

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H05994

研究課題名(和文) がん由来DNAによるがん免疫の誘導機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of antitumor immune activation via tumor cell-derived DNA

研究代表者

鍛代 悠一 (KITAI, Yuichi)

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：90756165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は抗がん剤であるトポテカンががん細胞の細胞死を介して免疫賦活化DNAの放出を誘導し、樹状細胞の活性化を促進することを明らかにした。担がんマウスにおいてトポテカンの投与は樹状細胞とCD8陽性T細胞を介したがん免疫の誘導を促進した。これらの応答はDNA受容体であるcGASとその下流分子であるSTINGに依存しており、STING欠損マウスにおいてはトポテカンによる腫瘍の縮小は見られなかった。またトポテカンによりがん細胞から放出される免疫賦活化DNAはエクソソームに内包されており、このDNA内包エクソソームが樹状細胞に取り込まれることでSTING依存的ながん免疫応答が誘導されることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Danger-associated molecular patterns (DAMPs) derived from damaged or dying cells not only elicit inflammation but also potentiate antitumor immune responses. Here, we show that treatment of breast cancer cells with the antitumor agent Topotecan, an inhibitor of topoisomerase I, induces DAMP secretion that triggers dendritic cell (DC) activation and cytokine production. Topotecan administration inhibits tumor growth in tumor-bearing mice, accompanied by infiltration of activated DCs and CD8+ T cells. These effects are abrogated in mice lacking STING, an essential molecule in cytosolic DNA-mediated innate immune responses. Furthermore, Topotecan-treated cancer cells release exosomes that contain DNA, which activate DCs via STING signaling. These findings suggest that a STING-dependent pathway drives antitumor immunity by responding to tumor cell-derived DNA.

研究分野：自然免疫

キーワード：がん免疫 抗がん剤 細胞死

1. 研究開始当初の背景

がん免疫はがん細胞の排除を促進するが、その活性化にはがん細胞由来の抗原による獲得免疫の誘導だけではなく、細胞死に伴う内在性分子の放出による自然免疫の誘導が重要であることが示唆されている。例えば、通常のアポトーシスは免疫応答を活性化しないが、アントラサイクリン系の抗がん剤による細胞死はがん細胞からの核タンパク質 HMGB1 の放出を促進し、HMGB1 による自然免疫シグナルを介した樹状細胞の成熟とがん抗原特異的な細胞障害性 T 細胞の活性化を誘導する。そのためがんから放出される内在性分子ががんに対する自然免疫応答において重要な役割を担っていると考えられている。しかしアントラサイクリン系以外の抗がん剤による HMGB1 の放出は確認されていないことから、薬剤の作用機序とそれに伴う細胞死の機構ががんに対する自然免疫を活性化させる内在性分子の放出に重要であると考えられる。そこで申請者は様々な作用機序の抗がん剤を用いてスクリーニングを行うことで、細胞死により放出され、自然免疫を活性化させる新規の内在性分子の探索を行った結果、抗がん剤であるトポテカンが細胞死を介してがん細胞からの免疫賦活化 DNA の放出を誘導することを見出した。この免疫賦活化 DNA は樹状細胞を活性化することでがん免疫を促進することが示唆されたが、その産生機構や樹状細胞の活性化機構はまったく不明である。そこで本研究ではトポテカンによる DNA を介したがん免疫の活性化機構を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

がん細胞由来 DNA によるがん免疫の活性化機構の解明

3. 研究の方法

(1) トポテカン処理がん細胞から放出される免疫賦活化 DNA がどの細胞内シグナル経路を介して樹状細胞の活性化を誘導しているかを検証した。樹状細胞には TLR9 と cGAS と呼ばれる DNA 受容体が存在し、細菌やウイルスなどの病原菌由来の DNA を感知することで自然免疫応答を誘導することが知られている。そこで申請者は TLR9 を含む TLR ファミリーのアダプター分子である MyD88/TRIF と cGAS 下流のシグナル分子である STING の欠損マウスからの骨髄由来樹状細胞 (GMDC) を調整し、トポテカン処理がん細胞由来 DNA による樹状細胞のサイトカイン産生を定量することで、TLR9 と STING の寄与を明らかにした。

