

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08603

研究課題名(和文) マクロファージの活性化制御に基づく小細胞肺癌の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapies for small cell lung cancer based on regulating macrophage activation

研究代表者

入来 豊久 (Iriki, Toyohisa)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員

研究者番号：20802078

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)：治療標的や治療薬の開発が課題である小細胞肺癌(SCLC)の新たな治療戦略を目指して、本研究では腫瘍浸潤マクロファージ(M<sup>1</sup>)の活性化制御によるSCLCの治療戦略の有効性を検証した。本研究では申請者らが同定した環状スルフィド化合物であるOnionin Aや、その誘導体がSTAT3阻害によりM<sup>1</sup>の活性化を制御することで腫瘍細胞の増殖を抑制することを明らかにした。また、それら化合物がSCLC移植モデルマウスにおいても腫瘍浸潤M<sup>1</sup>の活性化制御を介した腫瘍免疫の賦活により腫瘍進展を抑制することを明らかにした。ゆえに、M<sup>1</sup>の活性化制御がSCLCに対する新規治療戦略の候補となりうる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は標準治療の進歩に乏しい小細胞肺癌に対して、マクロファージの活性化を調節する化合物を治療に応用しようとする研究であり、本研究にて数種の環状スルフィド化合物がマクロファージの活性化制御により小細胞肺癌に有効性を示すことを明らかにした。本研究成果は小細胞肺癌治療において腫瘍微小環境の制御が治療ターゲットとなりうる可能性を明らかにしたことで新たな治療戦略の一助となるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel therapeutic strategy for small cell lung cancer, we examined the effect of a therapeutic strategy using compounds regulating the activation of tumor-infiltrating macrophages on small cell lung cancer progression. In the present study, we demonstrated that Onionin A, a cyclic sulfur compound, and its derivatives inhibit tumor proliferation by regulating macrophage activation through suppressing STAT3 activation. Those compounds also suppressed tumor progression in small cell lung cancer-bearing mice by stimulating tumor immunity through regulating the activation of tumor-infiltrating macrophages. Therefore, it is suggested that the regulating macrophage activation may be a candidate for a novel therapeutic strategy against small cell lung cancer.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：小細胞肺癌 腫瘍関連マクロファージ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌は、悪性新生物の中で死亡原因の第1位であり、罹患数、死亡数共に増加傾向にある。その中で小細胞肺癌 (SCLC) は、腺癌、扁平上皮癌に次ぎ、肺癌全体の 15-20% を占める。非小細胞肺癌 (NSCLC) では分子標的治療薬、免疫チェックポイント阻害薬を含む新たな治療薬が次々と開発されている一方で、SCLC の標準治療は数十年ほとんど変わっていないのが現状であり、新たな治療標的、治療薬を開発することは喫緊の課題である。近年、マクロファージのフェノタイプは炎症惹起性の古典的活性化マクロファージ (M1 マクロファージ) に加え、抗炎症性、組織修復性のオルタナティブ活性化マクロファージ (M2 マクロファージ) の 2 種類に大別されている。このようなマクロファージの活性化の違いは様々な病態に深く関連し、がんでは、M2 マクロファージが腫瘍組織において血管新生を誘導し、IL-10、PGE<sub>2</sub> 等の免疫抑制分子を産生することで抗腫瘍免疫を抑制し、腫瘍増殖に関与する。また、腫瘍組織において M1 マクロファージの割合が増えると抗腫瘍免疫が活性化し、がんの発育・転移が抑制されることが知られている。よって、マクロファージの活性化状態を M2 から M1 へ転換することは、新たながん治療への応用につながると期待されている。

