

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 23 年 5 月 10 日現在

機関番号： 10101  
 研究種目： 若手研究(B)  
 研究期間： 2010～2011  
 課題番号： 22790371  
 研究課題名（和文） 抗癌免疫応答を惹起するアジュバントによる免疫抑制性ミエロイド細胞の機能転換  
 研究課題名（英文） Functional conversion of tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors by dsRNA adjuvant  
 研究代表者  
 志馬 寛明 (SHIME HIROAKI)  
 北海道大学・大学院医学研究科・助教  
 研究者番号： 70372133

研究成果の概要（和文）：多くの癌では免疫機能に変調がみられ、抗癌免疫が機能不全に陥ることにより、癌の進展が促進される。中でも腫瘍内に多数浸潤する M2 形質をもったマクロファージは、癌細胞の増殖を多面的に補助し、悪性形質の獲得に寄与している。本研究では、2 本鎖 RNA アジュバントが腫瘍内マクロファージの TLR3-TICAM-1 経路を活性化することにより、癌の増殖抑制をもたらすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In many cancer patients, immune system is subverted by immunosuppressive cells as well as tumor-derived factors, which contributes to tumor progression. Tumor-associated macrophages with immunosuppressive, M2-like phenotype support the tumor growth by several mechanisms. Here, we show that double-stranded RNA (dsRNA) adjuvant induces growth retardation of 3LL tumor by converting tumor-supporting macrophages to tumoricidal effectors through the activation of TLR3-TICAM-1 signaling pathway.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2011 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：腫瘍免疫

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：癌、アジュバント、TLR3、マクロファージ、癌免疫療法、2 本鎖 RNA、TICAM-1、TRIF

## 1. 研究開始当初の背景

進行癌患者は、しばしば健常人とは異なる免疫状態に陥る。腫瘍局所では、炎症や免疫

抑制により、抗癌免疫応答が機能不全となる。免疫抑制は、制御性T細胞(regulatory T cells, Tregs)や癌細胞が産生する免疫抑制性サイト

カインに加えて、多くの癌で増加するミエロイド由来抑制性細胞 (myeloid-derived suppressor cells, MDSCs) や腫瘍随伴マクロファージ (tumor-associated macrophages, TAMs) などによってもたらされる。特にマクロファージは腫瘍内に多数浸潤し、癌細胞の増殖、浸潤、転移などの悪性形質の獲得と密接に関わっている。これらの免疫細胞の機能を制御することができれば、癌の増殖を抑制することができると考えられているが、有効な手段は確立されていない。

一方、微生物成分に由来する免疫活性化物質はアジュバントとよばれ、強力な免疫応答を誘導することから、癌治療への応用が試みられてきた。微生物アジュバントの多くは、toll-like receptors (TLRs) のリガンドであることが近年明らかにされている。我々は癌細胞株のマウス移植モデルを用い、TLR3のリガンドである2本鎖RNAアナログpolyI:Cが強力な増殖抑制効果を誘導できることを明らかにしてきた。TLR3は、主に樹状細胞やマクロファージに発現し、polyI:Cによる活性化によって、サイトカインを産生するとともに成熟化する。その結果、活性化されたこれらの細胞によって抗癌エフェクター細胞である細胞傷害性T細胞やNK細胞の活性化が誘導され、癌細胞の直接的な傷害により、腫瘍増殖が抑制されることが明らかにされている。

PolyI:Cが癌に対する治療効果を発揮できるということは、免疫変調状態に陥っている担癌宿主においても抗癌免疫応答を誘導できることを示唆するが、抑制性に働く免疫細胞に対する作用は、ほとんど解析されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、免疫アジュバントの一つである poly I:C が、腫瘍内に浸潤した免疫抑制的

な性質をもつミエロイド系細胞の機能を抗癌性へと転換することで治療効果を発揮する可能性に基づいて解析を行い、新たな抗癌作用のメカニズムを明らかにすることを目的とした。特に、腫瘍内に浸潤するマクロファージの機能変化に着目して解析を行った。

## 3. 研究の方法

3LL 肺癌細胞株を同系 B6WT マウスの皮下に移植し、腫瘍を形成させた (担癌マウス) 後、polyI:C を腹腔内投与した。腫瘍径を測定するとともに、腫瘍内免疫細胞の検出、F4/80 特異抗体によるマクロファージの単離を行い、癌細胞に対する傷害活性や機能変化を解析した。野生型マウスの代わりに各種ノックアウトマウスを用いて、シグナル経路の解析を行った。

