

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07222

研究課題名(和文) 腫瘍局所マクロファージの形質決定分子を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategy targeting the the molecule governing the differentiation of TAM

研究代表者

村岡 大輔 (MURAOKA, Daisuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・准教授

研究者番号：20608955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：免疫チェックポイント阻害療法などのがん免疫療法が、その高い有効性から注目を集めている。しかしながら、一部の癌は、これらの治療法に対し不応答性であることが問題となっている。不応答性となる原因として、非活性化状態であり抗原提示能を示さない腫瘍局所マクロファージ tumor-associated macrophages (TAM) の存在が鍵となることが明らかになってきた。本研究では、この様なマクロファージの性質を決定する分子を同定し、新しい治療法を開発することを目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
がん免疫療法の治療効果を向上させる為に、TAMを標的とした様々な戦略が取られてきた。しかしながら、未だにTAMの性質を制御する方法は確立されていない。本研究では、IKKがTAMの性質決定において重要な分子であることを明らかにし、その阻害が免疫チェックポイント阻害療法の有効性を向上させることを明らかにした。当研究成果は、今後のがん免疫療法の適応拡大につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Although cancer immunotherapies including immune checkpoint inhibitors therapy show efficacy in a part of the cancer patient, many patients are refractory to these immunotherapies. The mechanisms underlying this tumor immune resistance have not been fully elucidated but it has been considered that tumor-associated macrophages (TAMs) as a key factor correlate with this resistance. In this project, we identified the molecule governing the character of TAMs and established the therapeutic strategy for cancer targeting these molecules.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍局所マクロファージ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

T細胞などの免疫系が認識する腫瘍特異的抗原の発見以来、がん免疫療法の開発が盛んに行われている。近年では、免疫チェックポイント阻害剤がその高い治療効果から多くの期待を集めており、更なる有効性向上を目指した多くの研究が進められている。しかし、その一方で患者の約6~8割が当治療法に対し不応答性であることが深刻な問題となっている。不応答性の原因は腫瘍局所の免疫環境にあり、特に免疫チェックポイント阻害剤の標的分子 (PD-L1・PD-1) の発現欠如並びに CD8 陽性 T 細胞浸潤の欠如が指摘されているが (Weiping Zou ら, Science Translational Medicine, 2016) 未だこの様な難治性腫瘍に関する知見は不足しており、チェックポイント阻害剤不応答性腫瘍を標的にした基礎研究および有効な治療法の開発は喫緊の重要な課題である。

### 2. 研究の目的

研究代表者は現在までに、腫瘍局所マクロファージ (Tumor associated macrophage: TAM) の形質が腫瘍のチェックポイント阻害剤の応答性と密接に相関することを示してきた。本研究では、この様な腫瘍局所マクロファージの形質 (活性・抗原提示能) 決定を担う責任分子を同定し、当該分子を標的とした新規治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) TAM の網羅的遺伝子解析

免疫チェックポイント阻害療法応答性腫瘍 (CT26、CMS7、CMS5a/NY) および不応答性腫瘍 (CMS5a) を BALB/c マウスへと皮下移植し腫瘍回収後に、セルソーターを用いて TAM を精製した。精製した TAM より RNA を抽出後に cDNA を作製し、マイクロアレイ解析を行った。当網羅的遺伝子発現データを Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) にて解析した。

#### (2) TAM のフェノタイプ解析

BALB/c マウスおよび nude mouse に CMS5a/NY を皮下移植した後に腫瘍を回収して、TAM における各種活性化マーカーの発現をフローサイトメトリーを用いて解析した。

#### (3) TAM の抗原提示能の解析

BALB/c マウスおよび nude mouse に CMS5a/NY を皮下移植し腫瘍回収後、セルソーターを用いて TAM を精製した。精製した TAM と 9m 特異的 TCR 発現遺伝子操作マウスより回収した CD8 陽性 T 細胞を共培養した。CD8 陽性 T 細胞の分裂を TAM の抗原提示能の指標とした。

#### (4) TAM の性質決定に関わる分子のスクリーニング

BALB/c マウスに CMS5a を皮下移植したマウスから腫瘍を回収し、培養した。各薬剤を培地へと添加し形態変化をアレイスキャンにて観察した。

#### (5) 抗腫瘍試験

BALB/c マウスに CMS5a を皮下移植した後、IKK 阻害剤および免疫チェックポイント阻害抗体 (抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 GITR 抗体) を投与し、経時的に腫瘍サイズを計測した。

### 4. 研究成果

腫瘍のチェックポイント阻害剤への応答性を規定する TAM の形質決定を担う分子を同定する為、免疫チェックポイント阻害療法応答性腫瘍および不応答性腫瘍由来 TAM における網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、不応答性および応答性腫瘍の TAM 間で IFN- $\gamma$  シグナルなどの各種サイトカイン関連シグナル分子の発現が異なっていることが明らかになった (図 1)。

