

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19064

研究課題名(和文) 骨髄由来免疫抑制細胞におけるp16/p21の機能解明

研究課題名(英文) Analysis of functions of p16Ink4a and p21Cip1/Waf1 in myeloid-derived suppressor cells

研究代表者

大熊 敦史 (Okuma, Atsushi)

大阪大学・微生物病研究所・特任助教(常勤)

研究者番号：70726059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん免疫を抑制することでがんの進展を促進するmyeloid-derived suppressor cell (MDSC)が、CDKインヒビターであるp16及びp21を発現していることを見出した。がん抑制因子として知られるp16及びp21が、生体内では以下のような機構でがんの進展を促進する。MDSCのサブタイプの1つであるMo-MDSCにおいてp16、p21がケモカインレセプターCX3CR1の発現を亢進し、腫瘍部にMo-MDSCが集積する事でがん免疫を抑制する。また、抗がん剤として開発が進められているCDK阻害薬の中には、がんの進展を促進してしまう可能性がある事を示した。

研究成果の概要(英文)：p16Ink4a and p21Cip1/Waf1 act as tumour suppressors. However, we report an unexpected function of p16Ink4 and p21Cip1/Waf1, namely, tumour promotion through chemotaxis. In monocytic myeloid-derived suppressor cells (Mo-MDSCs), p16Ink4 and p21Cip1/Waf1 are highly expressed and stimulate CX3CR1 chemokine receptor expression by preventing CDK-mediated phosphorylation and inactivation of SMAD3. Thus, deletion of p16Ink4 and p21Cip1/Waf1 reduces CX3CR1 expression, thereby inhibiting Mo-MDSC accumulation in tumours expressing CX3CL1 and suppressing the tumour progression in mice. Notably, blockade of the CX3CL1/CX3CR1 axis suppresses tumour growth, whereas inactivation of CDKs elicits the opposite effect. These findings reveal an unexpected function of p16Ink4a and p21Waf1/Cip1 and indicate that regulation of Mo-MDSCs chemotaxis is a valuable potential strategy for control of tumour development.

研究分野：免疫学

キーワード：MDSC CDKインヒビター ケモタキシス

1. 研究開始当初の背景

p16Ink4a と p21Cip1/Waf1 は cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) として知られており、DNA ダメージを受けた際にその発現が誘導され、RB の活性化を介し不可逆的な増殖停止状態である細胞老化を誘導することが知られている (Campisi, Cell, 2005)。このため、古くから p16Ink4a と p21Cip1/Waf1 は重要ながん抑制因子として機能していると考えられてきた。確かに、p16Ink4a や p21Cip1/Waf1 遺伝子を欠損したマウスは様々な種類のがんを発症し早期に死亡するため、これら遺伝子が発がんを負に制御していることには間違いがない (Sharpless et al., Nature, 2001; Martin-caballero et al., Cancer Res., 2001; Takeuchi et al., Cancer Res., 2010)。しかし、それ以外の機能については、遺伝子欠損マウスが早期に死亡するため殆ど不明なままである。このような問題点を克服するために、これまで当研究室では p16Ink4a 及び p21Cip1/Waf1 遺伝子の発現を発光シグナルとしてマウスの生体内で可視化出来るイメージングマウス (p16-Luc, p21-Luc マウス) を開発してきた (Ohtani et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2007; Yamakoshi et al., J. Cell Biol., 2009)。その中で、発がんさせた p16-Luc マウスは、がん細胞だけでなく、脾臓やリンパ節など二次リンパ組織で p16Ink4a の発現を示す発光が強く観察されることがわかっていたが、発現細胞種やその機能・意義については不明であった。

