

令和元年6月23日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04703

研究課題名(和文) がんから放出される免疫メディエーター「乳酸」のシグナル分子機構

研究課題名(英文) The signaling mechanism of immune mediator lactic acid secreted from cancer

研究代表者

井上 徳光 (Inoue, Norimitsu)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・総括研究員(腫瘍免疫学部門長)

研究者番号：80252708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、世界に先駆けて、解糖系の終末代謝産物であると考えられていたがん由来の乳酸が、がん周囲の異常な免疫環境を形成するのに関与する事を発見した。今回、私達は、乳酸イオンと酸性状態が、独立にエピジェネティックな修飾を誘導することを示した。また、頭頸部癌の高乳酸環境と免疫抑制に関わるM2様マクロファージへの転換との関連を示した。高乳酸環境が免疫細胞に作用して、がんの炎症誘導と免疫抑制誘導に影響を与えることがわかったため、今後、がんの免疫及び代謝環境をターゲットにしたがん免疫療法の開発を目指すことが重要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの免疫療法が実際の臨床に使われ注目を集めている。しかし、現在の方法だけでは、対象が限られており、現法を補完する新しい免疫療法の開発が期待されている。私達は、現法の獲得免疫をターゲットにするのではなく、自然免疫系をターゲットにした新しい治療法の開発を目指している。特に、がんの代謝と免疫環境との関連を明らかにし、それをターゲットにしたユニークな研究を遂行している。今回、がんによって形成される免疫環境形成のメカニズムの一端を基礎と臨床の両方において解明してきており、今後さらに発展させる必要があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have identified that tumor secreted lactic acid, which has been thought to be a terminal metabolite of glycolysis before this, plays an important role in the formation of abnormal immune-microenvironment around cancer. In this study, we showed that both lactic anion and acidic condition independently induce the epigenetic modification. Furthermore, we showed that tumor microenvironment with high level of lactic acid is associated with M2-like macrophage polarization in head and neck cancer. Because the tumor microenvironment with high level of lactic acid directly affects the induction of cancer inflammation and immunoregulation, it is important for us to develop new cancer immunotherapy targeting immune- and metabolic microenvironment.

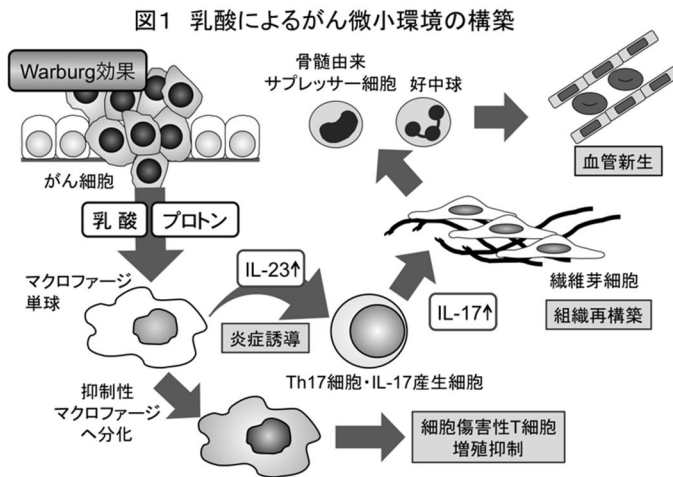
研究分野：腫瘍免疫

キーワード：がん免疫 がん微小環境 乳酸 免疫制御 プロトン IL-23 IL-17 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私たちは、世界に先駆けて、単なる解糖系の終末代謝産物であると考えられていたがんから放出される乳酸が、免疫細胞に働きがんの免疫環境に影響を与えることを発見した (図1)。がんが



代謝異常を示す事やがん組織に浸潤した免疫細胞の異常は、HanahanとWeinbergによって2011年にCell誌にまとめられたHallmarks of Cancer: The next generationにも示されているがんの特徴であるが、がんがどのようにそのような微小環境を形成するかという問いに答えられる報告はほとんどなかった。私たちは、骨髄系の細胞に働き、IL-23 依存的及び非依存的な経路に

