

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23501283

研究課題名(和文) 抗がん剤による抗腫瘍免疫応答活性に関わる分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular machineries of antitumor immune responses triggered by anticancer chemotherapy

研究代表者

地主 将久 (Jinushi, Masahisa)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授

研究者番号：40318085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤刺激により自然免疫応答を抑制する因子をスクリーニングした結果、樹状細胞上に発現誘導されるTIM-3が、HMGB1-DNA複合体形成を介して核酸のエンドゾーム輸送を阻害することで、自然免疫応答を遮断すること、抗がん剤を介した細胞死に伴い遊離する核酸を介した自然免疫応答を抑制することでその抗腫瘍効果を抑制することを明らかとした。

さらに、腫瘍内マクロファージに高発現するTIM-4が、抗がん剤刺激により誘導されたアポトーシスがん細胞を貪食後にオートファジー活性を介して癌抗原分解を促進することで、抗原特異的T細胞応答を抑制していることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Anticancer agents modulate host immune responses through various regulatory mechanisms. By screening the critical factors that increase upon anticancer therapies and regulate the immune responses by tumor-associated myeloid cells (TAM), we identified several key factors expressed on TAM, which greatly influence antitumor effects of chemotherapy. For example, TIM-3 interacts with HMGB1 released from chemotherapy-treated tumor cells, and suppresses innate pattern recognition signals mediated by nucleic acids. On the other hands, DAMP released from chemotherapy-damaged tumors induced TIM-4 on TAM. TIM-4 promotes the autophagy-mediated lysosomal degradation of ingested tumors and represses antigen presentation and tumor-specific CTL responses. Our findings provide new evidences that targeting of TAM-derived factors provides new strategy to improve the therapeutic responses to anticancer regiments and eradicate therapy-resistant tumors.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：癌 免疫 腫瘍ミエロイド細胞 TIM-3 TIM-4 HMGB1 オートファジー 抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

近年の多剤化学療法や分子標的治療剤開発をはじめとした進歩により、手術不能進行再発癌の治療成績は改善傾向にあるが、現状では完全治癒や長期生存延長を達成するには限界があるのも事実である。その成因のひとつとして、多様な遺伝子変異に彩られた腫瘍細胞の根絶には、腫瘍細胞自体を標的とする制がん法の奏功性が低率であることを挙げることができる。

近年腫瘍細胞の維持、増殖に血管内皮細胞、ストロマ細胞、免疫細胞など非腫瘍細胞群が果たす役割が注目されている。事実、従来の抗癌剤と、抗 VEGF-A 抗体など腫瘍血管新生を標的とした新たな制がん法の組合せが、担がん患者の生存期間を優位に延長させることが明らかとなった。その一方で、一部の抗癌剤が宿主免疫応答の増強により抗腫瘍応答を増強させることがマウスによる前臨床試験で証明され、同時にその分子メカニズムについても解析が進んでいる状況である (Zitvogel L, J Clin Invest, 2009)。以上より、抗癌剤には、直接的な殺腫瘍効果に加えて、腫瘍微小環境の宿主免疫応答活性化を惹起することで、抗腫瘍効果を発揮できる機能を有しているといえる。但しヒト担癌患者において、抗癌剤単独での免疫応答は極めて低率である。このことは、化学療法によって制御される内因性宿主免疫応答を、負に調節する分子機構が存在し、有効な抗腫瘍反応を妨げている可能性を示唆する。以上の背景より、本研究では抗癌剤誘導性抗腫瘍免疫応答を制御する分子の同定と其の制御の分子学的メカニズムについて、特に自然免疫制御機構にフォーカスを当て、ヒト癌の病態に及ぼす影響について検証する。

2. 研究の目的

宿主免疫調節機構は、化学療法、分子標的療法など各種抗がん療法の治療応答性制御に重要な役割を果たすことが、前臨床動物モデルや臨床データから明らかにされつつある。申請者は之までに腫瘍組織で高発現し、かつ宿主免疫寛容を誘導することで腫瘍抗癌剤反応性を負に制御する制御因子の存在を明らかにしてきたが、腫瘍特異性が高くかつ特定の分子標的、化学療法への治療応答、治療抵抗性改善に寄与する免疫制御因子の存在については依然不明である。本研究では、この抗がん剤応答抑制に寄与する免疫抑制因子、とりわけ樹状細胞やマクロファージに発現する分子群を同定し、その機能を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

化学療法、分子標的療法により制御される

抗腫瘍免疫応答を制御する因子群を、干渉 RNA ライブラリー導入されたマクロファージ細胞株(RAW267.4)を対象に、抗がん剤(CDDP)処理された死がん細胞(B16)認識後の IFN シグナルをルシフェラーゼ法によるスクリーニングを通して同定する。その免疫制御因子について、阻害抗体、抗癌剤投与によりヒト抗原提示細胞で活性化される免疫関連シグナル解析により、抗癌剤誘導性免疫応答に関わる責任下流シグナル因子を選別する。さらに、干渉 RNA ベクター導入あるいは阻害抗体、抗癌剤併用にて感作されたマクロファージ、樹状細胞の免疫原性変化をサイトカイン産生、特異的 CTL 活性の変化等から検証する。また、遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* での抗腫瘍効果を検証する。さらに、担癌患者検体を対象に、免疫制御因子とその下流因子が治療抵抗性、生存率に与える影響を解析する。以上より、ヒト癌において抗癌剤による抗腫瘍免疫活性に果たす免疫制御シグナルの意義を明らかとする。