## 4. 研究成果

担癌マウスに polyI:C の腹腔内投与を行ったところ、投与後 12 時間以内に出血性の壊死がみられ、腫瘍増殖は速やかに抑制された (図 1)。TNF- $\alpha$  ノックアウトマウスでは、出血性壊死や増殖抑制が全く起こらなかった (図 1)。実際に腫瘍内では、polyI:C 投与 1 時間以内に TNF- $\alpha$  の産生が起こっていた (図 2)。TNF- $\alpha$  産生細胞を調べると、F4/80 陽性マクロファージであった (図 3)。PolyI:C 投与後に腫瘍から単離したマクロファージは 3LL 癌細胞に対して細胞傷害活性を示し、抗 TNF- $\alpha$  中和抗体で阻害された (図 4)。以上の結果から、polyI:C を投与すると、腫瘍内マクロファージから TNF- $\alpha$  が産生され、3LL 癌細胞の直接的傷害により、出血性壊死を伴う腫瘍増殖の抑制が起これると考えられた。

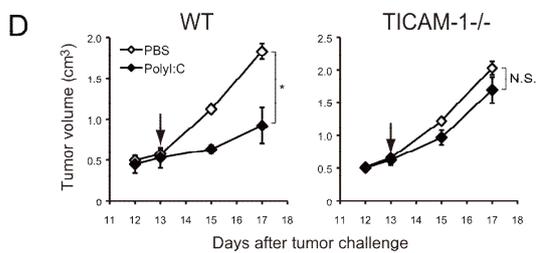
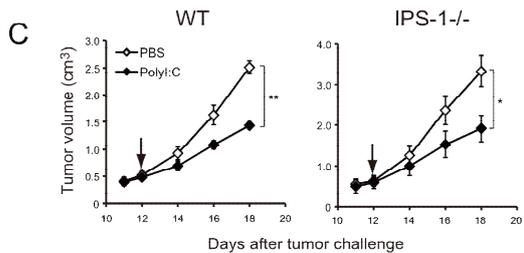
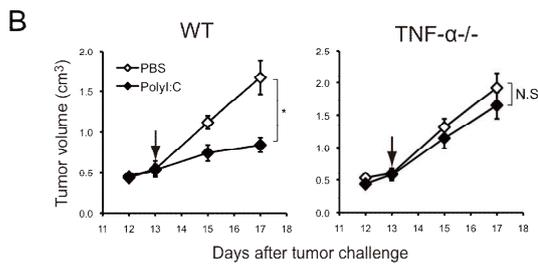
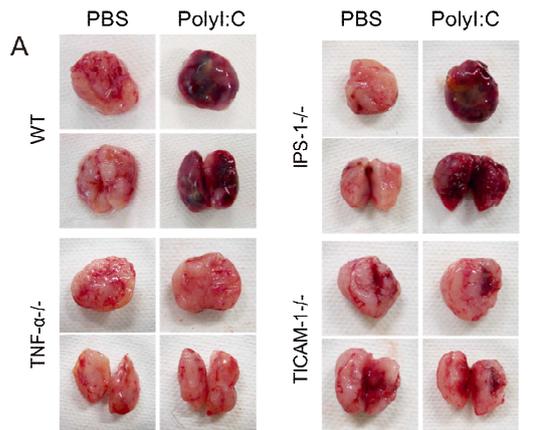


