

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590470

研究課題名(和文) RNAアジュバントによる腫瘍浸潤免疫細胞の機能修飾

研究課題名(英文) Regulation of function of tumor-infiltrating myeloid cells by RNA adjuvant

研究代表者

志馬 寛明 (Shime, Hiroaki)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70372133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：免疫アジュバントによる自然免疫シグナルの活性化が、腫瘍の成長を促進するミエロイド由来抑制性細胞(MDSCs)に与える影響について解析した。RNAアジュバントは、MAVS経路を介してMDSCsを活性化し、その結果産生されるIFN- γ により抗がんエフェクター細胞であるNK細胞を活性化した。加えて、RNAアジュバントはTICAM-1 (TRIF)経路を介してMDSCsに抗腫瘍活性を付与した。しかし、Pam2リポペプチドによるtoll-like receptor 2の活性化は、MDSCsの生存と免疫抑制活性を増強した。自然免疫シグナル経路は、MDSCsの生存や機能調節に深く関係することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are a heterogeneous population of cells that exhibit immunosuppressive activity in cancer. We have studied the effects of innate immune signaling activation on MDSC function. A double-stranded (ds) RNA adjuvant induced IFN- γ production by MDSCs through MAVS (IPS-1) signaling pathway, leading to NK cell activation. dsRNA adjuvant stimulation also converted MDSCs into cells with anti-tumor activity through TICAM-1 (TRIF) signaling pathway. In contrast, Pam2 lipopeptide-induced toll-like receptor 2 (TLR2) activation resulted in enhanced survival and immunosuppressive activity of MDSCs. Thus, our data suggest that innate immune signaling is closely related to expansion and function of MDSCs.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：がん免疫 ミエロイド系細胞 アジュバント マクロファージ TLR MDSC

1. 研究開始当初の背景

多くのがん患者は、免疫機能が抑制された状態に陥る。がんに対する免疫療法を成功させるのに重要な要因の一つは、免疫抑制状態を解消することだと考えられている。それ故、有効な手段を確立するための研究開発が盛んに行われている。マウスの腫瘍モデルの解析から、がんで免疫抑制状態に陥る主な原因は、特殊な性質をもったミエロイド系免疫細胞の全身的な増加にあることが明らかとなった。それらのミエロイド系免疫細胞は、がん細胞に由来する因子や腫瘍内微小環境の作用により特有の機能を獲得していることから、腫瘍随伴マクロファージ

(tumor-associated macrophages, TAMs)(CD11b⁺F4/80⁺)、ミエロイド由来抑制性細胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)(CD11b⁺Gr1⁺)、腫瘍随伴好中球

(tumor-associated neutrophils, TANs または顆粒球型 granulocytic-MDSCs, G-MDSCs)(CD11b⁺Ly6G⁺)と呼ばれ、正常組織で同じ表面マーカーを有する細胞とは区別される。これらのミエロイド系免疫細胞は、固有の機能により、腫瘍の成長を多面的に幫助する。

一方、微生物成分に由来する免疫アジュバントは自然免疫系の賦活化により、がんの治療効果をもたらすことが動物モデルで明らかにされ、がん治療の薬剤候補として期待されている。免疫アジュバントは、樹状細胞の活性化を介したNK細胞や細胞傷害性T細胞の活性化誘導により抗がん作用を発揮する。さらに、免疫アジュバントには、TAMsの機能を抗がん性に転換する作用があることも明らかとなった。しかし、免疫アジュバントがMDSCsやTANsの機能や担がん宿主体内での数に与える影響は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、免疫アジュバントによるシグナ

ル伝達経路の活性化が免疫抑制的に働くミエロイド系細胞の機能に与える影響を定義することを目的とした。2本鎖RNAアジュバント(polyI:C)およびPam2リポペプチドによるCD11b⁺Gr1⁺MDSCsやTANs(G-MDSCs)の機能変化に注目して解析した。

3. 研究の方法

マウスがん細胞株(B16, 3LL, EL4, EG7等)の皮下移植モデルを用いて、各種アジュバント(polyI:C, Pam2CSK4, CpG ODN等)の投与による腫瘍退縮効果を測定した。アジュバント投与後のマウスの腫瘍や脾臓などから免疫細胞(CD11b⁺F4/80⁺, CD11b⁺Gr1⁺, CD11b⁺Ly6G⁺, CD8⁺CD11c⁺)を採取し、遺伝子発現、表面マーカー、サイトカイン分泌、がん細胞に対する細胞傷害活性などをアジュバント非投与マウス由来の細胞と比較し、機能の違いを調べた。さらにその機能変化が腫瘍の成長に与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1) RNAアジュバントにより活性化したCD11b⁺Gr1⁺MDSCsによるNK細胞の活性化

