

令和 4 年 4 月 25 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08717

研究課題名（和文）腫瘍内微小環境リプログラミングによる新規治療法の開発

研究課題名（英文）Reprogramming the tumor microenvironment to establish novel strategies and approaches for cancer therapy

研究代表者

北原 秀治（Kitahara, Shuji）

東京女子医科大学・医学部・特任准教授

研究者番号：40510235

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、腫瘍細胞の増殖、転移の鍵を握る腫瘍微小環境の変化の過程を、腫瘍モデルマウス、ヒト病理検体を用いて追跡し、形態と機能の両側面から解析することにより、その腫瘍の特徴を理解するとともに、腫瘍内に正常な微小環境（血管、リンパ管の正常化）を再構築させ、「腫瘍微小環境のリプログラミング」を起こす事で、腫瘍の増殖を制御するための新しい抗脈管療法や、免疫療法を含めたより効果的なコンビネーション療法、そして発癌の予防薬の開発への応用を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管新生因子であるVasohibin2をコントロールすることで、用いた主要モデルマウスの血管正常化、免疫細胞の侵入が見られ、腫瘍微小環境の正常化が見られた。今後、Vasohibin2を始め、微小循環系を制御することで、微小免疫環境が改善され、腫瘍増殖を抑制し、今後の併用療法の可能性の拡大を示唆できた。また、病理検体より、微小環境の変化によって分類することで、より個別の分子標的治療薬の選定が可能になることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to understand the characteristics of tumors by following alterations in the tumor microenvironment (TME), which plays a key role in the growth and metastasis of tumor cells. We used tumor model mice and human pathological specimens and analyzed them from both morphological and functional perspectives. By reprogramming the environment, we aimed to develop new anti-vascular therapies to limit tumor growth, and improve the efficacy of combination therapies including immunotherapy as well as of chemopreventive drugs.

研究分野：顕微解剖学

キーワード：腫瘍血管 腫瘍微小環境 免疫環境 併用療法 消化器癌

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の特徴所見である異常細胞増殖には、様々な血管増殖因子群による複雑な分子経路を介した血管新生が伴う。癌の作る異常血管は、腫瘍周辺の低酸素、低 pH 環境を作り出し、免疫原性の低下を引き起こす。癌細胞は免疫抑制因子を産生し、さらに関連細胞が惹起され、癌生育に最適な免疫抑制性環境が構築されていく。一方、消化管は、リンパ節、パイエル板といった特異的な免疫監視機構を有し恒常性を維持しているが、一旦悪性腫瘍が発生すると、免疫チェックポイント経路を利用した、監視機構を逃れるシステムが新たに構築される。近年、次世代の癌治療法として、分子標的治療薬を用いた腫瘍微小環境の正常化が注目されている。同時にこの方法が宿主免疫機構にも影響を与えることが報告され始めている。しかしながら、こうした免疫機構をはじめ、腫瘍微小環境正常化に至るまでの詳しいメカニズムや、正常化後の予後、副作用に関しては未だ不明な点が多く、現在も臨床応用出来ていない。われわれは上記を背景とし、この「腫瘍微小環境の正常化、およびそのメカニズムへのアプローチ」が、結果として、消化管における強力な宿主免疫力を回復させると共に、化学療法、免疫療法、放射線療法などの治療効果を最大限に発揮させる宿主環境を根本治療となる、つまり次世代の癌治療法としての可能性を確信している。

