

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430158

研究課題名(和文) がん微小環境における芳香族炭化水素受容体AhRの意義解明と治療標的としての評価

研究課題名(英文) Study on roles of aryl hydrocarbon receptor (AhR) in tumor microenvironment and estimation of AhR as a therapeutic target for cancer patients

研究代表者

塚本 信夫 (Tsukamoto, Nobuo)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20407117

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)：芳香族炭化水素受容体(Aryl hydrocarbon receptor; AhR)はがん微小環境の中でがん細胞や様々な免疫細胞で活性化が認められる。IDOやTDOにより産生されるKynurenine (Kyn)ががん細胞でのAhR活性化に働く。我々はがん細胞内で活性化されたAhRによる免疫抑制分子の産生誘導という新たな免疫抑制機構を明らかにし、その免疫抑制に関わる分子を幾つか同定した。また、IDOはヒトがん細胞でリン酸化されることを示し、そのシグナルの一部を明らかにすることができた。我々の結果から、AhRを標的にした治療が、免疫抑制を解除する有効な治療法となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Aryl hydrocarbon receptor (AhR) was found to be activated in cancer cells and various immune cells in tumor microenvironments. Kynurenine, a tryptophan metabolite by indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO) and tryptophan 2, 3-dioxygenase (TDO), is involved in activation of AhR in cancer cells. We identified a novel mechanism of immunosuppression through downstream molecules of AhR in cancer cells in tumor microenvironments. Through a comprehensive gene expression analysis and mouse in vivo experiments, we identified several molecules responsible for this immunosuppression observed in tumor with activated IDO-kynurenine-AhR pathway. We also showed that IDO is phosphorylated in human cancer cells and clarified a part of this signal in tumor microenvironment. From our results, targeting AhR in tumor may be a useful strategy for cancer treatment by reversal of immunosuppression in tumor microenvironments.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍免疫 免疫抑制 AhR IDO Kynurenine

1. 研究開始当初の背景

最近、免疫抑制の解除を目的とした抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-1 抗体投与、さらに免疫抑制性細胞を含むリンパ球の減少処置後にがん抗原特異的 T 細胞を投与する免疫療法の臨床試験においてがん患者の長期生存につながる明確な治療効果が認められている。また化学療法や放射線治療などの反応性が、治療前のがん組織での T 細胞浸潤度に規定される可能性など、がん治療一般にも、免疫状態が重要である可能性も示唆されている。免疫療法が効かない症例では、がん微小環境の免疫抑制病態が大きな原因とされており、その分子細胞機構の解明と改善法の開発は、免疫療法、さらには化学療法などのがん治療の改善にもつながる可能性がある。

芳香族炭化水素受容体(Aryl hydrocarbon receptor; AhR)は、外来のダイオキシンやベンゾピレンなどの結合によって活性化される核内受容体かつ転写因子であり、発がん促進や内分泌攪乱への関与が知られている。AhR は、多くのがん種において活性化が認められ、予後不良との相関やがん転移との関連などが報告されている。また、がん免疫抑制に関与する制御性 T 細胞(Treg)や Th17 など様々な免疫細胞に発現し、その分化や機能への関与が報告されている。我々の予備検討では、ヒト大腸がんや腎がんなどのがん組織では、がん細胞と浸潤免疫細胞の両方に AhR 活性化(核内移行)が認められ、AhR はがん微小環境の免疫抑制病態に関与する可能性がある。

AhR は通常細胞質に存在するが、リガンドの結合により核内移行し、AhR Nuclear Translocator (ARNT) とヘテロ二量体を形成し、Xenobiotic Responsive element (XRE) と呼ばれる DNA 配列への結合により、Cytochrome P4501A1 (CYP1A1) などの下流遺伝子の発現調節を行う。CYP1A1 発現は AhR 活性の指標として使われている。AhR の外来性リガンドは知られているが、がん細胞の AhR を活性化させる内在性リガンドは十分に分かっていない。最近、がん細胞で高発現する Tryptophan(Trp) 代謝酵素 indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) による代謝産物 Kynurenine(Kyn)が AhR 活性化能をもつ可能性が示唆されている。

