

令和 5 年 5 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16306

研究課題名（和文）腫瘍内に浸潤した免疫細胞中の概日時計機構変容による腫瘍増殖メカニズムの解明

研究課題名（英文）Tumor immunosuppression by disruption of the circadian clock in tumor-infiltrated immune cells

研究代表者

鶴田 朗人（Tsuruta, Akito）

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：40847745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：生体時計を制御する時計遺伝子は免疫細胞の中でも発現しており、様々な免疫機能を制御している。そのため、生体時計の変容は免疫機能異常を生じさせる要因の一つであることが指摘されている。本研究では、腫瘍微小環境に浸潤したマクロファージ（tumor-associated macrophage: TAM）において、概日時計機構が変容することを見出した。TAMにおける概日時計機構の変容が、免疫チェックポイント阻害剤ICIの治療標的となっているProgrammed death receptor-1(PD-1)の発現リズムを制御し、ICIの治療効果に日内変動を生じさせることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、がん細胞によってがん組織に浸潤した免疫細胞の概日時計機構が変容することで、免疫機能に変化が生じ、腫瘍浸潤マクロファージに発現するProgrammed death receptor-1(PD-1)の発現リズムに合わせて免疫チェックポイント阻害剤を投与することによって薬効を増強できることを明らかにした。本研究成果は、免疫チェックポイント阻害剤の効果を最大限引き出すための投薬時刻設計につながることや、生体リズム変容ががん発症を助長するメカニズムの解析につながることで期待される。

研究成果の概要（英文）：Clock genes that control biological clocks are also expressed in immune cells and regulate various immune functions. Alteration of biological clock induces dysregulation of immune functions. In this study, we found that the circadian clock machinery was altered in tumor-associated macrophages (TAMs). This alteration causes the administration-time dependent changes of the effect of immune checkpoint inhibitor (ICI).

研究分野：時間生物学

キーワード：腫瘍免疫 時間生物学 時間薬剤学

1 . 研究開始当初の背景

腫瘍に浸潤した免疫細胞(以下、腫瘍浸潤免疫細胞)は、直接的または抗体産生などを介して間接的にがん細胞を攻撃し、腫瘍の増殖を抑制すると考えられている。しかし、がん細胞は浸潤してきた免疫細胞からの攻撃を逃れるために、免疫抑制分子を高発現することや、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラス I(細胞自身に異常が生じていることを免疫細胞に知らせるための分子)の発現を減少させることなどが明らかになっている。また、がん細胞は浸潤してきた免疫細胞に腫瘍増殖因子を発現させるなど、腫瘍の増殖を促すよう性質変換させることも指摘されており、これらの性質変換した免疫細胞は腫瘍増殖において重要役割を担っている。近年、このような腫瘍浸潤免疫細胞の性質変換を抑制する免疫チェックポイント阻害薬が開発されたが、単独投与による奏効率は10~20%程度に留まっており、その有効性を高めるうえでも、腫瘍浸潤免疫細胞が性質変換するメカニズムの理解が課題となっている。

一方、生体リズムの乱れは免疫機能やホルモン分泌の異常を介して、発がん率の増加や腫瘍の増殖を促すことが指摘されている。しかし、宿主(ホスト)の生体リズムの乱れが、正常細胞ではなくがん細胞の成長を促すメカニズムについては未だ不明である。この原因として、腫瘍内にはがん細胞だけでなく、免疫細胞や線維芽細胞、血管内皮細胞などの異質な細胞が混在するにも関わらず、腫瘍全体またはがん細胞のみを対象とした解析が行われてきたことが挙げられる。生体リズムを制御する時計遺伝子は全身の細胞に発現し、細胞増殖やエネルギー代謝などの生命活動の維持に関わる様々な生理機能に 24 時間周期の変動を生じさせている。免疫細胞においては、炎症、貪食、遊走、サイトカイン産生などの機能制御に関わるということが指摘されており、免疫細胞における時計遺伝子の機能破綻は、免疫細胞としての機能低下につながると考えられているが、腫瘍内に浸潤した免疫細胞の時計遺伝子の機能と免疫細胞としての性質変換との関係性は未解明である。

2 . 研究の目的

本研究ではまず、腫瘍微小環境に浸潤する免疫細胞の中でも多くの割合を占め、その機能と概日時計機構の密接な関連性が指摘されているマクロファージに着目して解析を行う。腫瘍微小環境におけるマクロファージ機能と概日時計機構との関連性について明らかに、本メカニズムを基にした治療応用を目的として研究を行う。

