

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07668

研究課題名(和文) 腫瘍由来ミトコンドリアDAMPsの抗腫瘍免疫における機能解析と癌免疫療法への応用

研究課題名(英文) Roles of tumor-derived mitochondrial DAMPs in anti-tumor immunity and application to cancer immunotherapy

研究代表者

和氣 加容子(Waki, Kayoko)

久留米大学・付置研究所・講師

研究者番号：40649597

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)：ミトコンドリア由来のN-ホルミルペプチド(FP)はDAMPsとして働き、炎症反応を誘導し、腫瘍内での炎症反応は抗腫瘍免疫に抑制的に作用することが知られている。ホルミル化に関する酵素 mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase (Mtfmt) をノックアウト(KO)したFP欠損株をマウスの腫瘍細胞株を用いて樹立した。腫瘍細胞をマウスへ皮下移植後、野生株に比べてKO株で腫瘍増殖が抑制され、免疫染色とFACS解析により、腫瘍内への免疫抑制細胞の浸潤低下が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍細胞から放出されるミトコンドリアDAMPsであるFPの抗腫瘍免疫における役割は明確ではなかった。本研究では、腫瘍ミトコンドリアFPを抑制すると、腫瘍増殖の抑制が見られた。更に、腫瘍内への抗腫瘍免疫を促進する免疫細胞の浸潤増加と、抑制性免疫細胞の浸潤減少も確認された。これらのことは、腫瘍ミトコンドリアFPを制御することで腫瘍微小環境を変化させ、抗腫瘍免疫が誘導・増強されたことを示唆し、他のがん治療法と併用する次世代複合免疫療法の開発の可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial N-formyl peptides (mtFPs) act as DAMPs (damage-associated molecular patterns) and are known to induce inflammation reactions. Inflammation in tumors has been reported to have inhibitory effects on anti-tumor immunity. We knocked out mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase (mtfmt), which catalyzes the formylation of methionyl-tRNA, in mouse tumor cell lines. When transplanted subcutaneously, the Mtfmt knockout (KO) clones grew slower in C57BL/6 mice. In addition, less immunosuppressive cells, such as myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells, were observed in Mtfmt KO tumors than in wild-type tumors, by immunohistochemistry and FACS analyses. These results suggested the possibility that mtFPs changed tumor microenvironment and affected negatively on anti-tumor immunity.

研究分野：がん免疫

キーワード：ミトコンドリアDAMPs ホルミルペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はがんペプチドワクチン療法の臨床研究において、投与ペプチドに対する特異免疫応答が誘導され、生存期間延長等の臨床効果が発現することを示してきた。しかしながら、特異免疫誘導と臨床効果との間に相関が認められない症例もあり、がん局所における微小環境が影響していることが示唆された。がん患者において免疫応答が抑制される要因のひとつとして、がん起因する炎症反応があげられる。また、炎症反応はがんの増殖・進展を促進する作用を有することが知られている。

そこで、腫瘍局所に炎症を誘導する要因として腫瘍細胞死により放出される DAMPs に着目し、腫瘍細胞の核内タンパク質 HMGB1 の抗腫瘍免疫における作用に関する研究を行ってきた。近年、ミトコンドリア DAMPs である FP が外傷や熱傷等に伴う全身性炎症反応症候群の主たる起因为物質であり、HMGB1 を含む既知の DAMPs とは異なり Toll 様受容体を介さないことが示された。そこで、本研究ではミトコンドリア由来 FP に着目した。FP は強い炎症反応を引き起こすが、好中球や樹状細胞上の FPR を介して自然免疫を惹起し、樹状細胞の抗原クロスプレゼンテーションとそれに続く抗原特異的免疫応答の誘導に関与していることも報告されている。しかしながら、FP が抗腫瘍免疫において抑制的もしくは促進的に作用するかは明確ではない。故に、この問いに対して明確な回答を得るとともに、その結果をがん免疫療法へ応用展開することが望まれる。

2. 研究の目的

ミトコンドリア DNA 遺伝子がタンパク質へと翻訳される際、mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase (Mtfmt) により翻訳開始のメチオニンにホルミル化が起こる。本研究では、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により Mtfmt ノックアウト腫瘍細胞株を樹立し、それらを用いて FP が抗腫瘍免疫にどのように作用するのかを調べる。これらの細胞株の性状を明らかにしたのちにマウスに移植し、in vivo で誘導される免疫応答の解析を行い、「ミトコンドリア DAMPs である FP が抗腫瘍免疫に抑制あるいは促進のいずれに作用するか？」という問いに対して明確な回答を得るとともに、その結果をがん免疫療法への応用を目指すことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) ホルミルペプチド (FP) の腫瘍細胞における機能

