

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：24402
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2021
課題番号：20K18097
研究課題名(和文) 新規腎性貧血治療薬による治療抵抗性腫瘍内マクロファージの極性変更と分子機能解析
研究課題名(英文) Analysis of tumor infiltrating macrophage polarity alteration in PHD inhibitor treatment tumor
研究代表者
山口 一行 (Yamaguchi, Kazuyuki)
大阪市立大学・大学院医学研究科・医員
研究者番号：80848317
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腫瘍移植モデルマウスに対しプロリン水酸化酵素(PHD)阻害薬の投与により、腫瘍内マクロファージによる腫瘍増大抑制が生じる機序について検討を行った。PHD阻害薬の投与により腫瘍組織内マクロファージの低酸素誘導因子(HIF)、特にHIF-1 が優位になることにより、腫瘍内マクロファージの遺伝子発現は炎症に関わる遺伝子発現を誘導するとともに、マクロファージの極性に関わる遺伝子の発現変化も誘導することが示唆された。これらの炎症性マクロファージの表現型に関わる遺伝子発現により腫瘍抑制性の表現型をとる可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療抵抗性腫瘍は殺細胞性化学療法のみならず免疫チェックポイント阻害剤の奏効率も低い。また、治療抵抗性腫瘍においては腫瘍組織内に多くのマクロファージが浸潤しているとされており腫瘍進展、治療抵抗性に寄与しているとされる。腫瘍組織内マクロファージの表現型を変化させることは治療抵抗性を変化させるとともに、既存の化学療法・免疫チェックポイント阻害薬への感受性を改善することにつながるものと考えられる。また、これらのことは治療抵抗性腫瘍に対する治療戦略の開発だけでなく治療選択肢の拡大につながるものとする。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanism which tumor-infiltrating macrophages inhibited tumor growth by administration of a prolyl hydroxylase (PHD) inhibitor to tumor transplant mouse model. Administration of PHD inhibitor was superior to hypoxia-inducible factor (HIF), especially HIF-1, in tumor infiltrating macrophages. Subsequently, administration of PHD inhibitor on tumor bearing mice was induced inflammatory associated gene expression and macrophage polarization gene expression in tumor infiltrating macrophages. It was implied that these induced genes may be affected tumor infiltrating macrophages phenotype and tumor growth inhibition.

研究分野：泌尿器

キーワード：腫瘍 腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍内は低酸素環境下にあり血管は脆弱かつ不規則に走行するため血流が乏しくなることから、腫瘍組織は低酸素・低栄養と呼ばれる特殊ながん微小環境を形成する。がん微小環境下では腫瘍関連マクロファージは腫瘍増殖を促す(文献1)。しかし、がん微小環境を改善することで腫瘍関連マクロファージは表現型が変化し(文献2)、腫瘍増殖を抑制する。申請者は担癌モデルマウスにプロリン水酸化酵素(PHD)阻害薬を投与すると、がん微小環境の改善とマクロファージ活性化による腫瘍増殖抑制作用が生じることを明らかにしてきた。しかし、PHD阻害薬による腫瘍内マクロファージのHIF活性化が腫瘍増殖抑制をきたす詳細な機序については明らかとなっていない。そこで、本研究では、PHD阻害薬は腫瘍内マクロファージにどのように腫瘍増殖抑制性の表現型を獲得させるかを明らかにすることを旨とする。

2. 研究の目的

本研究の目的はPHD阻害薬による腫瘍内マクロファージのHIF活性化が、腫瘍増大を抑制する詳細な機序を解明することである。転写因子HIFのサブタイプであるHIF-1が優位になるとマクロファージは異物排除を担う炎症性マクロファージへと極性化するとされている。一方で、一般的に腫瘍組織内は低酸素環境と考えられており、HIF-1が活性化しているはずであるが、炎症性マクロファージとは異なる抗炎症性マクロファージが多いとされ(文献3)腫瘍の増大、進展が生じている。そこで本研究ではPHD阻害薬による腫瘍内マクロファージのHIFの活性化が、腫瘍増大を抑制する詳細な機序を解明することである。

3. 研究の方法

マクロファージ特異的HIF欠損および過剰発現マウスの作製

マクロファージ特異的HIF欠損および過剰発現マウスは *Hif1a^{flox/flox}*、*Epas1^{flox/flox}*、*Vhl^{flox/flox}*、*Lyzm-Cre* を交配させることにより作製した。これらの動物実験は大阪市立大学医学部動物実験倫理委員会にて承認された計画に沿って行った。

