

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 10 日現在

機関番号：13701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893085

研究課題名(和文) 頭頸部癌における乳酸代謝機構が免疫変調状態に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Understanding the effect of lactate metabolism on cancer-mediated immunoregulation in head and neck cancer

研究代表者

大橋 敏充 (Ohashi, Toshimitsu)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80707860

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：がん微小環境における乳酸と免疫抑制と関連を明らかにするために、頭頸部癌組織を用いて検討を行った。がん特有の解糖系亢進に関わる因子、グルコース輸送体(GLUT1)、乳酸脱水素酵素A(LDH-A)の発現と組織乳酸濃度との間に関連性を認めた。免疫抑制の評価としてM2マーカー(CD68、CD163、CSF-1R等)の発現を測定した。CD68、CSF-1と乳酸濃度の間で関連性を認めた。また、解糖系因子とM2マーカーの発現を比較すると、GLUT1・LDH-AとCD163に関連性を認めた。がん患者において、解糖系因子を治療ターゲットとすることで、変調した免疫状態を改善する可能性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Understanding the effect of lactate metabolism on cancer-mediated immunoregulation in head and neck cancer, I analyzed gene expression in cancer by quantitative RT-PCR. Glucose transporters-1 (GLUT-1) and Lactate dehydrogenase-A (LDH-A), which are linked with enhanced glycolysis, have relevance for intratumor lactate concentration. Meanwhile, CD68 and CSF-1, which are known as M2 macrophage marker, have also relevance for intratumor lactate concentration. Furthermore, GLUT-1 and LDH-A have relevance for CD163 which is also known as M2 marker. These results suggest that the factors associated with enhanced glycolysis have something to do with M2 macrophage polarization. For cancer patients, the therapy targeting enhanced glycolysis is one potential strategy that improves the immunosuppressive status.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：腫瘍免疫 がん代謝 頭頸部癌 乳酸

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は、通常酸素状態においても解糖系が亢進しており、大量の乳酸を産生する (Warburg 効果)。がん微小環境において、乳酸は炎症誘導に必須な IL-23/IL-17 経路を亢進する因子として作用しており (Shime H et al. J Immunol 2008)、さらに申請者は、乳酸が免疫細胞のアルギナーゼ 1 (Arg1) の発現を亢進する因子であることを同定した (Ohashi T et al. Int J Cancer 2013)。Arg1 は、TAM や MDSC に高発現することで、T 細胞の活性・増殖を抑制し、抗がん免疫反応を抑制する。つまり、乳酸は、炎症を誘導し、さらに抗がん免疫を抑制することで、がんの進展を促進していると考えられる。実際、頭頸部癌や子宮頸癌では、腫瘍内乳酸濃度が高いほど、転移しやすく予後も悪いことが報告されている (Walenta S et al. Semin Radiat Oncol 2004)。さらに、申請者は、担がんマウスに乳酸産生を抑制する薬剤を投与することで、免疫抑制性細胞の機能を抑え、抗がん免疫反応を増強させることを報告した (Ohashi T et al. Int J Cancer 2013)。

2. 研究の目的

がん細胞が産生した大量の乳酸は、炎症誘導・抗がん免疫抑制を引き起こし、がん特有の変調した免疫状態を形成する一因であることを明らかにしてきた。今回、頭頸部癌患者の検体を用いて、ヒトにおいても乳酸が炎症・免疫抑制に関わっていることを解明する。同時に解糖系亢進に関わる酵素や輸送体の発現を評価することにより、頭頸部癌において高乳酸と最も関連のある因子を検索し、効果的に乳酸産生を抑制・免疫状態を改変する分子標的治療のターゲットの解明につなげる。

3. 研究の方法

まず予備研究として、頭頸部癌における乳酸と炎症の関係を探るために、PDG-PET の SUV_{max} と血液中の炎症マーカーの比較検討を行った。当院で治療を行った頭頸部癌患者 69 例を対象とした (除外項目: $SUV_{max} < 5$ 、重複検・急性炎症の合併)。

がん微小環境における乳酸と炎症・免疫抑制の関係を探るために、当院で頭頸部癌手術を行った患者 20 例の原発巣より採取した組織を用いた。また、良性疾患により両口蓋扁桃摘出術を行った 5 例の咽頭組織を対照として用いた。組織内乳酸濃度を測定するために、D-PBS(-)の中で組織を破碎し、上清中の乳酸濃度を測定した。摘出組織から RNeasy Mini kit を用いて mRNA を抽出し、定量的リアルタイム PCR で遺伝子発現を評価した。18srRNA もしくは CD68 で normalization (CD68; CD163, CD200R, CSF-R, ARG1, 18srRNA; その他) し、CT 法を用いて解析した。解糖系亢進に関わる因子としてグルコース輸送体 (GLUT-1)、ピルビン酸キナーゼ M2 (PKM2)、乳酸脱水素酵

