

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：24402

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24035

研究課題名（和文）治療抵抗性癌に対する新規免疫治療法の開発

研究課題名（英文）The development of new immunotherapies for treatment-resistant cancer

研究代表者

山口 一行（Yamaguchi, Kazuyuki）

大阪市立大学・大学院医学研究科・医員

研究者番号：80848317

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：M 特異的にHIF-1、HIF-2欠損およびHIF-1、HIF-2過剰発現マウスを作製し、M 特異的にHIF-1、HIF-2を欠損、過剰発現させることで腫瘍増殖へ与える影響を検討した。腫瘍の増殖曲線や phagocytosis assay、フローサイトメトリーなどを行うことでM 内のHIF-1およびHIF-2が腫瘍増殖に関与していることを明らかにした。それとともに腫瘍抑制に関与する可能性がある因子を同定したため、今後はこの因子をブロック、投与することで腫瘍の増殖抑制にどのように関与するか詳細な機序を明らかにしていく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HIFを介して腫瘍内M が活性化する機能を明らかにするとともに、腫瘍内M 活性化に関与する分子を同定することで新規抗悪性腫瘍薬の創出につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：The mice of HIF-1, HIF-2 deficient and/or HIF-1, HIF-2 overexpressing in M are prepared. The impact of them was examined. By performing tumor growth curve, phagocytosis assay, flow cytometry, etc., it was clarified that HIF-1 and HIF-2 in M are effected in tumor growth. We have identified a factor that may be involved in tumor suppression, and in the future we plan to clarify the detailed mechanism of how blocking and administering this factor is involved in tumor growth suppression.

研究分野：泌尿器病態学

キーワード：癌 マクロファージ PHD阻害薬

1. 研究開始当初の背景

がん組織内の血管は正常血管と異なり、脆弱で不規則に走行し血流が乏しい。そのため、腫瘍組織内は低酸素・低栄養・低 pH といった特殊な環境を形成し、がん微小環境と呼ばれている。この環境下に存在する腫瘍関連 Mφ (TAM) は抗炎症型 Mφ となり、腫瘍増殖を促進する性質をもつ。しかし、がん微小環境を改善することで腫瘍内の Mφ は炎症型 Mφ へ変化し、腫瘍増殖の抑制に寄与すると報告されている (Park JS, et al. *Cancer Cell*, 2016)。尿路上皮がんは、腎盂がん、尿管がん、膀胱がん、尿道がんと分類できる。膀胱がんは尿路上皮がんの中で最も多いがんであり、先進国では男性の中で 4 番目に多いがんである。膀胱がんは診断当初は大多数が筋層非浸潤性膀胱がん (NMIBC) で低悪性度であるが高い再発率をもち、再発した NMIBC の 1/3 がより高い悪性度となっている。NMIBC では、がんの深達度が高いほうが TAM の浸潤が多く (Ayari C, et al. *Eur Urol*, 2009)、NMIBC では TAM が多いほど再発までの期間が短くなる可能性があるとして報告されている (Takayama H, et al. *J Urol*, 2009)。

申請者らのグループでは PHD 阻害薬 (PHDi) を腫瘍移植モデルマウスに投与すると腫瘍内の微小環境が改善すると報告している (Koyama S. et al. *Sci. Rep.* 2017)。さらに、申請者らが行った予備検討では、PHD 阻害薬の投与量を変更することで微小環境を改善するばかりでなく、腫瘍増大を抑制することまた、PHD 阻害薬の効果を遺伝子的に模倣したマウスを用いた結果から、腫瘍増大抑制効果には Mφ の HIF が関与している可能性を得ている。

がん微小環境において、Mφ ががん細胞を貪食した結果、T 細胞や NK 細胞などの機能が逆に抑制され、腫瘍の増殖が進行するという報告 (Su S, et al. *Cell* 175:442-457, 2018) や HIF はがん細胞に対して増殖や転移を促進するとの報告 (Semenza GL, et al. *Nat Rev Cancer*, 2003) がなされている。一方で、Mφ や T 細胞などの免疫細胞は代謝系を変化させることで免疫細胞の活性が高まるとの報告 (Palazon A, et al. *Immunity*, 2014) もあるが、本研究のように生体で薬剤により全身性に HIF を活性化させ、がん細胞と免疫細胞の競合を包括的に検討した研究はほとんど行われていない。

2. 研究の目的

「HIF が腫瘍内 Mφ の機能に与える影響について明らかにすること」を目的とし、Mφ 特異的 HIF 欠損マウスおよび PHDi を用いて腫瘍内 Mφ における HIF の役割と腫瘍内 Mφ の機能・役割の解析を行う。

3. 研究の方法

本研究は Mφ 特異的に HIF 遺伝子を欠損させるもしくは PHDi との組み合わせにより HIF を過剰発現させ、生体腫瘍組織中での Mφ への影響を検討する。

(1) マウスの皮下に 1.0×10^6 LLC を移植し、移植後 10 日目 (day10) より 2 日おきに腫瘍径を測定した。Veh 群には day10 に DMSO 腹腔内投与し、FG 群には FG 3 mg 腹腔内投与した。

(2) マウスの皮下に 1.0×10^6 LLC を移植し、移植後 16 日目に腫瘍を摘出した。CD31 および ZO-1 で免疫染色を行い腫瘍内の血管サイズや血管の成熟度を KEYENCE で観察した。