我々の予備実験では、がん細胞株への IDO の過剰発現は CYP1A1 の発現を著しく増加し、また恒常的に AhR 核移行が見られるがん細胞株に Kyn を代謝する酵素を過剰発現すると CYP1A1 の発現が部分的に減少したことから、Kyn ががん細胞の AhR リガンドの一つであるとともに、他の AhR リガンドの存在も推定された。また、Kyn が Treg 誘導や樹状細胞(DC)の機能障害を起こすことに加えて、恒常的活

性化型 AhR を過剰発現させたがん細胞からは何らかの免疫抑制因子が放出されることを見いだした。これらの結果は、がん細胞で産生される Kyn(および未知の AhR リガンド)が免疫抑制細胞を誘導するとともに、これら AhR リガンドにより活性化された AhR ががん細胞からの免疫抑制分子の産生を誘導する、という大きく 2 つの免疫抑制経路の存在を示唆している。この経路の分子細胞機構の解明により、がん微小環境の免疫抑制病態の解明につながるだけでなく、AhR を治療標的として免疫抑制を改善する可能性を示すことができる。

がん細胞における AhR の活性化は、がん細胞の浸潤転移などの悪性形質に関与することが報告されている。最近、がん細胞における AhR の機能に関しては、乳がんでは、核内受容体であるエストロゲン受容体(ER)とも結合し、その下流遺伝子の発現調節に関与すること、NF- κ B ファミリーの RelB とも結合し炎症誘導などに働くこと、腎がんでは、HIF-1 -ARNT 複合体により AhR の転写活性が調節されることなど、がん種によって AhR 複合体が異なり、そのがん細胞悪性形質(増殖生存、浸潤転移、免疫抑制など)への影響も異なる可能性が指摘されている。さらに IDO-Kyn 経路に加えて、最近、IDO 分子内に Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs)が存在し、そのリン酸化を介したシグナルがプラズマ細胞様樹状細胞による免疫寛容に重要であることが報告されている。したがって、がん細胞悪性形質に関する IDO-AhR 経路の解析においては、これらの点を考慮した研究が必要である。

2. 研究の目的

核内受容体である芳香族炭化水素受容体(Aryl hydrocarbon receptor; AhR)は、がん細胞とがん浸潤免疫細胞で核内移行が認められ、活性化している。我々は、がん細胞が発現する indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)の代謝産物 Kynurenine(Kyn)が内在性 AhR リガンドとして働き、がん細胞の悪性化だけでなく免疫抑制分子を産生させ、がん細胞が産生する Kyn と合わせて、がん微小環境の免疫抑制的環境に重要な役割を果たす可能性を見いだしている。そこで本研究では、AhR のがん細胞の悪性化と、免疫系を中心としたがん微小環境への作用の分子細胞機構を解明し、AhR ががん治療の標的となるかどうかを検討する。本研究成果は AhR を標的とした新しいがん治療につながる可能性がある。

3. 研究の方法

(1)がん細胞 AhR 活性化のがん悪性形質(免疫抑制・増殖・浸潤)への関与と分子細胞機

構の解析

AhR や IDO 発現操作によるがん細胞の免疫調節因子産生や増殖浸潤変化の検討
各種ヒトとマウスがん細胞に、恒常的活性化型 AhR 遺伝子導入、IDO 遺伝子導入、および Kyn 代謝酵素 KMO の shRNA 導入し、AhR 活性化、IDO 高発現、Kyn 高産生する、それぞれのがん細胞を作成し、その免疫調節性分子の産生 (ELISA や DNA マイクロアレイなど)、増殖生存 (WST1 アッセイなど)、および浸潤能 (Matrigel アッセイなど) について、*in vitro* で検討する。恒常的活性化型 AhR 遺伝子導入がん細胞の DNA マイクロアレイで、AhR 下流でがん細胞の免疫抑制・増殖・浸潤に関与する分子が推定された場合、その分子が AhR で直接に転写制御されているかどうかを検討する。さらに、その分子を siRNA や shRNA でノックダウンして、AhR の生物作用の機序を明らかにする。また各種 AhR/IDO 遺伝子導入マウスがん細胞を移植したマウスでの病態解析を進める。具体的には、AhR 活性化がみられるがん組織あるいは所属リンパ節に浸潤する各種免疫細胞 (T 細胞、樹状細胞、マクロファージなど) の同定と機能変化の解析を行う。

