慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	がん微小環境における不均一な免疫抑制機構の解明と有効な抗腫瘍免疫誘導法の開発
Sub Title	Analysis of non-uniform immune-suppressive mechanisms in tumor microenvironment and development of effective anti-tumor immune therapies
Author	塚本, 信夫(Tsukamoto, Nobuo) 河上, 裕(Kawakami, Yutaka)
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	がん組織は不均一であり多様な免疫抑制機構が存在する。Trp代謝酵素IDOやTDOが産生するKynurenineによりがん細胞内で活性化された芳香族炭化水素受容体AhRが免疫抑制分子を産生誘導することによる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、ヒトがん細胞でIDOリン酸化部位の一つをリン酸化するキナーゼを同定し、このキナーゼに対する阻害剤による抗腫瘍効果の増強を示した。IDO1のタンパク質量が著しく減少する変異体を見出し、その分子機構を明らかにした。またIDO1の転写を低下させる薬剤を同定することができた。さらに低酸素環境でのがん微小環境の解析を試みた。 Tumor tissues are inhomogeneous and various immune-suppressive mechanisms suppress anti-tumor immunity. We identified a novel mechanism of immunosuppression through downstream molecules of Aryl hydrocarbon receptor (AhR) in cancer cells in tumor microenvironments and identified several molecules responsible for this immunosuppression observed in tumor with activated IDO-kynurenine-AhR pathway. We also found that IDO is phosphorylated in human cancer tissues, and we identified a kinase responsible for phosphorylation of one of the IDO phosphorylation sites. We also identified mutations which decreases protein expression of IDO in cancer cells and clarified part of mechanisms of the phenomena. Furthermore, we identified drugs which can suppress transcription of IDO1 in cancer cells. We further tried analysis of tumor microenvironment under the hypoxia condition.
Notes	研究種目：基盤研究 (C) (一般) 研究期間：2016～2018 課題番号：16K07181 研究分野：腫瘍免疫学 PDFファイルは改訂版に差し替え (2020.12.17)
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16K07181seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年 １１ 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：2016～2018
課題番号：１６Ｋ０７１８１

研究課題名（和文）がん微小環境における不均一な免疫抑制機構の解明と有効な抗腫瘍免疫誘導法の開発

研究課題名（英文）Analysis of non-uniform immune-suppressive mechanisms in tumor microenvironment and development of effective anti-tumor immune therapies

研究代表者

塚本　信夫（Tsukamoto, Nobuo）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：２０４０７１１７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,800,000円

研究成果の概要（和文）：がん組織は不均一であり多様な免疫抑制機構が存在する。Trp代謝酵素IDOやTDOが産生するKynurenineによりがん細胞内で活性化された芳香族炭化水素受容体AhRが免疫抑制分子を産生誘導することによる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、ヒトがん細胞でIDOリン酸化部位の一つをリン酸化するキナーゼを同定し、このキナーゼに対する阻害剤による抗腫瘍効果の増強を示した。IDO1のタンパク質量が著しく減少する変異体を見出し、その分子機構を明らかにした。またIDO1の転写を低下させる薬剤を同定することができた。さらに低酸素環境でのがん微小環境の解析を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
近年、抗CTLA-4抗体や抗PD-1抗体投与、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が、これら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いる。特にがん患者のがん組織は非常に不均一であり多様な免疫抑制機構が存在することが免疫抑制の解除を困難にしている。本研究の結果は、がん組織における不均一で多様な免疫抑制機構の分子細胞機構の解明と改善法の開発に重要な手がかりを与えるものであり、免疫療法、さらには標準治療の改善にもつながると期待される。

研究成果の概要（英文）：Tumor tissues are inhomogeneous and various immune-suppressive mechanisms suppress anti-tumor immunity. We identified a novel mechanism of immunosuppression through downstream molecules of Aryl hydrocarbon receptor (AhR) in cancer cells in tumor microenvironments and identified several molecules responsible for this immunosuppression observed in tumor with activated IDO-kynurenine-AhR pathway. We also found that IDO is phosphorylated in human cancer tissues, and we identified a kinase responsible for phosphorylation of one of the IDO phosphorylation sites. We also identified mutations which decreases protein expression of IDO in cancer cells and clarified part of mechanisms of the phenomena. Furthermore, we identified drugs which can suppress transcription of IDO1 in cancer cells. We further tried analysis of tumor microenvironment under the hypoxia condition.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍免疫　がん免疫治療　免疫抑制　IDO　TDO　AhR

