

令和 元年 6 月 19 日現在

機関番号：24402

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07024

研究課題名(和文)腫瘍免疫強化を誘導するがん微小環境改善療法の開発

研究課題名(英文)Developing of tumor microenvironment improvement therapy to induce anti-tumor immunity

研究代表者

西出 峻治(Nishide, Shunji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・医員

研究者番号：10803132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究にて、腫瘍移植マウスにおいてプロリル水酸化酵素(PHD)阻害薬により腫瘍組織内の血管を正常化し、腫瘍組織の環境を改善することを確認した。さらにin vivoにおいてPHD阻害薬がマクロファージの貪食活性を促進することを明らかとした。これによりPHD阻害薬を用いて腫瘍環境の改善が腫瘍免疫を活性化することを明らかとした。本研究によってがん免疫療法の新たな治療戦略が拓かれると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん微小環境は腫瘍免疫を低下させる一因となっている。これまでに、がん微小環境改善が腫瘍免疫に与える影響を検討したものはほとんどない。本研究により生体内でのがん微小環境の改善が腫瘍免疫の活性化をもたらすことを明らかとした。これによりPHD阻害薬を用いた、新しいがん免疫療法を提案できると考える。さらに現在、PHD阻害薬は慢性腎不全患者の腎性貧血治療薬としても期待されているが、本研究によって将来的にPHD阻害薬を使用する慢性腎不全、透析患者の免疫が活性化する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we confirmed that prolyl hydroxylase (PHD) inhibitor normalizes tumor vessels and improves the tumor microenvironment in mice. Furthermore, We reveal that PHD inhibitors activate phagocytosis of macrophages in vivo. In this study, We find that improvement of the tumor environment activate tumor immunity by using PHD inhibitors. We believe that this research will open up new therapeutic strategies against cancer.

研究分野：泌尿器

キーワード：腫瘍免疫 がん微小環境 マクロファージ 貪食能 PHD阻害薬 低酸素誘導因子

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

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織内の血管は正常な血管と異なり、脆弱かつ不規則に走行し血流が乏しい。それ故、腫瘍組織は低酸素・低 pH かつ、間質圧が上昇しており、がん微小環境と呼ばれる特殊な環境を形成している。こうした環境では薬物送達の効率が低下するだけでなく、化学療法や放射線療法などの治療抵抗性の一因となっている (Jain RK: *Cancer Cell*, 26: 605-622, 2014)。

さらになん微小環境では、腫瘍免疫が抑制される (Wherry EJ: *Nat. Immunol*, 12: 492-499, 2011)。このため、がん微小環境は腫瘍免疫を抑制する一因となっている。近年、免疫チェックポイント阻害剤などの免疫療法が注目されているが、多くのがんでの奏効率は 10~30% 前後であり十分ではない。そこで免疫療法の効果を上げるためには、免疫細胞が腫瘍組織において十分に機能するように、がん微小環境の改善が重要と考えられている。

2. 研究の目的

近年、免疫チェックポイント阻害剤などの免疫療法が注目されているが、多くのがんでの奏効率は決して十分ではない。そこで免疫療法の効果を上げるためには、免疫細胞が腫瘍組織において十分に機能するように、腫瘍組織の環境を改善させることが重要と考える。これまでに申請者らは腫瘍移植マウスにおいてプロリル水酸化酵素 (PHD) 阻害薬により腫瘍組織内の血管を正常化し、腫瘍組織の環境を改善することを確認している。さらに *in vitro* では PHD 阻害薬が T 細胞の活性を促進するとの報告もあり、PHD 阻害薬の腫瘍環境の改善との相乗効果も期待できる。そこで本研究の目的は PHD 阻害薬を用いることによる腫瘍環境の改善が腫瘍免疫を活性化するか否かを明らかにすることである。本研究によってがん免疫療法の新たな治療戦略が拓かれると考える。

3. 研究の方法

PHD 阻害薬によるがん微小環境の改善が、腫瘍免疫を活性化するか否かを明らかにするために以下のことを行った。

- (1) 様々な癌腫の腫瘍移植モデルにおいて、PHD 阻害薬により腫瘍血管の正常化が生じるか明らかにした。
- (2) 腫瘍血管正常化によりがん微小環境が改善するかを明らかにする。
- (3) PHD 阻害薬による微小環境改善が腫瘍免疫にもたらす影響を明らかにする。