4. 研究成果

抗がん剤刺激により自然免疫応答を抑制する因子をスクリーニングした結果、樹状細胞上に発現誘導される TIM-3 (T cell immunoglobulin and mucin domain 3) を同定したため、その役割について解析した。TIM-3 は、IL-10, VEGF, Arginase-I など多彩な腫瘍側因子により発現亢進が認められ、Toll-like receptor や Rig-I-like helicase など細胞質センサーを認識する核酸リガンド刺激による IFN 産生能を、顕著に抑制する機能を有することを同定した。さらにその分子機構を詳細に検証したところ、TIM-3 は炎症性腫瘍微小環境で高産生される HMGB-1 と結合することで、HMGB1-DNA 複合体形成を阻害することが判明した。HMGB1-DNA 複合体は核酸のエンドゾーム輸送に重要であり、TIM-3 による競合阻害により複合体形成が阻害されることで、自然免疫シグナルを遮断することを明らかとした。さらに、CD11c-DTR と TIM-3 欠損骨髄細胞移植によるキメラマウスの検証により、樹状細胞上の TIM-3 は、抗がん剤を介した細胞死に伴い遊離する核酸を介した自然免疫応答を抑制することでその抗腫瘍効果を抑制すること、さらに TIM-3 と HMGB1 相互作用を標的とした阻害抗体投与により、抗がん剤の効果を劇的に改善することを明らかとした。さらに、腫瘍内マクロファージに高発現する TIM-4 が、抗がん剤刺激により誘導されたアポトーシスがん細胞を貪食後にオートファジー活性を介して癌抗原分解を促進することで、抗原特異的 T 細胞応答を抑制していることを明らかとした。

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 5 件)

1. Okamoto T, Hayashi Y, Mizuno S, Yanai H, Nishikawa J, Nakazawa A, Iizasa H, **Jinushi M**, Sakaida I & Yoshiyama H. Colonization of an acid resistant *Kingella denitrificans* in the stomach may contribute to gastric dysbiosis by *Helicobacter pylori*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 20:169-174, 2014. (査読有)
2. Baghdadi M, Yoneda A, Yamashina T, Nagao H, Komohara Y, Nagai S, Akiba H, Foretz M, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Takeya M, Viollet B, Yagita H & **Jinushi M***. TIM-4 glycoprotein-mediated degradation of dying tumor cells by autophagy leads to reduced antigen presentation and increased immune tolerance. **Immunity**, 39: 1070-1081, 2013. (査読有)
3. Baghdadi M, Nagao H, Yoshiyama H, Akiba H, Yagita H, Dosaka-Akita H & **Jinushi M**. Combined blockade of TIM-3 and TIM-4 augments cancer vaccine efficacy against established melanomas. **Cancer Immunology Immunotherapy**, 62: 629-637, 2013. (査読有)
4. China S, Baghdadi M, Akiba H, Yoshiyama H, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Gorman JV, Colgan JD, Hirashima M, Uede T, Takaoka A, Yagita H & **Jinushi M***. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. **Nature Immunology**, 2012; 13: 832-842. (査読有)
5. Baghdadi M, Chiba S, Yamashina T, Yoshiyama H & **Jinushi M***. MFG-E8 regulates the immunogenic potential of dendritic cells primed with necrotic cell-mediated inflammatory signals. **PLoS ONE**, 7: e39607, 2012. (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. **Jinushi M**. Interaction between cancer cells and myeloid cells determine therapeutic responses to chemotherapy. SITC Annual Meeting. 2013 November 7-9, National Harbor, MA, USA.(Gaylord National Harbor Hotel)
2. **Jinushi M**. TIM-4-AMPK- α 1 interaction is critical for immune

tolerance mediated by dying tumor cell phagocytosis. In: Cold Spring Harbor Laboratory Meetings "Harnessing Immunity to Prevent and Treat Disease": 2013 May 29-June 3, 78th Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology "Immunity & Tolerance" Cold Spring Harbor, NY, USA.(Cold Spring Harbor Laboratory)

3. **Jinushi M**. Tumor-infiltrating dendritic cells impede antitumor innate immunity through interaction of TIM-3 and HMGB1. 5th Annual Translational Symposium in University of Hawai'i Cancer Center. 2013 February 25, Honolulu, HI, USA. (University of Hawai'i Cancer Center)
4. **Jinushi M**, Chiba S, Baghdadi M, Yagita H. TIM-4 suppresses antitumor activities of cytotoxic chemotherapy by inducing autophagy and immune tolerance in tumor-associated myeloid cells. Cell Symposia 「Hallmarks of Cancer」. 2012 October 29-31, San Francisco, CA, USA.(Westin Hotel SanFrancisco)
5. **Jinushi M**. Tumor-infiltrating dendritic cells impede antitumor innate responses mediated by nucleic acids through TIM-3-DAMPs interactions. In: The 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society meeting. 2012. October 23-26. Tokyo, Japan.(一橋記念講堂)
6. **Jinushi M**. Macrophages primed by cancer stem cells differentiate into pro-tumorigenic myeloid cells and accelerate tumor progression. 10th Stem Cell Research Symposium. 2012 May 31-June 1. Awaji, Japan. (淡路国際会議場)
7. **Jinushi M**. Tumor-infiltrating dendritic cells suppress nucleic acid-mediated antitumor immunity through TIM-3-DAMPs interactions. In: Key Stone Symposia "Inflammation during carcinogenesis": 2012 May 20-25. Dublin, Ireland.(Dublin International Congress)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: Tumor-specific immune stimulator
発明者: **地主将久**, 八木田秀雄, 秋葉久弥

権利者：北海道大学
種類：知的財産権
番号：P2014-089806
出願年月日：2014年1月17日
国内外の別：国際出願

6. 研究組織

(1) 研究代表者

地主 将久 (JINUSHI, Masahisa)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授
研究者番号：40318085

(2) 研究分担者

吉山 裕規 (YOSHIYAMA, Hironori)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・准教授
研究者番号：10253147