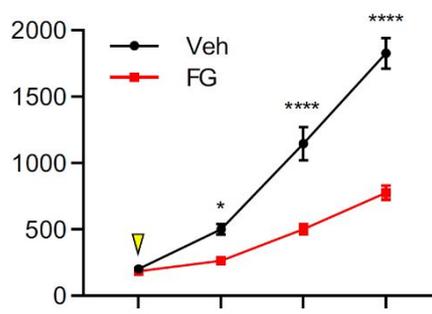


図 1. PHDi による腫瘍増大抑制

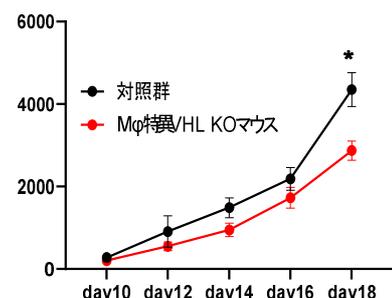


図 2. M 特異的 VHL KO マウス

による腫瘍増大抑制

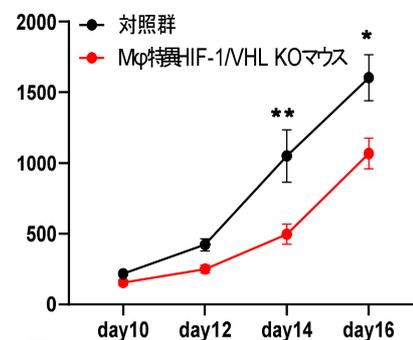


図 3. M 特異的 HIF-1/VHL KO

マウスによる腫瘍増大抑制

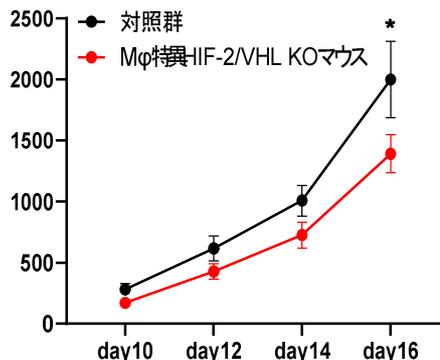


図 4. M 特異的 HIF-2/VHL KO

マウスによる腫瘍増大抑制

4. 研究成果

方法(1)を用いて、腫瘍移植モデルマウスに PHDi を投与することで腫瘍の増殖が抑制されることを確認した(図 1)。また、Mφ 特異的に VHL/HIF-1/HIF-2 を KO した遺伝子改変マウスではそれぞれ遺伝子改変マウス群で腫瘍増大の抑制がみられた(図 2.3.4)。以上より、Mφ 内の HIF が腫瘍の増殖抑制に関わることが示唆された。

次に方法(2)を用いて、腫瘍内の血管を観察した。野生群と FG 投与群では FG 投与により腫瘍内の血管数が減少するものの血管成熟度が上昇することが確認された(図 5)。また、遺伝子改変群では Mφ 特異的に HIF-2 を過剰発現させ、HIF-1 を KO すると、対照群よりも血管数が増加し血管成熟度も上昇していた(図 6)。また、Mφ 特異的に HIF-1 を過剰発現させ、HIF-2 を KO すると、対照群よりも血管数および血管成熟度が低下していた(図 7)。このことは、HIF-2 が血管新生に参与するという報告と一致しており、腫瘍内の血管においては HIF-2 が重要であることが示唆された。

以上より、腫瘍の進展抑制には Mφ 内の HIF が重要であることが示唆された。また、PHDi を投与することで、Mφ の HIF 活性を上昇させ、腫瘍の進展抑制をきたす可能性があることが示唆された。

今後は、in vitro でも貪食活性を検討するとともに、シーケンスを行うことで原因因子を特定し、PHDi を用いて腫瘍内 Mφ における HIF の役割と腫瘍内 Mφ の機能・役割の解析を行う予定としている。

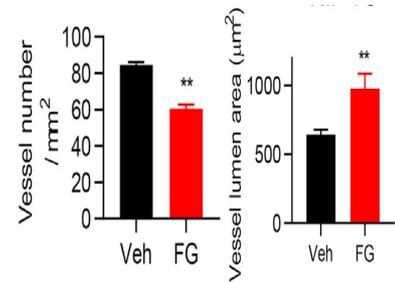


図 5 .PHDi 投与に伴う血管数と血管面積の変化

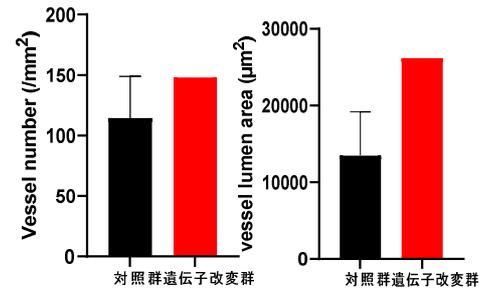


図 6 . M 特異的 HIF-1/VHL KO マウスによる腫瘍内血管数と血管面積の変化

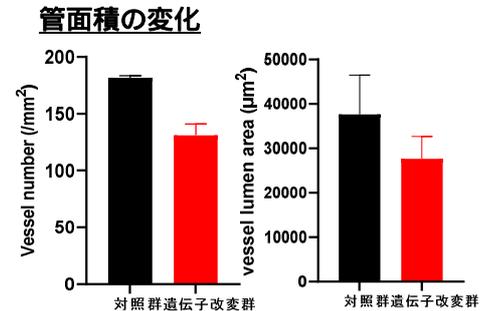


図 7 . M 特異的 HIF-2/VHL KO マウスによる腫瘍内血管数と血管面積の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------