よって、IL-17 産生を増強する事を示した。高乳酸環境は多くのがんに共通した性質であり、多くのがんで IL-23 産生の増強に関わっている可能性が考えられる。さらに、私たちは、乳酸が骨髄由来サプレッサー細胞 (MDSC) や M2 マクロファージのマーカである *Arginase1* (*ARG1*) の産生を増強する事を示した。また、乳酸と共に放出されるプロトンは、*ARG1* の発現を一時的に増強するだけでなく、一旦酸性環境に晒されたマクロファージは、酸性状態の除去後も抗原依存的な T 細胞の増殖を抑制する事を示した。これは、マクロファージを抑制性細胞に転換誘導した事を示す。また、私たちは、プロトンがエピジェネティックな変化を誘導する事も示している。

2. 研究の目的

本研究では、私達が、今まで明らかにしてきた乳酸によるシグナル伝達機構を詳細に解析し、臨床のグループと共同で、これらの現象の臨床におけるエビデンスを蓄積することを目的とする。今回、乳酸シグナル伝達機構のうち、IL-23/IL-17 経路に関わる因子の同定及び乳酸によるヒストンの修飾経路の解明を目的とする。臨床のグループとの共同研究では、乳酸濃度の測定及び乳酸濃度と M2 様マクロファージへの極性化との関連性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 私たちは、これまで、乳酸によって、IL-23/IL-17 経路に関わる分子として、そのシグナルをブロックする抗体の同定を試みた。また、乳酸は、ヒストン H3K27 のアセチル化を亢進するため、乳酸シグナルの下流分子をスクリーニングし、その分子を阻害剤を用いて同定した。さらに、クロマチン IP を行い、乳酸アニオン及びプロトンシグナルによる違いを解析した。

(2) 岐阜大学耳鼻咽喉科のグループと共同で、頭頸部癌における乳酸と M2 様マクロファージの集積との関連性を解析した。マクロファージマーカーとして *CD68*、M2 様マクロファージのマーカとし *MCSF* と *CD163* を解析した。さらに、乳酸の測定の代わりに、FDG-PET (2-Deoxy-2-[18F]fluoroglucose-positron emission tomography) を用いて、高乳酸の指標として使用できるかを検討した。

4. 研究成果

(1) 乳酸によって誘導され、IL-23/IL-17 経路を誘導する分子は、極めて重要と考えられるが、現在までに、分子を同定できていない。新たな研究費を用いて引き続き同定を続けていきたいと考えている。ヒストン H3K27 のアセチル化の誘導は、研究スタート時点では、乳酸アニオンと

プロトンでは同じシグナル経路を利用していると考えていたが、実際は、プロトン刺激では、H3K27のアセチル化が誘導されている遺伝子は、非常に限られておりシグナル経路も異なっていることを明らかにした。現在、論文準備中である。

(2) 以前行われた海外グループと同様に、頭頸部癌において、乳酸濃度は、がん部で著しく上昇していた。しかし、解糖系のマーカーである *GLUT1* 遺伝子や *LDHA* 遺伝子の発現とは、負に相関していた。さらに、高乳酸環境では、*CD68* の発現は減少していることから、マクロファージの数は減少するが、*MCSF* と *CD163* の割合は増加傾向にあり、浸潤マクロファージの中の M2 様マクロファージの比率が高まっている可能性が示唆された。現在、高乳酸マーカーとして、FDG-PET を使用できるどうかを検討し、論文を投稿中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