### 2. 研究の目的

上記の背景をもとに、我々はマクロファージの活性化制御による新たながん治療法の開発を目指した研究を行っている。近年、マクロファージ活性化関連因子を欠損した遺伝子改変動物を用いた国内外での研究により、マクロファージ活性化調節が病態の改善に有効であることは明らかである。また、腫瘍内には M2 マクロファージや骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) などの免疫抑制的に働く細胞が多数浸潤し、腫瘍免疫を抑制することで癌の増殖を促進することが知られている。ゆえに、既存のがん治療が著効しない症例では、M2 マクロファージや MDSC による免疫抑制が原因であると考えられている。また、免疫チェックポイント阻害薬の臨床応用に伴い腫瘍微小環境を形成する細胞の中ではリンパ球への注目が集まっている一方で、STAT3 活性化を標的としたマクロファージの活性化制御薬の開発も期待されている。さらに、近年、SCLC における Delta-like protein 3 (DLL3) の過剰発現が新たな治療標的として注目されている。そこで、本研究では STAT3 を抑制することでマクロファージの活性化を制御する環状スルフィド化合物を用いて、腫瘍移植モデルマウスでの有効性を検証することを目的とした。つまり、本研究では、主にマクロファージと癌細胞との共培養系での評価や SCLC 移植モデルマウス用いた以下に示す基礎的研究を行うことを目的とした。

- (1) 腫瘍移植モデルマウスへの環状スルフィド化合物単独投与でのマクロファージ活性化や SCLC に対する作用の解析
- (2) 腫瘍移植モデルマウスにおける化合物の既存の抗腫瘍療法との併用効果の検討
- (3) DLL3 のマクロファージの活性化に対する作用に着目し、腫瘍微小環境における機能の解析

### 3. 研究の方法

- (1) DLL3 のマクロファージの活性化に対する作用および DLL3 受容体である Notch シグナルにたいする作用の評価 : DLL3 にてヒト単球由来マクロファージを刺激し、M2 マクロファージマーカーの発現に対する作用や Notch シグナルの活性化に対する作用を Western blot や免疫細胞染色によって評価した。
- (2) 候補化合物の SCLC 細胞に対する STAT3 阻害作用および腫瘍増殖抑制作用の評価 : マクロファージ由来液性因子による SCLC 細胞の STAT3 活性化と細胞増殖能に対する候補化合物の効果を Western blot および WST-8 assay, ATP assay にて評価した。また、抗腫瘍作用を示す濃度にて、マクロファージやその他の腫瘍免疫関連細胞 (Myeloid-derived suppressor cells: MDSC, Treg, CTL, NK cell 等) を含む正常細胞に対する安全性 (毒性) も評価した。
- (3) SCLC 細胞とマクロファージの共培養条件下における候補化合物の STAT3 阻害作用およ

- び腫瘍増殖抑制作用の評価：マクロファージとの細胞間相互作用（直接・間接共培養）による SCLC 細胞の STAT3 活性化と細胞増殖能の増加に対する候補化合物の効果を BrdU 取り込みアッセイにて評価した。
- (4) 腫瘍移植モデルマウスにおける候補化合物の抗腫瘍作用の評価：マウスの皮下に腫瘍を移植した腫瘍移植モデルマウスに環状スルフィド化合物を投与し、その抗腫瘍効果を評価（腫瘍サイズや生存期間の測定等）すると共に、腫瘍組織を用いた免疫染色により、腫瘍細胞の活性化マーカーやマクロファージ活性化マーカー、リンパ球の浸潤を評価した。
- (5) 候補化合物の細胞障害性抗がん剤との併用効果の検討：腫瘍移植モデルマウスを用いて、環状スルフィド化合物と既存の抗腫瘍療法（シスプラチン等）との併用による抗腫瘍効果を評価すると共に腫瘍組織を用いた免疫染色により、腫瘍細胞の活性化マーカーやマクロファージ活性化マーカー、リンパ球の浸潤を評価した。

