

令和 6 年 9 月 20 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07758

研究課題名(和文) Berberineによる抗腫瘍免疫増強効果の機構解明と効果的な併用免疫療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of antitumor immunity enhancing effects of berberine and development of effective combination immunotherapy

研究代表者

塚本 信夫 (Tsukamoto, Nobuo)

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・特任研究員

研究者番号：20407117

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)：抗腫瘍免疫増強効果をもつ化合物berberine (BBR)を同定し、腫瘍増殖抑制機構を解析した。BBR投与により、所属リンパ節と脾臓のがん抗原特異的CD8+ T細胞の中に特定の表現型の集団が増加すること、腫瘍微小環境ではがん抗原特異的CD8+ T細胞の細胞傷害活性が増強されることを示し、これらの変化に関わる酵素や細胞状態を明らかにし、所属リンパ節や脾臓における作用機構と腫瘍におけるその違いを明らかにした。またCD8+ T同一細胞で、上記変化に関わり互いに抑制しあう2つのシグナルが同時に活性化し得ることを示した。さらに腫瘍増殖を相乗的に抑制できる併用がん免疫療法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、抗CTLA-4抗体や抗PD-1抗体投与、がん抗原特異的T細胞を投与するがん免疫療法の臨床試験においてがん患者の長期生存につながる明確な治療効果が認められているが、それらの奏効率は未だ低く、より効果の高いがん免疫療法の開発が望まれている。本研究の結果は、抗腫瘍免疫増強効果をもつ化合物BBRの作用機序を明らかにした結果、所属リンパ節や脾臓において、また腫瘍において抗腫瘍免疫応答の増強に重要な分子と細胞状態が示された。さらに、腫瘍増殖を相乗的に抑制できる併用がん免疫療法を示すことができ、がん免疫療法、さらには標準治療の改善にもつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：We identified berberine (BBR), a compound enhancing anti-tumor immunity, and analyzed the mechanism of tumor growth inhibition. BBR administration increased specific phenotypic populations among cancer antigen-specific CD8+ T cells in the draining lymph node and spleen. By contrast, in the tumor microenvironment, BBR administration enhanced cytotoxic activity of cancer antigen-specific CD8+ T cells. The enzymes and cellular states involved in these changes were shown, and the differences in the mechanisms of action in the draining lymph node and spleen and in the tumor were elucidated. We also showed that two mutually inhibitory signals related to the above changes can be activated simultaneously in the same CD8+ T cells. Furthermore, we developed a combination cancer immunotherapy that can synergistically inhibit tumor growth.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍免疫 がん免疫療法 berberine

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最近、免疫抑制の解除を目的とした抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-1 抗体投与、がん抗原特異的 T 細胞を投与する免疫療法の臨床試験において、がん患者の長期生存につながる明確な治療効果が認められている。しかしながら、これらの免疫療法の奏効率が未だ限られていることは、克服すべき免疫抑制が存在することを示唆している。

我々は、漢方薬に含まれる化合物の中から抗腫瘍免疫を増強させる効果をもつ化合物を探すスクリーニングを行い、候補化合物のひとつとして berberine (BBR) を同定した。BBR に関しては、がん細胞株への直接効果はすでに研究され、がん細胞の増殖抑制や細胞死誘導の報告があった。マウスがん細胞株に *in vitro* で BBR を作用させると、複数の細胞株で直接の増殖抑制効果が見られたが、マウス大腸がん細胞 CT26 に対しては *in vitro* で増殖抑制は見られなかった。しかし、CT26 を移植した Balb/c マウスに BBR を投与すると CD8⁺ T 細胞依存的に腫瘍増殖が抑制された。BBR は CD8⁺ T 細胞において特定のシグナル分子を活性化し、T 細胞の細胞死を抑制すること、腫瘍中の抗原特異的 CD8⁺ T 細胞のサイトカイン産生能を増加させること、また所属リンパ節 (dLN) や脾臓で特定の表現型の集団の割合を増やすことを明らかにしていた。腫瘍内 CD8⁺ T 細胞集団において、互いに抑制しあう 2 つのシグナルの活性化、各シグナルの下流で起こる遺伝子発現上昇が同時に起こっていたが、これらが同じ細胞で起きているのか異なる細胞で起きているのか、同じ細胞で両方が活性化する場合、その機構は何かについて明らかにする必要が生じた。さらに、樹状細胞に対して BBR を作用させた場合に抗腫瘍免疫に負に働く可能性のある変化が認められたため、その機構について明らかにする必要が生じた。研究開始当初において、類似の作用機序が予想される薬剤を用いた抗腫瘍免疫増強の研究が我々を含めて国内の 3 グループで進められており、最先端のところ競争関係にあったが、幾つかの全く新しい現象を見出している点で優位性と発展性を持って研究を進めていた。