図 1

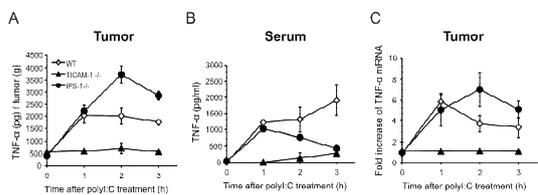


図 2

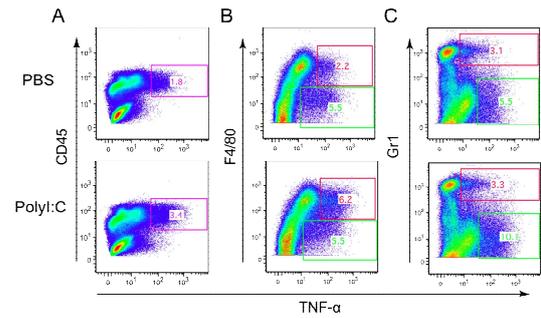


図 3

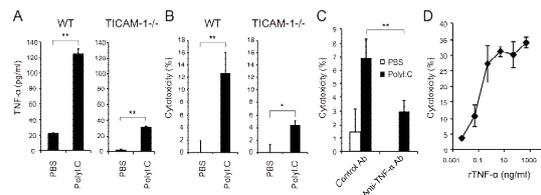


図 4

PolyI:C は、エンドソームの TLR3 受容体と細胞質の MDA5 受容体の両方に認識され、下流のアダプター分子 TICAM-1 (別名 TRIF) および IPS-1 (別名 MAVS) をそれぞれ介して 2 つのシグナル伝達経路を活性化する。3LL 移植モデルにおいて、TICAM-1 ノックアウトマウスでは、治療効果がほぼキャンセルされたが、IPS-1 ノックアウトマウスではキャンセルされなかった (図 1)。また、それと相関して、polyI:C で誘導される TNF- $\alpha$  産生も TICAM-1 ノックアウトマウスでのみキャンセルされた (図 2)。以上の結果から、TLR3-TICAM-1 経路の活性化が TNF- $\alpha$  産生と腫瘍増殖の抑制に必須であることが分かった。また、TICAM-1 ノックアウトマウスの腫瘍内マクロファージは、polyI:C を投与しても TNF- $\alpha$  を産生しなかった (図 4)。マクロファージには、抗癌性に働く M1 形質と腫瘍増殖を促進する M2 形質がある。腫瘍内のマクロファージは、多くの場合 M2 形質を示すが、polyI:C で刺激すると、M1 形質に特徴的な遺伝子群の発現が誘導された (図 5A)。一方、

M2 形質に特徴的な遺伝子の発現は変化しなかった (図 5B, C)。また、ロックアウトマウスを用いた解析結果から、M1 形質の獲得には、TLR3-TICAM-1 経路が必須であることが分かった (図 5A)。

以上の結果から、polyI:C は、TLR3-TICAM-1 経路の活性化により、腫瘍の増殖促進に働く腫瘍内マクロファージの形質を M1 に変換し、TNF- $\alpha$  を含む抗癌性に働く遺伝子の発現を誘導し、腫瘍の増殖を抑制することが明らかとなった。本研究成果は、TLR3-TICAM-1 経路の活性化による腫瘍内マクロファージの機能転換に基づいた、新規治療法の開発へと繋がることが期待される。

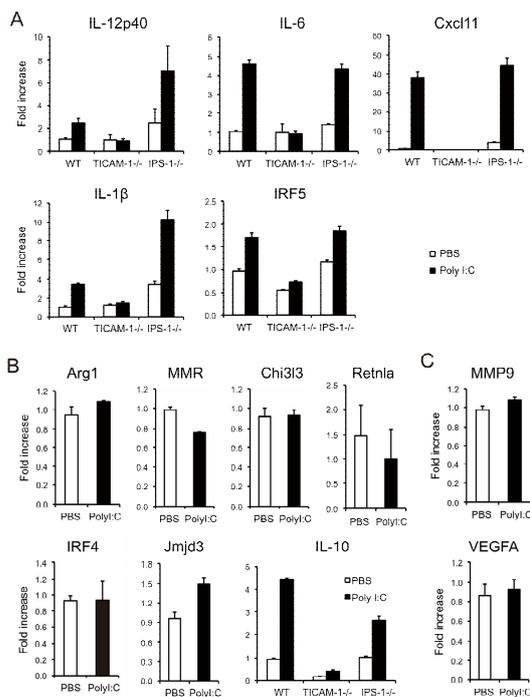


図 5

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

1. Seya T, Shime H, Matsumoto M. TAMable tumor-associated macrophages in response to innate RNA sensing. 2012 (in press)(査読有り)

2. Shime H, Matsumoto M, Oshiumi H, Tanaka S, Nakane A, Iwakura Y, Tahara H, Inoue N, Seya T. Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 ;109(6):2066-71. (査読有り)

3. Shime-Hattori A, Kobayashi S, Ikeda S, Asano R, Shime H, Shinano T. A rapid and simple PCR method for identifying isolates of the genus Azospirillum within populations of rhizosphere bacteria. J Appl Microbiol. 2011, 111(4):915-924. (査読有り)

4. Aly HH, Oshiumi H, Shime H, Matsumoto M, Wakita T, Shimotohno K, Seya T.

Development of mouse hepatocyte lines permissive for hepatitis C virus (HCV). PLoS One. 2011;6(6): DOI: e21284.

[10.1371/journal.pone.0021284](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021284) (査読有り)

5. Wakasa K\*, Shime H\*, Kurita-Taniguchi M, Matsumoto M, Imamura M, Seya T.

Development of monoclonal antibodies that specifically interact with necrotic lymphoma cells. Microbiol Immunol. 2011

May;55(5):373-7. (\*These authors equally contributed to this work) (査読有り)

6. Watanabe A, Tatematsu M, Saeki K, Shibata S, Shime H, Yoshimura A, Obuse C, Seya T, Matsumoto M. Raftlin Is Involved in the Nucleocapture Complex to Induce

Poly(I:C)-mediated TLR3 Activation. *J Biol Chem.* 2011 Mar 25;286(12):10702-11. (査読有り)