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

１．研究開始当初の背景

近年、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。また化学療法などの標準治療を受けたがん患者においても、治療前のがん組織での T 細胞浸潤度が予後に影響するなど、免疫状態が重要である可能性が示唆されている。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、さらには標準治療の改善にもつながると期待される。しかし、がん患者のがん組織は非常に不均一であり多様な免疫抑制機構が存在することが免疫抑制の解除を困難にしている。

Trp 代謝酵素 indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)や tryptophan 2, 3-dioxygenase (TDO)は癌微小環境において抗腫瘍免疫を抑制する主要な因子である。IDO は腫瘍に浸潤した T 細胞が産生するサイトカインにより腫瘍内に誘導される。我々はこれまで、IDO や TDO の芳香族炭化水素受容体(Aryl hydrocarbon receptor; AhR)を介した免疫抑制を解析してきた。AhR は、通常は細胞質に局在するが、外来のダイオキシンなどのリガンド結合によって核移行して活性化される核内受容体かつ転写因子である。がん細胞での AhR 活性化は予後不良やがん転移との関連が報告され、また、制御性 T 細胞(Treg)など様々な免疫細胞で分化や機能への関与が報告されている。ヒトがん組織では、がん細胞と浸潤免疫細胞の両方に AhR 核移行が認められたことから、がん微小環境で免疫抑制に関わる可能性が考えられた。我々は、がん細胞で高発現する IDO や TDO 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り、IDO や TDO による免疫抑制には、(1) IDO,TDO 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を示してきた。担がんマウスでの解析から、活性化 AhR の下流で誘導される免疫抑制物質の一つを同定することができ、この分子が腫瘍内の骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)や免疫抑制型マクロファージの増加を担っていた。ヒトで同じ現象が見られるか検証するため、ヒト大腸がん細胞株に恒常的活性化型 AhR を過剰発現したところ、この遺伝子発現が誘導される株とされない株が存在した。この差が DNA メチル化による可能性が考えられ、がん組織でこの遺伝子が DNA メチル化された部位では AhR 阻害剤による免疫増強効果が低い可能性が示唆された。

IDO には Kyn を生成する酵素活性に加えて、IDO 分子内にリン酸化部位が複数存在することが報告された。そこで、ヒトがん組織で IDO がリン酸化されているか調べるため、IDO の一つのリン酸化部位のリン酸化を認識する抗体を作成し、ヒト大腸がん組織を染色したところ、一部のがん細胞でこの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の悪性形質に関わる転写因子の一つの発現分布と良い一致を示した。がん細胞株に Trp 代謝に必須のアミノ酸残基を変異させた IDO 変異体、あるいはリン酸化部位を変異させた IDO 変異体を導入したところ、IDO による上述の転写因子および免疫抑制分子の誘導は Kyn-AhR 経路あるいは IDO リン酸化経路のいずれかが失われると誘導されないことを示すことができた。このことは IDO による悪性形質の誘導をリン酸化キナーゼの阻害によって制御できる可能性を示唆する。一方で、TDO も類似したリン酸化コンセンサス配列を２箇所に持ち、進化的に保存されていることがわかったが、実際にリン酸化されるか、その機能は何かについては不明である。また、TDO 過剰発現したマウスがん細胞で、脂質二重層のリン脂質運搬に関わる遺伝子が高発現するという結果が得られ、この遺伝子を発現させたがん細胞をマウス皮下に移植すると対照群より顕著に大きな腫瘍を形成した。この遺伝子の発現が免疫細胞との相互作用に影響する可能性が考えられた。さらに、ヒト大腸がん組織において上記転写因子が発現したがん細胞ではある膜表面分子が発現していないことを明らかにし、上記転写因子による膜表面分子の発現抑制の機構を明らかにすることが腫瘍免疫応答の理解に重要であることが示唆された。
また、がん組織の不均一性の原因の一つとして低酸素環境の構築がある。低酸素環境で幾つかのエピジェネティックな修飾酵素の発現が誘導されることから、同一患者の組織内でも低酸素部位では腫瘍免疫環境が異なる可能性に注目した。

