

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15722

研究課題名(和文)セマフォリン分子のマクロファージ活性化制御による抗腫瘍効果の解明と癌治療への応用

研究課題名(英文) Identification of anti-tumor effects for semaphorin molecules through regulation of macrophage polarization

研究代表者

姜 秀辰 (Kang, Sujin)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・寄附研究部門助教

研究者番号：30644398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症性および抑制性マクロファージへの分化にはmTORシグナルを介した適切な細胞内代謝の活性化が必要であるが、その詳細な機構は解明されていない。本研究では、mTOR-Sema6D-PPAR のシグナルが抑制性マクロファージ(M2)への分化に必須であることを明らかにした。mTORの阻害あるいはSema6D遺伝子欠損によって、PPAR の発現が低下し、脂肪酸の取り込みおよび酸化が低下した。また、c-AblとSema6D細胞内領域との相互作用がPPAR の発現に必要であった。さらに、Sema6D欠損マクロファージは腫瘍マクロファージ(TAM)への分化が顕著に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Sema6D の機能を阻害する抗Sema6D 抗体(agonist, antagonist)を用いた肥満に対する治療応用が期待される。同時に、マクロファージおよび脂肪細胞におけるSema6D の下流シグナルを標的とした天然化合物ライブラリーによるスクリーニングを行い、新たな分子標的薬を開発への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Differentiation into inflammatory and suppressive macrophages requires the activation of appropriate intracellular metabolism via mTOR signaling, but the detailed mechanism has not been elucidated. In the present study, the authors revealed that the signal of mTOR-Sema6D-PPAR is essential for differentiation into inhibitory macrophages. Inhibition of mTOR or Sema6D gene deficiency reduced PPAR expression and reduced fatty acid uptake and -oxidation. As a result, differentiation into inhibitory macrophages was inhibited. Furthermore, the interaction between c-Abl, a Src family tyrosine kinase, was required for the expression of PPAR. Furthermore, Sema6D tried to differentiate into tumor macrophages (TAM). From the above results, it was revealed that the retrograde signal of Sema6D couples immunity and metabolism via PPAR and promotes differentiation into inhibitory macrophages.

研究分野：免疫学

キーワード：マクロファージ セマフォリン TAM

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは活性化されると、M1 type または M2 type に分化することが知られている。M1 type は、IFN- γ 単独あるいはそれに加え TNF- α や GM-CSF 等のサイトカイン、LPS 等の細菌由来の刺激により誘導される。一方、M2 type は、Th2 サイトカインである IL-4, IL-13 等により誘導される。M1 type が活性酸素、IL-6, TNF- α , IL-12p40などを産生し、生体防御を荷っているのに対して M2 type は、IL-10, TGF- β , Prostaglandin E2 などの抗炎症性因子の産生や抑制性 T 細胞の分化を促すことが報告されている。

癌の増殖においては、癌細胞を取り巻く微小環境が影響を及ぼしている。マクロファージは線維芽細胞や血管内皮細胞と共に、癌の微小環境を形成する重要な細胞である。種々のヒト癌組織について、マクロファージに対する抗体で免疫染色すると、多数のマクロファージが癌細胞周囲に存在している。この様なマクロファージは腫瘍随伴マクロファージ (Tumor-associated macrophage: TAM)とよばれ、抗炎症性機能により抗腫瘍免疫の抑制や、種々の血管新生因子の産生によって新生血管を誘導する。乳癌、子宮内膜癌、食道癌、肝細胞癌、悪性リンパ腫などの多くのヒトの腫瘍において癌細胞の増殖を促進する作用があることが分かってきた。特に、癌組織では、TAMと癌細胞は近接し隣りあわせに密着しており、両者には密接な細胞間相互作用が存在すると考えられている。この相互作用には膜型 M-CSF と M-CSF 受容体が重要な役割を果たしている。マクロファージと癌細胞と一緒に培養すると、癌細胞によって分泌される IL-6, M-CSF, Prostaglandin E2 などによってマクロファージが活性化を受け、M2 type へと分化する。つまり癌細胞によりマクロファージが教育されることを示唆している。一方、M2 type に分化したマクロファージからは、VEGF, IL-8, EGF, PDGF 等の血管新生因子や細胞増殖因子が産生され、癌細胞の増殖に好都合な環境が形成される。つまり、癌細胞増殖促進には M2 type マクロファージと癌細胞との cell-to-cell contact が必要である。しかし、cell-to-cell contact に関与する分子基盤に関しては、TAM 側及び癌細胞側とも未だ明らかにされていない。