3 . 研究の方法

3-1 実験動物

5 週齢 C57/BL6J 雄性マウスを、室温 24 ± 1 、湿度 $60 \pm 10\%$ 、明暗周期(明期: 07:00-19:00)、自由摂食摂水条件下で 1 週間飼育した後、各実験に使用した。時刻の表記には Zeitgeber Time (ZT) を用い、ZT0-ZT12 を明期、ZT12-ZT24 (ZT0) を暗期とした。6 週齢 C57BL/6J 雄性マウスの左背部皮下に 50% Corning Matrigel 基底膜マトリックスに懸濁した B16/BL6 細胞 (1×10^4 cells / 50 μ l) を投与した。また、すべての動物実験は九州大学における動物実験委員会での承認を受けた後、その指針に従って実施した。

3-2 腫瘍関連マクロファージ(TAM)における PD-1 発現量の測定

B16/BL6 細胞を移植したマウスから、ZT2、ZT6、ZT10、ZT14、ZT18、ZT22 の 6 時点において腫瘍を採取し、25 mM HEPES-NaOH (pH7.4)、Collagenase、DNase を含んだ RPMI-1640 中でハサミを用い裁断後、37 で 15 分間インキュベーションし、細胞を分

散した。セルストレーナーを用いて細胞を単離した後、遠心分離した細胞ペレットに対して溶血バッファーを加え、溶血した。この操作を上清が無色透明になるまで繰り返した。各種フローサイトメトリー用の抗体で染色し、ソーティングおよびポピュレーション解析を行った。解析には BD FACSAria™ III Cell Sorter (Becton Dickinson Biosciences) を用いた。

3-3 ルシフェラーゼレポーターアッセイ

RAW264.7 細胞に、Pdc1 (-2050) ::Luc、Pdc1 (-1540) ::Luc、Pdc1 (-913) ::Luc または pGL4.18 と各種発現ベクターを Lipofectamine-LTX reagent を用いてトランスフェクトした。また、NF- κ B の転写活性の評価にはレポーターベクターとして pNF- κ B-Luc を使用した。また、pRL-TK vector を用いてトランスフェクション効率の補正を行った。24 時間後に Passive lysis buffer を用いて細胞を採取し、Dual-luciferase reporter assay system を用いて各ベクター由来のルシフェラーゼ活性を測定した。

3-4 in vitro での概日時計機構の再構築

培養細胞にデキサメタゾン (DEX) を最終濃度 100 nM となるように添加し、2 時間インキュベーターで培養した。その後、5% FBS, 0.5% Penicillin-streptomycin を含んだ DMEM に置換し、引き続き培養を行った。

3-5 PD-1/PD-L1 inhibitor (BMS-1) の抗腫瘍効果の測定

5 週齢 C57BL/6J 雄性マウスの左背部皮下に 50% Corning Matrigel 基底膜マトリックスに懸濁した Cf1ar KD B16/BL6 細胞 (1×10^5 cells / 50 μ l) を投与した。PD-1/PD-L1 inhibitor には BMS-1 を用いた。BMS-1 は Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解させ、最終濃度 1 mg/mL (90% Saline, 10% DMSO) に調製し、腫瘍移植後 9~16 日目の ZT6 または ZT18 に 50 μ L を腫瘍内に投与した (50 μ g/mouse)。腫瘍移植後 17 日目に腫瘍のサンプリングを行い、サンプリングした腫瘍の体積は足容積測定試験法により測定した。

4 . 研究成果

B16/BL6 腫瘍中の腫瘍関連マクロファージ(TAM)における PD-1 の概日リズム

B16/BL6 細胞を移植した担がんモデルマウスを対象に腫瘍中の PD-1 発現 TAM 細胞 (TAM PD-1+) 数に及ぼす時刻の影響を解析した。B16/BL6 担がんモデルマウスから 6 時点 (ZT2、ZT6、ZT10、ZT14、ZT18、ZT22) において腫瘍を採取し、flow cytometry を用いて総 TAM 数に対しての TAM PD-1+ 数の割合を測定した。その結果、腫瘍中の総 TAM 数における TAM PD-1+ 数には、ZT6 をトラフまた ZT18 をピークとする有意な概日リズムが認められることを明らかにした。次に、TAM および血中のマクロファージ細胞 (モノサイト) の時計遺伝子の発現リズムについて解析を行った結果、TAM ではいくつかの時計遺伝子の発現変容が生じており、特に Dec2 発現が大きく変容することが明らかになった。

Pdc1 遺伝子の転写活性リズム調節領域の探索

TAM において時計遺伝子発現に概日リズムが認められたことから、PD-1 をコードする遺伝子である Pdc1 の発現に影響を及ぼしているのではないかと推察し Pdc1 の転写調節領域に着目して解析を行った。マウス Pdc1 遺伝子の転写開始点 (Transcription Start Site; TSS) から上流 2050 bp について、転写因子結合予測フリーソフト JASPAR を用いて時計遺伝子応答配列を探索したところ、E-box、D-box、RORE 配列が確認された。そこで次に、マウス Pdc1 のプロモーター領域の -2050 ~ +60 bp を対象に、ルシフェラーゼレポーターベクター (Pdc1(-2050)::Luc、Pdc1(-1540)::Luc、Pdc1(-