#### 4. 研究成果

- (1) DLL3 のマクロファージの活性化に対する作用および DLL3 受容体である Notch シグナルにた対する作用の評価：DLL3 がヒト単球由来マクロファージにおいて CD163 (M2 マクロファージマーカー) 発現や STAT3 活性化を誘導することを明らかにした。ゆえに、腫瘍微小環境において DLL3 がマクロファージの M2 活性化に関与している可能性が示唆された。
- (2) 候補化合物の SCLC 細胞に対する STAT3 阻害作用および腫瘍増殖抑制作用の評価：環状スルフィド化合物である Onionin A および環状スルフィド誘導体がマクロファージ由来液性因子による SCLC 細胞の STAT3 活性化と細胞増殖能、浸潤能、三次元培養下のスフェア形成能などの増加を抑制し、抗腫瘍作用を示す濃度において正常細胞に対しては毒性を示さないことを明らかにした。
- (3) SCLC 細胞と M 共培養条件下における候補化合物の STAT3 阻害作用および腫瘍増殖抑制作用の評価：マクロファージと SCLC 細胞との共培養条件下において Onionin A および環状スルフィド誘導体はマクロファージ由来液性因子を介した腫瘍細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。また、環状スルフィド誘導体ならびに生薬「イカリソウ」由来のフラボノイド化合物である Epimedkoreanin B はマクロファージと様々な腫瘍細胞（肺癌、肉腫、腎癌、卵巣癌等）との共培養条件下において、マクロファージの活性化を制御することで腫瘍細胞の増殖を抑制することを明らかにした。
- (4) 腫瘍移植モデルマウスにおける候補化合物の抗腫瘍作用の評価：小細胞肺癌細胞（SBC3 細胞）を移植したヌードマウスへの Onionin A 投与により腫瘍進展（腫瘍重量・腫瘍サイズ）が減少し、皮下腫瘍における腫瘍の活性化マーカーである pSTAT3 陽性細胞数が減少した。ゆえに、マクロファージの活性化を制御する環状スルフィド化合物である Onionin A が小細胞肺癌において腫瘍の進展・増殖に抑制的に機能している可能性が示唆された。また、Onionin A の基本骨格を有する環状スルフィド誘導体も腫瘍移植モデルマウスにおいて腫瘍進展ならびに腫瘍の肺転移を有意に抑制し、腫瘍内におけるリンパ球の活性化も誘導することを明らかにした。さらに、マクロファージ活性化制御する生薬「イカリソウ」由来のフラボノイド化合物である Epimedkoreanin B が腫瘍移植モデルマウスにおける皮下腫瘍の進展を有意に抑制し、さらに、Epimedkoreanin B 投与群ではマクロファージの活性化を制御することで、ガンにおける抗腫瘍免疫の低下を抑制していることを明らかにした。
- (5) 候補化合物の細胞障害性抗がん剤との併用効果の検討：免疫不全マウスを用いたヒト SCLC 細胞の皮下腫瘍モデルにより、環状スルフィド化合物が既知抗腫瘍療法（抗 PD-L1 抗体、シスプラチン）との併用効果が認められることを明らかにした。ゆえに、本研究により我々が同定した環状スルフィド化合物がマクロファージの活性化制御に基づく小細胞肺癌に対する新規治療戦略の候補となりうる可能性が示唆された。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Pan Cheng, Fujiwara Yukio, Horlad Hasita, Iriki Toyohisa, Shiraishi Daisuke, Komohara Yoshihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Cyclic sulfur compounds targeting macrophage polarization into M2/protumor phenotype and their anti-tumor effects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	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/s00262-021-03085-1	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 Pan Cheng, Fujiwara Yukio, Horlad Hasita, Shiraishi Daisuke, Iriki Toyohisa, Tsuboki Jyunko, Ikeda Tsuyoshi, Komohara Yoshihiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Flavonoid Compounds Contained in Epimedii Herba Inhibit Tumor Progression by Suppressing STAT3 Activation in the Tumor Microenvironment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphar.2020.00262	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 潘程、藤原章雄、入来豊久、孤原義弘
2. 発表標題 環状スルフィド化合物のマクロファージ活性化制御による抗腫瘍作用
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学大学院生命科学研究部細胞病理学講座ホームページ  
<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dept/patho2/patho2.html>

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	藤原 章雄  (Fujiwara Yukio)  (70452886)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師   (17401)	
研究分担者	一安 秀範  (Ichiyasu Hidenori)  (50419636)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授   (17401)	

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