２．研究の目的

このような背景から、がんの不均一性の原因の内、Trp 代謝酵素とそのリン酸化、エピジェネティクス、低酸素領域の分布に注目し、それぞれに特徴的な免疫抑制機構とその解除法を明らかにするとともに、最適な治療標的を同定することを目的とする。具体的には、活性化 AhR の下流の免疫抑制分子の発現が DNA メチル化に依存するか？　IDO リン酸化陽性、上述の転写因子陽性がん細胞の膜表面分子減少の分子機構は何か？　TDO はリン酸化されるか？　されるならば機能は何か？　TDO 発現がん細胞は免疫細胞とどのような相互作用をするか？　また、低酸素環境で誘導されるエピジェネティックな修飾酵素はどのような腫瘍免疫環境を作

るのか？　どのような場合に Trp 代謝酵素阻害剤、AhR 阻害剤、リン酸化キナーゼ阻害剤、エピジェネティックな修飾酵素の阻害剤が免疫抑制解除に有効か？　最終的に抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-1 抗体とこれらの阻害剤の併用は担がんマウスの治療効果増強につながるか？　について検討する。

３．研究の方法

Tryptophan 代謝酵素の発現、リン酸化、活性化 AhR の下流での免疫抑制分子産生の不均一性、さらには低酸素環境による不均一性に焦点を絞り、微小環境での不均一な免疫抑制の誘導機構の解明と、それぞれに適した抑制回避法と治療標的について検討する。IDO の複数経路を介した免疫抑制のどの経路を阻害するのが有効なのかを明らかにするとともに、TDO に期待される免疫抑制について解析する。また低酸素環境に関連したエピジェネティック修飾酵素を標的にする免疫増強法についても可能性を検討する。

(1) Tryptophan 代謝酵素の発現抑制法の探索

ヒト IDO1 および TDO2 のプロモーター領域をクローニングし、その制御下に分泌型ルシフェラーゼを発現するレンチウイルスベクターを作成する。細胞数変化をモニターできるように同じベクター上に CMV プロモーター制御下に分泌型アルカリフォスファターゼを発現するユニットを持つものを用いる。これらのレポーターベクターを用いてレンチウイルスを作成し、大腸がん細胞株に感染させてレポーターベクターを定常的に導入したレポーター細胞を作成する。これらのレポーター細胞に化合物ライブラリーを添加し、培養上清中の分泌型ルシフェラーゼと分泌型アルカリフォスファターゼの活性を測定し、アルカリフォスファターゼで規格化したルシフェラーゼ活性を比較する。

(2) がん細胞 AhR 活性化の下流での免疫抑制誘導の制御機構解明

① 活性化 AhR による下流免疫抑制分子の誘導制御機構の解明

恒常的活性化型 AhR を発現させたヒトおよびマウスがん細胞株の網羅的遺伝子発現データおよび当研究室で解析された大腸がん患者の網羅的遺伝子遺伝子発現クラスター解析の結果をもとに AhR の下流で働く免疫抑制遺伝子の候補遺伝子を探索する。ヒトの各種がん細胞株に恒常的活性化型 AhR でのこれら候補遺伝子の発現を mock コントロールと比較して AhR の下流での発現誘導の一般性と不均一性を検討する。さらにこれらの遺伝子の DNA メチル化を解析する。

②活性化 AhR による下流転写因子誘導を介した免疫抑制・悪性形質とその解除法の解明

上記転写因子過剰発現株を用いた網羅的遺伝子発現解析からこの下流で起こる免疫抑制や悪性形質について明らかにする。またヒトでのこの転写因子のプロモーター領域をクローニングし、上と同様にこのプロモーター制御下に分泌型ルシフェラーゼを分泌するレポーターベクターを作成する。ヒト大腸がん細胞株に IDO1 およびこのレポーターベクターをレンチウイルスにより定常的に導入したレポーター細胞株を作成する。このレポーター細胞に化合物ライブラリーを添加し、培養上清中の分泌型ルシフェラーゼと分泌型アルカリフォスファターゼの活性を測定し、アルカリフォスファターゼで規格化したルシフェラーゼ活性を比較する。

(3) IDO1 リン酸化キナーゼの同定

リン酸化部位のうちの一つの配列から *in silico* で予測された複数のキナーゼ候補から、患者がん組織の免疫染色においてリン酸化部位の一方のリン酸化が陽性となるがん細胞と同じ細胞に発現していることと、活性化型発現ベクターの遺伝子導入によりがん細胞内で *in vitro* でリン酸化できることを指標に、がん細胞内での IDO1 リン酸化部位の一つのリン酸化を担う責任キナーゼを同定する。IDO1 を発現させた大腸がん細胞株にこのキナーゼに対する阻害剤を作用させ、AhR 下流で免疫抑制を担う分子の発現が低下するかどうかを定量 PCR により解析する。