原著

1. Kato, H, Miyakawa Y, Hidaka Y, Inoue N, Ito S, Kagami S, Kaname S, Matsumoto M, Mizuno M, Matsuda T, Shimono A, Maruyama S, Fujimura Y, Nangaku M, Okada H Safety and effectiveness of eculizumab for adult patients with atypical hemolytic-uremic syndrome in Japan: interim analysis of post-marketing surveillance. *Clin. Exp. Nephrol.* 23(1):65-75, 2019 PMID: 29959568 DOI: 10.1007/s10157-018-1609-8. 査読有
2. Ito S, Hidaka Y, Inoue N, Kaname S, Kato H, Matsumoto M, Miyakawa Y, Mizuno M, Okada H, Shimono A, Matsuda T, Maruyama S, Fujimura Y, Nangaku M, Kagami S. Safety and effectiveness of eculizumab for pediatric patients with atypical hemolytic-uremic syndrome in Japan: interim analysis of post-marketing surveillance. *Clin. Exp. Nephrol* 23(1):112-121, 2019 PMID: 30039480 DOI: 10.1007/s10157-018-1610-2. 査読有
3. Akazawa, T., Ohashi, T., Wijewardana, V, Sugiura K, Inoue, N. Development of a vaccine based on bacteria-mimicking tumor cells coated with novel engineered toll-like receptor 2 ligands. *Cancer science*, 109(5) 1319-1329, 2018 PMID: 29575556 DOI: 10.1111/cas.13576 (関連論文) 査読有
4. Ohashi, T., Aoki, M., Tomita, H., Akazawa, T., Sato, K., Kuze, B., Mizuta, K., Hara, A., Nagaoka, H., Inoue, N., and Ito, Y. M2-like macrophage polarization in high lactic acid-producing head and neck cancer *Cancer Science* 108(6) 1128-1134, 2017 PMID: 29575556 DOI: 10.1111/cas.13576 (関連論文) 査読有
5. De Silva, NH., Akazawa, T., Wijewardana, V., Inoue, N., Oyamada, M., Ohta, A., Tachibana, Y., Wijesekera, DPH., Kuwamura, M., Nishizawa, Y., Itoh, K., Izawa, T., Hatoya, S., Hasegawa, T., Yamate, J., Inaba, T., Sugiura, K. Development of effective tumor immunotherapy by the combination of a dendritic cell-targeting Toll-like receptor ligand, interferon-gamma and cyclooxygenase inhibitors. *PLOS one* 12(11) e0188738, 2017 PMID: 29190690 DOI: 10.1371/journal.pone.0188738. (関連論文) 査読有
6. Roy, N., Ohtani, K., Hidaka, Y., Amano, Y., Matsuda, Y., Mori, K., Hwang, I., Inoue, N., Wakamiya, N. Three pentraxins C-reactive protein, serum amyloid p component and pentraxin 3 mediate complement activation using Collectin CL-P1 *Biochim Biophys Acta - General Subjects* 861(2):1-14, 2017 PMID: 27864148

DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.11.023. 査読有

7. Kojima-Kita K, Kuramochi-Miyagawa S, Nagamori I, Ogonuki N, Ogura A, Hasuwa H, Akazawa T, Inoue N, Nakano T. MIWI2 as an Effector of DNA Methylation and Gene Silencing in Embryonic Male Germ Cells. *Cell Rep*. 16(11):2819-28, 2016 PMID: 27626653

DOI: 10.1016/j.celrep.2016.08.027. 査読有

8. Nakanishi, K., Kukita, Y., Segawa, H., Inoue, N., Ohue, M., Kato, K. Characterization of the T cell receptor beta chain repertoire in tumor infiltrating lymphocytes *Cancer Med*. Sep;5(9):2513-2521, 2016 DOI: 10.1002/cam4.828. PMID: 27465739 (関連論文)

9. Roy, N., Ohtani, K., Matsuda, Y., Mori, K., Hwang, I., Suzuki, Y., Inoue, N., Wakamiya, N. Collectin CL-P1 utilizes C-reactive protein for complement activation. *Biochim Biophys Acta - General Subjects* 1860(6): 1118-1128, 2016 PMID: 26922829

DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.02.012. 査読有

その他総説

1. 大谷克城、日高義彦、井上徳光、若宮伸隆 補体系の役割と補体関連疾患 血液内科 78 (2) 184-191, 2019 査読無
2. 井上徳光 補体の活性化とその制御 分子リウマチ治療 11(4) 210-214, 2018 査読無
3. 宮田敏行、井上徳光 血栓と補体 日本補体学会学会誌 補体 55 (2) 13-45, 2018 査読有
4. 井上徳光 補体と自然免疫・獲得免疫 腎と透析 83 531-537, 2017 査読無
5. 大谷克城、井上徳光、若宮伸隆 補体関連検査とその考え方 腎と透析 83 538-543, 2017 査読無

〔学会発表〕(計 14 件 本研究関連 8 件、その他国際学会 6 件)

