

EP2/4 阻害薬による抗腫瘍作用の機序解明

—新しいがん免疫治療薬の開発に向けて—

概要

京都大学大学院医学研究科創薬医学講座 成宮周 特任教授（京都大学名誉教授）、タムケオ・ディーン 同特定准教授、及びパンヤワタナヌクーン・シワコン 同博士課程学生らの研究グループは、免疫チェックポイント阻害薬^{*1}（抗 PD-1 抗体^{*1} など）非感受性 LLC1 肺がんモデル動物において生理活性脂質プロスタグランジン^{*2}E2（PGE₂）が受容体 EP2・EP4 を介して、炎症反応・血管新生及び制御性 T 細胞^{*3}(Treg)のリクルート・活性化を促進するという作用機序を明らかにしました。

また、ヒト扁平上皮肺がん、卵巣漿液性嚢胞腺がん、浸潤性乳がん及び肝細胞がんにおいて、EP2 及び EP4 の発現量は、動物モデルで見出された炎症反応・血管新生関連遺伝子及び制御性 T 細胞の動員・活性化関連遺伝子の発現量と強く相関し、予後と逆相関することを見出しました。このことから、EP2/EP4 阻害薬は、これらのヒトがんに対し、炎症と Treg を抑制することにより、腫瘍微小環境^{*4}での免疫抑制を解除し、抗腫瘍効果を発揮する作用が考えられます。現在臨床で用いられている免疫チェックポイント阻害薬に比べて、特定のがんにおいてより効果的な治療薬となる可能性があります。EP2/4 阻害薬は現在がん治療の臨床試験が世界中で行われており、本研究で得られた知見が適応がん患者の特定につながる可能性があり、試験を加速させると期待しています。

本研究成果は、2022 年 6 月 7 日（現地時刻）に米国の医学雑誌「Cell Reports」のオンライン版で公開されました。



図 がんにおける PGE₂-EP2/4 シグナリングの作用と作用機序の概念図

1. 背景

プロスタグランジン (PG) は、不飽和脂肪酸であるアラキドン酸の代謝物で、外傷や感染など侵害刺激が生体に加わって生じる腫脹や熱感、痛み、発熱などの急性炎症症状の発現に関わっています。一般的には、炎症に続き免疫細胞が活性化し、それによって免疫反応が惹起されます。炎症は本来刺激が無くなると終息しますが、往々にして長引きます。例えば、がんにおいては、炎症が長期にわたり持続することが知られています。それにも関わらず、炎症に続く免疫反応が抑制され、がんの進行に寄与すると考えられています。なぜ腫瘍微小環境では、活発な炎症が免疫の活性化に繋がらないかは大きな謎でした。本研究では、マウス同種腫瘍移植モデルを用いて、EP2/EP4 阻害薬による薬理的介入とシングルセル RNA シーケンス (scRNA-seq)^{※5} による解析を行い、プロスタグランジン E 受容体 EP2 と EP4 シグナルが腫瘍微小環境に及ぼす影響を解明しました。さらには、ヒトがんのデータベースを解析し、ヒトがんにおける EP2/EP4 の働きを確認しました。

2. 研究手法・成果

がん治療における免疫チェックポイント阻害薬の成功は、腫瘍微小環境での免疫回避・腫瘍増殖促進メカニズムを研究することががん細胞そのものの研究と同様、非常に重要であることを改めて示しました。一方で、現在の免疫チェックポイント阻害薬の一つの課題は、有効性のあるがんでも奏率が 30%程度にとどまり、無効ながん種も多いことです。このため、免疫チェックポイント阻害薬の有効性を向上させる手段、あるいは、CTLA-4 や PD-1 以外の免疫抑制分子についての研究開発が活発に行われています。本研究では、免疫チェックポイント阻害薬である抗 PD-1 抗体が無効な LLC1 肺がんの同種移植マウスモデルを用いて、EP2/4 阻害薬による抗腫瘍効果及びそのメカニズム解明を行ないました。

