

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09220

研究課題名(和文) 内在性リガンドが介在する癌と微小環境との相互作用を標的とした肺癌治療の開発

研究課題名(英文) Developing novel lung cancer therapy targetting cancer cell intrinsic ligands

研究代表者

木島 貴志 (Kijima, Takashi)

大阪大学・医学系研究科・招へい教授

研究者番号：90372614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肺癌に対して抗癌剤治療を行った際に癌細胞から放出される内在性リガンド、特にアポトーシス小体の機能について、化学療法に対する耐性化もしくは治療抵抗性という観点から解析を行った。抗癌剤治療によって、自然免疫TLR2受容体を刺激するようなリガンドが誘導され、それが治療効果に影響する可能性を見出した。詳細なりガンドの同定については今後検討を進めていく。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated how tumor-associated vesicles like apoptotic bodies released after chemotherapies can modulate tumor microenvironment in terms of sensitivity to subsequent chemotherapies. We found that a specific type of chemotherapy can induce TLR2 ligand, which modulate inflammatory status in lung cancer microenvironment and reduce the sensitivity for the subsequent chemotherapies.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 癌微小環境 内在性リガンド

## 1. 研究開始当初の背景

近年、分子標的治療の導入により、固形癌の化学療法による治療成績は劇的に改善しつつある。分子標的治療薬は単独ないし殺細胞性抗癌剤との併用で癌細胞のアポトーシスを強力に誘導し、優れた抗腫瘍効果を発揮する。しかし、未だに外科的根治切除不可能な固形癌を化学療法のみで制御することは不可能である。理由として、化学療法が誘導する転移促進や抗癌剤耐性獲得や宿主に対する致命的な副作用などが挙げられる。その背景において、癌周囲の微小環境内で起こる変化、特に腫瘍関連マクロファージ(TAM)や腫瘍関連線維芽細胞(CAF)を介した無菌的炎症の惹起が、積極的かつ重要な役割を果たしていると考えられる(Nat Med,2013;19:1423-37)。抗癌剤に暴露された腫瘍細胞が産生する HMGB1 などの傷害関連分子パターン(DAMPs)の多くがパターン認識受容体により認識され、M<sub>2</sub> の活性化を促したり(Nat Rev Cancer,2012;12:860-75)、炎症性サイトカイン IL-6 が単球を M2 タイプ M<sub>2</sub> へと分化させたり(Cancer Res,2013;73:2480-92)、CAF が産生する HGF が抗癌剤耐性を誘導する(Clin Cancer Res,2009;15:6630-8)。このように、腫瘍と微小環境細胞の間の伝達物質としては液性因子に注目して研究が行われてきた。しかし、腫瘍細胞は抗癌剤に曝されながらも存続するため、TAM や CAF のような高い可塑性を持つ細胞を有効に利用する目的で、生理活性の高い分子をより多くより確実に微小環境へ送り届けていると想定される。

我々が実臨床で肺癌治療を行う際、以下のような現象に遭遇する。まずは、抗癌剤への耐性化である。耐性機序を明らかにした実験モデルはいずれも、癌細胞を細胞外マトリックス蛋白(Nat Med,1999;5:662-8)ないしは HGF などの液性因子で刺激する(Clin Cancer Res,2009;15:6630-8)という微小環境から癌細胞へという一方向的なモデルである。しか

し、劇的な腫瘍縮小にも関わらず再発する環境においては、化学療法中に TAM や CAF を介した動的な変化がリアルタイムに微小環境側にも起こっているはずである。次に、間質性肺炎合併肺癌における抗癌剤治療による間質性肺炎の急性増悪である。癌細胞周囲の微小環境を構成する線維芽細胞が癌細胞との相互作用によって CAF として活性化してしまっていることが大きな原因ではないかと考えられる。3つめは、化学療法により引き起こされる高サイトカイン血症を伴う炎症である。造血器腫瘍では抗癌剤治療により腫瘍崩壊症候群を生じることが以前より知られているが、化学療法の奏効率の向上に伴い、近年では固形癌でも報告されている(N Engl J Med,2011;364:1844-54)。腫瘍崩壊症候群までは至らなくとも、化学療法後に発熱し、患者の全身状態が低下することはしばしば経験する。その背景に、癌と微小環境の相互作用を介した無菌的炎症の惹起が考えられる。