NK細胞の活性化により腫瘍成長が抑制されることが明らかにされているB16皮下移植マウスのpolyI:C治療モデルを用いて、CD11b⁺Gr1⁺MDSCsの機能変化を解析した。既報の通り、担がんマウスのCD11b⁺Gr1⁺細胞は、免疫抑制活性を示していたが、polyI:Cに回答して、1型インターフェロンや炎症性サイトカイン等の免疫活性化因子を産生することが分かった。PolyI:Cによって活性化されたCD11b⁺Gr1⁺細胞は、NK細胞からのIFN- γ 産生を誘導したことから、樹状細胞と同様にアクセサリ細胞として機能するようになることが分かった。その作用には、MAVS経路の活性化によるCD11b⁺Gr1⁺細胞からのIFN- γ の産生と細胞接触が必須であった。IFN- γ は、

B16 細胞の増殖を直接抑制することから、樹状細胞の活性化を介した NK 細胞の活性化による直接的な細胞傷害とともに、CD11b⁺Gr1⁺ MDSCs の機能転換を介した NK 細胞の活性化に伴う IFN- γ 産生が、polyI:C 投与による B16 の腫瘍退縮に寄与している可能性が示唆された。

(2) RNA アジュバント刺激 CD11b⁺Ly6G⁺

TAMs/G-MDSCs による抗がん作用

EL4 の移植モデルで、polyI:C の治療効果に CD11b⁺Ly6G⁺細胞が必須であることを見出した。PolyI:C 投与で活性化した CD11b⁺Ly6G⁺細胞は、EL4 がん細胞の腫瘍形成を阻害した。また、その抗がん活性の獲得には、TICAM-1 (TRIF) シグナル経路が必須であることを明らかにした。

(3) TLR2 リガンドによる CD11b⁺Gr1⁺細胞の免疫抑制活性の増強

Pam2 リポペプチドの投与は、樹状細胞を介した細胞傷害性 T 細胞の活性化により、抗がん作用を発揮することが知られてきた。しかしその一方で、Pam2 リポペプチドは担がんモデルにおける CD11b⁺Gr1⁺ MDSCs の割合を増加させるとともに、それらの細胞が持つ免疫抑制活性すなわち CD8⁺ T 細胞増殖に対する抑制活性をさらに増強することを明らかにした。その機能には、TLR2 下流のシグナルが必須であった。すなわち、MDSC における TLR2 シグナルの活性化は、免疫アジュバント療法の足かせとなる危険性を有することが明らかとなった。

以上の結果は、自然免疫アジュバントが誘導する自然免疫シグナル経路の種類ごとに、樹状細胞のみならず、TAMs や MDSCs の機能が大きく変化し、腫瘍成長に多大な影響を与えることを示唆するものであった。自然免疫シグナル経路およびターゲット細胞の選択的活性化が、免疫アジュバントを用いたがん免

疫療法の成否の重要なポイントとなる可能性があると考えられた。

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. Functional alteration of tumor-infiltrating myeloid cells in RNA adjuvant therapy. *Anti-cancer Research* 2015 (in press) (査読有り)
2. Takemura R, Takaki H, Okada S, Shime H, Oshiumi H, Akazawa T, Matsumoto M, Tejima T, and Seya T. 2015. PolyI:C-induced, TLR3/RIP3-dependent necroptosis backs up immune effector-mediated tumor elimination in vivo. *Cancer Immunol Res.* doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0219 (in press) (査読有り)
3. Matsumoto M, Tatematsu M, Nishikawa F, Azuma M, Ishii N, Morii-Sakai A, Shime H, Seya T. Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and CTL activation without significant cytokine production in vivo. *Nat Commun* 6:6280, 2015 doi: 10.1038/ncomms7280. (査読有り)
4. Maruyama A, Shime H, Takeda Y, Azuma M, Matsumoto M, and Seya T[#]. Pam2 lipopeptides systemically increase myeloid-derived suppressor cells through TLR2 signaling. *BBRC* 457: 445-450, 2015 doi:10.1016/j.bbrc.2015.01.011 (査読有り)
5. 瀬谷 司、志馬寛明、松本美佐子 腫瘍浸潤マクロファージの RNA 応答 細胞工学 vol.33(12) p1242-1246, 2014 (査読無し)

