

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07177

研究課題名(和文) 治療誘導性“老化”がん細胞を標的とする新規発想に基づくがん根治療法の確立

研究課題名(英文) New anti-cancer therapy targeting therapy-induced senescent cancer cells

研究代表者

原田 守 (Harada, Mamoru)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：50260716

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)：抗がん剤はがん細胞死を誘導するために使用されるが、一部のがん細胞は細胞増殖を停止した老化(senescence)状態となって生き残り、治療後の再発に関与している。最近、老化細胞を選択的に除去できるsenolytic drugが報告され、その代表が、Bcl-2/xL阻害剤であるABT-263である。今回、ヒトのがん細胞株を用いて、抗がん剤が細胞老化を誘導すること、そして、治療誘導性老化がん細胞をABT-263により効率的に除去できることをin vitroとin vivoの実験系で明らかにした。これらの研究成果は、がんの根治を期待できる有効な複合的がん治療になり得ると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん化学療法剤や分子標的薬などの抗がん剤は、本邦でのがん治療の中心となっている。しかし、これらの抗がん剤で一時的にはがんの退縮を認めても、多くの場合、再発してしまう。その機序として、がん治療後に残存した老化がん細胞が再発にかかわっている可能性が示唆されている。申請者は、抗がん剤治療後に残存した老化がん細胞を選択的に破壊する薬剤を用いてがんの根治を目指した複合的がん治療モデルの検証を多種類のヒトがん細胞を用いて実施し、この治療プロトコルが有効であることを示した。これらの成果は、がんの根治を期待できる複合的がん治療の可能性を示しており、がん治療効果を高めるために貴重な情報となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Anti-cancer drugs have been used to induce cancer cell death, whereas some cancer cells survive via slowing cell cycle, called senescence, as a result of DNA damage responses. These therapy-induced senescent cancer cells have been considered as responsible cells for recurrence. Alternatively, several drugs that selectively kill senescent cells have been reported recently. ABT-263 (navitoclax), a Bcl-2/xL inhibitor, is a representative of them. In this research project, we revealed that senescence was induced in human breast, lung and pancreatic cancer cell lines when treated with abemaciclib, pemetrexed or gemcitabine, respectively. In addition, such senescent cancer cells were effectively killed by ABT-263. These results indicate a possibility of effective combined anti-cancer therapy having the potential to induce complete cure of cancer.

研究分野：がん免疫治療学

キーワード：がん免疫療法 腫瘍生物学 複合的がん治療法

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年のがん免疫研究の進展により、がん特異抗原が多数同定され、担がんに伴う免疫抑制や免疫寛容の機序も解明された。さらに、免疫チェックポイント阻害抗体療法と CAR (chimeric antigen receptor) 遺伝子を導入した T 細胞による養子免疫療法という 2 つのブレイクスルーにより、免疫療法への期待がかつてない程に高まっている。しかし、治療効果を高めるためには他のがん治療との併用が必要と考えられる。実際、免疫チェックポイント阻害抗体療法に関しては、化学療法剤・分子標的薬や放射線療法との併用の有効性が報告されている。一方、抗がん化学療法剤はがん細胞死を誘導するために使用されるが、一部のがん細胞は DNA 損傷反応により細胞増殖を停止した老化 (senescence) 状態となって生き残る。細胞増殖の停止自体は抗がん効果であるが、老化細胞は様々な分泌タンパク質 (炎症性サイトカイン, ケモカイン, 細胞外マトリクス分解酵素など) を産生する老化随伴分泌現象 (senescence-associated secretary phenotype: SASP) を介して治療後のがんの再発・転移を促進すると考えられている。

申請者は、抗がん化学療法が担がん宿主の免疫応答に及ぼす影響・効果について、マウス同系腫瘍モデルを用いて研究してきた。代表的な免疫抑制性細胞である調節性 T 細胞 (regulatory T cells: Treg) と骨髄由来免疫抑制性細胞 (myeloid-derived suppressor cells: MDSC) の免疫抑制効果を cyclophosphamide (CP) と gemcitabine 投与で軽減するとともに、doxorubicin で免疫応答誘導性がん細胞死 (immunogenic cancer cell death) を誘導するという抗がん化学療法剤による chemoimmuno-therapy の治療モデルを報告した。そして、この抗がん効果が、CD137(41-BB) 抗体療法や ICB 抗体 (抗 CTLA-4 抗体) で増強できることも報告した。また、臨床において消化器がんに対して頻用される抗がん剤 5-FU/Oxaliplatin を CP と併用することによりマウス大腸がんに対して顕著な抗がん効果が誘導され、その効果が ICB 抗体 (抗 PD-1 抗体・抗 CTLA-4 抗体) との併用で増強できる immunogenic chemotherapy の治療モデルを報告した。しかし、これら一連の研究の過程で、がんが退縮したと判断した後に再発する場合があることを観察しており、申請者は、この再発に治療誘導性老化がん細胞が関与している可能性を考えている。そして、複合的がん治療によりがんを根治するためにはこの細胞群を駆逐する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、抗がん化学療法剤や分子標的薬による治療後に残存して生き残る治療誘導性老化がん細胞をターゲットとした複合的がん治療の有効性を検証し、がんの根治を目指した真に有効な複合的がん治療モデルを確立することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト癌細胞株として、乳がん細胞株 (MDA-MB-231, MCF-7)、肺がん細胞株 (A549, PC9)、膵がん細胞株 (PANC-1, AsPC-1, CFPAC-1, PANC10.05) を使用した。乳がん細胞に対する分子標的薬として CDK4/6 阻害剤 abemaciclib、肺がん細胞に対する抗がん剤として葉酸阻害剤 pemetrexed、膵がん細胞に対する抗がん剤として代謝阻害剤 gemcitabine を使用した。細胞老化の指標として、cell growth/beta-galactosidase/IL-6・IL-8 発現を確認した。また、cancer cell death を flow cytometry で調べた。老化細胞を選択的に除去できる senolytic drug として、Bcl-2/xL 阻害剤である ABT-263/ABT-737 を使用した。In vivo 異種移植モデルとして、ヒトがん細胞 (MDA-MB-231, A549, BxPC-3) をヌードマウスの皮下に移植し、薬剤を単独、または、併用投与してがんの増殖への影響を調べた。

(2) 細胞が老化すると細胞周期が停止する。この cell cycle arrest には p21Cip1/Waf1 と p16Ink4a が関与していることが知られている。ヒト乳がん MDA-MB-231 細胞とヒト肺がん A549 細胞は p16 Ink4a 欠損細胞であったことから、CRISPR/Cas9 法を用いて、p21Cip1/Waf1 を knock out (KO) し、p21Cip1/Waf1 と p16Ink4a の両方を欠失したヒトがん細胞株 (MDA-MB-231-KOp21, A549-KOp21) を樹立し、実験に用いた。

4. 研究成果

ヒト乳がん細胞を用いた研究

CDK4/6 阻害剤である abemaciclib でヒト乳がん MDA-MB-231 細胞と MCF-7 細胞を処理すると、MDA-MB-231 細胞に定型的な細胞老化が誘導された。MCF-7 細胞の老化誘導は不明瞭であった。そして、abemaciclib 誘導性老化 MDA-MB-231 細胞では、その後の ABT-263 治療により apoptosis が誘導された。この apoptosis 誘導には ROS が関与していた。Nude mice に xenograft された MDA-MB-231 細胞に abemaciclib と (ABT-263 と同じ特異性を有する) ABT-737 を単独または併用投与すると、併用した場合に MDA-MB-231 細胞の in vivo での増殖が抑制された。MDA-MB-231 細

胞は p16 Ink4a 欠損細胞であったので、CRIPER/Cas9 法を用いて、p21Cip1/Waf1 を KO したがん細胞株 (MDA-MB-231-KOp21) を樹立した。興味深いことに、MDA-MB-231-KOp21 細胞では cell death が促進された。このことから、abemaciclib 誘導性老化がん細胞で発現が高まる p21 は、cell cycle を停止させるとともに apoptosis に対して抑制的に機能していることが明らかになった。

ヒト肺がん細胞を用いた研究

葉酸阻害剤である pemetrexed でヒト肺がん A549 細胞と PC9 細胞を処理すると、A549 細胞に定型的な細胞老化が誘導された。そして、pemetrexed 誘導性老化 A549 細胞では、その後の ABT-263 治療により、apoptosis が誘導された。