申請者はこれまでに、腫瘍血管の形態的・機能的特徴を理解するために、B16 メラノーマ腫瘍細胞に、血管内皮細胞の培養に使われる基底膜抽出物である Matrigel (BD Biosciences) を混合した新たな移植腫瘍モデルマウスを樹立し、その新生腫瘍血管を「多重免疫染色法と電子顕微鏡を用いた三次元イメージング法」にて解析してきた。この結果から、「腫瘍はその周囲の微小環境の変化に応じて、その微小循環系の新生パターンを様々に変化させるのではないか？」という仮説を立てるに至り、腫瘍細胞が生体内の現場において、正常組織から良性～悪性へと転化する変化(多段階発癌)と、腫瘍血管やリンパ管の新生パターンの変化にも密接な関係があるのではないかと疑問が、この仮説とともに再び湧いてきた。そこで申請者は、生後数週より小腸、大腸に腫瘍を自然発症する $Apc^{Min/+}$ マウス及び、ヒト手術標本(腺腫、腺癌)を材料に、新生血管、リンパ管を種々のマーカーによる多重免疫染色で可視化し、微細構造から三次元レベルに至るまでの形態解析を行った。その結果、腸上皮の悪性化、つまり消化管腫瘍の特徴である多段階発癌に伴い、微小循環系にも段階的な新生パターンの変化が現れることが解った。さらに我々は、これらの結果に加えて、血管新生因子 Vasohibin2 (VASH2: Kimura et al, *Blood*, 2009) が腫瘍細胞の悪性化に伴い、腫瘍血管周囲に発現してくることも見いだした。そこで、このような血管新生因子を制御することができれば、逆に腫瘍細胞の悪性化を抑制できるのではないかと、この仮説をたて、 $Apc^{Min/+}/Vash2^{-/-}$ マウスを作り、腫瘍の成長過程を追跡する段階にいたった。血管新生因子 VASH2 を抑制した $Apc^{Min/+}/Vash2^{-/-}$ マウスでは、腫瘍血管が正常化し、消化管腫瘍の発症が抑制されることが確認でき、これらの結果を国際誌に投稿した。また、その原因を、マイクロアレイで探ってみると、慢性炎症、宿主免疫に関係する遺伝子の変化が確認できた。さらに、それらのメカニズムを追求するために、免疫染色や RT-PCR を用いて、腫瘍血管を正常化することによる生体内の微小環境の変化、主にマクロファージの動向や、免疫細胞の動態 (CD4、CD8、樹状細胞など) を、 $Apc^{Min/+}/Vash2^{-/-}$ マウスを用いて追跡する段階へといたってきた。

2. 研究の目的

本研究においては大きな2つの課題を柱に、それに対する研究を行うこととした。

その課題とは、

腫瘍血管正常化を通じた微小環境正常化は、生体内に何をもちこたすのか、宿主免疫力は回復するのか？

腫瘍血管は、形態的な異常をはじめ、血流の不均一や透過性の異常など、正常組織の血管とは形態と機能が大きく異なる。そのため、腫瘍内に低酸素状態を引き起こし、腫瘍優位な環境を作る事が知られている。化学療法においても、投与した薬剤が腫瘍の隅々まで行き渡らず、また、放射線療法も、その低酸素状態のために効果が不十分であるなど、腫瘍細胞を完全に根絶することは難しい。1993年より開発の始まった腫瘍血管内皮細胞をターゲットにした分子標的治療薬についても、「腫瘍血管を完全に破綻させる事は、完全な抗腫瘍には繋がらない」と報告されている。以降さらに、Rakesh Jain 博士らによって、腫瘍血管は破綻させるのではなく、正常血管に近づけることで、ドラッグデリバリーシステムの改善などが得られ、抗腫瘍効果が得られるという腫瘍血管正常化という考えが提唱された。その後、この正常化が生体に様々なベネフィットを生み出すことがわかり、そのメカニズムの解明が急がれた。