まずは、LLC1 腫瘍に対して、EP2/EP4 阻害薬の投与が有意に腫瘍増大を抑制することを確認しました。次に、EP2、EP4 受容体のノックアウトマウスを用いて検討を行いました。その結果、同様の腫瘍増大の抑制効果が観察され、EP2 及び EP4 の阻害はがん細胞そのものではなく、宿主由来の細胞を介して働いていることが示唆されました。さらに、そのメカニズムを調べるために、LLC1 担がんマウスに対して EP2/EP4 阻害薬の投与を行い、腫瘍を摘出し、宿主由来の腫瘍浸潤免疫細胞^{※6} を FACS sorting 法^{※7} により回収した後、scRNA-seq 法で総計 31,971 個の腫瘍浸潤免疫細胞の遺伝子発現解析を行いました。遺伝子発現のパターンにより clustering 解析^{※8} を行い、腫瘍浸潤免疫細胞を骨髄系由来細胞やリンパ球など 15 の細胞集団に分類しました (図 1)。

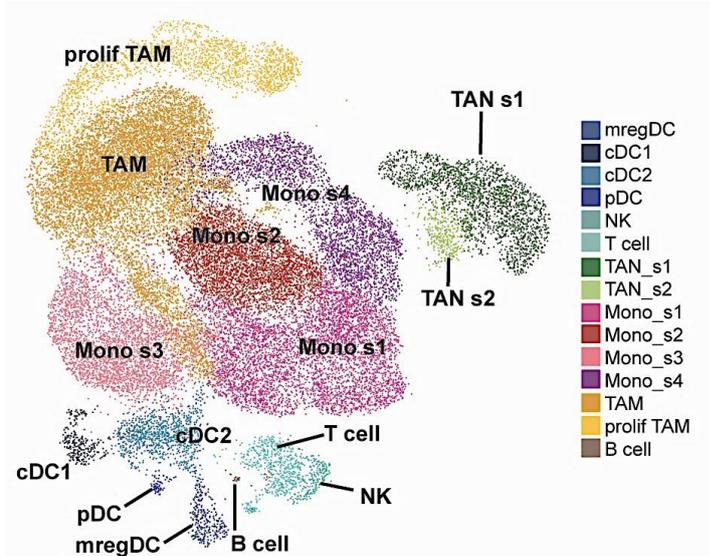


図 1 scRNA-seq 解析による LLC1 腫瘍浸潤免疫細胞の同定

T細胞集団については、さらに subclustering 解析^{*8}を行い、CD8 T細胞、CD4 Treg細胞、Treg以外のCD4 T細胞と増殖T細胞の4つの亜集団に分類しました(図2)。

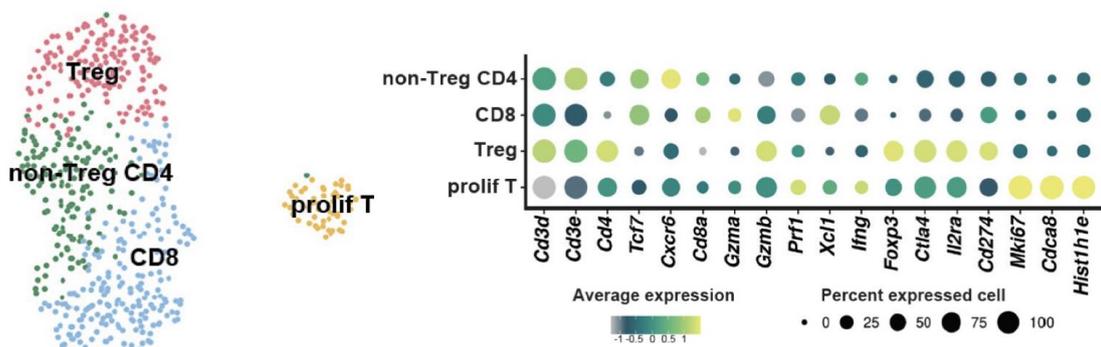
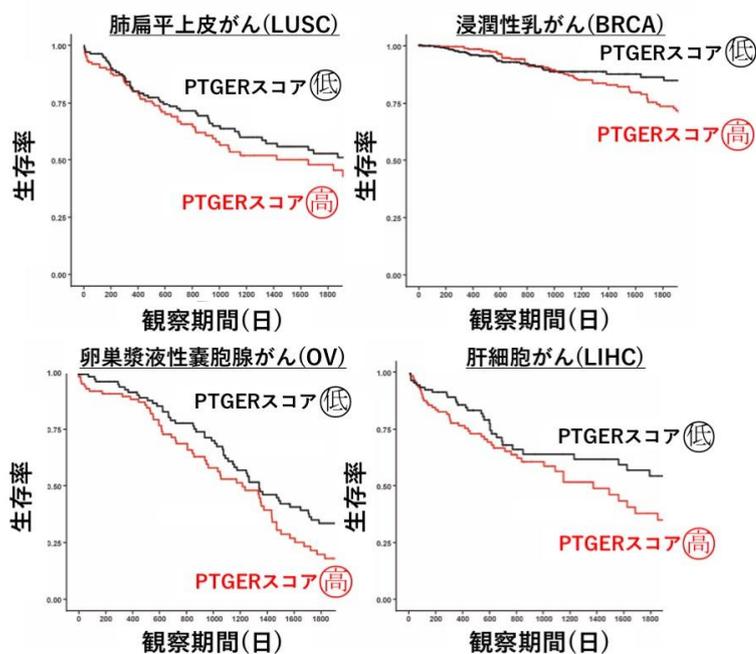
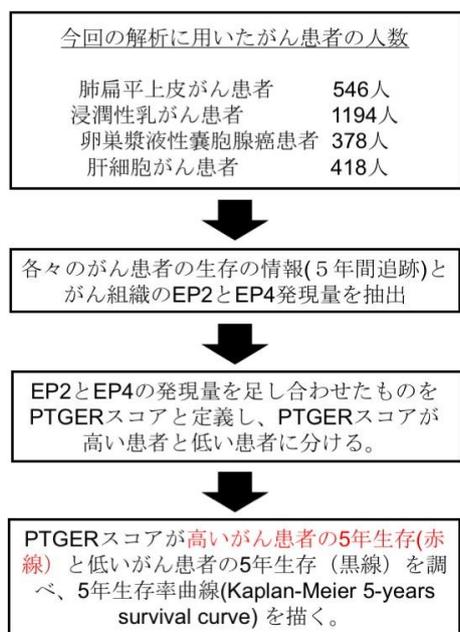


図2 LLC1 腫瘍浸潤T細胞の subclustering 解析

次に、これらの細胞集団について、それぞれで EP2/EP4 阻害による遺伝子発現変化を解析しました。その結果、EP2/EP4 経路が、骨髄系細胞集団(TAN s1-s2, Mono s1-s4 及び TAM)で NF- κ B 経路を活性化して炎症・血管新生関連遺伝子の発現誘導を起こしていることと、他方で、mregDC細胞(免疫制御分子に富む腫瘍内成熟樹状細胞)と CD4 Treg 細胞に働くことで、Treg の腫瘍へのリクルートと活性化を促進していることを見出しました。また、特記すべきなのは、本研究では、ヒトがんデータベース解析により、扁平上皮肺癌、卵巣漿液性嚢胞腺がん、浸潤性乳がん及び肝細胞がんなどのヒトがんにおいて、EP2/EP4 の発現量が上記2つの過程(骨髄系細胞による炎症・血管新生及び Treg による免疫抑制)に関連する遺伝子の発現と相関し、これらがんの予後予測因子(図3)となりうることを見出した点です。これらの結果は、PGE₂-EP2/EP4 シグナルが骨髄系細胞での炎症の活性化と Treg 細胞を介する免疫抑制という2つの相反する現象に作用していることを示唆するもので、新しい概念です。

がんゲノムアトラス (TCGA) データベース解析



-> LUSC, BRCA, OV及びLIHCのがん患者において、がん組織でのEP2とEP4発現量が高い(PTGERスコアが高い)群では、5年生存率が低くなる傾向がある