A549 細胞は p16 Ink4a 欠損細胞であったので、CRIPER/Cas9 法を用いて、p21Cip1/Waf1 を KO したがん細胞株 (A549-KOp21) を樹立した。その後、parental A549 細胞と A549-KOp21 細胞を用いて、pemetrexed で細胞老化を誘導し、ABT-263 による senolysis の誘導の程度を比較したところ、parental A549 細胞でも senolysis が誘導されるが、A549-KOp21 細胞では顕著に cell death が増強されることを見出した。さらに、A549-KOp21 細胞を pemetrexed と 4 日間培養すると培養開始 2 日後から急激に細胞死が出現し、様々な阻害剤を用いた実験から、この細胞死は apoptosis ではなく、lipid peroxidation による新しいタイプの cell death である ferroptosis であることが判明した。さらに、A549-KOp21 細胞に p21 を再発現させると cell death が抑制されたことから、ferroptosis においても p21 が抑制的に機能していることが明らかになった。

ヒト膵がん細胞を用いた研究

膵がんの治療で頻用される gemcitabine は 4 種類のヒト膵癌細胞 (PANC-1, AsPC-1, CFPAC-1, PANC10.05) の中で PANC-1 と AsPC-1 細胞に典型的に細胞老化を誘導した。そして、gemcitabine 誘導性老化 PANC-1/AsPC-1 細胞では、その後の ABT-263 治療で apoptosis が誘導され、また、colony 形成能も抑制された。また、gemcitabine 誘導性老化 PANC-1/AsPC-1 細胞を Bcl-xL 特異的阻害剤で処理しても同様な細胞死誘導効果が観察されたことから、ABT-263 による senolysis の機序として Bcl-xL の阻害が関わっていることが明らかになった。さらに、nude mice に xenograft された AsPC-1 細胞に gemcitabine と (ABT-263 と同じ特異性を有する) ABT-737 を単独または併用投与すると、併用した場合に AsPC-1 細胞の in vivo での増殖が抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Harada M, Iida Y, Kotani H, Minami T, Komohara Y, Eto M, Yoshikawa K, Uemura H.	4. 巻 71
2. 論文標題 T-cell responses and combined immunotherapy against human carbonic anhydrase 9-expressing mouse renal cell carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy,	6. 最初と最後の頁 339-352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-021-02992-7.	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 Hoque MM, Iida Y, Kotani H, Kartika ID, Harada M.	4. 巻 42
2. 論文標題 Hydroxychloroquine promotes Bcl-xL-induced apoptosis in BxPC-3 human pancreatic cancer cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research,	6. 最初と最後の頁 3495-3506
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.15836	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 Koyanagi A, Kotani H, Iida Y, Tanino R, Kartika ID, Kishimoto K, Harada M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Protective roles of cytoplasmic p21Cip1/Waf1 in senolysis and ferroptosis of lung cancer cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Proliferation,	6. 最初と最後の頁 e13326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cpr.13326.	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 Ishitobi K, Iida Y, Kotani H, Taniura T, Notsu Y, Tajima Y, Harada M.	4. 巻 113
2. 論文標題 A modulatory effect of L-arginine supplementation on anticancer effects of chemoimmunotherapy in colon cancer-bearing aged mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology,	6. 最初と最後の頁 109423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2022.109423.	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 Kartika ID, Kotani H, Iida Y, Koyanagi A, Tanino R, Harada M	4. 巻 10
2. 論文標題 Protective role of cytoplasmic p21Cip1/Waf1 in apoptosis of CDK4/6 inhibitor-treated senescence in breast cancer cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 8988-8999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.4410.	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 Taniura T, Ishitobi K, Hidaka M, Harada M.	4. 巻 68
2. 論文標題 Modulatory effects of supplementation of Lentinula edodes mycelia extract and L-arginine on the therapeutic efficacy of immunogenic chemotherapy in colon cancer-bearing mice.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 15-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.13101.	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 -