7. 瀬谷 司、押海 裕之、志馬 寛明、松本 美佐子: 自然免疫と癌治療, 実験医学, vol. 29, p111-118, 2011. (査読無し)

8. 志馬 寛明、松本 美佐子、瀬谷 司 腫瘍浸潤 myeloid cells による免疫抑制, 臨床免疫・アレルギー科, vol. 56, p23-30, 2011. (査読無し)

9. Sawahata R\*, Shime H\*, Yamazaki S, Inoue N, Akazawa T, Fujimoto Y, Fukase K, Matsumoto M, Seya T. Failure of mycoplasma lipoprotein MALP-2 to induce NK cell activation through dendritic cell TLR2. *Microbes Infect.* 2011, 13(4):350-8 (\*These authors equally contributed to this work) (査読有り)

10. Yabu M\*, Shime H\*, Hara H, Saito T, Matsumoto M, Seya T, Akazawa T, Inoue N. IL-23-dependent and -independent enhancement pathways of IL-17A production by lactic acid. *Int. Immunol.* 23:29-41, 2011 (\*These authors equally contributed to this work) (査読有り)

11. Seya T, Kasamatsu J, Azuma M, Shime H, Matsumoto M. Natural killer cell activation secondary to innate pattern sensing. *J Innate Immun.* 2011;3(3):264-73. (査読有り)

12. Seya T, Shime H, Ebihara T, Oshiumi H, Matsumoto M. Pattern recognition receptors of innate immunity and their application to tumor

immunotherapy. *Cancer Sci.* 101:313-320, 2010. (査読有り)

13. Akazawa T, Inoue N, Shime H, Kodama K, Matsumoto M, Seya T. Adjuvant engineering for cancer immunotherapy: development of a synthetic TLR2 ligand with increased cell adhesion. *Cancer Sci.* 101:1596-1603, 2010. (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

1. 児島絢子 癌で増加する CD11bGr1 陽性細胞は、二本鎖 RNA アジュバントの刺激により、NK 細胞活性化能を獲得する 日本分子生物学会 2011 年 12 月 14 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

2. Shime H. Tumor-infiltrating macrophages turn tumoricidal through TLR3/TICAM-1 signal by dsRNA stimulation. The 16th Korea-Japan cancer research workshop 2011 年 12 月 10 日 北海道大学 (札幌市)

3. Shime H. Tumoricidal activity of tumor-associated macrophages induced by RNA adjuvant therapy. 日本免疫学会 2011 年 12 月 28 日 幕張メッセ (千葉県)

4. Aly HH. Establishment of HCV replication in mouse hepatocytes through the modulation of mouse innate immune response. 日本免疫学会 2011 年 12 月 27 日 幕張メッセ (千葉県)

5. Shime H. Tumoricidal activity of tumor-associated macrophages activated by RNA adjuvant. 日本癌学会 2011 年 10 月 4 日 名古屋国際会議場 (愛知県)

6. 志馬 寛明 二本鎖 RNA アジュバントによる腫瘍随伴マクロファージの活性化と抗腫瘍免疫応答 日本がん免疫学会 2011年6月30日 千里ライフサイエンスセンタービル (大阪府)

7. Seya T. RNA adjuvant: multi-directional induction of antitumor effectors by dendritic cells. 第69回 日本癌学会学術総会 2010年9月23日 大阪国際会議場 (大阪)

8. Shime H. Tumor-infiltrating myeloid cells evoke in vivo tumoricidal activity by RNA adjuvant therapy 第69回 日本癌学会学術総会 2010年9月22日 大阪国際会議場 (大阪)

9. 志馬 寛明 Possible contribution of tumor-infiltrating myeloid cells to anti-tumor immune response during RNA adjuvant therapy 平成22年度 がん若手研究者ワークショップ 2010年9月3日 アートランドホテル蓼科 (長野)

10. 志馬 寛明 樹状細胞と腫瘍浸潤マクロファージのアジュバント応答 第14回 日本がん免疫学会総会 (招待講演) 2010年7月23日 KKR ホテル熊本 (熊本)

[図書] (計 1 件)

Advanced technologies for adjuvant research and development 抗がん免疫アジュバントの開発と現状 瀬谷 司, 佐藤 治子, 志馬 寛明, 松本 美佐子 CMC 出版, 238-249, 2011

[その他]

ホームページ等

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~e20536/>

新聞報道等

北大広報(2012.1)

マイナビニュース(2012.1)

北海道医療新聞(2012.1)

日刊工業新聞 (2012.1)

Newton Doctor (2012.3)

科学新聞 (2012.2)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志馬 寛明 (Shime Hiroaki)

北海道大学大学院医学研究科・助教

研究者番号：70372133

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし