ細胞に IDH-2 遺伝子を強制発現させた系 (IDH2-GBM) を用いて、マウス脳内に Orthotopic transplantation を施行した系を用いて、グリオーマ組織内の免疫浸潤の程度及び免疫細胞プロファイルの検証を行った。IDH2-GBM では Control-GBM と比して、腫瘍内に著名な CSF1R+IDO1+ミエロイド系細胞の浸潤を認めた。興味深いことに、CD8+T 細胞は腫瘍辺縁に認められたが、腫瘍内での浸潤は scatter であった。それに対して、Control-GBM においては腫瘍内の名ロイド細胞、T 細胞ともに浸潤を認めず、いわゆる Non-inflamed phenotype の像を呈していた。

(4) 以上より、IDH1 変異は腫瘍免疫原性を高める機能があるが、同時に免疫抑制機能を有するミエロイド細胞を誘導することで、T 細胞を腫瘍内から Exclusion する機能があることが判明した。さらに IDH 野生型グリオーマは免疫細胞浸潤をみとめず、IDH1 変異は腫瘍免疫原性を規定する大きなファクターであることが明らかになった。この IDH1 変異による「Inflamed phenotype」が、免疫チェックポイント分子阻害剤の治療応答に影響を及ぼす可能性を検証するため、上述の GBM orthotopic model に対して抗 PD-1 抗体の治療応答を検証した。IDH1 変異 GBM に対して抗 PD-1 抗体は優位な生存期間の延長を示し、更に IDH1 阻害剤併用により、相乗的な抗腫瘍効果を示した。それに対して、野生型 GBM に対する抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体の効果は

認められなかった。

(5) 以上より、IDH1 変異は免疫抑制性ミエロイド細胞分化・浸潤を促進することで、免疫応答を負に制御するとともに、T 細胞を中心とした腫瘍 Inflamed phenotype の形成に重要な役割を果たすことが明らかになった。現在抗 PD-1 抗体をはじめとする免疫療法が臨床の場で注目されているが、この治療応答は腫瘍内 Inflamed phenotype であるかに大きく依拠していることが提唱されている。本研究成果は、IDH1 変異という腫瘍内代謝性変化が免疫療法の適応を決める上での重要なバイオマーカーとなる可能性を示唆する一方、IDH1 変異型腫瘍に対する免疫療法の可能性を示唆する点で、重要な価値を有するものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Kokubu Y, Tabu K, Muramatsu N, Wang W, Murota Y, Nobuhisa I, Jinushi M, Taga T. Induction of protumoral CD11c(high) macrophages by glioma cancer stem cells through GM-CSF. *Genes Cells*. 2016 Mar;21(3):241-51. doi: 10.1111/gtc.12333. (査読有)
2. Tan Y, AlKhamees B, Jia D, Li L, Couture JF, Figeys D, Jinushi M, Wang L. MFG-E8 Is Critical for Embryonic Stem Cell-Mediated T Cell Immunomodulation. *Stem Cell Reports*. (査読有) 2015 Nov 10;5(5):741-52. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.09.005.
3. Komohara Y, Morita T, Annan DA, Horlad H, Ohnishi K, Yamada S, Nakayama T, Kitada S, Suzu S, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Akashi K, Takeya M, Jinushi M. The Coordinated Actions of TIM-3 on Cancer and Myeloid Cells in the Regulation of Tumorigenicity and Clinical Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinomas. *Cancer Immunol Res*. 2015 Sep;3(9):999-1007. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0156. (査読有)
4. Jinushi M, Komohara Y.

- Tumor-associated macrophages as an emerging target against tumors: Creating a new path from bench to bedside.  
 Biochim Biophys Acta. 2015 Apr;1855(2):123-30. doi: 10.1016/j.bbcan.2015.01.002. (査読有)
5. Jinushi T, Shibayama Y, Kinoshita I, Oizumi S, Jinushi M, Aota T, Takahashi T, Horita S, Dosaka-Akita H, Iseki K.  
 Low expression levels of microRNA-124-5p correlated with poor prognosis in colorectal cancer via targeting of SMC4.  
 Cancer Med. 2014 Dec;3(6):1544-52. doi: 10.1002/cam4.309. (査読有)
6. Jinushi M.  
 Immune regulation of therapy-resistant niches: emerging targets for improving anticancer drug responses.  
 Cancer Metastasis Rev. 2014 Sep;33(2-3):737-45. doi: 10.1007/s10555-014-9501-9. (査読有)
7. Yamashina T, Baghdadi M, Yoneda A, Kinoshita I, Suzu S, Dosaka-Akita H, Jinushi M.  
 Cancer stem-like cells derived from chemoresistant tumors have a unique capacity to prime tumorigenic myeloid cells.  
 Cancer Res. 2014 May 15;74(10):2698-709. doi: 10.1158/0008-5472. (査読有)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特記事項なし

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

地主 将久 (Jinushi Masahisa)

慶應義塾大学・医学部・特任准教授

研究者番号：4 0 3 1 8 0 8 5

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

・北林 一生 (Kitabayashi Isho)

国立がん研究センター研究所・造血腫瘍分野長

・菰原 義弘 (Kimohara Yoshihiro)

熊本大学大学院医学研究科細胞病理学・准教授

・秀 拓一郎 (Taku syuichiro)

熊本大学大学院医学研究科脳神経外科学・講師

・秋田 弘俊 (Akita Hirotooshi)

北海道大学大学院医学研究科腫瘍内科学・教授

・八木田 秀雄 (Yagita Hideo)

順天堂大学医学部免疫学・先任准教授