セマフォリン分子群は神経軸索の方向性を決定する神経ガイダンス因子として同定された分子群であるが、現在、その機能は神経系にとどまらず器官形成、血管新生、癌の進展への関与など、多岐にわたることが明らかとなっている。申請者が所属する研究グループではこれまでにいくつかのセマフォリン分子が免疫細胞にも発現し、免疫応答を制御する機能を有することを明らかにしてきた。免疫細胞に発現するセマフォリン分子は、免疫反応の様々な phase を制御する機能を有し、「免疫疾患治療の鍵分子」と呼ばれている。癌の微小環境には免疫細胞の浸潤、線維芽細胞の増殖、血管新生などが顕著にみられ、微小環境が癌の転移・浸潤能に影響を及ぼすと考えられている。前述のように最近大腸癌、乳癌、悪性黒色腫などのヒトの転移性癌におけるセマフォリンの関与が示されている (Maione et al, *J Clin Invest.* 2012)。また、セマフォリンは、VEGF の受容体の一つでもある Neuropilin-1 を介した血管新生制御作用、セマフォリンシグナルと MET の関連、線維芽細胞の増殖に関与することも分かっている (Kang et al. *J Exp Med*, 2007)。本研究では、腫瘍内微小環境におけるマクロファージの活性化にセマフォリン分子がどのようなメカニズムで関わっているのかを詳細に解析し、セマフォリン分子及び細胞内シグナル伝達分子を標的とする新しい癌治療

の開発に寄与したいと考えている。また、実際にヒトの悪性腫瘍組織においてセマフォリン発現細胞の分布や役割、癌の悪性度などとの関連性を検討し、セマフォリンが腫瘍内微小環境形成に重要な役割を果たしているか検討することを本研究の目的とする。

2. 研究の目的

腫瘍内微小環境形成において腫瘍随伴マクロファージ(TAM)が重要な役割を果たしている。そこで、TAM 活性の分子基盤を解明することで TAM を標的とする治療法の開発が癌根治という新たな治療戦略に繋がることが期待される。申請者は最近セマフォリン分子 Sema7A が M2 type マクロファージの活性を制御し、免疫恒常性維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした(Kang et al, *J. Immunol.*, 2012)。更に、マクロファージに発現する Sema6D が M1/M2 への極性化を制御するとの知見を得た。本研究では、癌細胞移植マウスモデルを用い、セマフォリン分子をターゲットにする腫瘍組織微小環境形成に対する分子メカニズムを解明し、セマフォリン分子機能障害抗体を用いた抗腫瘍に対する治療効果を検討する。具体的には以下の4つの方面から解析を行なう。骨髄由来マクロファージの M1/M2 極性化を制御する Sema6D の生物学作用機構の解明、 TAM の代謝制御による癌細胞の増殖及び腫瘍微小環境形成機構の解析、 Sema6D シグナル分子阻害剤を用いた抗腫瘍免疫に対する治療効果の検討

3. 研究の方法

マウス骨髄細胞を採取し、リコンビナント M-CSF 存在下に5日間培養し、LPS+IFN γ 及び IL-4 の刺激により、M1、M2 に誘導したマクロファージのサイトカイン産生及び分化マーカーの発現を ELISA 及び定量 PCR で検討した。その結果、Sema6D を欠損すると野生型より、M1 細胞の炎症性サイトカイン産生が亢進し、M2 細胞分化に必須の分子である arginase-1, chitinase, resistin like molecule (RelM)の発現が顕著に減少していた。特に、Sema6D 欠損マクロファージにおいてはM1 及び M2 分化の際、PPAR γ 発現が著しく抑制されるという興味深い結果を得た。この結果によると、マクロファージにおいて Sema6D シグナルは PPAR γ の転写を制御することが示唆される。Sema6D による PPAR γ 転写制御に関する機構を明らかにするため、i)マクロファージにおける Sema6D のリガンド分子の同定、ii)マクロファージにおける Sema6D の細胞内シグナル解析を検討する。i)では、従来ニワトリ胎児の心臓形態形成の過程に Sema6D に対する結合パートナーとして同定された Plexin-A1 欠損マウスの骨髄由来マクロファージを用い、M1/M2 極性化を検討する。さらに M1/M2 分化の過程にリコンビナント Sema6D-Fc を Sema6D 欠損マクロファージに加え、マクロファージにおける Sema6D の逆行性シグナルの関与性を検討する。ii)では、Sema6D の細胞質内領域に結合する分子を同定を行う。まず、Sema6D の膜近位部に存在する tyrosine kinase と結合領域に点突然変異を導入した後、Sema6D 欠損マクロファージに導入し、マクロファージの極性化を検討する。さらに、Sema6D の細胞内結合 tyrosine kinase 活性を siRNA 法を用い制御し、PPAR γ 転写との相互関係及びマクロファージ極性化について検討する。