マウスの腫瘍細胞株 (B16F10、E.G7-OVA、CT26 等) で Mtfmt をノックアウトすることによりホルミル化タンパク質欠損株を樹立し、in vitro での増殖や形態変化・代謝への影響等の性状を野生株と比較検討する。

マウスの腫瘍細胞株 (E.G7-OVA、B16F10、CT26) で、CRISPR/Cas9 システムを用いて mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase (Mtfmt) をノックアウトし、ホルミル化タンパク質欠損株を樹立した。Mtfmt ノックアウトはタンパク質レベルで Western blotting により確認した。本研究には、久留米大学遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を得て行った。

Mtfmt ノックアウトの in vitro における増殖及びグルコース代謝への影響を検討するため、Cell counting kit 8 (Dojindo) と Glucose assay kit-WST (Dojindo) を用いてアッセイを行った。

(2) ホルミルペプチド (FP) の宿主免疫系への作用

Mtfmt ノックアウト株のマウスでの増殖：Mtfmt ノックアウト株 (1×10^6 細胞) もしくは野生株をマウスに皮下移植し、腫瘍細胞の増殖抑制効果を腫瘍サイズで評価した。E.G7-OVA と B16F10 の Mtfmt ノックアウト株は C57BL/6 マウスを、CT26 の Mtfmt ノックアウト株は BALB/c マウスを用いた。本研究の動物実験は久留米大学動物実験委員会の承認を得て行った。

Mtfmt ノックアウト株の免疫不全マウスでの増殖：E.G7-OVA Mtfmt ノックアウト株 (1×10^6 細胞) もしくは野生株を C57BL/6 と免疫不全マウス BALB/c nu/nu マウスに皮下移植し、腫瘍細胞の増殖抑制を腫瘍塊形成後から腫瘍サイズで評価した。

腫瘍由来 FP の腫瘍微小環境に及ぼす作用：E.G7-OVA Mtfmt ノックアウト株 (1×10^6 細胞) もしくは野生株を C57BL/6 マウスに皮下移植し、移植後 7 日、9 日、12 日目に腫瘍組織を摘出し、免疫染色により、腫瘍組織内における CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、F4/80+マクロファージ、CD11c+樹状細胞、Gr1+好中球の浸潤を検討した。また、移植後 9 日目の腫瘍組織から腫瘍浸潤リンパ球を抽出し、FACS 解析により腫瘍組織内へ浸潤している抑制性免疫細胞：タイプ 2 マクロファージ、monocytic-MDSCs、CD4+Treg 細胞を検討した。

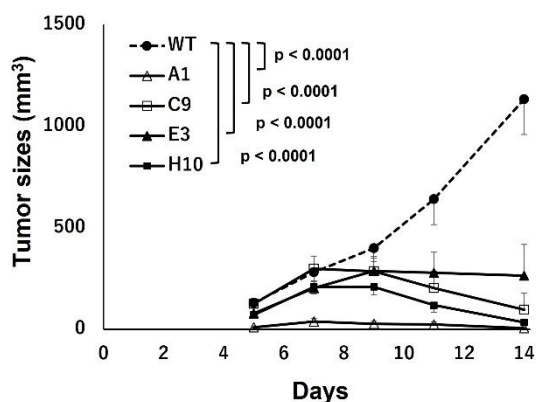
4. 研究成果

マウス腫瘍細胞株において、Mtfmt をノックアウトし、ホルミル化タンパク質欠損株を樹立した。Mtfmt KO 細胞は、in vitro での細胞増殖及びグルコースの消費について、野生株と

の違いは見られなかった。しかし、担癌マウスモデルを用いて、マウスの皮下にノックアウト株と野生株を移植後、腫瘍サイズを測定したところ、野生株に比べて、Mtfmt ノックアウト株では著しい増殖抑制が見られた(図1)。この増殖抑制は、Mtfmt ノックアウト株と野生株を免疫不全マウスである BALB/c nu/nu マウスに皮下移植したところ、抑制の解除が見られた。このことは、Mtfmt ノックアウト株の in vivo における腫瘍増殖抑制効果に腫瘍細胞特異的な免疫応答が誘導されていることが示唆される。