腫瘍内微小環境リプログラミングは、化学療法、免疫療法、放射線療法にどのような影響を与えるのか？

癌の微小環境は、劣悪な酸素化・代謝環境、マトリクスの再構築とそれに伴い増大した組織、劣化した免疫応答による慢性炎症状態などを特徴とし、癌増殖に優位な環境、および癌治療抵抗性の主な要因の一つである。申請者は慢性炎症を背景として発癌する消化器系の癌（特に胃癌、大腸癌）に注目しており、それらの微小環境を正常化し、抗腫瘍治療効果を増大させることができれば、今後増え続けると予想される消化器系癌の治療の礎になると期待している。申請者のグループは、切除不能進行肝細胞癌に唯一有効な治療法であるソラフェニブが、VEGFR2 阻害による腫瘍血管の剪断を通じて組織内低酸素を惹起し、リンパ球浸潤を阻害、腫瘍内制御性T細胞の増加、腫瘍免疫を抑制する細胞の浸潤増加を発生させ、治療耐性を生じることを見出した。そこでソラフェニブに加えて SDF-1/CXCR4 経路を阻害、さらに免疫チェックポイント阻害剤を併用することで抗腫瘍免疫応答（腫瘍内微小環境を正常化）を改善し、ソラフェニブ耐性が打破できることを見出した。申請者は引き続きそのメカニズムの追究と、新たに抗血管新生療法の強度調整による「血管正常化」を介した微小環境の改善、抗腫瘍免疫応答の改善を狙ったより現実的な新治療の開発（特にコンビネーション療法の開発）を消化管における癌で追求した。

3. 研究の方法

本研究では、

「腫瘍内微小環境正常化が生体内にもたらす影響、及びそのメカニズムの解析」 「微小環境正常化が、化学療法、免疫療法、放射線療法に与える変化の検証」 「腫瘍内微小環境正常化は自然発症腫瘍を制御、そして予防できるのか？」 以上3つの計画を完了させるために、独自の癌モデル動物、および実際のヒト手術検体を用いて、腫瘍内微小環境の詳細な観察を、下記の方法で検討を行った。研究材料として、東京女子医大で維持している *Apc^{Min/+}/Vash2^{-/-}* マウス、分担研究先で維持している *Vash2^{LacZ/LacZ}Gan* マウス、また各種癌細胞を使用した。

戦略として、分子標的治療薬（抗血管新生治療薬）は容量依存性に腫瘍血管正常化を引き起こすことが知られている。本研究では、VEGFR2 阻害剤が腫瘍血管正常化を通じて、微小環境正常化

を引き起こす容量を、同所移植モデルで調整し、微小環境正常化が宿主免疫力を回復させるまでの過程（リンパ球の動向など）を、胃癌及び大腸癌細胞同所移植マウス、自然発症腫瘍モデルを用いて下記の手法をもちいて検証した。

形態的アプローチとして；全体構造から超微形態構造に至るまでを三次元的に探求

- () 多重免疫染色とレクチン灌流法と組み合わせた三次元イメージング法
- () 透過型電子顕微鏡による微細構造の解析及び 3D 解析
- () 組織を丸ごと観察するための全載伸展標本による三次元解析
- () ウィンドウモデルによる生体組織観察：（腹腔を特殊な透明な素材で置き換え、生きたまま腫瘍の成長を観察できる）を用いて三次元的に腫瘍の成長を観察する。

機能的アプローチとして；臨床応用への実現のために、生体内でおこる形態変化を左右する因子の相互関係の探求

- () レクチン染色による糖鎖の解析：上皮の悪性化は糖鎖と深く関わっているため、腫瘍の各ステージでの糖鎖発現を解析することにより、微小環境との相互関係が解明する。
- () RT-PCR 法、マイクロアレイ法及び RNA シークエンス：腫瘍微小環境正常化により、生体内で、どのような変化が起こるのかを追跡するための方法として用いる。