(2) 次にトポテカンによる免疫賦活化 DNA の産生とそれによるがん免疫の活性化が生体内でも起きているかを検証するため、担がんマウスにトポテカンを投与し、腫瘍浸潤した T 細胞と樹状細胞の活性化をフローサイトメトリーと qPCR 法を用いて検証した。

(3) 先行論文より、細胞内に侵入した病原体由来の DNA は cGAS により認識され、cyclic GMP-AMP (cGAMP) に変換されることで STING-IRF3 シグナル経路を活性化することが知られている。また放射線により細胞死を誘導した場合、DNase 耐性の酸化 DNA が死細胞から放出され、同様に STING-IRF3 経路を介して自然免疫を活性化することが報告されている。そのためトポテカンにより放出される免疫賦活化 DNA もこれらに属する可能性がある。これを検証するため、抗がん剤 A 処理後の E0771 細胞の培養上清からフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿法を用いて核酸抽出を行い、精製した DNA をマスペクトル解析により解析することでトポテカンにより放出される免疫賦活化 DNA が cGAMP であるか高分子 DNA なのかを検証した。また DNase 耐性の酸化 DNA であるかを酸化 DNA を認識する抗体を用いた ELISA 法を用いて検証した。

(4) トポテカンによる細胞死は免疫賦活化 DNA の放出を誘導するが、その細胞死のメカニズムは不明である。そこでトポテカンによる細胞死が既知のプログラム細胞死であるアポトーシス、ネクロプトーシス、フェロトーシス等に属するかをそれぞれの細胞死の阻害剤を用いて検証した。

4. 研究成果

(1) トポテカンを用いてマウス乳がん細胞株 E0771 細胞の細胞死を誘導後、回収した培養上清をマウス骨髄由来樹状細胞に添加し、ELISA 法を用いて樹状細胞からの IL-6 と CXCL10 の産生を評価した。その結果、トポテカンで処理した E0771 細胞の培養上清を樹状細胞の培地に加えた場合、樹状細胞からの IL-6 と CXCL10 の産生が著しく増加した。このサイトカインの産生は STING 欠損樹状細胞において顕著に低下したが MyD88/TRIF 両欠損樹状細胞では野生型と比較して有意な差は得られなかった。さらにトポテカン処理細胞由来の DNA は樹状細胞において CD80 や CD86 などの T 細胞共役活性化分子の発現や細胞内シグナル分子である NF- κ B、IRF3 のリン酸化を促進したが、これらの応答は STING 欠損樹状細胞では減弱した。そのため、トポテカン処理細胞から放出される免疫賦活化 DNA は TLR ファミリーには依存せず、STING 依存的に樹状細胞を活性化し、がん免疫を促進させることが示唆された。

(2) E0771 細胞を C57BL/6 マウスに同系移植し、トポテカン投与後に腫瘍浸潤細胞をフローサイトメトリーにより解析した結果、CD8 陽性 T 細胞と活性化樹状細胞が有意に増加した。さらに腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞をセルソーターにより単離し、IFN γ の発現を qPCR 法により定量した結果、トポテカン投与群の腫

瘍から単離した CD8 陽性 T 細胞では有意に IFN γ の発現が増加した。また STING 欠損マウスに同様の実験を行った場合、トポテカンによる腫瘍成長の抑制効果は減弱し、また CD8 陽性 T 細胞および樹状細胞の活性化は有意に低下した(図 1)。これらの結果からトポテカンによる細胞死とそれに伴う樹状細胞での STING の活性化は生体内においても誘導され、がん免疫の促進に寄与することが明らかとなった。