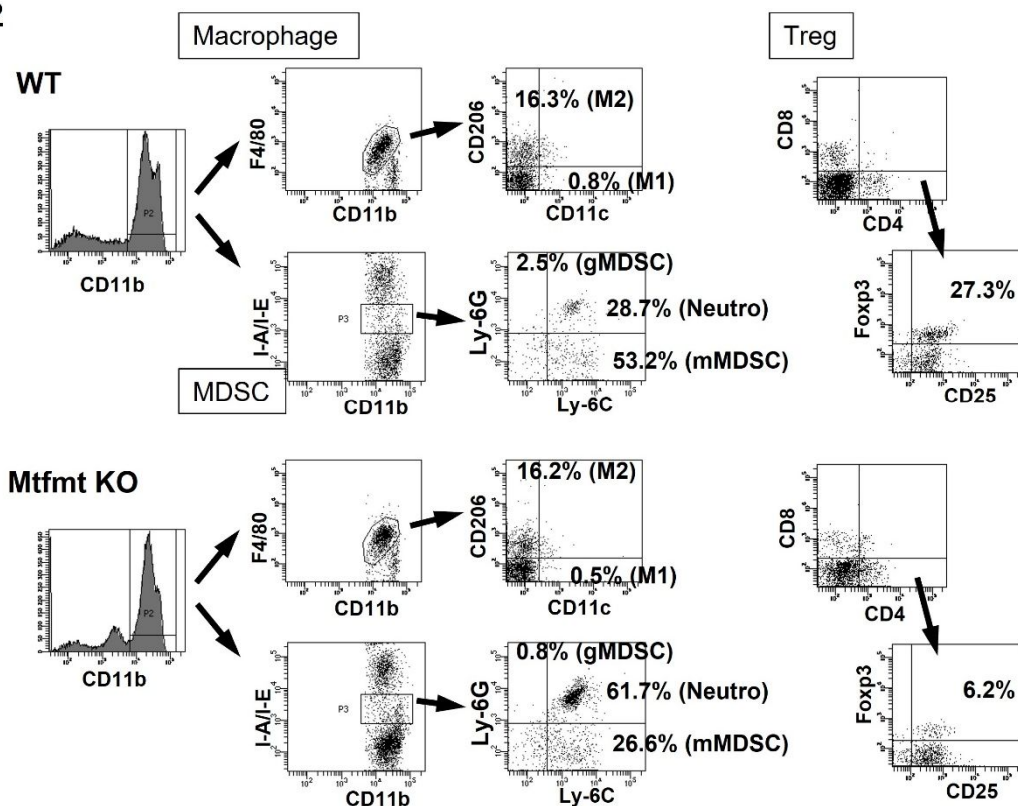
腫瘍細胞由来のホルミルペプチドを抑制することが腫瘍微小環境へどのような作用を及ぼしているかを検討するため、Mtfmt ノックアウト株をマウスの皮下へ移植し、形成された腫瘍組織を抽出後、免疫染色を行った。野生株に比べて、Mtfmt をノックアウトした腫瘍組織では、CD4+T 細胞、CD8+T 細胞、F4/80+マクロファージ、CD11c+樹状細胞、Gr1+ 好中球の腫瘍内への浸潤がより多く見られた。特に、F4/80+マクロファージと CD11c+樹状細胞の腫瘍内浸潤は顕著に促進されていた。また、腫瘍細胞を皮下移植後、腫瘍組織から腫瘍浸潤リンパ球を抽出し、FACS 解析した。Mtfmt をノックアウトした腫瘍組織では、CD11b+ Ly-6C+/Ly6G- monocytic MDSCs と CD4+Treg 細胞の腫瘍内への浸潤頻度が低くなっているのが見られた。これらのことより、Mtfmt ノックアウト株の in vivo における腫瘍増殖抑制効果は、腫瘍局所への免疫細胞の浸潤促進と免疫抑制細胞の浸潤抑制により抗腫瘍免疫応答が誘導・増強されたと考えられる。

図 1



野生株 (WT) に比べて、Mtfmt ノックアウト株 (A1、C9、E3、H10) は in vivo での顕著な増殖抑制が見られた。

図 2



以上より、本研究において、腫瘍から放出されるミトコンドリア DAMPs であるホルミルペプチドを抑制することで、腫瘍微小環境を変化させ、抗腫瘍免疫を増強することが可能であることが示された。今後、腫瘍由来のミトコンドリアホルミルペプチドの制御を臨床応用できるようなシステムを検討し、免疫チェックポイント阻害療法などへの応用とともに、次世代複合免疫療法の開発へつなげることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 和氣加容子
2. 発表標題 Role of mitochondrial N-formyl peptides as damage-associated molecular patterns on anti-tumor immunity
3. 学会等名 日本癌学会（国際学会）
4. 発表年 2021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	山田 亮 (Yamada Akira) (50158177)	久留米大学・付置研究所・特命教授 (37104)	

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