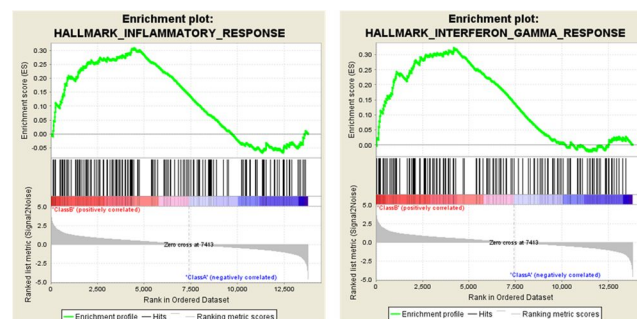


図 1. TAM の網羅的遺伝子発現解析 免疫チェックポイント阻害療法反応性 (CT26、CMS7、CMS5a/NY) および不応答性腫瘍 (CMS5a) より TAM を精製し網羅的遺伝子発現解析を行った。

網羅的遺伝子解析により、IFN- $\gamma$  関連遺伝子の発現が異なることが明らかになった為、次に当シグナルに注目し TAM の形質決定への IFN- $\gamma$  シグナルの関わりについて IFN- $\gamma$  ノックアウトマウスを用いて検討を行った。腫瘍局所マクロファージが活性化する免疫チェックポイント応答性腫瘍である CMS5a/NY を野生型マウスおよび IFN- $\gamma$  KO マウスに皮下移植

し、TAMの活性化状態を検討した。その結果、野生型マウス由来のTAMでは、各種活性化マーカーの発現が上昇しているのに対し、IFN- $\gamma$  KOマウス由来のTAMではこの様な活性化が観察されなかった(図2A)。また、TAMの抗原提示能についても、活性化分子の発現と同様に、野生型マウスで観察されたTAMの抗原提示能がIFN- $\gamma$ マウスでは消失することが明らかになった(図2B)。さらに、このようなTAMの性質決定におけるT細胞の重要性を検討する為、ヌードマウスを用いて同様の検討を行った。その結果、ヌードマウス由来のTAMは、活性化状態が弱く且つ抗原提示能が欠損しており、TAMのこれらの機能獲得にはT細胞が関与していることが示された(図2A,B)。また、抗CD8抗体および抗CD4抗体によりこれらの細胞をそれぞれ除去することで、各細胞の重要性についても検討し、CD8およびCD4の両細胞がTAMの性質決定に重要である事を明らかにした(図2C)。

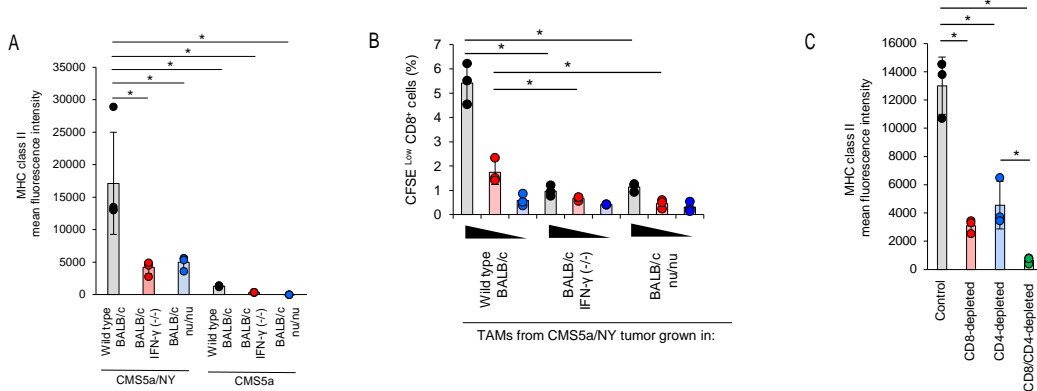


図2. BALB/cマウスおよび nude mouse にCMS5a/NYを皮下移植した。A) 腫瘍移植7日後に、腫瘍を回収しフローサイトメトリーにてTAMにおけるMHCクラスIIの発現を解析した。B) 腫瘍移植7日後に、腫瘍を回収しTAMを精製した後、TAMにおける抗原提示能を評価した。C) 腫瘍移植日の前日に、抗CD8抗体および抗CD4抗体を投与し、各細胞を枯渇処理したのち腫瘍移植を行った。腫瘍移植7日後に、腫瘍を回収しフローサイトメトリーにてTAMにおけるMHCクラスIIの発現を解析した。

次にIFN- $\gamma$ シグナル以外のTAMの性質決定に関わる分子を同定する為、TAMを用いたスクリーニング系を構築し、新規シグナル分子の探索を行った。まずは、スクリーニング系の確認の為、TAMの性質を転換すると報告があるCpG ODNをプレートに添加し形態観察を行った。その結果、CpGを添加することで、TAMの存在依存的に腫瘍由来培養細胞がスフェロイドを形成することが明らかになった。次に、このスフェロイド形成を指標としたスクリーニング系を用いて、TAMの形態変化を導くシグナル分子の探索を様々なシグナル分子阻害剤を用いて行った。その結果、IKKの阻害剤であるIKK-16の添加により、TAMのスフェロイド形成が確認された。そこで、このIKK阻害によるTAMの性質転換が免疫チェックポイント阻害療法の治療効果を改善するかを検討した。その結果、IKK-16を免疫チェックポイント阻害療法と併用することで、治療効果を有意に上昇させられることが明らかになった(図3)。

