

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16830

研究課題名（和文）TRPV1シグナル活性化による新規がん免疫応答メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of novel cancer immune responses by TRPV1 signaling

研究代表者

杉山 大介（Sugiyama, Daisuke）

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90759375

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）：我々が温度を感じるためには特別な受容体を必要とする。本研究ではその受容体の中で免疫応答を向上することが知られているTRPV1受容体に着目し、TRPV1シグナルが亢進することでがん免疫治療効果が増強されるか否かを検証した。その結果、TRPV1のリガンドであるカプサイシンを腫瘍生着マウスへ投与することで、抗PD-1抗体免疫療法の治療効果が向上し、この要因としてTRPV1シグナルの亢進によるCD8陽性T細胞および抗原提示細胞の活性化が示唆された。本研究結果により、免疫療法の治療効果が得られない患者に対する新たな治療法として、TRPV1シグナル亢進機構を応答できる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのがん免疫研究の多くは、がん細胞および免疫細胞の性質に着目したものであったが、本研究ではTRPV1という神経系に関する因子に着目した研究である。本研究結果より、TRPV1シグナルの亢進により抗腫瘍免疫応答が増強したことから、神経系に着目したがん免疫応答研究の発展につながると考えられる。現在では、抗腫剤や分子標的薬を併用した免疫療法が主流になっており、今後神経系に着目したがん免疫メカニズムが解明されることで、新規併用薬剤の開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We need specific receptors to sense temperature. In this study, we focused on the TRPV1 receptor, which is known to enhance immune responses, and examined whether activated TRPV1 signaling enhances the efficacy of cancer immunotherapy. The results showed that administration of capsaicin, a TRPV1 ligand, to tumor-bearing mice augmented the therapeutic effect of anti-PD-1 antibody immunotherapy, suggesting the activation of CD8-positive T cells and antigen-presenting cells by enhancing TRPV1 signaling. The results of this study suggest that the TRPV1 signaling enhancement mechanism may be a new therapeutic approach for patients who do not respond to immunotherapy.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍免疫 CD8陽性T細胞 TRPV1シグナル

1. 研究開始当初の背景

がんに対する治療法として、生体内の免疫応答を利用したがん免疫療法が標準治療として確立され、とりわけ免疫チェックポイント阻害剤 (Immune checkpoint inhibitors; ICIs) が目覚ましい治療効果を示している。一方で、ICIs の治療効果は 20~50% であり、全てのがん患者に治療効果を示すための新規治療法の開発が世界中で進められている。ICIs の治療効果がみられない、つまり治療抵抗性を示す患者ではがん細胞に対して免疫応答が働いていないと考えられ、その原因を解明するために腫瘍微小環境 (Tumor microenvironment; TME) における免疫細胞応答の解析が実施されている。特に、腫瘍組織への免疫細胞浸潤が少ない状態は「Cold-tumor (非炎症部位)」と呼ばれ、ICIs の治療抵抗性を生み出す要因とされている。この Cold-tumor を「Hot-tumor (炎症部位)」に変えることができれば ICIs の治療効果を高めることができると考え、本研究課題では温度や辛みといった「Hot」を感知する受容体である TRPV1 に着目し、TRPV1 シグナルの活性化によるがん免疫応答増強メカニズムの解明を試みる。これまでの研究から、TRPV1 シグナルは免疫細胞を活性化することが知られているため、がん免疫応答においても免疫細胞を活性化させ TME を Hot に変えることができるのではないかと考えた。本研究成果より、がん免疫応答の新たな分子メカニズムが解明されることで、がん免疫療法の効果を向上させる新規治療法の開発につながることを期待される。

2. 研究の目的

本研究では、新規がん免疫応答増強メカニズムとして、炎症惹起物質に着目した研究をおこなう。がん免疫療法の治療効果において、免疫細胞の蓄積が多く免疫細胞の活性が高いがん環境である「Hot-tumor」と、そうではない「Cold-tumor」に分けられる。ICIs の治療効果がみられる Hot-tumor の TME を作り出す新たなメカニズムの解明が切望されている。本研究では炎症惹起に関わる受容体である TRPV1 に着目し、これを活性化することで Hot-tumor の TME を作り出す。これらの結果より、ICIs の治療効果がみられない患者に対する新規がん免疫治療法の開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