2. 研究の目的

本研究は、抗腫瘍免疫増強効果のある化合物として我々が同定した BBR について、CD8⁺ T 細胞でこれまでに明らかにした様々な作用機構に基づいて、未だ明らかにできていない本質的な機構について明らかにするとともに、より強力な抗腫瘍免疫を誘導できる併用免疫療法を開発することを目的とした。BBR に関しては、がん細胞への直接効果について多くの先行研究があるが、抗腫瘍免疫への作用を研究しているのはこれまでのところ我々のみであり、多くの新知見を得てきた。本研究に挙げた疑問点は腫瘍免疫の本質に関わるものであり、明らかにできれば学術的に重要な発見になるだけでなく、効果的な治療法として臨床応用にもつながるものである。

3. 研究の方法

腫瘍内 CD8⁺ T 細胞集団において、互いに抑制しあう 2 つのシグナルの活性化を flowcytometry で評価する方法を開発した。BBR 投与により腫瘍、所属リンパ節、脾臓内の CD8⁺ T 細胞において発現が上昇する 2 つの酵素を、腫瘍あるいは所属リンパ節から単離した CD8⁺ T 細胞に強制発現させ 2 つのシグナルの下流遺伝子の発現を解析した。BBR 投与マウスから腫瘍、所属リンパ節、脾臓内の CD8⁺ T 細胞を単離し、代謝状態を測定した。腫瘍からの CD8⁺ T 細胞の *in vitro* 培養で BBR 添加し上記表現型細胞集団の割合を評価するとともに、その増加をさらに増強させる化合物を探索した。また BBR の作用機序として上記 2 種の酵素の上流に位置すると考えられる酵素の活性化型の強制発現あるいは上記化合物の併用により上記表現型の細胞集団の割合を評価した。これらの知見に基づき、BBR と併用することでより強力な抗腫瘍免疫を誘導できる併用免疫療法を探索した。

4. 研究成果

CT26 移植 Balb/c マウスに BBR を投与すると CD8⁺ T 細胞依存的に腫瘍増殖が抑制された。腫瘍増殖抑制機構として、BBR による CD8⁺ T 細胞の細胞死抑制、腫瘍中の抗原特異的 CD8⁺ T 細胞のサイトカイン産生能増加などを示した。BBR 投与により、所属リンパ節と脾臓のがん抗原特異的 CD8⁺ T 細胞の中に特定の表現型の集団が増加し、これが抗腫瘍効果増強に寄与すると考えられたが、同じ表現型の集団は腫瘍内のがん抗原特異的 CD8⁺ T 細胞の中では増加しなかった。一方、腫瘍微小環境ではがん抗原特異的 CD8⁺ T 細胞の細胞傷害活性が増強されることを示した。これらの結果と相関して、BBR 投与後の所属リンパ節や脾臓からのがん抗原特異的 CD8⁺ T 細胞と腫瘍からのがん抗原特異的 CD8⁺ T 細胞での細胞状態の差異を示した。また、腫瘍内 CD8⁺ T 細胞集団において、互いに抑制しあう 2 つのシグナルの活性化、各シグナルの下流で起こる遺伝子発現上昇が同時に起こっていたが、同一細胞で両方が活性化し得ることを示した。BBR 投与により腫瘍、所属リンパ節、脾臓内の CD8⁺ T 細胞において発現が上昇する 2 つの酵素を、腫瘍あるいは所属リンパ節から単離した CD8⁺ T 細胞に強制発現させたところ、いずれの強制発現でも 2 つのシグナルの下流遺伝子の発現誘導が確認された。一方の酵素の強制発現により所属リンパ節由来のがん抗原特異的 CD8⁺ T 細胞で上記表現型の細胞集団が顕著に増加したが、腫瘍由来のがん

抗原特異的 CD8⁺ T 細胞では増加せず、腫瘍微小環境内でがん抗原特異的 CD8⁺ T 細胞に加わった変化が上記集団の増加を妨げていると推測された。また、腫瘍からの CD8⁺ T 細胞の *in vitro* 培養で BBR 添加により上記表現型細胞集団が増加したが、その増加をさらに増強させる化合物を同定し、また BBR の作用機序として上記 2 種の酵素の上流に位置すると考えられる酵素の活性化型の強制発現単独あるいは上記化合物の併用により上記表現型の細胞集団が顕著に増加を示した。さらに以上の研究成果をもとに、腫瘍増殖を相乗的に抑制できる併用がん免疫療法を開発した。

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 0件）

1. 著者名 Kawakami Y, Ohta S, Sayem MA, Tsukamoto N, Yaguchi T	4. 巻 25
2. 論文標題 Immune-resistant Mechanisms in Cancer Immunotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 810-817
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-019-01611-x	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 TSUKAMOTO Nobuo, KUROSAKI Sou, INOUE Jun-ichiro, KAWAKAMI Yutaka
2. 発表標題 Immunosuppression caused by IDO protein stability in tumor microenvironment
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会・学術集会
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	河上 裕 (Kawakami Yutaka) (50161287)	国際医療福祉大学・医学部・教授 (32206)	

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
---------	---------