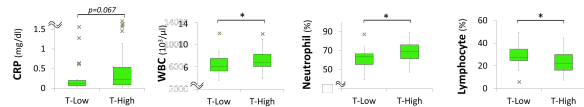
素 A (LDH-A)、炎症の因子として IL-17、免疫抑制の因子としてマクロファージマーカー (CD68, CD163, CD200R, CSF-R, ARG1) の遺伝子発現を評価した。

2 群間の差の検定には、t 検定もしくは Mann-Whitney 検定を用いた。2 群間の相関分析には、Spearman の順位相関係数を用いた。P<0.05 を有意とした (*p<0.05, **p<0.01)。

4. 研究成果

(1) 予備研究

解糖系が亢進しているがんでは、PDG-PET の SUV_{max} が高値になり、また乳酸産生も亢進すると考えられる。乳酸値を反映するものとして原発巣の SUV_{max} を用い、 SUV_{max} 低値群 ($SUV_{max} < 14$, n=35)、 SUV_{max} 高値群 ($SUV_{max} \geq 14$, n=34) の 2 群にわけて、各種炎症マーカーとの関係を検討した。高値群において、白血球 (WBC) が有意に高値、好中球%が有意に高値、リンパ球%が有意に低値という結果が得られた。転移リンパ節の SUV_{max} においても同様の検討を行ったが、2 群間に有意差は認めなかった。



予備研究の結果から、原発巣での解糖系亢進の状態と全身炎症とに何らかの関わりがあることが示唆された。

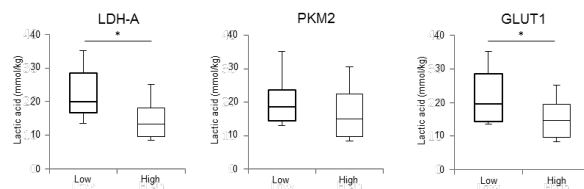
(2) 正常組織より腫瘍組織の乳酸濃度は高い

まず Warburg 効果により腫瘍組織で乳酸が多く産生していることを確かめるため、正常組織と腫瘍組織で乳酸濃度を比較した。正常組織 ($10.28 \pm 3.5 \text{ mmol/kg}$) と比較し、腫瘍組織 ($18.42 \pm 7.7 \text{ mmol/kg}$) で有意に高値であった (p=0.018)。

(3) LDH-A と GLUT1 の高発現群では乳酸濃度が低い

腫瘍組織由来の mRNA を用いて、LDH-A、PKM2、GLUT-1 の発現を評価した。LDH-A と GLUT-1 を比較すると、強い相関関係を認めた (rs=0.815, r<0.001)。

それぞれにおいて、低発現群・高発現群にわけ、2 群間における乳酸濃度を比較した。LDH-A (p=0.017)、GLUT-1 (p=0.045) において有意に高発現群で乳酸濃度が低かった。

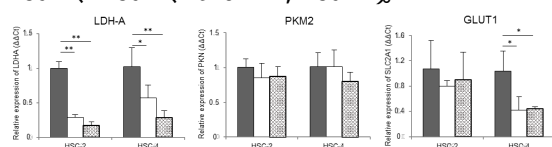


(4) 頭頸部癌細胞株において、乳酸は LDH-A、GLUT-1 の発現を抑制する

頭頸部癌細胞株 (HSC-2、HSC-4) を、乳酸も

しくは塩酸存在下で 12 時間培養したのち、細胞を回収し LDH-A、PKM2、GLUT-1 の発現を評価した。

PKM2 は乳酸および塩酸による影響を認めなかった。LDH-A、GLUT-1 は乳酸および塩酸により発現が有意に抑制された (LDH-A ; HSC-2、HSC-4、GLUT-1 ; HSC-4)。

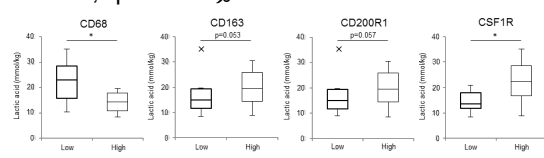


グレー：対照、白：乳酸 (20mM)、網目：塩酸 (15mM)