(1) マクロファージ特異的HIF-1、HIF-2欠損および過剰発現マウスの腫瘍病態・組織解析

作製した遺伝子改変マウスに対しLewis肺癌細胞株をC57BL/6Jマウス皮下に 1×10^6 細胞を移植し腫瘍を形成させ、腫瘍移植モデルマウスはLewis肺癌細胞株をC57BL/6Jマウス皮下に 1×10^6 細胞を移植することにより作製した。PHD阻害薬処置は移植後10日目にPHD阻害薬であるFG-4592を120 mg/kg腹腔内投与し、その後2または6日目に腫瘍組織を摘出し、組織評価、細胞解析に用いた。腫瘍体積は1日おきに腫瘍の長径と短径を測定し、 $\text{長径} \times (\text{短径})^2 \times 1/2$ にて算出した。

(2) 腫瘍内マクロファージの機能評価・解析

マクロファージ特異的HIF-1、HIF-2欠損および過剰発現マウスより骨髄由来マクロファージ(BMDM)を作製し、Phagocytosis assay kit (Cayman chemical)を用いて貪食活性を測定することにより機能評価を行った。実験は添付の製品説明書の記載に沿って行った。また、BMDMに対するPHD阻害薬処置は培養液に100 μM のFG4592を添加後、12時間経過したのちに実験に使用した。

(3) 腫瘍増殖抑制性マクロファージ集団における網羅的遺伝子発現解析

野生型腫瘍移植モデルマウスに対しPHD阻害薬投与後48時間の腫瘍組織を摘出し、1mg/ml Collagenase 10 unit/ml DNaseIにより単細胞化を行い、FcR blocking reagent処理後、CD45 PE-Cy7、F4/80 PE、Ly6C PerCP-Cy5.5、CD11b APC-Cy7により細胞を染色後腫瘍抑制性マクロファージ集団(CD45⁺, CD11b⁺, F4/80⁺, Ly6C^{lo})をBDFACSAria セルソーターを用いて単離したのち、網羅的遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 腫瘍移植モデルマウスに対するPHD阻害薬の腫瘍増大抑制はマクロファージのHIF-1を介する。

PHD阻害薬による腫瘍増大抑制がマクロファージのHIF-1、HIF-2のどちらが関与しているかを検討するために、マクロファージ特異的HIF-1およびHIF-2欠損マウスを用いて腫瘍移植モデルマウスを作製し、PHD阻害薬処置することにより検討を行った。その結果、図1に示すように、マクロファージ特異的HIF-2欠損マウスにおいてはPHD阻害薬処置による腫瘍増大抑制に対する影響は認められなかったが、マクロファージ特異的HIF-1欠損マウスにおいてはPHD阻害薬による腫瘍増大抑制効果が認められなくなった。このことから腫瘍移植モデルマウスに対するPHD阻害薬の腫瘍増大抑制効果はマクロファージのHIF-1を介することが示唆された。

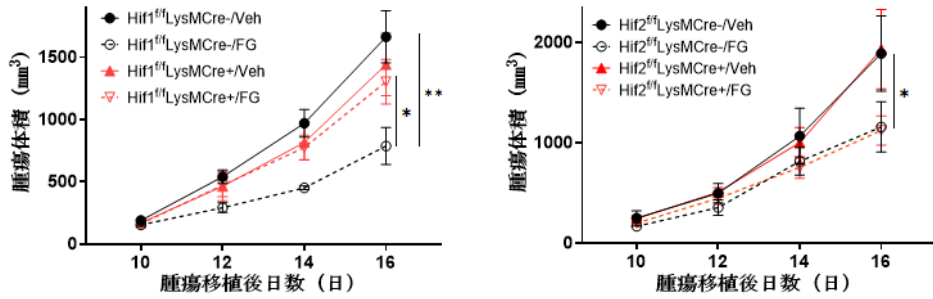


図 1. マクロファージ特異的 HIF-1 および HIF-2 欠損マウスにおける PHD 阻害薬の腫瘍増大に対する影響

(2) マクロファージ HIF-1 は食食活性に影響する。PHD 阻害薬の腫瘍増大抑制効果がマクロファージの HIF-1 を介することから、マクロファージの HIF-1 がマクロファージの食食活性に影響を与えるか否かについて骨髄由来マクロファージを用いて検討を行った。マクロファージ特異的 HIF-2 欠損マウスでは PHD 阻害薬投与により食食活性が上昇した。しかしながら、マクロファージ特異的 HIF-1 欠損マウスでは PHD 阻害薬投与によって、食食活性の上昇は認められなかった(図 2)。このことから HIF-1 の発現上昇が食食活性に寄与すると考えられた。このことから、マクロファージ特異的 HIF-1 および HIF-2 過剰発現マウスより骨髄由来マクロファージを作製し、食食活性評価を行った。その結果、HIF-1 過剰発現マクロファージにおいては食食活性の優位な上昇が認められたのに対し、HIF-2 過剰発現マクロファージにおいては食食活性の上昇は認められなかった。(図 3)