以上を主な研究手段として考えていた。このように形態、機能の両側面から生命現象を解析することにより、本研究の明確な答えが導きだされたと考えた。

4．研究成果

本計画の研究は、腫瘍細胞の増殖、転移の鍵を握る微小循環系（血管、リンパ管）を含む腫瘍微小環境の変化の過程を、腫瘍モデルマウス（同所移植マウス、自然発症モデルマウス、ヒト手術検体移植マウス）、ヒト病理検体を用いて追跡し、形態と機能の両側面から解析することにより、その腫瘍の特徴を理解するとともに、腫瘍内に正常な微小環境（血管、リンパ管の正常化）を再構築させ、「腫瘍微小環境のリプログラミング」を起こす事で、腫瘍の増殖を制御するための新しい抗脈管療法や、免疫療法を含めたより効果的なコンビネーション療法、そして発癌の予防薬の開発への応用を目指す。本計画の前段階研究として、血管新生因子である Vasohibin2 をノックダウンした腫瘍細胞の作成に成功し、以下に示す研究成果を得た。第一に、使用した腫瘍細胞各種から Vasohibin2 が発現していることが確認できた。第二に、この Vasohibin2 の抑制が、IL-6 ファミリーなどの慢性炎症に関連する因子を抑えることがわかった。申請者の以前の研究結果を加えると、今後、Vasohibin2 を制御することは、腫瘍血管を正常化し、その影響で正常化した微小環境が腫瘍増殖の抑制するのではないかと仮説が立てられた。次のこの Vasohibin2 をノックダウン腫瘍細胞をマウスの皮下に移植したモデルマウスをもちいて、解析を続け。第一に、腫瘍細胞をマウスの皮下に移植し、その微小環境を解析した結果、腫瘍血管の正常化、免疫細胞の腫瘍組織内への侵入が見られた。第二に、このモデルマウスに、免疫チェックポイント阻害剤を投与したところ、腫瘍の抑制は見られなかったが、微小環境の正常化が見られた。第三にこれらの結果を追及すると、微小環境の線維化は抑制傾向に、リンパ球の浸潤も増加傾向にあった。しかし、直接腫瘍の抑制に結びつくかどうかは、今後の検討の余地が必要であった。Vasohibin2 の制御が、微小免疫環境が改善されることが今回の研究で明らかになり、今後の治療薬の開発への期待が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 4件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Aoki Shuichi, Inoue Koetsu, Klein Sebastian, Halvorsen Stefan, Chen Jiang, Matsui Aya, Nikmaneshi Mohammad R, Kitahara Shuji, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Placental growth factor promotes tumour desmoplasia and treatment resistance in intrahepatic cholangiocarcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 2020-322493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2020-322493	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Duda Dan G., Dima Simona O., Cucu Dana, Sorop Andrei, Klein Sebastian, Ancukiewicz Marek, Kitahara Shuji, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Potential Circulating Biomarkers of Recurrence after Hepatic Resection or Liver Transplantation in Hepatocellular Carcinoma Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1275 ~ 1275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12051275	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Shigeta Kohei, Matsui Aya, Kikuchi Hiroto, Klein Sebastian, Mamessier Emilie, Chen Ivy X, Aoki Shuichi, Kitahara Shuji, et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 Regorafenib combined with PD1 blockade increases CD8 T-cell infiltration by inducing CXCL10 expression in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e001435 ~ e001435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jitc-2020-001435	査読の有無 有
オープンアクセス 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 該当する
1. 著者名 Shigeta Kohei, Datta Meenal, Hato Tai, Kitahara Shuji, Chen Ivy X., Matsui Aya, Kikuchi Hiroto, Mamessier Emilie, Aoki Shuichi, Ramjiawan Rakesh R., Ochiai Hiroki, Bardeesy Nabeel, Huang Peigen, Cobbold Mark, Zhu Andrew X., Jain Rakesh K., Duda Dan G.	4. 巻 71
2. 論文標題 Dual Programmed Death Receptor 1 and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Blockade Promotes Vascular Normalization and Enhances Antitumor Immune Responses in Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 1247-1261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.30889	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Kofuji Satoshi, Hirayama Akiyoshi, Eberhardt Alexander Otto, Kawaguchi Risa, Sugiura Yuki, Sampetean Oltea, Ikeda Yoshiki, Warren Mikako, Sakamoto Naoya, Kitahara Shuji et al.	4. 巻 21
2. 論文標題 IMP dehydrogenase-2 drives aberrant nucleolar activity and promotes tumorigenesis in glioblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1003 ~ 1014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-019-0363-9	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Hayakawa R, Komoike K, Kawakami H, Morishima M, Shimizu K, Kitahara S, Fujieda H, Ezaki T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Ultrastructural changes in the choriocapillaris of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in C57BL/6 mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Med Mol Morphol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-020-00246-6	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Chen Jiang, G. Duda Dan, Matsui Aya, Kikuchi Hiroto, Kawakubo Kazumichi, Kitahara Shuji	4. 巻 24
2. 論文標題 A Basic and Clinical Perspective on the Future of Perioperative Therapy for Gastric Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgery, Gastroenterology and Oncology	6. 最初と最後の頁 273 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21614/sgo-24-6-273	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Pereira Ethel R., Kedrin Dmitriy, Seano Giorgio, Gautier Olivia, Meijer Eelco F. J., Jones Dennis, Chin Shan-Min, Kitahara Shuji, Bouta Echoe M., Chang Jonathan, Beech Elizabeth, Jeong Han-Sin, Carroll Michael C., Taghian Alphonse G., Padera Timothy P.	4. 巻 359
2. 論文標題 Lymph node metastases can invade local blood vessels, exit the node, and colonize distant organs in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 1403 ~ 1407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aal3622	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 Nakanishi Hidehiko, Morikawa Shunichi, Kitahara Shuji, Yoshii Asuka, Uchiyama Atsushi, Kusuda Satoshi, Ezaki Taichi	4. 巻 51
2. 論文標題 Morphological characterization of pulmonary microvascular disease in bronchopulmonary dysplasia caused by hyperoxia in newborn mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 166 ~ 175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-018-0182-2	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 -

