

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19070

研究課題名(和文) STINGを介した腫瘍内への細胞集積とその抗腫瘍免疫応答に関わるメカニズムの解明

研究課題名(英文) Study for mechanism of STING-mediated inflammation in tumor microenvironment

研究代表者

大栗 敬幸 (Ohkuri, Takayuki)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：70564061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：cGAMPの腫瘍内活性化によるマクロファージの腫瘍内浸潤にはSTING/IRF3/IRF7経路を介してI型IFNsが誘導されることが重要であることが示唆された。次に、骨髄キメラマウスを用いた解析によって、腫瘍内の骨髄球形細胞以外にも血管内皮細胞や間質細胞によって産生されるI型IFNが重要であることが示唆された。以上のことから、cGAMPによってSTINGを介して腫瘍内を活性化することによってI型IFNsが誘導され活性化マクロファージが大量に腫瘍内浸潤し、抗腫瘍免疫応答が活性化されることが明らかになった。

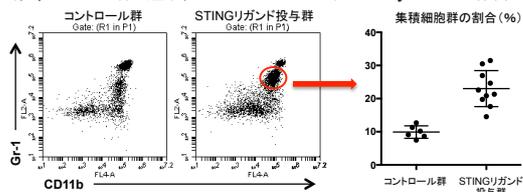
研究成果の概要(英文)：STING contributes to anti-tumor immunity through sensing tumor-derived genomic DNAs in the tumor-bearing host. Although injection of STING ligands into tumor sites shows anti-tumor effects via inducing type I IFNs and activating immune system, precise events caused in the tumor remain to be assessed. We found that CD11b+ Ly6C+ cells were found to robustly accumulate into the tumor site after intratumoral injection of STING ligand, cGAMP in the 4T1 mouse model. The accumulating subsets were positive for F4/80 and Ly6C but not Ly6G, macrophage phenotypes. The accumulating macrophages in the tumor site were also confirmed in the other mouse models. In STING-deficient mice, intratumoral cGAMP treatment did not induce macrophage accumulation. The functional analyses revealed that the macrophages showed activities of phagocytosis and TNF $\alpha$  production. These results demonstrate that the accumulating macrophages into the tumor site by STING stimulation contribute to the anti-tumor immunity.

研究分野：tumor immunology, pathology

キーワード：STING macrophages

## 1. 研究開始当初の背景

STING (Stimulator of interferon genes) は細胞質内に存在する DNA 等の核酸を感知するセンサーであり、ウイルス感染の際に I 型 IFN の産生を誘導することによって効果的な抗ウイルス免疫の惹起に寄与していることが知られていた。しかし、本申請者は、脳腫瘍のマウス自然発癌モデルを用いて、STING の機能欠損マウスは野生型マウスに比べて脳腫瘍の形成が早いだけではなく、形成された腫瘍内における免疫抑制性細胞の割合も高いことを明らかにした。さらに、この知見をもとに STING リガンドである c-di-GMP (cyclic diguanylate monophosphate) が癌の治療剤になるかを検討するために、マウス脳室内にグリオーマ細胞を移植し、c-di-GMP の腫瘍内投与について検討した結果、腫瘍内に効果的なエフェクター T 細胞を集積させ、腫瘍増殖を抑制することを明らかにした (Ohkuri T et al. *Cancer Immunol Res* 2014)。STING リガンドによる抗腫瘍免疫活性化機能に関してさらなる研究を行った結果、申請者は、STING リガンド投与後 10 時間という早期の段階において、CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>mid</sup> 細胞群が腫瘍内に集積し始めることを発見し (下図)、この細胞群は CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> 活性



化マクロファージであることを見出している。これは、STING リガンドの腫瘍内投与によって最初に見られる大きな変化であり、3 種類の癌細胞株を用いた移植モデルで同様に見られることから、腫瘍内集積マクロファージと抗腫瘍効果の間には何らかの因果関係があると予想される。更に申請者は、STING リガンドを投与する前にマクロファージを除去すると、STING の抗腫瘍効果が見られなくなるという知見も得ている。つまり、腫瘍内で STING リガンドが引き起こす活性化反応が積極的にマクロファージを腫瘍内に呼び込み、集積してきたマクロファージが何らかの作用を示すことによって、結果的に抗腫瘍免疫応答を引き起こしていることが推測される。以上のことから、STING リガンドの腫瘍内投与によって引き起こされる一連の現象について、その分子メカニズムを明らかにすることにより、より効果的で画期的な抗腫瘍免疫活性化法の開発へ繋げることが可能になると期待される。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、組織学的並びに分子学的手法を用いて、STING リガンドの腫瘍内投与によって集積するマクロファージの生物学的性状を解析するとともに、マクロファ