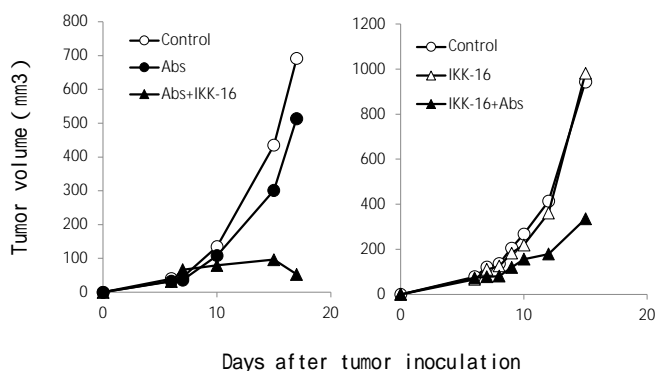


図3. BALB/cにCMS5a/NYを皮下移植した後、IKK-16および抗免疫チェックポイント分子抗体を投与した。経時的に、腫瘍サイズを測定し、各治療効果を評価した。

以上より、IFN- $\gamma$ シグナルおよびT細胞がTAMの活性化状態や抗原提示能を獲得するのに重要であり、これが腫瘍のチェックポイント療法への感受性を規定する可能性があることが示唆された。また、このようなTAMの性質転換の標的として、NF- $\kappa$ Bシグナルが有用である可能性も示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Muraoka Daisuke, Seo Naohiro, Hayashi Tae, Tahara Yoshiro, Fujii Keisuke, Tawara Isao, Miyahara Yoshihiro, Okamori Kana, Yagita Hideo, Imoto Seiya, Yamaguchi Rui, Komura Mitsuhiro, Miyano Satoru, Goto Masahiro, Sawada Shin-ichi, Asai Akira, Ikeda Hiroaki, Akiyoshi Kazunari, Harada Naozumi, Shiku Hiroshi | 4. 巻<br>129               |
| 2. 論文標題<br>Antigen delivery targeted to tumor-associated macrophages overcomes tumor immune resistance   | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Clinical Investigation  | 6. 最初と最後の頁<br>1278 ~ 1294 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1172/JCI97642   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-                 |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Daisuke Muraoka  |
| 2. 発表標題<br>Delivery of a tumor antigen to TAMs by using a nanogel leads to eradication of tumor resistant to immune therapies |
| 3. 学会等名<br>第78回日本癌学会学術総会（招待講演）  |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>村岡大輔                           |
| 2. 発表標題<br>腫瘍局所マクロファージの抗原提示能誘発による難治性腫瘍の克服 |
| 3. 学会等名<br>第23回日本がん免疫学会総会（招待講演）           |
| 4. 発表年<br>2019年                           |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>村岡大輔                        |
| 2. 発表標題<br>TAMを標的とした免疫細胞治療抵抗性の克服戦略     |
| 3. 学会等名<br>第11回 日本血液疾患免疫療法学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年<br>2019年                        |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>村岡大輔、瀬尾尚宏、林妙、藤井啓介、池田裕明、秋吉一成、原田直純、珠玖洋 |
| 2. 発表標題<br>腫瘍の細胞性免疫応答反応性を規定するマクロファージの分化機構の解明    |
| 3. 学会等名<br>第22回日本がん免疫学会総会                       |
| 4. 発表年<br>2018年                                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Daisuke Muraoka, Naohiro Seo, Tae Hayashi, Keisuke Fujii, Hiroaki Ikeda, Kazunari Akiyoshi, Naozumi Harada and Hiroshi Shiku |
| 2. 発表標題<br>Immune sensitivity of tumor is governed by the mechanism for differentiation of tumor-associated macrophages (TAMs)          |
| 3. 学会等名<br>第77回日本癌学会学術総会  |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>村岡大輔、原田直純、林妙、秋吉一成、珠玖洋                           |
| 2. 発表標題<br>尾静脈投与ワクチンによる腫瘍局所マクロファージへの抗原送達が増進する腫瘍環境に及ぼす影響の解析 |
| 3. 学会等名<br>第21回日本がん免疫学会総会                                  |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Naozumi Harada, Daisuke Muraoka, Kazunari Akiyoshi, and Hiroshi Shiku  |
| 2. 発表標題<br>Induced Antigen Presentation by Tumor-Associated Macrophages Enhances Infiltration of CD8+ T Cells with Low PD-1 Level |
| 3. 学会等名<br>第76回日本癌学会学術総会  |
| 4. 発表年<br>2017年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|