TRPV1 シグナルによるがん免疫応答増強効果を検証するため、ICIs の一種である抗 PD-1 抗体に治療効果を示すマウス大腸がん由来細胞株 MC38 を生着させた担癌マウスモデルを使用した。MC38 生着マウスが抗 PD-1 抗体治療抵抗性をもつ抗体投与時期に、TRPV1 の特異的リガンドであるカプサイシンを腫瘍局所に接種し、抗 PD-1 抗体を同時投与した。また、臨床応用を目指すため経口および混入餌によるカプサイシン投与方法を施行し、Cold-tumor であるマウス肺がん細胞株 LLC とマウス乳がん細胞株 4T1 を生着させた担癌マウスモデルを用い、腫瘍サイズを計測することで抗 PD-1 抗体治療の増強効果を検証した。TRPV1 シグナルの活性化に伴う免疫応答変化を検証するため、カプサイシン投与後の担癌マウスから脾臓、所属リンパ節、腫瘍組織を回収し、それぞれに浸潤するリンパ球を用いたフローサイトメトリー解析を実施した。評価項目として、細胞傷害性 T 細胞である CD8 陽性 T 細胞 (CD8+T cells) の存在率および活性化分子マーカーの発現量、および CD8+T cell を活性化させる樹状細胞 (Dendritic cells; DCs) およびマクロファージの活性化分子マーカーの発現量を解析した。さらに、TRPV1 は神経細胞において高発現することから、TME における神経細胞を介した免疫応答変化を検証するため、TRPV1 シグナルの活性化に伴い神経細胞から放出される Calcitonin gene-related peptide (CGRP) を担癌マウスにて制御することで、抗腫瘍免疫応答が変化するかどうかを腫瘍サイズ測定およびフローサイトメトリー解析にて検討した。TRPV1 シグナル活性化に伴う免疫細胞応答変化を詳細に解析するため、カプサイシン投与後の担癌マウスの腫瘍組織から CD45 陽性免疫細胞を回収し、single cell RNA sequence (scRNAseq) 解析を実施し、各種免疫細胞の遺伝子発現変化を解析した。

4. 研究成果

はじめに、TRPV1 シグナルの活性化が抗 PD-1 抗体治療効果を増強できるかどうかを検証するため、MC38 担癌マウスに抗 PD-1 抗体を投与すると共に、カプサイシンの腫瘍内投与を試みた。その結果、治療効果がみられない時期に抗 PD-1 抗体を投与した際に、カプサイシンを同時投与することで腫瘍退縮効果が観察された (図 1)。この結果を臨床応用するために、カプサイシンを経口投与に変更し同様の実験をおこなったところ、抗 PD-1 抗体の治療効果を増強することはできなかった (図 2)。この原因を調べるため、経口投与後の担癌マウスにおける免疫応答変化

をフローサイトメトリーにて解析した。その結果、カプサイシンを投与することで腫瘍組織に浸潤するDCsの存在率および活性化分子マーカーのCD80/86の発現量が上昇したが(図3)、一方で腫瘍浸潤CD8+T cellsの存在率が低下し、活性化マーカーの上昇はみられなかった(図4)。

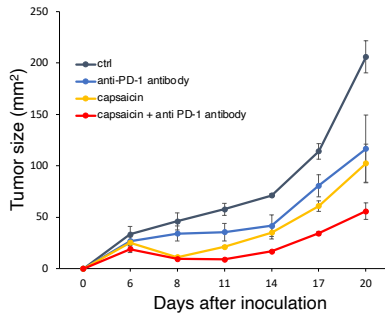


図1. カプサイシンによるICI治療の増強効果
MC38担癌マウスに、抗PD-1抗体(腫瘍移植6、9、12日後)の腹腔内投与およびカプサイシン(腫瘍移植6日後)を腫瘍局所投与した。