ジの腫瘍内集積に関与する分子メカニズムを解明し、腫瘍内に集積した活性化マクロファージがどのように抗腫瘍効果に寄与しているかを以下の点を中心に明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) ① BALB/c マウスに同系統由来の乳癌細胞株である 4T1 細胞を皮内接種し、5 日後に cGAMP およびコントロールとして溶媒である PBS を腫瘍組織内に直接投与した。投与前、投与 2、4、10、16、24 時間後に腫瘍組織を回収し、腫瘍組織内の CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群の割合をフローサイトメーターを用いて解析する。

② cGAMP の腫瘍内投与による CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群の腫瘍内集積が STING 依存的であるかを STING 欠損マウスを用いて検討する。このマウスは C57BL/6 系統であるため、腫瘍株は同系統由来のメラノーマ細胞株である B16F10 細胞を用いる。

(2) ① cGAMP によって集積する CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群の形態学的解析を行うために、cGAMP 投与後の腫瘍組織を回収し、セルソーターを利用して単一細胞群を分取する。分取した細胞をサイトスピンし、ディクイック染色し顕微鏡観察を行う。また、抗原提示能を有するかを検討するために、フローサイトメーターを用いて MHC class I および class II の発現量を解析する。

② CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群の貪食能を検討するために、cGAMP と共に蛍光ビーズを腫瘍内に投与し、16~24 時間後に腫瘍内に浸潤してきた CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群を回収し、Ly6 を蛍光標識後にサイトスピンし蛍光顕微鏡で Ly6C 陽性細胞内に蛍光ビーズが検出されるか解析する。

③ CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群の抗腫瘍効果に寄与する分子の遺伝子発現量を検討するために、セルソーターを利用して細胞群を単離し、抽出した mRNA から Ifnb、Cxcl10 などの遺伝子発現量をリアルタイム qPCR によって解析する。

(3) ① cGAMP による CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群の腫瘍内浸潤のメカニズムを明らかにするために、CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群の細胞表面に発現されているケモカインレセプターをフローサイトメーターを用いて解析する。

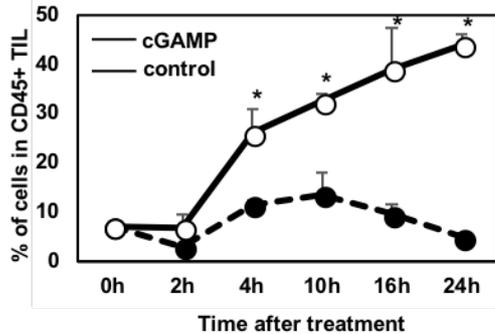
② 陽性であることが認められたケモカインレセプターに対するシグナルを阻害する抗体を用いて、cGAMP による CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群の腫瘍内浸潤を阻害できるかを明らかにするために、それらに対する阻害抗体をマウスに腹腔内に投与した後に cGAMP を腫瘍内投与し CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群の腫瘍内浸潤割合を解析する。

③ さらに、STING の下流には STAT6 があり STAT6 依存的に CCL2 や CCL20 が産生されると

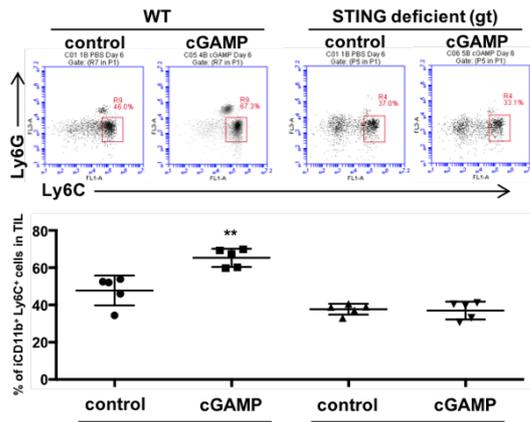
という報告があることから、STAT6 欠損マウスを用いて cGAMP による CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群の腫瘍内浸潤が認められるか検討する。

#### 4. 研究成果

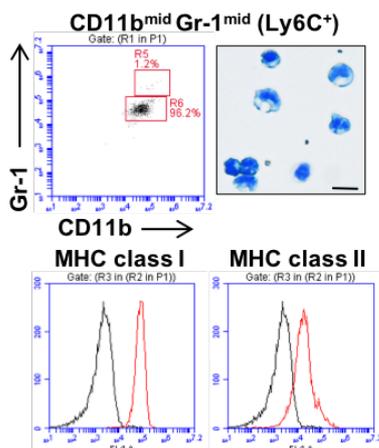
(1) ①STING リガンドである cGAMP を腫瘍内に直接投与することによって投与後 24 時間までに時間依存的に CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>の細胞群が腫瘍内に集積することを確認した (下図)。