1. 著者名 Anami T, Ibe Y, Lianbo Li, Komohara Y, Hirao H, Harada M, Yano H, Fujiwara Y, Motoshima T, Yatsuda J, Hibi T, Kamba T.	4. 巻 57
2. 論文標題 Overexpression of SerpinB9 in non-seminomatous testicular germ cell tumors.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Medical Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 68-75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-023-00374-9.	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 Hirao H, Adawy A, Li L, Yoshii D, Yano H, Fujiwara Y, Honda M, Harada M, Yamamoto M, Komohara Y, Hibi T.	4. 巻 40
2. 論文標題 The expression analysis of SerpinB9 in hepatoblastoma microenvironment.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-024-05647-7.	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 Harada M, Kotani H, Iida Y, Tanino R, Minami T, Komohara Y, Yoshikawa K, Uemura H.	4. 巻 115
2. 論文標題 Hypoxia-related carbonic anhydrase 9 induces serpinB9 in cancer cells and apoptosis in T cells via acidosis.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1405-1416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.16133	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 Hoque MM, Iida Y, Kotani H, Harada M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Senolysis of gemcitabine-induced senescent human pancreatic cancer cells.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Reports	6. 最初と最後の頁 e2075
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cnr2.2075.	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14件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 原田守
2. 発表標題 低酸素環境で誘導される免疫抵抗性。
3. 学会等名 第26回がん免疫学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯田雄一、原田守
2. 発表標題 アロCCL19発現同種間葉系細胞の抗腫瘍効果の検討。
3. 学会等名 第26回がん免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷浦隆仁、飯田雄一、小谷仁司、石飛一成、平原典幸、田島義証、原田守
2. 発表標題 2種類の同系大腸がんマウスモデルを用いた複合的免疫化学療法。
3. 学会等名 第26回がん免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mamoru Harada
2. 発表標題 Protective roles of p21Cip1/Waf1 in cell death of therapy-induced senescent cancer cells.
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mamoru Harada, Yuichi Iida, and Hitoshi Kotani
2. 発表標題 SerpineB9, a hypoxic response-related molecule responsible for immunotherapy resistance.
3. 学会等名 第51回日本免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuichi Iida, Mamoru Harada
2. 発表標題 A novel immunotherapy using CCL19-expressing allogeneic mesenchymal stromal cells exerts anti-tumor effect by increasing CD103+ CD8+ T cells.
3. 学会等名 第51回日本免疫学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原田守、小谷仁司、菰原義弘、飯田雄一
2. 発表標題 ヒトcarbonic anhydrase 9 を発現した 'cold' マウス腎がんに対する複合がん免疫療法
3. 学会等名 第25回がん免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯田雄一、原田守
2. 発表標題 ア口CCL19発現同種間葉系細胞の腫瘍残存および抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第25回がん免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原田守、飯田雄一、菰原義弘、小谷仁司
2. 発表標題 ヒトCA9 発現マウス腎がんに対する免疫チェックポイント阻害とaxitinib による複合がん療法
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小谷仁司、谷野良輔、飯田雄一、原田守
2. 発表標題 老化誘導剤アフィジコリンと老化細胞除去薬ABT-263のヒト乳がんと肺がん細胞に対する併用効果
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Iida Y, Harada M
2. 発表標題 Anti-tumor immunotherapy using CCL19-expressing allogeneic mesenchymal stromal cells
3. 学会等名 第50回日本免疫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Harada Mamoru, Iida Yuchi, Hoque Mahbul M, Kotani Hitoshi
2. 発表標題 Penetrexed-induced ferroptosis in A549 human lung cancer cells and a protective role of p21.
3. 学会等名 第82回日本癌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hoque Mohammad Mahbul, Yuichi Iida, Hitoshi Kotani, Mamoru Harada
2. 発表標題 Senolysis of gemcitabine-induced senescent human pancreatic cancer cells
3. 学会等名 第82回日本癌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuichi Iida, Mamoru Harada
2. 発表標題 Anti-tumor effect of CCL19-expressing allogeneic mesenchymal stromal cells.
3. 学会等名 第52回日本免疫学会総会
4. 発表年 2023年～2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

島根大学医学部免疫学講座ホームページ
<https://www.med.shimane-u.ac.jp/immunology/>

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