(4) IDO1 のタンパク質量が減少する変異体の探索と分子機構の解析

IDO1 の様々な変異体に FLAG タグを付加してがん細胞内での発現量を抗 FLAG 抗体により比較し、IDO1 のタンパク質量が著しく減少する変異体を探索する。タンパク質量が著しく減少する変異体について、ユビキチン化の可能性を検討し、さらにそこに結合する可能性のある E3 リガーゼ複合体との結合を免疫沈降により検証する。

(5) TDO による新たな免疫抑制機構の解明

マウス及びヒト TDO2 において IDO1 のリン酸化部位に類似する配列を探し、リン酸化の可能性のあるアミノ酸残基を変異させた変異体と Trp 代謝できない変異体を作成する。野生型、

変異型 TDO2 発現細胞において PhosTag を用いてリン酸化が起きているか検証する。またマウス TDO 変異体をマウスがん細胞に発現させ、*in vitro* での増殖・浸潤能、担がんマウスにおいて野生型 TDO で観測された免疫系への影響が変異型で変化するかを解析する。

(6) 低酸素環境でのヒストン修飾による免疫抑制機構の解析

低酸素環境のがん細胞で誘導されるエピジェネティック修飾酵素の同定

ヒトがん細胞株を低酸素チャンバー内で培養し、網羅的遺伝子発現解析から顕著な発現誘導のあるエピジェネティック修飾酵素を同定する。同定された遺伝子を過剰発現させたがん細胞株を作り、網羅的遺伝子解析から、がん微小環境において免疫細胞など周囲の細胞に作用して免疫抑制環境を構築する可能性のある遺伝子を探索する。

(7) 既存免疫療法と IDO1 リン酸化キナーゼ阻害剤併用の治療効果検討

IDO 発現がん細胞をマウスに移植し、抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-1 抗体といった免疫チェックポイント阻害剤に加えて、IDO1 リン酸化を止めるためのキナーゼ阻害剤を併用し、抗腫瘍免疫応答の相乗的な増強を試みる。IDO の酵素活性に対する阻害剤を併用した場合との比較から、IDO による免疫抑制のどの段階を抑制するのが最も有効なのかを明らかにする。

４．研究成果

がん微小環境の不均一な免疫抑制機構として、まず Trp 代謝酵素 IDO1 による抑制機構について研究した。IDO1 による抗腫瘍免疫の抑制の一部は、がん細胞で活性化された AhR の下流で誘導される免疫抑制分子が担うことがわかってきた。本研究から、AhR の下流で誘導される免疫抑制分子として新たに２種類の遺伝子を同定した。これらは以前に同定した AhR 下流標的遺伝子の 1 つと機能的に類似した性質を持ちうる遺伝子であった。活性化型 AhR を発現させたヒトの様々ながん細胞株で、これら 3 種類の遺伝子の発現誘導を検討した結果、これらのいずれかは誘導されたことから、がん細胞での AhR 活性化が普遍的な新たな役割を担う可能性が示唆された。

IDO1 に存在する複数のリン酸化部位を同時に変異させた変異体では AhR 下流で免疫抑制を担う分子の 2 つの誘導が抑制されたことからリン酸化の責任キナーゼ、あるいは下流因子の誘導に関わるシグナルを阻害することで免疫抑制を解除できる可能性が示唆された。リン酸化部位のうちの一つの配列情報をもとに、その配列をリン酸化しうると *in silico* で予測された複数のキナーゼ候補の中から、患者がん組織の免疫染色においてその IDO1 リン酸化が陽性となる細胞と同じ細胞に発現していることと、キナーゼの活性化型を遺伝子導入することによりがん細胞内で *in vitro* でリン酸化できることを指標に、がん細胞内での IDO1 リン酸化部位の一つのリン酸化を担う責任キナーゼを同定することができた。そこで、IDO1 を発現させた大腸がん細胞株にこのキナーゼに対する阻害剤を作用させたところ、AhR 下流で免疫抑制を担う分子の 1 つの発現が転写レベルで抑制された。さらに、IDO1 を発現させたマウスがん細胞株を移植したマウスにこのキナーゼに対する阻害剤を投与したところ、抗腫瘍効果の増強がみられた。既存の免疫増強法とこのキナーゼ阻害剤の併用をいくつか試み、相乗的な抗腫瘍効果を得られる治療法を見出すことができた。