②、cGAMP 投与による CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群の腫瘍内集積は STING 機能欠損マウスでは認められなかったことから、STING 依存性であることが確認された (下図)。



(2) ①CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群を形態学的に解析するために、セルソーターを利用して単一細胞群を分取しサイトスピン後、ディフクイック染色した結果、この細胞群は単球・マクロファージ系の細胞であることが確認された。また、フローサイトメーターを用いた解析によって、T 細胞に対する抗原提示に

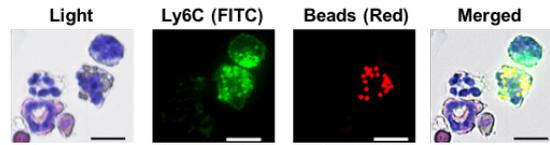


必須な MHC class I および class II を発現していることが確認された (左図)。このことから、cGAMP によって腫瘍内に集積する細胞群は抗原提示細胞になり

ることが示唆された。

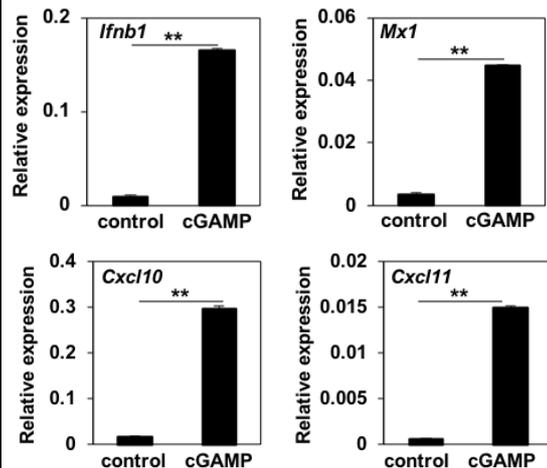
② cGAMP と蛍光ビーズを同時に腫瘍内投与した。FITC 標識された抗 Ly6C 抗体を用いて染色した腫瘍内浸潤細胞をサイトスピンし、蛍光顕微鏡で解析した結果、蛍光ビーズを含む Ly6C 陽性細胞が検出された (下図)。

このことから、cGAMP によって腫瘍内に浸潤



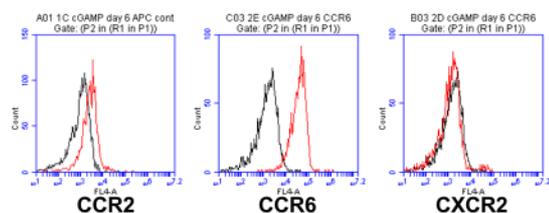
する CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群は、貪食能を有していることが示唆された。

③ CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群の抗腫瘍効果に寄与する分子の遺伝子発現量を検討するために、セルソーターで単離した CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群から RNA を抽出しリアルタイム qPCR によって *Ifnb*, *Cxcl10* などの遺伝子発現量を解析した。その結果、対照群 (腫瘍内に PBS を投与した後に存在する同じ細胞マーカーをもつ細胞群) に比べて *Ifnb1*, *Mx1*, *Cxcl10*, および *Cxcl11* の発現量が有意に高いことが確認された (下図)。以上のことから、cGAMP によって集積する



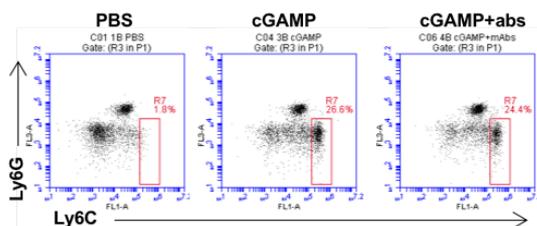
CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群は抗腫瘍免疫応答を惹起する M1 様の単球・マクロファージ系細胞であることが示唆された。

(3) ①cGAMP による CD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群の腫瘍内浸潤のメカニズムを明らかにするために、細胞群の細胞表面に発現されるケモカインレセプターを解析した結果、CCR2 および CCR6 を発現していることが確認された。CXCR2 は発現していなかった (下図)。



② CCR2 および CCR6 のそれぞれのリガンドである CCL2 および CCL20 に対する中和抗体を

マウス腹腔内に投与して検討した結果、cGAMPによるCD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群の腫瘍内浸潤を阻害できなかった(下図)。