4 . 研究成果

1) mTOR 活性依存的に発現する Sema6D は抑制性マクロファージ分化に必須である

mTOR の活性化による抑制性マクロファージへの分化制御機構を明らかにするため、mTOR 阻害剤である Torin1 存在下に抑制性マクロファージの分化を誘導し、DNA マイクロアレイ法を用いて遺伝子発現解析を行った。その結果、mTOR 活性阻害により Sema6D の発現が低下することが明らかとなり、Sema6D の発現は mTOR シグナルによって制御されることが示された。次に、マクロファージ分化制御における Sema6D の機能を明らかにするため、Sema6D 欠損マウスを用いてマクロファージの分化能を評価した。野生型マクロファージに比べて Sema6D 欠損マクロファージでは IL-4 刺激に対する M2 型マクロファージマーカーの発現が顕著に減弱していた。一方で、LPS や IFN- γ に対して Sema6D 欠損マクロファージでは IL-6、TNF など炎症性サイトカインの産生が亢進しており、過剰な M1 型応答を示した。これらの結果から、*in vitro* において Sema6D は抑制性マクロファージへの分化に必要であることが明らかとなった。さらに、Sema6D による抑制性マクロファージ分化制御を *in vivo* においても検討するため、キチン腹腔内投与による抑制性マクロファージ誘導を行った。キチン腹腔内投与は IL-4 産生細胞を腹腔内へ誘導し、抑制性マクロファージの分化を促進するが、野生型マウスと比較して Sema6D 欠損マウスでは M2 型マクロファージマーカーの発現が顕著に低下していた。また、LPS 腹腔内投与によるエンドトキシンショックモデルで Sema6D 欠損マウスでは野生型よりも血清中の炎症性サイトカイン濃度が高値であり、致死率も高いことが確認された。以上の結果から、*in vitro* のみならず *in vivo* においても、mTOR 活性依存的に発現される Sema6D が抑制性マクロファージの機能獲得に重要であると明らかになった。

2) Sema6D シグナルは PPAR γ を介しマクロファージの脂質代謝を制御する

抑制性マクロファージ分化における Sema6D シグナルの分子機構を明らかにするため、野生型および Sema6D 欠損マクロファージの遺伝子発現の差異を RNA-Sequencing 法により解析した。その結果、Sema6D 欠損マクロファージでは *Pparg* 遺伝子及び PPAR γ シグナルに関連する遺伝子の発現減少を認めた。実際に抑制性マクロファージ分化条件下において、Sema6D 欠損マクロファージでは PPAR γ の発現が顕著に低下していた。さらに、Sema6D 欠損マクロファージに *Pparg* 遺伝子を導入すると抑制性マクロファージ関連遺伝子の発現が上昇した。一方で、PPAR γ 活性阻害剤存在下において Sema6D 欠損マクロファージに *Sema6d* 遺伝子を導入しても抑制性マクロファージマーカー遺伝子の発現は回復できなかった。以上より、PPAR γ は免疫抑制機能の獲得における Sema6D の主要な下流分子であることが明らかになった。

PPAR γ は主に脂肪細胞分化に関与し、脂質代謝の鍵分子として知られている。免疫系においては特に単球やマクロファージに発現し、抗炎症作用を発揮することが報告されている。上述の通り Sema6D シグナルが PPAR γ の発現を制御することから、抑制性マクロファ