このように、癌における無菌的炎症は、臨床上的様々な問題となる現象において、重要な背景であると考えられる。液性因子よりもっと効率の良い無菌的炎症を惹起する生理活性物質の伝達機構やメカニズムを明らかにし、そのトリガーとなる鍵分子を同定し、さらにはその鍵分子を阻害することで、TAM や CAF を介した化学療法への耐性化誘導や転移能の活性化を抑制できれば、根治切除不能肺癌の生存期間のさらなる延長をもたらすことが期待できる。さらに、間質性肺炎合併肺癌症例のように、現時点では化学療法で惹起される炎症を引き金とした致死的急性増悪の危惧から治療不適応と判断される症例にも、安全に治療が行えるようになる可能性がある。

## 2. 研究の目的

癌が転移したり化学療法に耐性を獲得し

て再発したり、さらには化学療法時に宿主にとって致死的な副作用を引き起こしたりする背景には、癌周囲の微小環境を介した無菌的炎症が重要な役割を果たしていると考えられる。癌細胞の蛋白断片や核酸断片は、裸の状態あるいはエキソソームやアポトーシス小体(Apoptotic Body: AB)のような小胞体に内包された状態で放出され、生理活性をもつ内在性リガンドとして無菌的炎症のトリガーとなると考えられる。特に、抗癌剤治療により腫瘍が縮小する過程では日常では起こりえない程多数の AB が生じる。本研究の目的は、AB 内の内在性リガンドが癌微小環境に及ぼす影響を検証し、無菌的炎症のトリガーとなる治療標的となりうる鍵分子を同定することである。

### 3. 研究の方法

#### 1. 癌微小環境における無菌的炎症のトリガーとなるリガンドとセンサーの同定

1-1. 抗癌剤暴露肺癌細胞由来 AB 内の内在性リガンドが核酸由来であるかどうかを、野生型(WT)と MyD88 KO マウスの骨髄由来 M (BMDM)に抗癌剤暴露癌細胞上清より単離した AB 添加により刺激して、炎症性サイトカイン産生の変化を確認する。MyD88 KO マウス由来 BMDM で刺激が入らなくなれば、AB 刺激は TLRs が inflammasome を介していることが示唆される。そのどちらが AB のセンサーとして働いているかは、TLRs 4, 7, 9 の各 KO マウス由来 BMDM を用いた刺激実験および caspase 阻害剤を用いた阻害実験で絞り込んで行くことが可能である。

1-2. Inflammasome の関与に関しては、NLRP3 や AIM2 KO マウス由来の BMDM や KO 細胞作成に有用な最新のゲノム編集技術である CRISPR/Cas9(Science, 2013;339:819-36)によってこれらの遺伝子を KO した単球由来

THP-1 細胞を用いて、上記と同様に抗癌剤暴露肺癌細胞由来 AB 刺激が入らなくなるかどうかを検証する。KO 細胞の作成が困難な場合は、shRNA によるノックダウン(KD)による実験も有用である。抗癌剤暴露肺癌細胞由来 AB 刺激が inflammasome を介しているのであれば、AB 内の mtDNA が酸化されているかどうかを調べる。日常臨床で肺癌を含む固形癌で最も標準的に使用される抗癌剤であるプラチナ系抗癌剤は細胞死の誘導において、大量の活性酸素を発生させるが、その際に、mtDNA が酸化されている可能性は高いと考える。酸化 mtDNA は NLRP3 inflammasome に直接会合し炎症を惹起すると報告されていて(Immunity,2012;36: 401-14)、ここにおいても抗癌剤によるアポトーシスと、発生段階における炎症を惹起しないアポトーシスとは異なる細胞死(immunogenic cell death)である可能性がある。mtDNA の酸化は 8-OHdG を検出する事で判断でき、NLRP3 と会合しているかは免疫沈降法で確認する。