乳酸および塩酸で抑制されたことより、LDH-A および GLUT-1 は周囲の酸により発現が抑制されると考えられた。

(5) M2 マクロファージマーカーが高発現する腫瘍では乳酸濃度が高い

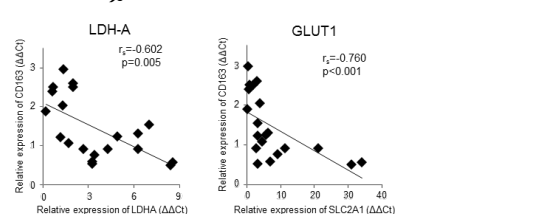
マクロファージマーカーである CD68 の高発現群では、有意に乳酸濃度が低かった。免疫抑制性マクロファージ (M2) のマーカーとして CD163、CD200R、CSF-1R、ARG1 の発現を評価した。CSF-1R では高発現群で有意に乳酸濃度が高かった ($p=0.016$)、CD163、CD200R1 でも同様の傾向を認めた (CD163 ; $p=0.053$, CD200R ; $p=0.057$)。



また CD68 は乳酸濃度と負の相関を認め ($r_s=-0.500$, $r=0.048$)、CSF-1R は乳酸濃度と正の相関を認めた ($r_s=0.534$, $r=0.037$)。ARG1 ではこれらのような傾向は認めなかった。

(6) LDH-A と GLUT-1 は M2 マクロファージマーカーと関連がある

腫瘍における解糖系因子とマクロファージマーカーの発現を評価した。LDH-A と GLUT-1 が CD163 と負の相関を認めた (LDH-A ; $r_s=-0.602$, $r=0.005$, GLUT-1 ; $r_s=-0.760$, $r<0.001$)。



PKM2 は M2 マクロファージマーカーと相関を認めなかった。

(7) 考察

頭頸部癌では正常咽頭組織より乳酸濃度が高く、Warburg 効果により解糖系亢進していることが示唆された。解糖系が亢進した結

果、乳酸濃度が高くなると考えられるので、解糖系に関わる因子も高発現していると想定していた。しかし、実際に腫瘍由来の mRNA を測定してみると、LDH-A、GLUT-1 が高発現する腫瘍では、有意に乳酸濃度が低い結果が得られた。

乳酸と解糖系因子との関係を明らかにするために頭頸部癌細胞株を用いて検討を行った。その結果、酸 (乳酸) により LDH-A、GLUT-1 の発現が抑制されることが明らかになった。つまり、腫瘍自体が産生する乳酸などの酸が増えてくると negative feedback により LDH-A、GLUT-1 が抑制されると考えられた。酸の negative feedback 他にも、HIF-1 などそれら因子に影響を与えると報告されており、実際の腫瘍では様々な要因が作用し、我々の想定とは全く逆の結果が得られたと考えられた。

マクロファージマーカーである CD68 は乳酸濃度と逆相関を認めた。CD68 で normalization することにより M2 マクロファージマーカーの高発現が、乳酸濃度が高値との関連性が示唆された。言い換えれば、乳酸濃度が高いほど、M2 への polarization が亢進していると考えられる。つまり、乳酸が高いほど免疫抑制性が亢進していることが示唆された。

解糖系因子と M2 マクロファージマーカーの発現を評価すると、LDH-A と GLUT-1 が、M2 マーカーとの逆相関関係が示唆された。これは、乳酸と LDH-A、GLUT-1 が負の相関、乳酸と M2 マーカーが正の相関を認めたことに起因していると考えられた。

今回の結果からは、LDH-A や GLUT-1 の発現を高めることにより M2 polarization が改善するように考えられるかもしれない。しかし、LDH-A や GLUT-1 の発現が高まると、さらに解糖系が亢進し乳酸産生が亢進することも十分考えられる。今回は Warburg 効果の主要な因子と言われている PKM2 の発現と、乳酸、M2 マーカーの関係性を示唆する結果が得られなかった。乳酸産生、M2 polarization を効果的に抑制する因子の特定はできなかったが、解糖系因子と M2 polarization に何らかの関わりがあることは明らかになった。腫瘍の解糖系因子を制御することが、M2 polarization を抑制し、腫瘍特有の免疫抑制状態を改善させる可能性があることが示唆された。

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1件)

Akazawa T, Ohashi T, Nakajima H, Nishizawa K, Kodama K, Sugiura K, Inaba T, Inoue N. Development of a dendritic cell-targeting lipopeptide as an immunoadjuvant that inhibits tumor growth without inducing

local inflammation. International Journal of Cancer、査読あり、135(12)、2014、2847-2856

DOI: 10.100/ijc.28939

〔学会発表〕(計1件)

大橋敏充、久世文也、青木光広、水田啓介、伊藤八次、頭頸部癌における FDG-PET と炎症マーカーとの関連性の検討、2014 年 6 月 12 ~ 13 日、東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 敏充 (TOSHIMITSU OHASHI)

岐阜大学医学部附属病院 助教

研究者番号：80707860

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：