今回申請者は、これらのイメージングマウスに発光活性を持たないがん細胞を移植したところ、担がんマウスの腫瘍部で p16Ink4a 及び p21Cip1/Waf1 遺伝子の発現が観察されるようになることを見出した。また、p16Ink4a に関しては、同様のコンセプトで作製された p16Luc/+ Knock-in マウスで腫瘍での発光が報告されている (Burd et al., Cell, 2013)。さらに、我々は免疫組織染色法などにより、腫瘍部に集積する p16Ink4a および p21Cip1/Waf1 発現細胞が myeloid-derived suppressor cell (MDSC) であることを突き止めた。MDSC はがん微小環境により誘導され、免疫系を抑制することでがんの進展や転移を助ける働きをもつ myeloid 系細胞集団である (Talmadge et al., Nat Rev Cancer, 2013)。近年、がん微小環境におけるがん免疫の抑制機構が解明され、PD-1 や CTLA4 などの分子標的が明らかになるにつれて、MDSC も同様にがん免疫治療の観点から注目を集めている (Qin et al., Nat. Med., 2014; Highfill et al., Sci. Transl. Med., 2014)。

そこで、p16Ink4a 及び p21Cip1/Waf1 遺伝子の二重欠損 (p16/p21 DKO) マウスへ、悪性皮膚がん (Spindle cell tumor) の細胞を皮下移植したところ、野生型マウスに比べがんの進展が遅いことが判明した。また、p16/p21 DKO マウスの MDSC を野生型マウスに移植した

場合、野生型マウス由来の MDSC を移植した群と比べ腫瘍の進展を促進する効果が弱いことを明らかにした。つまり、MDSC の機能の違いが p16/p21 DKO マウスにおける腫瘍の成長の遅延の原因の一つであることを示している。

2. 研究の目的

本研究案に先立ち、イメージングマウスを用いた *in vivo* での解析から、担がんマウスにおいて、がんに対する免疫応答を抑制することでがんの進展・転移を促進する myeloid-derived suppressor cell (MDSC) が、Cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) である p16^{Ink4a} 及び p21^{Cip1/Waf1} を発現していることを見出した。驚いたことに p16/p21 double knockout (DKO) マウスでは、MDSC の機能低下により移植したがん細胞の増殖が遅いことが判明した。これらの知見を基に本研究では MDSC における p16^{Ink4a}、p21^{Cip1/Waf1} の機能解明に取り組み、がん治療において注目されている CDK 阻害剤とがん免疫療法の双方に新たな知見をもたらすことを目標とする。

3. 研究の方法

in vivo でのがんの進展への影響について、MDSC における p16^{Ink4a} と p21^{Cip1/Waf1} の機能解明を目指し次の実験を行う。1) *in vitro* での MDSC の免疫抑制能を測定する。2) MDSC 移植実験によって、MDSC の遊走能の変化が腫瘍の進展に影響を及ぼすのかを *in vivo* で評価する。3) DNA マイクロアレイによる遺伝子発現変化の網羅的解析を行うことで、p16^{Ink4a}/p21^{Cip1/Waf1} の欠失と MDSC の機能低下をつなぐシグナル経路の探索をする。4) MDSC の遊走を阻害することで腫瘍の進展に影響するか *in vivo* で評価する。5) 3) で挙げられた候補を *in vitro* で評価する。6) また、MDSC における p16^{Ink4a}/p21^{Cip1/Waf1} の機能が細胞老化と関連するののかについても調べる。7) CDK 阻害薬を用い、CDK が MDSC の機能に与えるか明示する。

4. 研究成果

1) *in vitro* での MDSC の免疫抑制能

担がんマウスの MDSC を単離し、T 細胞との共培養下で T 細胞を抗原刺激し、活性化 T 細胞から産生される IL-2 を測定することで、MDSC の免疫抑制能を測定した。また、同様に共培養系で T 細胞受容体に刺激を入れることで T 細胞の増殖を、細胞分裂により希釈される蛍光色素である CFSE を用い測定し、MDSC の効果を評価した。その結果、WT マウス由来の MDSC と p16/p21 DKO マウス由来の MDSC で免疫抑制能に差は無かった。また、MDSC において T 細胞の増殖、活性化を抑制することが知られている iNOS や Arginase、PD-L1 など (Gabrilovich et al., Nat. Rev. Immunol., 2012) の発現を比較したが、有意な変化はなかった。

2) MDSC の遊走能の変化と腫瘍の進展 (細胞移植実験)