#### 2. 同定したリガンドとセンサーの TAM および CAF における生物学的意義の検討

2-1. 肺癌臨床検体を用いた TLRs や inflammasome 関連蛋白の発現パターンと予後および化学療法の効果の相関の解析  
TLRs や inflammasome 関連蛋白が、癌微小環境を構成するどの細胞に発現しているのか、また、肺癌患者の臨床経過にどのような影響を及ぼしているかを検討する。さらに、TAM が抗腫瘍効果を持つ M1 タイプか腫瘍増殖促進や免疫抑制機能を持つ M2 タイプかを HLA-DR や CD163 の免疫染色で、また、CAF の活性化を  $\alpha$ -SMA の染色性で評価する。これらについては、気管支鏡生検ないし手術時に採取した肺癌組織検体を用い、染色強度をスコア化し、臨床経過(予後、化学療法奏効期間など)や既知の予後不良因子との相関を解析

する。

## 2-2. 抗癌剤抗癌剤暴露肺癌細胞由来 AB のヒト末梢血単核球由来 M に対する生理活性の検討

健常者と癌患者の末梢血から単核球細胞を単離し M へ分化させた後に、抗癌剤抗癌剤暴露肺癌細胞由来 AB による刺激を行って、両者での反応性の違いを解析する。この実験により、癌が産生するサイトカインなどの液性因子が全身性にも影響を及ぼし、M の貪食能などへも影響しうるかどうかを検討できる。

## 3. 同定したリガンドとセンサーの TAM および CAF における生物学的意義の検討 (マウス)

### 3-1. WT および同定したセンサーの KO 担癌マウスにおける抗癌剤治療効果の検討

同定した内因性リガンドのセンサーの WT と KO マウスに皮下または orthotopic(肺)に Lewis Lung Carcinoma 細胞を移植し腫瘍を形成させた上で、抗癌剤による治療実験を行い、WT と KO マウスで抗癌剤の効き方に差があるか検討する。

### 3-2. 担癌 WT および KO マウスにおける TAM の遺伝子発現プロファイル解析

摘出腫瘍より FACS または MACS を用いて腫瘍近傍の TAM または腫瘍から離れた非癌肺組織の M を単離し、mRNA を抽出後 cDNA array を行い、両者の遺伝子発現プロファイルの差を調べる。AB が TAM へ与える影響の in vivo モデルとなる。

療法の治療効果を高め、さらに、より合併症の少ない治療法に繋がるかどうかを検討する。

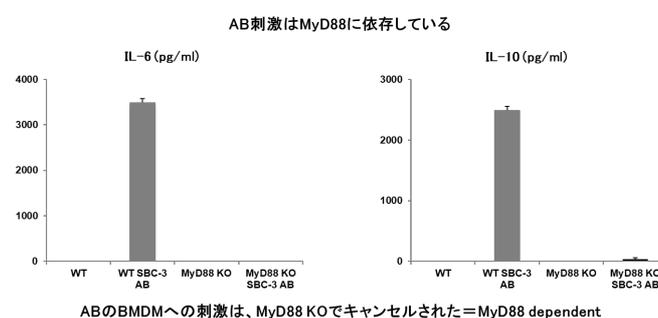
## 4. 研究成果

### 1. 肺癌微小環境における無菌的炎症のトリガーとなるリガンドとセンサーの同定

H27 年度には、小細胞肺癌細胞株 (SBC-3, NCI-H69) および EGFR 変異陽性肺腺癌細胞

株(PC-9)を各々IC90濃度のCisplatin(CDDP)および Gefitinib(EGFR-TKI)で処理し、細胞死を誘導した後培養上清より AB を安定して回収する系を立ち上げた。免疫細胞の AB に対する反応性を見るため、PMA 処理によりマクロファージに分化させたヒト単核球細胞株 THP-1 を AB で刺激したところ、IL-6, IL-1 などの炎症性サイトカインの誘導を確認した。その反応が、MyD88 を欠損する THP-1 細胞株で消失することまで確認した(図1)。