また、IDO1 の様々な変異体に FLAG タグを付加してがん細胞内での発現量を比較したところ、IDO1 のタンパク質量が著しく減少する変異体を見出した。この知見をもとに、がん細胞での IDO1 タンパク質量を減少させる薬剤の同定に至った。特定のがん細胞株で同定した変異が他のがん種でも IDO1 タンパク質量を減少させるか検討したところ、他の複数のがん種の細胞株でも効率よく IDO1 のタンパク質量を減少させ、このアミノ酸残基が広範ながん種で IDO1 の安定な発現に関与していることが示された。一方、特定のがん種のがん細胞株において IDO1 タンパク質量に全く影響しなかった変異体が別のがん種のがん細胞株で IDO1 のタンパク質量を著しく減少させることを見出した。まだ、この現象がどこまで一般化できるのかは不明である。次に、IDO1 のタンパク質量が減少する機構について明らかにするためプロテアソーム阻害剤存在下でユビキチンの結合を検討した。同定した２種類の変異について、それぞれで IDO1 タンパク質量の減少が認められたがん細胞株で IDO1 変異体のユビキチン化が起こっており、ユビキチン-プロテアソーム系によって分解が起きていることが示唆された。さらに、同定した２種類の変異について、結合する E3 リガーゼ複合体構成要素を探索したところ、E3 リガーゼ複合体の基質認識に関わる複数のタンパク質の結合を示すことができたが、上記２種類の変異の間では異なる基質認識タンパク質の結合が認められ、２種類の変異の間での E3 リガーゼ複合体が使い分けされている可能性が示唆された。

一方、別の Trp 代謝酵素 TDO2 にリン酸化部位が存在する可能性を検討するため、マウス及びヒトの TDO2 についてリン酸化候補 2 箇所の変異体を作成し、PhosTag による検出を試みたが、リン酸化部位であるという確証は得られなかった。また、IDO1 のタンパク質量を減少させる変異に相当する類似配列が TDO2 にも存在したため TDO2 についても変異体を作成したが、タンパク質量の減少はみられなかった。

IDO1 や TDO2 による免疫抑制を解除する治療法を開発するため、がん細胞での IDO1、

TDO2 の発現を転写レベルで抑制する低分子化合物のスクリーニング系を作成した。これを用いたスクリーニングから、IDO1 の mRNA 発現を低下させる薬剤を同定することができた。さらに、がん細胞で活性化された AhR の下流で誘導される免疫抑制分子の発現に影響する IDO1 リン酸化からのシグナルを明らかにするためのスクリーニング系を作成した。IDO1 ががん細胞の増殖速度を極端に遅くするためスクリーニングに困難を伴うが、現在スクリーニングを進めている。

また、IDO1 のリン酸化を検出する抗体で大腸がん病理切片を染色した際にリン酸化が陽性になった部位で見られた表面分子の発現変化について、大腸がん細胞株への IDO1 の過剰発現によって再現することに成功し、この現象の分子機構を解析することが可能になった。

また、大腸がん細胞株を低酸素で培養した結果、発現誘導されるヒストン脱メチル化酵素を 1 種類同定し、その発現によるがん微小環境への影響と治療への応用について検討を行なっている。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計０件）

〔学会発表〕（計 2 件）

1.河上裕、塚本信夫、谷口智憲、がん微小環境の代謝制御による免疫チェックポイント阻害剤の治療効果増強、第２２回日本がん免疫学会総会（招待講演）、2018 年

2.Nobuo Tsukamoto, Kento Shimamoto, Yuto Sakai, Hajime Kamijuku, Yutaka Kawakami、Signal crosstalk of aryl hydrocarbon receptor (AhR) and IDO phosphorylation in tumor microenvironment. 第 45 回日本免疫学会総会・学術集会、2016 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 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：2017 年
国内外の別： 国内

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：PCT/JP2018/024950
出願年：2018 年
国内外の別： 国外

○取得状況（計０件）

〔その他〕
なし

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：河上　裕
ローマ字氏名：KAWAKAMI, Yutaka
所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8 桁）：50161287

(2)研究協力者
なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。