担がん WT または p16/p21 DKO マウス由来の MDSC を担がん WT マウスに移植することで、腫瘍の進展速度に変化があるか調べた。その結果、MDSC のサブタイプのうち Mo-MDSC を美静脈から移植した際に、WT マウス由来の細胞の方が p16/p21 DKO マウス由来の細胞よりも腫瘍の進展を促進することを突き止めた。この Mo-MDSC は、p16/p21 DKO マウスの腫瘍内でその数が少なかったサブタイプである。また、Mo-MDSC を腫瘍内に移植した際には genotype 間で変化はなかった。この結果は Mo-MDSC が腫瘍部に存在できれば、その機能は変化が無いことを示唆しており、Mo-MDSC の遊走能の違いを *in vivo* で確認することができた。

3) MDSC の遊走能の違いに関与する因子探索

DNA マイクロアレイによる遺伝子発現変化を WT マウス由来の MDSC と p16/p21 DKO マウス由来の MDSC で比較した。そうしたところ、CCR2, CCR5, CX3CR1 の発現が p16/p21 DKO マウス由来の MDSC で低下していた。

4) MDSC の遊走能の変化と腫瘍の進展 (ケモカイン-ケモカインレセプターについて)

上記のケモカインレセプターの中でも CX3CR1 はそのリガンド CX3CL1 の中和抗体や、がん細胞で CX3CL1 を knockdown することで、がんの進展が劇的に遅くなるもしくはがんが生着しないことを示した。

5) CX3CR1 発現誘導にかかわる因子の検証

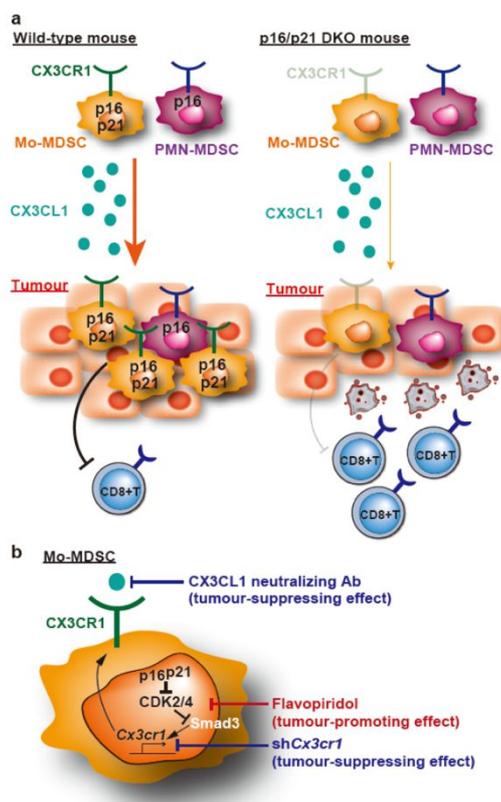
タンパク質間相互作用データベースの検索により候補にあがった Smad3 は、CDK2 によりリン酸化され、そのレベルは p16/p21 DKO 由来の Mo-MDSC は WT と比べて高いことを示した。また chromatin-IP や CX3CR1 プロモーターレポーターアッセイによって、CDK は Smad3 を介して CX3CR1 の転写を抑制することを示した。

6) 細胞老化との関係性

あらゆる細胞老化のマーカー (DNA ダメージ、細胞周期の不可逆的な停止、炎症性サイトカインの産生増加、ラミン B の発現低下) を調べたが、細胞老化と同様の表現型を示さなかった。

7) CDK 阻害薬の MDSC に対する作用

CX3CR1 を高発現し、CDK 阻害薬に耐性のあるがんでは、抗がん剤として開発されている CDK 阻害薬の中には、がんの進展を促進してしまうことを担がんマウスもで示した。



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 1 件)

Okuma A*, Hanyu A, Watanabe S, Hara E*. "p16Ink4a and p21Cip1/Waf1 promote tumour growth by enhancing myeloid-derived suppressor cells chemotaxis." *Nat Commun.*, 2017 Dec 12; 8(1): 2050. doi:10.1038/s41467-017-02281-x 査読あり

[学会発表](計 1 件)

大熊敦史 「The role of p16Ink4a and p21Cip1/Waf1 in myeloid-derived suppressor cells」第 45 回日本免疫学会学術集会 2016 年 12 月 7 日 (沖縄)

[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：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大熊 敦史 (Okuma, Atsushi)
大阪大学・微生物病研究所・特任助教(常勤)

研究者番号：70726059

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()