図3 ヒトがんにおける EP2/4 の発現量と 5 年生存率

3. 波及効果、今後の予定

本研究により PG 合成阻害薬であるアスピリンの疫学的研究で長年示唆されてきた PG のがんにおける役割の実態と分子メカニズムの一端を明らかにしたことは、学術的に非常に意義があると考えています。また、最近、EP2/EP4 阻害薬は様々ながん患者に対する臨床試験に進んでいますが、本研究の成果により、この薬物の対象とする患者の選別、層別化に大きな影響を及ぼす可能性があり、臨床試験の加速につながると期待しています。

今後の課題としては、本研究で LLC1 がんモデルの解析で一定の成果は得られましたが、LLC1 がんモデルは T 細胞浸潤が少なく、抗 PD-1 抗体も無効な腫瘍であるため、多くの T 細胞が浸潤する腫瘍微小環境での EP2/EP4 依存性の免疫回避のメカニズムは LLC1 がんモデルとは異なっている可能性が考えられます。そこで、今後はこれまでに確立した手法を用い、T 細胞の浸潤が多く、抗 PD-1 抗体が有効ながんモデルマウスの解析を行い、これまで知られていない未知の EP2/EP4 依存的な免疫回避メカニズムをさらに探索したいと考えています。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会(JSPS) 基盤研究 A 「プロスタグランジンによる腫瘍免疫抑制：標的細胞とメカニズムの解明」(研究代表者:成宮周, 課題番号 20H00498)、京都予防医学研究会がん研究助成 「ヒト乳がんにおけるプロスタグランジン受容体 EP4 発現細胞の同定」(研究代表者:タムケオ ディーン)の支援を受けて実施されました。

また、本研究は、大阪大学 iFreC (田中淳特任准教授、坂口志文特任教授)、マヒドン大学理学部 (チャルンサワン・ワロドム准教授)との国際共同研究であり、アステラス製薬株式会社とも連携して実施されました。

<用語解説>

※1 **免疫チェックポイント阻害薬、抗 PD-1 抗体**:免疫 T 細胞は抗原刺激を受けると活性化し、獲得免疫応答を惹起しますが、同じ免疫 T 細胞の表面に発現している PD-1 などの免疫チェックポイント分子はこの活性化を抑制し、獲得免疫応答を阻害します。そのため、免疫チェックポイント阻害薬で免疫チェックポイント分子の働きを阻害すると、抗原刺激を受けた T 細胞の活性化が持続します。がんの病態において、腫瘍細胞上の PD-L1 と T 細胞上の PD-1 の相互作用により、T 細胞の活性化が抑制され、獲得免疫が腫瘍細胞を攻撃するのを防ぎます。抗 PD-1 抗体は、がんが免疫系による攻撃を回避するのを防ぎ、抗腫瘍効果を発揮します。近年では、抗 PD-1 抗体は様々ながんの治療に用いられ、がん治療に革命をもたらしています。

※2 **プロスタグランジン (PG)**:プロスタグランジンは、脂肪酸に由来する一群の生理活性物質で、最初、精液中の子宮収縮物質として見いだされ、当初、前立腺 (Prostate gland) で作られると考えられたので、von Euler により prostaglandin (PG,プロスタグランジン)と名付けられました。これら物質の構造は、スウェーデンの Bergstrom と Samuelsson によって決定され、プロスタグランジン (PG) E₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂ や トロノキサン (TX) A₂ などが含まれており、多彩な生理活性を持っています。これまでの研究により、様々なヒトがんにおいて、PGE₂ が多く産生されていることが知られています。プロスタグランジンの合成を阻害する薬としてアスピリンが有名です。