がん種による AhR 複合体や IDO-ITIM のがん悪性形質への影響の検討
AhR の形成する複合体が異なるがん細胞に、活性化 AhR や IDO 遺伝子を導入、あるいは Kyn 添加などにより、がん種による AhR や IDO の作用の違いを検討する。がん種による AhR や IDO の作用差が認められた場合、DNA マイクロアレイ解析でその作用に関与する下流分子の同定を試み、候補分子の siRNA などを用いた遺伝子発現操作によりがん悪性形質へ意義を検討する。また、ヒト野生型 IDO、Kyn 産生喪失 HA 変異型、ITIM 変異型遺伝子、それぞれをがん細胞に導入して、がん細胞の悪性形質 (免疫抑制・増殖・浸潤など) の変化を検討し、各種がん種での IDO と AhR の分子機構の詳細を検討する。

(2)がん細胞由来 AhR 活性化分子 (Kyn や未知分子) による、免疫抑制的・がん促進的がん微小環境の構築の検討と分子細胞機構の解明

Kyn やがん細胞培養上清による各種免疫細胞への影響の *in vitro* 検討
Ahr 野生型およびノックアウトマウスから得た各種免疫細胞に、Kyn やがん細胞培養上清を加えて培養することにより、各種免疫細胞での AhR 活性化による分化・機能変化を検討する。

(3)AhR ががん治療の標的となる可能性の検討

がん患者の病理組織切片を用いた AhR や IDO 発現、IDO ITIM リン酸化の解析
がん患者の病理組織切片を用いて、AhR と IDO の免疫染色を行い、がん細胞での IDO 発現と AhR 核移行の頻度を解析するとともに、がん浸潤する免疫細胞で AhR 核移行がみられるかを明らかにする。また、IDO ITIM のリン酸化を検出する抗体を作成し、がん患者の病理組織切片の免疫染色を行うことにより、がん患者での臨床的意義を明らかにする。

AhR や IDO 発現操作したがん細胞の移植、AhR 阻害剤の投与による、AhR と IDO のがん細胞や免疫細胞への *in vivo* での意義の検討

各種 AhR/IDO 遺伝子導入マウスがん細胞をマウスに移植して、*in vivo* でのがん細胞の増殖浸潤や免疫抑制性を検討する。また、AhR 阻害剤 (CH-223191) の投与による、がん細胞やがん微小環境における浸潤免疫細胞の変化などを検討し、宿主免疫細胞 AhR の *in vivo* での意義を明らかにする。

4. 研究成果

がん細胞で高発現する IDO による代謝産物 Kynurenine (Kyn) が、がん細胞の AhR 内在性リガンドの一つであることが明らかになってきた。AhR のがん微小環境での役割を解明するため、マウスの様々ながん細胞株に IDO あるいは恒常的活性化型 AhR (actAhR) を過剰発現させ、同系マウスに移植したところ、がん組織での制御性 T 細胞 (Treg) の増加、骨髄由来抑制細胞 (MDSC) の増加、免疫抑制型マクロファージの増加が見られた。この結果から、IDO による免疫抑制には、(1) IDO による Trp 枯渇、(2) がん細胞で産生される Kyn による免疫抑制細胞の誘導、(3) がん細胞内で活性化された AhR による免疫抑制分子の産生誘導、という 3 つの免疫抑制経路が存在することが示唆された。Treg と MDSC の *in vitro* 誘導において Kyn 添加はほとんど誘導を増強しなかったことから、がん細胞内の AhR 活性化で誘導される遺伝子産物が抑制性免疫細胞の誘導に重要であることが示唆された。異なるがん種のマウスがん細胞の IDO/actAhR 過剰発現株について DNA チップ解析を行ったところ、AhR 依存的に誘導される遺伝子群ががん種によって大きく異なることが明らかになった。マウス大腸がん細胞を中心に、がん細胞内での AhR 活性化により誘導される遺伝子群の中から、免疫抑制に関わる可能性のある遺伝子を過剰発現させたがん細胞、actAhR 発現がん細胞でその遺伝子をノックダウンしたがん細胞を作成し、同系マウスに移植し、腫瘍の増殖や免疫系への影響をした結果、AhR の下流で免疫抑制に関わる複数の遺伝子を同定することができた。その一つとして、腫瘍内の MDSC や免疫抑制型マクロフ