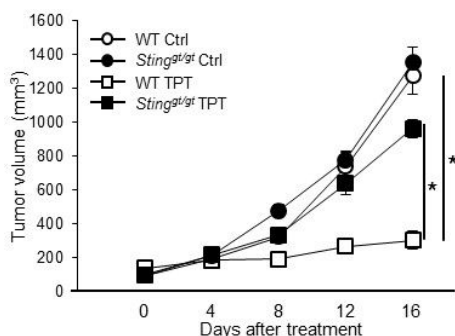


図 1 . 担がん STING 欠損マウスへのトポテカン投与による腫瘍成長抑制効果の検証

(3) トポテカン処理がん細胞から放出される免疫賦活化 DNA を解析するため、トポテカンにより細胞死を誘導した細胞の培養上清からフェノール/クロロホルム抽出により DNA を精製し、アガロース電気泳動によりその分子量を検証した。精製した DNA は 0.2-10 kbp 程度の様々な分子量の含んでおり、cGAS と STING 依存的に樹状細胞からのサイトカインの産生を誘導した。そのためトポテカンによりがん細胞から放出された DNA に cGAMP は含まれていないことが示唆された。さらに精製前のトポテカン処理がん細胞の培養上清に含まれている DNA は DNase に耐性であることから、タンパク質や脂質膜により保護されていることが示唆された。そこで申請者はこの免疫賦活化 DNA がエクソソームに内包されていると推測し、これを検証した。トポテカン処理がん細胞の培養上清のエクソソーム画分を超速心法により精製し、このエクソソームに DNA が内包されていることをアガロース電気泳動により確認した。さらにこの DNA 内包エクソソームは STING 依存的に樹状細胞からのサイトカイン産生を誘導した。これらの結果はトポテカンによる細胞死が免疫賦活化 DNA を内包したエクソソームの放出を促進し、STING 依存的ながん免疫を活性化させることを示唆する。

(4)トポテカンによる DNA 内包エクソソームの放出を伴う細胞死が既知のプログラム細胞死に属するかを検証するため、カスパーゼや RIPK 等の阻害剤によりトポテカンによる細胞死が阻害できるかを Annexin V/PI 染色後のフローサイトメトリーにより評価した。しかしトポテカンによる細胞死はアポトー

シス、ネクロプトーシス、フェロトーシス、オートファジー細胞死等の阻害剤により阻害することはできなかった。そのため、トポテカンは既知のプログラム細胞死とは異なる未知のプログラム細胞死を誘導することで DNA 内包エクソソームの放出それに伴うがん免疫の活性化を誘導していることが示唆された。本研究ではその未知のプログラム細胞死の詳細を明らかにすることはできなかったため、今後の研究からそのメカニズムの詳細を明らかにしていきたいと考えている。

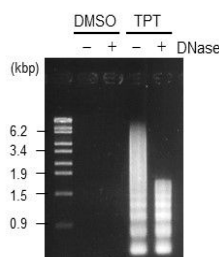


図 2 . アガロース電気泳動によるトポテカン処理がん細胞から精製したエクソソーム内包 DNA の検証

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 1 件)

Kitai, Y., Kawasaki, T., Sueyoshi, T., Kobiyama, K., Ishii, K. J., Zou, J., Akira, S., Matsuda, T., and Kawai, T. (2017) DNA-Containing Exosomes Derived from Cancer Cells Treated with Topotecan Activate a STING-Dependent Pathway and Reinforce Antitumor Immunity. *J Immunol* 198, 1649-1659.

DOI: 10.4049/jimmunol.1601694.

(査読有り)

〔学会発表〕(計 1 件)

DNA-Containing Exosomes Derived from Cancer Cells Treated with Topotecan Activate a STING-Dependent Pathway and Reinforce Antitumor Immunity.

鍛代悠二、雛健、末吉拓也、川崎拓実、小檜山康司、石井健、審良静男、松田正、河合太郎

日本薬学会第 137 回年会

仙台国際センター(宮城県仙台市)

2017 年 3 月 26 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

6．研究組織

(1)研究代表者

鍛代 悠一 (KITAI, Yuichi)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：90756165