ージ分化において Sema6D が脂質代謝を制御する可能性を検討した。まず、脂質代謝関連遺伝子である CD36 及び FABP4 の発現を調べたところ、Sema6D 欠損マクロファージではこれらの遺伝子の発現が顕著に減少していた。次に、細胞内への脂質取り込み能を評価したところ、Sema6D 欠損抑制性マクロファージでは LDL の取り込み能が低下していた。さらに、細胞外フラックスアナライザーを用い脂肪酸 β 酸化を評価した結果、Sema6D 欠損抑制性マクロファージにおいて β 酸化の低下を認めた。以上の結果より、Sema6D シグナルは PPAR γ を介して細胞内への脂質取り込み及び脂質代謝を制御し、抑制性マクロファージ分化に寄与することが明らかになった。

3) Sema6D 逆行性シグナルは c-Abl を介して抑制性マクロファージ分化を制御する

セマフォリン分子群は通常リガンドとして機能しその受容体であるプレキシンやニューロピリンとの結合を介して様々な機能を発揮する^{5, 6)}。クラス IV セマフォリン分子群はセマフォリン分子の中で最も長い細胞内領域を持つユニークな分子である。ニワトリ胎児を用いた心臓の形態形成において Plexin-A1 をリガンドとした Sema6D 逆行性シグナルの重要性が報告されている⁸⁾。一方で、免疫系における Sema6D 逆行性シグナルの機能については未だ不明である。そこで、Sema6D 逆行性シグナルの抑制性マクロファージ分化への関与を検討するため、Sema6D 細胞内シグナル伝達に必須であるチロシンキナーゼとの結合を阻害する Sema6D 変異体を Sema6D 欠損マクロファージに発現させたが、この変異体は抑制性マクロファージ分化マーカーの発現を回復できなかった。つまり、抑制性マクロファージ分化には Sema6D 逆行性シグナルの活性が必須であることが明らかとなった。次に、Sema6D のリガンド探索を行った。Plexin-A4 存在下において野生型抑制性マクロファージでは *Pparg* の発現が上昇するのに対し、Sema6D 欠損マクロファージでは変化を認めなかった。さらに、c-Abl 阻害剤及び siRNA を用いた *Abl1* ノックダウンにより抑制性マクロファージへの分化が抑制されたことから、抑制性マクロファージ分化には c-Abl 活性が重要な役割を果たすことが明らかになった。これらの結果から、Plexin-A4 をリガンドとする Sema6D 逆行性シグナルは c-Abl を介して免疫抑制活性を持つことがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sujin Kang, Toshio Tanaka, Masashi Narazaki, Tadimitsu Kishimoto	4. 巻 50
2. 論文標題 Targeting interleukin-6 signaling in clinic	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunity	6. 最初と最後の頁 1007-1023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sujin Kang, Yoshimitsu Nakanishi, Yoshiyuki Kioi, Daisuke Okuzaki, Tetsuya Kimura, Hyota Takamatsu, Shohei Koyama, Satoshi Nojima, Masayuki Nishide, Yoshitomo Hayama, Yuhei Kinehara, Yasuhiro Kato, Takeshi Nakatani, Tomomi Shimogori, Junichi Takagi, Toshihiko Toyofuku, Atsushi Kumanogoh	4. 巻 in press
2. 論文標題 Semaphorin 6D reverse signaling controls macrophage lipid metabolism and anti-inflammatory polarization	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Sujin Kang
2. 発表標題 Semaphorin 6D reverse signaling controls macrophage lipid metabolism and anti-inflammatory polarization
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sujin Kang
2. 発表標題 Semaphorin 6D reverse signaling controls macrophage lipid metabolism and anti-inflammatory polarization
3. 学会等名 European Macrophage and dendritic cell society（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sujin Kang
2. 発表標題 Semaphorin 6D reverse signaling controls macrophage lipid metabolism and anti-inflammatory polarization
3. 学会等名 EMBO Aging and metabolism (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sujin Kang
2. 発表標題 Semaphorin controls immune metabolism and immune diseases
3. 学会等名 APICA (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sujin Kang
2. 発表標題 Semaphorin 6D reverse signaling couples with immune and metabolic system
3. 学会等名 日本免疫学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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