1. 著者名 Shuji Kitahara, Yasuhiro Suzuki, Taichi Ezaki	4. 巻 6
2. 論文標題 How immunotherapy and targeted therapy are changing gastrointestinal cancer treatment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Research Archives	6. 最初と最後の頁 1-14
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Li Sen, Li Wende, Leung Chi-Ho, Kitahara Shuji, Liu Yujiao, Klein Sebastian, Fukumura Dai, Gerweck Leo E, Loeffler Jay S, Jain Rakesh K, Duda Dan G, Huang Peigen	4. 巻 10
2. 論文標題 Combined Angiotensin Receptor Blocker Losartan and the CXCR4 Inhibitor AMD3100 Increases the Efficacy of Radiotherapy in a Metastatic Osteosarcoma Mouse Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Science & Therapy	6. 最初と最後の頁 358-365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/1948-5956.1000570	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 北原秀治
2. 発表標題 VASH 2 とがん微小環境
3. 学会等名 第43会日本分子生物医学会年会フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北原秀治
2. 発表標題 これからのアカデミア学術集会
3. 学会等名 第4回デジタルヘルス学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北原秀治
2. 発表標題 がん微小環境選択的な分子標的治療戦略
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北原秀治
2. 発表標題 がん微小環境選択的な分子標的治療戦略
3. 学会等名 東北大学加齢研セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shuji Kitahara
2. 発表標題 Novel approaches to pancreatic cancer
3. 学会等名 IASGO/Post Graduate Course2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北原秀治
2. 発表標題 胃癌における新しい診断と治療戦略の開発
3. 学会等名 日本血管生物医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北原秀治
2. 発表標題 がん微小環境における血管の役割（骨肉腫モデルを用いて）
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北原秀治
2. 発表標題 腫瘍内微小環境リプログラミングによる新規治療法の開発
3. 学会等名 消化器がんプロジェクト会議（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
研究分担者	鈴木 康弘 (Yasuhiro Suzuki) (60332277)	東北大学・未来科学技術共同研究センター・助教 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------