このことから、これらのケモカイン・ケモカインレセプターシグナルを利用していないことが示唆された。

③ STAT6 欠損マウスを用いた検討においても、cGAMPによるCD11b<sup>mid</sup>Gr-1<sup>mid</sup>Ly6C<sup>+</sup>細胞群の腫瘍内浸潤が認められたことから、STINGによって活性化されるシグナル伝達経路のうちIRF3もしくはIRF7の関与が示唆された。

## 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2件)

- ① Takayuki Ohkuri、Akemi Kosaka、Toshihiro Nagato、Hiroya Kobayashi、Effects of STING stimulation on macrophages: STING agonists polarize into “classically” or “alternatively” activated macrophages?, Hum Vaccin Immunother、査読有、2018、14(2):285-287  
DOI: 10.1080/21645515.2017.1395995.
- ② Takayuki Ohkuri、Akemi Kosaka、Kei Ishibashi、Takumi Kumai、Yui Hirata、Kenzo Ohara、Toshihiro Nagato、Kenzo Oikawa、Naoko Aoki、Yasuaaki Harabuchi、Esteban Celis、Hiroya Kobayashi、Intratumoral administration of cGAMP transiently accumulates potent macrophages for anti-tumor immunity at a mouse tumor site、Cancer Immunol Immunother、査読有、2017、66(6):705-716  
DOI: 10.1007/s00262-017-1975-1.

[学会発表] (計8件)

- ① 大栗 敬幸、小坂 朱、石橋 佳、大原賢三、平田 結、及川 賢輔、青木 直子、長門 利純、永田 真莉乃、原渕 翔平、小林 博也、Intratumoral cGAMP injection accumulates M1 macrophage in tumor via NF-kB/TLR4 pathway to enhance anti-tumor immunity、北海道病理談話会、2017年10月14日、北海道
- ② 大栗 敬幸、小坂 朱、石橋 佳、金城その子、百合野 秀朗、大原賢三、平田 結、及川 賢輔、青木 直子、長門 利純、池尾 一穂、橋本 真一、小林 博也、cGAMPの腫瘍内投与によってNF-kB/TLR4依存的にM1マクロファージ

を腫瘍内に集積させ抗腫瘍免疫応答を活性化させる、癌学会、2017年9月28日、神奈川県

- ③ Takayuki Ohkuri、STING-mediated inflammation in tumor site、Oncology Focus Symposium in Sapporo、2017年7月24日、北海道
- ④ 大栗 敬幸、小坂 朱、石橋 佳、小林 博也、がん免疫療法研究の最前線、肺癌学会ワークショップ、2017年7月1日、北海道
- ⑤ 大栗 敬幸、小坂 朱、石橋 佳、金城その子、熊井 琢美、大原賢三、平田 結、永田 真莉乃、原渕 翔平、長門 利純、及川 賢輔、青木 直子、百合野 秀朗、門間 則和、池尾 一穂、橋本 真一、小林 博也、Intratumoral STING stimulation recruits M1 macrophage in the tumor via NF-kB/TLR4 pathway to trigger anti-tumor immunity、がん免疫学会、2017年6月28日、千葉県
- ⑥ Takayuki Ohkuri、Akemi Kosaka、Kei Ishibashi、Takumi Kumai、Kenzo Ohara、Yui Hirata、Toshihiro Nagato、Kensuke Oikawa、Naoko Aoki、Hiroya Kobayashi、Intratumoral STING stimulation transiently accumulates M1-like macrophage in the tumor microenvironment resulting in the anti-tumor effects、病理学会、2017年4月28日、東京都
- ⑦ 大栗 敬幸、小坂 朱、石橋 佳、熊井 琢美、平田 結、大原賢三、永田 真莉乃、長門 利純、及川 賢輔、青木 直子、原渕 保明、小林 博也、STINGリガンドの腫瘍内投与はマクロファージを腫瘍内に集積させ抗腫瘍免疫応答を誘導する、北海道病理談話会、2016年10月15日、北海道
- ⑧ Takayuki Ohkuri、Akemi Kosaka、Kei Ishibashi、Kenzo Ohara、Yui Hirata、Toshihiro Nagato、Naoko Aoki、Kensuke Oikawa、Yasuaki Harabuchi、Hiroya Kobayashi、2'3'-cGAMP suppresses the migration of myeloid-derived suppressor cells into the tumor site、癌学会、2016年10月6日、神奈川県

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大栗 敬幸 (OHKURI, Takayuki)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号: 70564061