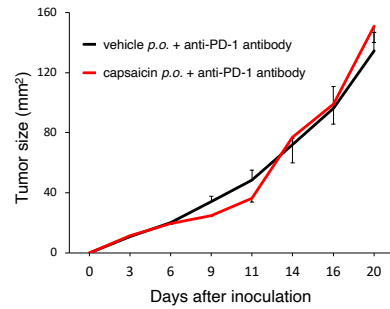


図2. カプサイシン経口投与によるICI治療の増強効果
LLC担癌マウスに、抗PD-1抗体(腫瘍移植4、7、10日後)の腹腔内投与およびカプサイシン(腫瘍移植3日後から9日間)を経口投与した。

同様の実験において、他の免疫細胞フェノタイプを解析したところ、腫瘍局所において骨髄性免疫抑制細胞(myeloid-derived suppressor cells; MDSCs)の存在率は低下していたが、腫瘍関連マクロファージ(tumor associated macrophages; TAMs)の存在率は上昇し、かつ活性化マーカーのMHC class II分子が高発現していた(図5)。これらの結果から、カプサイシンの経口投与では、免疫抑制に関わるTAMが腫瘍局所において活性化されることで、CD8+T cellsが活性化できず、結果として免疫療法による腫瘍退縮効果がみられないと考えた。次に、カプサイシンの経口投与による免疫療法向上効果を見出すため、TRPV1が高発現する神経系に着目した解析を試みた。

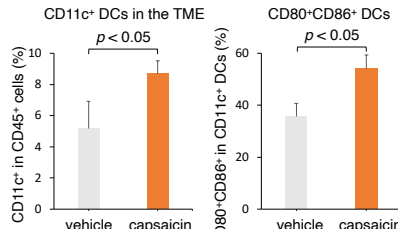


図3. カプサイシン経口投与による腫瘍局所DCの変化
LLC担癌マウスに、カプサイシン(腫瘍移植5日後から3日間)を経口投与した。投与後に腫瘍組織を回収し、フローサイトメトリーにてCDcの選択的マーカー(CD11c)および活性化マーカー(CD80、CD86)の発現量を解析した。

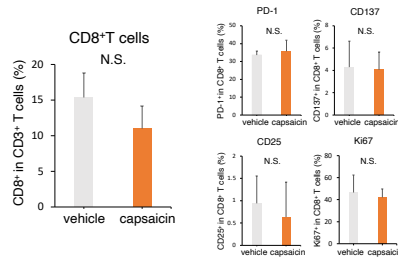


図4. カプサイシン経口投与による腫瘍局所CD8+T cellsの変化
LLC担癌マウスに、カプサイシン(腫瘍移植5日後から3日間)を経口投与した。投与後に腫瘍組織を回収し、フローサイトメトリーにてCD8+T cellsの選択的マーカー(CD8)および活性化マーカー(PD-1、CD137、CD25、K67)の発現量を解析した。

TRPV1シグナルが亢進することで、神経細胞からSubstance PおよびCGRPが放出されることがわかっており、Substance Pは免疫細胞を活性化させ、CGRPは活性を阻害する。このことから、CGRPの作用をブロックすることで免疫細胞の活性化が維持されると推察し、カプサイシン経口投与に加えCGRP阻害剤の併用投与を試みた。その結果、併用投与による腫瘍退縮効果を示す傾向がみられた(図6)。

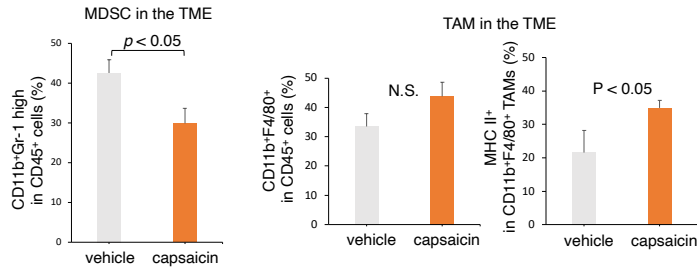


図5. カプサイシン経口投与による腫瘍局所免疫細胞の変化
LLC担癌マウスに、カプサイシン(腫瘍移植5日後から3日間)を経口投与した。投与後に腫瘍組織を回収し、フローサイトメトリーにてMDSCsの選択的マーカー(CD11b+Gr-1+) (左)、TAMsの選択的マーカー(CD11b+F4/80+)および活性化マーカー(MHC class II)の発現量を解析した(右)。