アージの増加を担う分子を同定した。ヒトで同じ現象が見られるか検証するため、ヒトがん細胞株に恒常的活性化型 AhR を過剰発現したところ、この遺伝子が誘導される株とされない株が存在した。これは、がん微小環境での AhR を介した免疫抑制に不均一性を与える可能性を示唆した。最近、IDO が Trp 代謝酵素としての機能の他に、ITIM を介したシグナル伝達を担うことが報告された。そこで、Trp 代謝と ITIM 機能のそれぞれを喪失させた IDO 変異体をヒトがん細胞株に導入し、がん細胞における IDO 機能においてそれぞれが担う機能について解析した。ヒトがん組織で IDO が ITIM リン酸化されているか調べるため、IDO のリン酸化 ITIM に対する抗体を作成し、ヒト大腸がん組織を染色したところ、一部のがん細胞で ITIM リン酸化が観察された。さらにリン酸化陽性がん細胞の分布はがん悪性因子の一つの発現分布と良い一致を示した。この分子はがん細胞への actAhR 過剰発現で発現が誘導され、actAhR 過剰発現マウスがん細胞でこの遺伝子をノックダウンしたがん細胞を移植したマウスは、actAhR 過剰発現マウスがん細胞を移植したマウスに比べて顕著に高い抗腫瘍免疫応答を示したことから、この分子が actAhR の下流で免疫抑制を担う分子の一つであることが示された。がん細胞株に Trp 代謝と ITIM 機能のそれぞれを喪失させた IDO 変異体を導入したところ、IDO によるこの遺伝子の誘導において Kyn-AhR 経路と ITIM リン酸化経路のクロストークが存在することが明らかとなった。ITIM リン酸化を担うキナーゼを同定するため、*in silico* で候補キナーゼを予測し、ヒト大腸がん組織の免疫染色で ITIM リン酸化部位に発現するキナーゼを絞り込み、*in vitro* で IDO ITIM リン酸化を亢進するキナーゼを同定した。がん組織の免疫染色と *in vitro* の解析から、IDO ITIM リン酸化のシグナルの一部を示すことができた。今後、がん組織の免疫抑制環境の不均一性を生む原因の一つとして IDO-AhR の果たす役割について明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Kudo-Saito C, Shirako H, Ohike M, Tsukamoto N, Kawakami Y. CCL2 is critical for immunosuppression to promote cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 30:393-405, 2013. (査読有) DOI: 10.1007/s10585-012-9545-6.
2. Kawakami Y, Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Iwata-Kajihara T, Nakamura S, Nishio H, Satomi R, Kobayashi A, Tanaka M, Kamijuku H, Tsujikawa T, Kawamura N. Roles of signaling pathways in cancer cells and immune cells in generation of

immunosuppressive tumor associated microenvironments. in "The Tumor Immunoenvironment" Eds, Michael Shurin, Anatoli Malyguine, Viktor Umansky, Springer Science. :307-323,2013. (査読無)

3. Kawakami Y, Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Iwata-Kajihara T, Nakamura S, Nishio H, Satomi R, Kobayashi A, Tanaka M, Hoon Park J, Kamijuku H, Tsujikawa T, and Kawamura N. Cancer-induced immunosuppressive cascades and their reversal by molecular-targeted therapy. "Renaissance of Cancer Immunotherapy" *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1284(1):80-86,2013. (査読無) DOI: 10.1111/nyas.12094.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Nobuo Tsukamoto, Hajime Kamijuku, Yutaka Kawakami, Molecular mechanisms of immunosuppression by aryl hydrocarbon receptor (AhR) in tumor microenvironment. 2015 日本免疫学会総会・学術集会、2015 年 11 月 18~2015 年 11 月 20 日、Sapporo Convention Center (北海道・札幌市)
2. Hajime Kamijuku, Nobuo Tsukamoto, Yutaka Kawakami, Berberine has direct enhancing activities on anti-tumor memory and effector T cells. 第 74 回日本癌学会学術集会、2015 年 10 月 8 日~2015 年 10 月 10 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)
3. Hajime Kamijuku, Nobuo Tsukamoto, Jeong Hoon Park, Hjin-ju Liu, Yutaka Kawakami, Berberine has direct enhancing activities on anti-tumor memory and effector T cells. International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages 2015, 2015 年 7 月 9 日~2015 年 7 月 11 日、東京大学伊藤国際学術センター伊藤謝恩ホール (東京都・文京区)
4. 松下麻衣子、小沢光司、中村美紀、鈴木拓真、市川大樹、塚本信夫、河上裕、服部豊、白血病幹細胞に発現する新規がん精巢抗原の同定、第 12 回日本免疫治療学会研究会学術集会、2015 年 2 月 28 日~2015 年 2 月 28 日、東京ガーデンパレス (東京都・文京区)
5. Nobuo Tsukamoto, Jeong Hoon Park, Hajime Kamijuku, Yutaka Kawakami, Immunosuppression by downstream molecules regulated by aryl hydrocarbon receptor (AhR) in tumor microenvironment. 第 43 回日本免疫学会総会・学術集会、2014 年 12 月 10 日~2014 年 12 月 12 日、京都国際会議場 (京都府・京都市)