様々な癌腫の腫瘍移植モデルに対し、PHD 阻害薬が血管正常化を誘導するか検討を行った。

(PHD 阻害薬の腫瘍特異性の評価検討)

マウスの皮下に腫瘍細胞を移植したマウス腫瘍移植モデルにおいて、PHD 阻害剤を投与後、腫瘍を摘出し、免疫染色にて腫瘍血管の構造的、機能的変化を評価した。構造的変化は血管内皮細胞マーカーである CD31 で免疫染色し、血管密度、血管数、血管径を評価した。また、Z0-1 染色にて血管内皮細胞のタイトジャンクション、NG-2 染色にて血管周皮細胞が血管内皮細胞を覆っているか否か解析することにより腫瘍血管正常化の評価を行った。

以上の評価系を膀胱癌細胞など様々な癌腫で行い、PHD 阻害薬の腫瘍特異性の評価を行った。また、マウス腫瘍移植モデルにおいて PHD 阻害剤を投与したのち、正常血管では血管外漏出しない蛍光標識高分子量デキストランを尾静脈より投与した。デキストランが組織に灌流された時点で組織を摘出し凍結切片を作製した。蛍光顕微鏡にて組織上の蛍光領域を検出し、定量評価することにより組織灌流性および血液の血管外漏出の評価を行った。

PHD 阻害薬による腫瘍血管の正常化により、がん微小環境が改善するか否かを評価を行った。

(腫瘍血管正常化とがん微小環境改善の評価)

腫瘍内の低酸素領域をがん微小環境の指標とし、これを検出・評価することによりがん微小環境の改善がなされたか否かを評価を行った。PHD 阻害薬の投与により腫瘍血管の正常化が生じるマウス腫瘍移植モデルにおいて PHD 阻害薬を投与後、低酸素プローブのピモニダゾールを投与した。腫瘍組織内に取り込まれたピモニダゾールを検出することにより腫瘍内の低酸素領域の評価を行った。

PHD 阻害薬によるがん微小環境の改善により免疫細胞の活性が変化するか評価した。

マウス腫瘍移植モデルにおいて PHD 阻害剤を投与後、マウスの血液中、腫瘍組織において免疫細胞 (T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞、マクロファージなど) の細胞数や各集団の割合についてフローサイトメーターを用いて解析・評価を行った。これらの細胞集団を検出・同定するには細胞表面マーカーとして細胞傷害性 T 細胞は CD8、ヘルパー T 細胞は CD4、NK 細胞は NK1.1 などを用いた。また、マウス腫瘍移植モデルにおいて PHD 阻害剤を投与した後に腫瘍組織を摘出し、マクロファージを単離し、腫瘍内マクロファージの貪食能を評価した。

4. 研究成果

本研究において、PHD 阻害薬を用いることで腫瘍血管を正常化し、がん微小環境を改善することを明らかにした。さらに、PHD 阻害薬が腫瘍増殖を抑制することを見出した。その際に腫瘍内マクロファージにおける、がん細胞への貪食活性が上昇していることを明らかとした。(論文投稿中)

また本研究の中で、PHD 阻害薬を投与した腫瘍担癌マウスの腫瘍からマクロファージを単離し、未処置の担癌マウスの腫瘍に局所注入した実験系においても腫瘍増殖を抑制した。以上の事から PHD 阻害薬による腫瘍増殖の抑制はマクロファージが基盤となり、腫瘍免疫が活性化していることを明らかとした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 国内学会

概要：年会優秀発表賞候補演題 (英語発表)

学会名：第 92 回 日本薬理学会年会

演題名：Explore the effect of PHD inhibitor on innate immune systems in tumor mouse model.

演者：Shunji Nishide, Shinji Matsunaga, Masayuki Shiota, Takehiro Yamaguchi, Junji Uchida, Tatsuya Nakatani, Katsuyuki Miura and Shuhei Tomita

場所：Osaka

年月日：2019 / 3 / 15

(2) 国内学会

概要：一般演題

学会名：第 52 回 臨床腎移植学会

演題名：腎性貧血治療薬 Roxadustat の自然免疫系への影響

演者：西出峻治、内田潤次、島田久生、香束昌宏、壁井和也、岩井友明、桑葉伸介、長沼俊秀、武本佳昭、仲谷達也

場所：大阪

年月日：2019 / 2 / 14

〔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：

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：
国内外の別：

〔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：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。