最後に、TRPV1シグナルの亢進による免疫細胞動態変化の詳細を調べるため、カプサイシンを経口投与した担癌マウスの腫瘍浸潤免疫細胞を回収し、scRNAseq解析を実施した。その結果、T cellおよびDCサブセットにおいて、カプサイシン投与により炎症関連遺伝子の発現が上昇することがわかり、TRPV1シグナルに関連する免疫細胞および遺伝子を解析する基礎データが得られた(図7)。

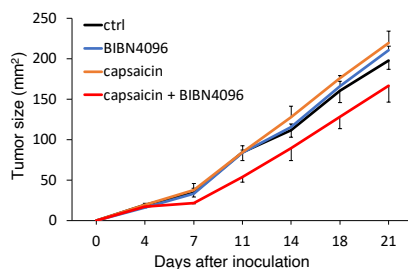


図6. CGRP阻害剤によるカプサイシン腫瘍退縮効果
4T1担癌マウスに、カプサイシン(腫瘍移植4日後から9日間)の経口投与およびCGRP受容体阻害剤BIBN4096(腫瘍移植4日後から9日間)を腹腔内投与した。

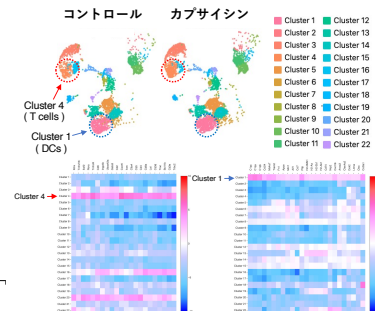


図7. カプサイシン投与による腫瘍局所免疫細胞scRNAseq解析
LLC担癌マウスに、カプサイシン混入飼餌による経口投与を行い、腫瘍移植7日後の腫瘍浸潤CD45陽性細胞を回収し、scRNAseq解析を実施した。データをCell Rangerにて精査し、Loupe Browserを用いて詳細に解析した。

本研究課題では、体内の炎症惹起に関わるTRPV1に着目し、免疫療法への応用に向けた基礎研究をおこなった。研究当初では、TRPV1のリガンドであるカプサイシンを腫瘍局所投与することで、抗PD-1抗体治療効果の増強が確認できた。一方で、臨床応用を目指すためカプサイシンの経口投与を試みたところ、免疫療法の治療増強効果が得られなかった。免疫応答解析の結果から、経口投与では全身のTRPV1シグナルが亢進することで、神経細胞からのCGRPが腫瘍組織に作用し、CD8+T cellsの活性化の低下、および免疫抑制性マクロファージの動員により抗腫瘍免疫応答が減弱したと考えられる。近年の研究において、腫瘍組織に存在する神経細胞が免疫応答を変化させることが報告されているが、TRPV1シグナルがどのような免疫応答変化を生じ

させることが報告されているが、TRPV1シグナルがどのような免疫応答変化を生じ

るかはあまり知られていない。本研究では、その一端を解明できる基礎研究成果を得られた。今後の展望として、scRNAseq にて見出した免疫細胞サブセットおよび遺伝子発現変化に着目し、TRPV1 シグナルの亢進により最も変化を受ける免疫抑制細胞サブセットを同定する。これにより、カプサイシン投与と当該免疫抑制細胞サブセットの阻害を併用することで、TME を Hot に変え、既存の免疫療法の治療効果を向上させる新規免疫治療法の開発につなげる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究成果については、論文文化に向け追加データの取得とデータ整理を行なっている。そのため、近日中に論文投稿する予定である。

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

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