6. 志馬寛明、松本美佐子、瀬谷 司 dsRNAによる TAM、MDSC の腫瘍免疫抑制作用から活性化作用への変換 臨床免疫・アレルギー科 vol.61 (6), p613-620, 2014 (査読無し)
 7. 志馬寛明、児島絢子、丸山晃、斉藤祐介、押海裕之、松本美佐子、瀬谷 司 Poly I:C の刺激により活性化したミエロイド由来抑制性細胞はナチュラルキラー細胞に抗癌活性を付与する 北海道医学雑誌 89(1), p80, 2014 (査読無し)
 8. Shime H, Kojima A, Maruyama A, Saito Y, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T[#]. Myeloid-derived suppressor cells confer tumor-suppressive functions on natural killer cells via polyinosinic:polycytidylic acid treatment in mouse tumor models. *J Innate Immun* 6(3): 293-305, 2014 doi:10.1159/000355126 (査読有り)
 9. 志馬寛明、瀬谷 司、Toll-like receptor (TLR)と制御性 T 細胞(Treg)、週刊医学のあゆみ, 246(10), p871-878, 2013 (査読無し)
 10. 志馬寛明、松本美佐子、押海裕之、田中伸哉、中根明夫、岩倉洋一郎、田原秀晃、井上徳光、瀬谷 司. TLR3 シグナル経路の活性化は腫瘍内ミエロイド系細胞を癌攻撃型エフェクターに転換する、北海道医学雑誌 88(2-3), p81, 2013 (査読無し)
 11. 瀬谷 司、志馬寛明、松本美佐子 ネクローシス細胞による炎症惹起の機序、臨床免疫・アレルギー科, vol. 57(6), p674-680, 2012 (査読無し)
 12. Seya T, Shime H, Matsumoto M. TAMable tumor-associated macrophages in response to innate RNA sensing. *Oncoimmunol*, 1(6): 1000-1001, 2012. doi: 10.4161/onci.19894 (査読有り)
 13. Seya T, Shime H, Takaki H, Azuma M, Oshiumi H, Matsumoto M. TLR3/TICAM-1 signaling in RIP3 tumor necroptosis. *Oncoimmunol*. 1(6): 917-923, 2012. doi: 10.4161/onci.21244 (査読有り)
- 〔学会発表〕(計 14 件)
1. Shime H, Matsumoto M, Seya T. TICAM-1 signaling is essential for Ly6G+ cell-mediated inhibition of tumor growth induced by dsRNA adjuvant. 日本免疫学会 2014.12.10-12. 京都国際会館 (京都府・京都市)
 2. Maruyama A, Shime H, Matsumoto M, Seya T. TLR2 signal enhances survival and immune-suppressive activity of MDSCs. 日本癌学会 2014.9.25-27 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
 3. Shime H, Matsumoto M, Seya T. Ly6G+ cell-mediated retardation of tumor growth in RNA adjuvant therapy 日本癌学会 2014. 9.25-27 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
 4. 志馬寛明、松本美佐子、瀬谷 司 RNA アジュバントによる Ly6G 陽性細胞を介した抗がん作用 日本がん免疫学会 2014.7.30-8.1 ひめぎんホール (愛媛県・松山市)
 5. Shime H, Matsumoto M, Seya T. dsRNA adjuvant induces the antitumor function of tumor-associated myeloid cells. 4th

international symposium on carcinogenic spiral, Infection, Immunity and cancer. 2014.2.10-11
京王プラザホテル札幌 (北海道・札幌市)

6. 志馬寛明、松本美佐子、瀬谷 司 RNA アジュバントによる腫瘍随伴ミエロイド系細胞を介した抗癌作用 「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」 公開シンポジウム 2014.1.30-31. 一橋講堂 学術総合センター (東京都・千代田区)

7. 竹村龍、高木宏美、志馬寛明、松本美佐子、瀬谷 司 Toll-like receptor 3 を介したネクロプトーシス誘導機構の研究 日本生化学会 2013.9.11-13 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

8. Shime H, Matsumoto M, Seya T. Supportive involvement of tumor-associated myeloid cells in RNA adjuvant therapy for cancer. ICI2013 2013.8.22-28 Milan (Italy)

9. 志馬寛明、松本美佐子、瀬谷 司 RNA アジュバントによる腫瘍随伴ミエロイド系細胞を介した抗癌作用 「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」 公開シンポジウム 2013.1.29-30. 一橋講堂 学術総合センター (東京都・千代田区)

10. Shime H, Matsumoto M, Seya T. Splenic CD11b+Gr1+ cells turn NK activators by dsRNA in tumor-implant mice. 日本免疫学会 2012.12.5-7 神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)

11. Shime H, Matsumoto M, Seya T. NK cell activation by tumor-associated myeloid cells during RNA adjuvant therapy for cancer. IEHS2012 2012.10.23-26. 学術総合センター (東京都・千代田区)

12. Seya T, Matsumoto M, Shime H, Azuma M. A crucial RNA adjuvant for immunotherapy for cancer. 日本癌学会 2012.9.19-21 ロイトン札幌 (北海道・札幌市)

13. Shime H, Matsumoto M, Seya T. The role of tumor-associated myeloid cells in RNA adjuvant therapy. 日本癌学会 2012.9.19-21 ロイトン札幌 (北海道・札幌市)

14. 志馬寛明、児島絢子、松本美佐子、瀬谷 司
担癌宿主で増加する CD11b+Gr1+細胞は 2 本鎖 RNA の投与により NK 細胞活性化能を獲得する 日本がん免疫学会
2012.7.26-28 北海道大学学術交流会館(北海道・札幌市)

〔図書〕(計 1 件)

Shime H, Matsumoto M, Seya T. Chapter 3: The role of innate immune signaling in regulation of tumor-associated myeloid cells "*Inflammation and immunity in cancer*" Springer Book 25-47, 2015. doi: 10.1007/978-4-431-55327-4_3

〔その他〕

ホームページ等

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

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