※3 **制御性 T 細胞(Treg)**：制御性 T 細胞は免疫系を調節し、自己抗原に対する免疫寛容の制御に関わり、CD4 陽性 T 細胞の亜集団の一つです。一般的に、制御性 T 細胞は免疫抑制性の細胞であり、エフェクター T 細胞の誘導と増殖を抑制またはダウンレギュレーションすることが知られています。これまでの研究により、制御性 T 細胞の分化・機能発現・分化状態の維持すべてにおいて、Foxp3 転写因子の発現が必須であることが分かっており、制御性 T 細胞を同定する時のマーカー分子として用いられます。がんにおいて、制御性 T 細胞は腫瘍微小環境での免疫抑制に深く関わっていると考えられていますが、その詳細のメカニズムについてはまだ不明な点が多いです。

※4 **腫瘍微小環境**：腫瘍微小環境とは、腫瘍組織の中に含まれている浸潤免疫細胞、間質細胞、新生血管、液性因子や細胞外マトリックスなどが形成する腫瘍内のマイクロレベル環境のことです。腫瘍と周囲の微小環境は密接に関連しており、絶えず相互作用していることが知られています。

※5 **シングルセル RNA シーケンス (scRNA-seq)**：生物学・医学研究において、従来の遺伝子発現を調べる手法として、定量 PCR、マイクロアレイ解析や RNA シーケンスなどが行われてきました。しかし、これらの方法は細胞集団の平均的な転写産物の量を測定することしかできず、個々の細胞の遺伝子発現の特徴を知ることができません。これは、細胞集団が均一ではなく様々な細胞が混ざっている場合に、特に大きな問題となります。これに対して、近年登場したシングルセル RNA シークエンシング(scRNA-seq)という新しい技術は 1 細胞における遺伝子発現情報の抽出を可能にし、細胞集団の中の個々の細胞の遺伝子発現プロファイルを明らかにすることができます。さらにバイオインフォマティクス解析を行うことにより、集団の中の細胞の種類を同定することも可能です。

※6 **腫瘍浸潤免疫細胞**：固形腫瘍は一般的に T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、樹状細胞 (DC)、単球細胞、マクロファージ、好中球、好酸球や肥満細胞など多くの免疫細胞が浸潤しており、腫瘍浸潤免疫細胞と呼ばれています。

※7 **FACS sorting 法**：Fluorescence activated cell sorting (FACS, 蛍光活性化細胞選別) 法は、蛍光標識した特定の細胞を含んだ細胞溶液にレーザー光を当て、レーザー光が蛍光標識した細胞に当たった時に生じる散乱光及び放出された蛍光を測定することで、細胞一個一個の特徴を割り出し、実験者が望む特徴を持つ細胞を自動的に単離精製する手法です。

※8 **clustering 解析/subclustering 解析**：scRNA-seq 解析では、解析に用いた細胞一個一個の遺伝子発現情報を抽出することができるため、解析に用いた細胞集団の中の個々の細胞の遺伝子発現プロファイルを明らかにすることができます。Clustering 解析/subclustering 解析は、その個々の細胞の遺伝子発現プロファイルの類似性から、亜集団/亜々集団として細胞を分類するバイオインフォマティクス解析手法です。

<研究者のコメント>

本研究で見出された EP2 及び EP4 阻害薬の抗腫瘍効果及び作用機序が現在世界中で実施されている EP2/EP4 阻害薬の臨床試験を加速させ、この薬物が効果を示すがん患者の選別・層別化に大きな影響を及ぼし、近いうちががん患者の治療に用いられることを期待しています。(タムケオ ディーン)

<論文タイトルと著者>

タイトル：**PGE₂-EP2/EP4 signaling elicits immunosuppression by driving the mregDC-Treg axis in inflammatory tumor microenvironment** (PGE₂-EP2 / EP4 シグナルは炎症性の腫瘍微小環境下で mregDC-Treg 軸を亢進させることにより免疫応答を抑制する)

著者：Thumkeo D, Punyawatthananukool S, Prasongtanakij S, Matsuura R, Arima K, Nie H, Yamamoto R, Aoyama N, Hamaguchi H, Sugahara S, Takeda S, Charoensawan V, Tanaka A, Sakaguchi S, Narumiya S

掲載誌：Cell Reports DOI : <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110914>