本研究関連発表

1. 井上徳光 がんの高乳酸環境と免疫制御 第22回日本がん免疫学会総会(招待講演)2018年 岡山
2. 大橋敏充、青木光広、赤澤隆、柴田博史、久世文也、井上徳光、伊藤八次 頭頸部癌におけるWarburg効果と腫瘍内M2様マクロファージの解析 第22回日本がん免疫学会総会 2018年 岡山
3. 大橋敏充、柴田博史、赤澤隆、井上徳光 FDG-PET/CTを用いた腫瘍内M2様マクロファージの評価 第77回日本癌学会学術集会 2018年 大阪
4. 赤澤隆、井上徳光、松浦成昭、宮代勲 「お笑い」が免疫に及ぼす影響の網羅的な解析— 笑いとはがん医療の実証研究— 第77回日本癌学会学術集会 2018年 大阪
5. 大橋 敏充、青木 光広、赤澤 隆、久世 文也、水田 啓介、井上 徳光、伊藤 八次 高乳酸頭頸部癌における M2 様マクロファージ分化の促進、第21回日本がん免疫学会総会 2017年 千葉
6. 井上徳光 がん微小環境における乳酸と免疫応答 第15回がんとハイポキシア研究会(招待講演) 2017年 淡路
7. 井上徳光、赤澤隆 がんが放出する乳酸によるヒストン修飾制御機構、第20回日本がん免疫学会総会、2016年 大阪
8. Akazawa, T., Sugiura, K., Inaba, T., Inoue, N Application of CR4-targeting antitumor immunoadjuvant for an advanced dendritic cell therapy. XXVI International Complement Workshop (国際学会) 2016年 金沢

その他発表(国際学会のみ)

1. Hidaka, Y., Inoue, N., Ohtani, K., Ohtsuka, Y., Sawai, T., Miyata, T., Ohsawa, I., Okada, H., Kinoshita, T., Sekine, H., Tsukamoto, H., Nakao, M., Mizuno, M., Murakami, Y., Horiuchi, T., Wakamiya, N. Comprehensive analysis of complement proteins and genes in thrombotic microangiopathy in Japan. XXVII International Complement Workshop (国際学会) 2018年 Santa Fe, U. S. A.
2. Hidaka, Y., Inoue, N., Ohtsuka, Y., Sawai, T., Miyata, T., Ohsawa, I., Ohtani, K., Okada, H., Kinoshita, T., Sekine, H., Tsukamoto, H., Nakao, M., Mizuno, M., Murakami, Y., Horiuchi, T., Wakamiya, N. Establishment of a comprehensive complement examination system for complement-related diseases by the Japanese Association for Complement Research (JACR). 6th International Conference "HUS & related diseases" (国際学会) 2017年, Innsbruck, Austria
3. Hidaka, Y., Inoue, N., Ohtsuka, Y., Sawai, T., Miyata, T., Ohsawa, I., Ohtani, K., Okada, H., Kinoshita, T., Sekine, H., Tsukamoto, H., Nakao, M., Mizuno, M., Murakami, Y., Horiuchi, T., Wakamiya, N. Establishment of a comprehensive complement examination system for complement-related diseases by the Japanese Association. for Complement Research (JACR), 16th European Meeting on Complement in Human Disease (国際学会) 2017, Copenhagen, Denmark
4. Murakami, Y., Inoue, N., Kawamotoi, M., Kohara, N., Kinoshita, T. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by PIGT mutations: Atypical PNH. XXVI International Complement Workshop (国際学会) 2016年 金沢
5. Roy, N., Ohtani, K., Yasuyuki Matsuda, Y., Kenichiro Mori, K., Hwang, I, Suzuki, Y., Inoue, N., Wakamiya, N. Collectin CL-P1 is involved in C-reactive protein-mediated complement activation XXVI International Complement Workshop (国際学会) , 2016年 金沢
6. Hidaka, Y., Inoue, N., Ohtsuka, Y., Sawai, T., Miyata, T., Osawa, I., Okada, H., Kinoshita, T., Sekine, H., Takahashi, M., Tsukamoto, H., Nakao, M., Nonaka, M., Matsushita, M., Yamamoto, T., Horiuchi, T., Wakamiya N. Establishment of a comprehensive complement examination system for complementrelated diseases by the Japanese Association for Complement Research XXVI International Complement Workshop (国際学会) 2016年 金沢

〔図書〕(計 2件)

1. 井上徳光、赤澤隆 獲得免疫
編者 小熊恵二、堀田博、若宮伸隆編 シンプル微生物学 第6版
南江堂 東京 474 (103-116), 2018
2. Inoue, N., Kinoshita, T.
Pathogenesis of Clonal Dominance in PNH; Growth Advantage in PNH.
Ed. Kanakura, Y., Kinoshita, T., Nishimura, J.
Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria-From bench to bedside: SpringerReference,
Springer-Verlag Tokyo 358 (229-251) 2017

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：赤澤 隆

ローマ字氏名：Akazawa Takashi

所属研究機関名：地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター（研究所）

部局名：その他部局等

職名：主任研究員

研究者番号（8桁）：80359299

(2)研究協力者

研究協力者氏名：大橋 敏充

ローマ字氏名：Ohashi Toshimitsu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。