図 1



H28 年度には、AB 刺激による免疫応答が、MyD88 の上流にあるどの TLR 受容体による認識に基づくのかを解析するため、TLR2, 4, 7, 9 の KO マウス由来の BMDM を用いて AB 刺激の応答を比較検討した。その結果、TLR2 刺激が AB の免疫原性に参与していることを見出した。マウス肺癌細胞株 LLC からは TLR2 刺激性を有する細胞由来成分(Versican)が腫瘍の増殖促進に関与しているという報告があるため (Nature.2009;457(7225):102-6.)、MyD88KO マウスに LLC を移植し腫瘍環境の免疫プロファイルの解析を行う予定であったが、MyD88KO マウスが脆弱のためにうまく繁殖出来なかった。そこで、TLR2 および TLR9 のノックアウトマウスを用いた実験に方針転換を行った。TLR2 および TLR9KO マウス由来の骨髄細胞を採取し、AB にて刺激実験を行ったところ、TLR2KO マウス由来の骨髄細胞で MyD88KO と同様のサイトカイン産生の有意な低下を認めた。現在 TLR2 および TLR9KO を繁

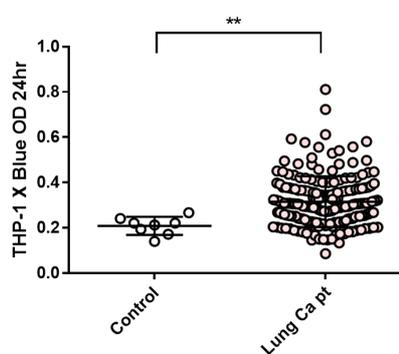
殖している状態で、プレリミナリーな実験においては、肺癌細胞株を皮下移植後、抗がん剤に対する腫瘍環境変化や治療効果の持続期間などについて興味深い知見を得ている。またマウスの繁殖不良のため中断されていた期間に、腫瘍内のマクロファージ・線維芽細胞などをフローサイトメトリー及び蛍光顕微鏡 (aSMA-GFP マウス) でモニターするシステムを構築することが出来た。

### 2.3. 同定したリガンドとセンサーの TAM および CAF における生物学的意義の検討

上述の通り MyD88KO マウスの使用を断念し、野生型マウスを用いて、スクリーニングのプラットフォーム作成を行った。野生型マウスにおいては、フローサイトメトリーによる各種免疫細胞プロファイルの同定、腫瘍組織中のサイトカイン測定、NF B シグナル活性化を検出可能なレポーターRAW 細胞を用いた血漿自体の刺激性のスクリーニングが可能であることを確認した。さらに、当研究室に集積している肺癌患者血清を用いて、NFkB 誘導能と抗がん剤治療効果についてスクリーニングしたところ、一部の患者では高い誘導能と化学療法抵抗性が相関したが、NFkB 誘導能が高い患者でも化学療法に良好な応答を示している症例も多く、抗がん剤の種類やインターフェロンの誘導能などについても追加解析を行っている(図2)。

図 2

THP-1 X blue cell のSerum刺激による吸光度の分布



### 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)  
Morimura O, Minami T, Kijima T et al. Trastuzumab emtansine suppresses the growth of HER2-positive small-cell lung cancer in preclinical models. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Jul 8; 488(4):596-602.

〔学会発表〕(計 1 件)  
Osa A, Koyama S, Uenami T et al. Monitoring Nivolumab Binding as a Method to Clarify the Residual Therapeutic Effects in Previously Treated Lung Cancer Patients. World Conference on Lung Cancer, Oct 2017 (国際学会)

〔図書〕(計 1 件)  
小山正平, 長彰翁, 青枝大貴, 木島貴志, 熊ノ郷淳 「肺がん微小環境の炎症とがん免疫療法」最新医学 71 巻 11 月増刊号: 2357-2364 2016

〔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：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者 木島貴志 (KIJIMA, Takashi)  
大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教授  
研究者番号：90372614

(2)研究分担者 南俊之 (MINAMI, Toshiyuki)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：00705113

(3)研究分担者 小山正平 (KOYAMA, Shohei)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：80767559

#### (4)研究分担者

森村 治 (MORIMURA, Osamu)  
大阪大学・大学院医学系研究科・大学院生  
長 彰翁 (Osa, Akio)  
大阪大学・大学院医学系研究科・大学院生