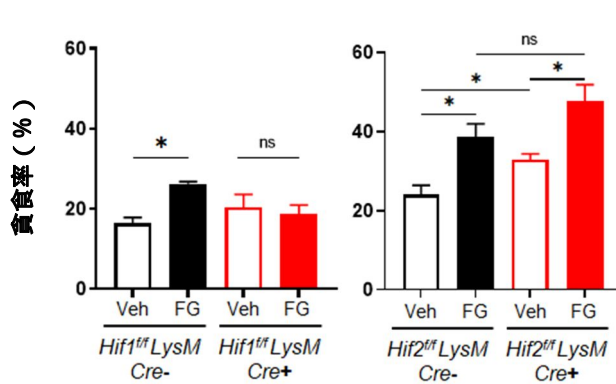


図 2. マクロファージ特異的 HIF-1 (左) および HIF-2 (右) 欠損による PHD 阻害薬の食食機能に対する影響

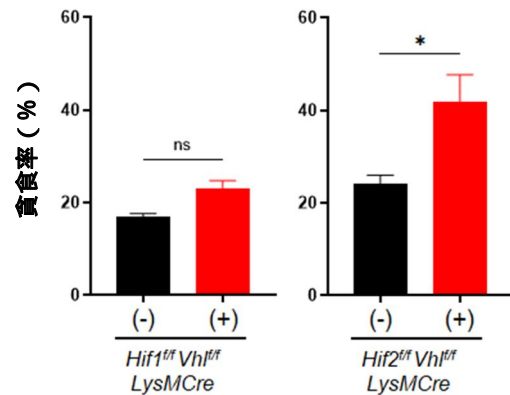


図 3. マクロファージ特異的 HIF-2 (左) および HIF-1 (右) 過剰発現における食食機能に対する影響

(3) 腫瘍増殖抑制性マクロファージ集団における網羅的遺伝子発現解析 PHD 阻害薬の腫瘍内マクロファージの遺伝子発現に対する影響について解析するために、PHD 阻害薬投与後 48 時間後の腫瘍組織内より腫瘍抑制性マクロファージを単離し、網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、PHD 阻害薬投与により腫瘍抑制性マクロファージ集団において低酸素応答、解糖系シグナルといった特徴的な遺伝子発現が認められた。

また、これらの特徴的な遺伝子群の中から、マクロファージの表現型に関わる遺伝子、および機能に関わる遺伝子について絞り込みを行い、十数個の候補遺伝子を見出した。現在、この遺伝子について腫瘍抑制に機能しているか否かについて検討を行っている。

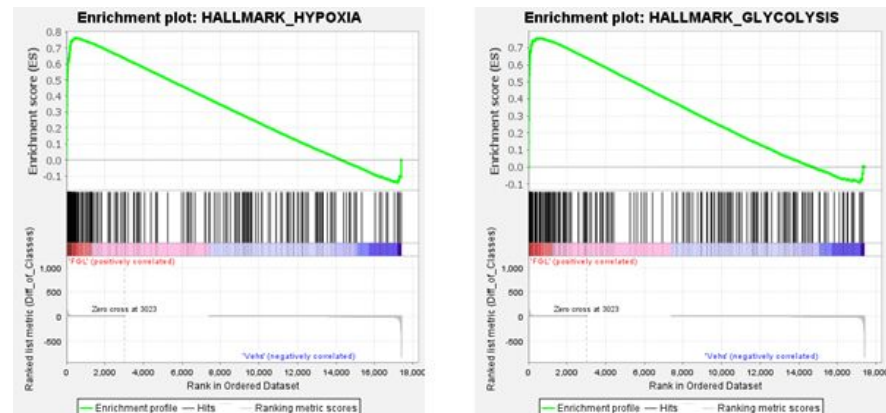


図 4. PHD 阻害薬投与による腫瘍抑制性マクロファージにおける遺伝子発現解析

<引用文献>

- DeNardo D. Ruffell B. Macrophages as regulators of tumour immunity and immunotherapy. *Nature Rev.* 2019, 19, 369-382
- Amici S. A. Young N.A. Miranda J.N. Jablonski K.A. et al. CD38 is robustly induced in human macrophages and monocytes in inflammatory conditions. *Front Immunol.* 2018
- Brown, JM. Recht L. Strober S. The promise of targeting macrophages in cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2017, 23, 3241-3250

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口一行、松永慎司、平川遼、徳留健太郎、山口雄大、富田修平
2. 発表標題 担癌モデルマウスにおけるプロリン水酸化阻害剤の腫瘍組織に対する効果検討
3. 学会等名 第140回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口一行、松永慎司、平川遼、徳留健太郎、山口雄大、富田修平
2. 発表標題 腫瘍増殖に対する腫瘍浸潤マクロファージの低酸素誘導因子の影響
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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
研究協力者	仲谷 達也 (Nakatani Tatsuya)		
研究協力者	富田 修平 (Tomita Shuhei)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	松永 慎司 (Matsunaga Shinji)		

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