6. Hajime Kamijuku, Nobuo Tsukamoto, Jeong Hoon Park, Hsin-ju Liu, Yutaka Kawakami, In vivo anti-tumor effects of berberine through augmentation of anti-tumor T-cell responses. 第43回日本免疫学会総会・学術集会、2014年12月10日～2014年12月12日、京都国際会議場（京都府・京都市）

7. Maiko Mtsushita, Miki Nakamura, Daiju Ichikawa, Nobuo Tsukamoto, Yutaka Kawakami, Yutaka Hattori. Identification of novel cancer-testis antigen expressed in leukemic stem cells of chronic myelogenous leukemia. ISEH 43rd Annual Scientific Meeting、2014年8月21日～2014年8月24日、モントリオール（カナダ）

8. Nobuo Tsukamoto, Jeong Hoon Park, Hajime Kamijuku, Boryana Popivanova, Yutaka Kawakami, Augmentation of anti-tumor immune responses by Kampo medicine compounds with aryl hydrocarbon receptor (AhR) antagonistic activity. 2013日本免疫学会総会・学術集会、2013年12月11日～2013年12月13日、幕張メッセ（千葉県・千葉市）

9. Jeong Hoon Park, Nobuo Tsukamoto, Hajime Kamijuku, Yutaka Kawakami, Role of aryl hydrocarbon receptor in immunosuppression of tumor microenvironments. 2013日本免疫学会総会・学術集会、2013年12月11日～2013年12月13日、幕張メッセ（千葉県・千葉市）

10. Hajime Kamijuku, Nobuo Tsukamoto, Jeong Hoon Park, Yutaka Kawakami, Augmentation of anti-tumor immune responses by a Kampo medicine compound which inhibits signaling associated with cancer induced immunosuppression. 2013日本免疫学会総会・学術集会、2013年12月11日～2013年12月13日、幕張メッセ（千葉県・千葉市）

11. Miki Nakamura, Maiko Matsushita, Daiju Ichikawa, Nobuo Tsukamoto, Yutaka Kawakami, Yutaka Hattori, Identification of novel cancer-testis antigen expressed in Leukemic Stem Cells of Chronic Myelogenous Leukemia. 2013日本免疫学会総会・学術集会、2013年12月11日～2013年12月13日、幕張メッセ（千葉県・千葉市）

〔図書〕（計 1 件）

1. Kawakami Y, Qian L, Kawamura N, Miyazaki J, Nagumo H, Tsubota K, Kinoshita, Nakamura K, Ohmura G, Satomi R, Sugiyama J,

Nishio H, Hayakawa T, Popivanova B, Nuchsupha S, Liu TH, Kamijuku H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Sakurai T, Fujita T, Yaguchi T. Development of personalized combination cancer immunotherapy based on the patients' immune status in "Inflammation and immunity in cancer" Eds:Tsukasa Seya, Keiko Udaka, Misako Matsumoto, Noriyuki Sato, Springer. Chapter 20:255-266,2015.

〔産業財産権〕
出願状況（計 1 件）

名称：抗腫瘍免疫療法増強剤
発明者：塚本信夫、河上裕
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2017-127973 号
出願年月日：平成 29 年 6 月 29 日
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：

〔その他〕
なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者
塚本 信夫 (NOBUO TSUKAMOTO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20407117

(2)研究分担者
河上 裕 (YUTAKA KAWAKAMI)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号：50161287

(3)連携研究者
なし