913)::Luc) を作成し、各種ルシフェラーゼレポーターベクターまたは pGL4.18 をマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 にトランスフェクションし、各種レポーターの転写活性を測定した。その結果、*Pdcd1*(-1540)::Luc および *Pdcd1*(-913)::Luc のレポーターをトランスフェクションした場合のみ有意な転写活性の差異が認められ、RAW264.7 細胞における *Pdcd1* の転写活性は TSS の上流 913~1540 bp の配列が重要であることが示唆された。

***Pdcd1* 遺伝子の転写活性に影響を及ぼす時計遺伝子の探索**

Pdcd1 遺伝子 TSS 上流 913~1540bp の領域が *Pdcd1* 遺伝子の転写リズム形成に影響を及ぼしていることが示唆されたことから、この領域に作用し転写を制御する時計遺伝子の同定を試みた。マクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞に *Pdcd1*(-1540)::Luc と各時計遺伝子の発現ベクターもしくはコントロールとして pcDNA3.1 をトランスフェクトし、24 時間培養後にルシフェラーゼ活性の測定を行った。その結果、コントロール細胞と比較して *Dec2* トランスフェクション細胞でルシフェラーゼ活性が有意に低下した。しかし、*Pdcd1* 遺伝子 TSS の上流 913~1540bp の領域に時計遺伝子応答配列が確認できなかったことから、本領域を対象に *Dec2* の作用点となる配列を探索した。既報から、本領域には 2 つの NF- κ B response element (NRE) が認められ、*Pdcd1* の転写を促進することが報告されている。そこで、*Dec2* が NRE を介して作用を示しているのかを明らかにするために、RAW264.7 細胞に *Pdcd1*(-1540)::Luc または NRE::Luc と、*Dec2* 発現ベクターおよび NRE の転写促進因子である *RelA* 発現ベクターを共トランスフェクションし、24 時間培養後にルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、pcDNA3.1 をトランスフェクションしたコントロール細胞と比較して *RelA* トランスフェクション細胞で *Pdcd1*(-1540)::Luc のルシフェラーゼ活性が有意に高値を示し、その一方でこの転写活性の増加は *Dec2* のトランスフェクションにより抑制された。また、*Dec2* の作用は NRE::Luc においても同様に認められた。このことから、マクロファージにおける *Pdcd1* 発現概日リズムは *Dec2* による NF- κ B の周期的な抑制によって制御されていることが示唆された。

B16/BL6 担がんモデルマウス腫瘍中の TAM PD-1+ を指標とした時間薬理学的検討

腫瘍細胞の病態が示す概日リズムを指標とした抗がん剤の至適投薬時刻の設定が、副作用の軽減と薬効の増加に影響を及ぼすことが明らかにされている。そこで、TAM の PD-1 発現量を指標に PD-1/PD-L1 阻害剤 (BMS-1) の至適投薬時刻の設定を試みた。一般的に様々なマウス由来のがん細胞に対しての PD-1 阻害剤の感受性が乏しく、遺伝子改変した細胞が薬効評価として用いられる。マウスメラノーマ様細胞では PD-1 阻害効果の一つであるアポトーシスを抑制している遺伝子 *Cflar* を低下させた細胞が用いられる。そこで、*Cflar* 発現を抑制した B16/BL6 を移植した担がんモデルマウスを対象に TAM PD-1+ の割合が低い時刻 ZT6 または高い時刻 ZT18 に、BMS-1 (50 μ g/匹) を投与し、投与開始後 8 日目に腫瘍径を測定した。その結果、ZT6 投与群と比較し、ZT18 投与群で腫瘍径が有意に低下した。このことから、TAM の PD-1 発現が高い時刻に合わせて PD-1/PD-L1 阻害剤の投与を行うことによって、同じ投与量でもより高い効果が得られることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akito Tsuruta, Yuki Shiiba, Naoya Matsunaga, Marina Fujimoto, Yuya Yoshida, Satoru Koyanagi, Shigehiro Ohdo	4. 巻 -
2. 論文標題 Diurnal Expression of PD-1 on Tumor-Associated Macrophages Underlies the Dosing Time-Dependent Antitumor Effects of the PD-1/PD-L1 Inhibitor BMS-1 in B16/BL6 Melanoma-Bearing Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-21-0786	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Akito Tsuruta, Naoya Matsunaga, Yuya Yoshida, Satoru Koyanagi, Shigehiro Ohdo
2. 発表標題 Optimization of dosing time of immune checkpoint inhibitor based on circadian rhythm of PD-1 expressing on macrophage
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------