

論文内容要旨

Signal regulatory protein alpha blockade potentiates tumoricidal effects of macrophages on gastroenterological neoplastic cells in syngeneic immunocompetent mice

(癌細胞免疫回避機構の解明とその制御法の開発

CD47-SIRP α シグナルを介したマクロファージの役割)

Annals of Gastroenterological Surgery, 2018, in press.

主指導教員：大段 秀樹教授

(医歯薬保健学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：安井 弥教授

(医歯薬保健学研究科 分子病理学)

副指導教員：田中 友加准教授

(医歯薬保健学研究科 消化器・移植外科学)

安部 智之

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

【背景】

マクロファージの自己認識機構として、CD47-SIRP α 経路による抑制性シグナル(do not eat me signal)が証明されており、白血病や悪性腫瘍において CD47 分子を強発現することで、免疫回避機構を構築している報告が散見される。しかしながら、それらの報告は全て免疫不全マウスや異種移植モデルを用いたものであり、正常免疫を有する同種同系マウスモデルでの報告はされていない。本研究は、免疫系が正常の同種同系マウスモデルにおいて CD47-SIRP α を介した免疫回避機構の解析とその克服法を検討した。

【方法】 C57BL/6J (B6)マウス腹腔内マクロファージを採取し、同種同系マウス肝癌細胞株 (Hepa1-6)と大腸癌細胞株 (CMT93)を対象として *in vitro*と *in vivo*マクロファージ貪食試験を行った。CD47 発現をノックダウンした各種癌細胞株の作成は CD47shRNA 法を用いた。なお、CD47 発現確認に関しては、PCR およびフローサイトメトリー、蛍光免疫染色法を用いた。CD47 および SIRP α のブロッキングには、抗 CD47 モノクローナル抗体と抗 SIRPa モノクローナル抗体を用いた。CD47 ノックダウン細胞株および CD47 あるいは SIRP α ブロッキング抗体による CD47-SIRP α シグナル遮断でのマクロファージ貪食能に与える影響を評価した。マクロファージ遊走能は、トランスウェル法を用いて、抗 CD47 抗体および抗 SIRPa 抗体の添加による遊走能への影響について経時的に観察した。*In vivo*モデルでの抗腫瘍効果検討実験は、抗 NK1.1 抗体を前投与した B6 マウスに大腸癌細胞株 (CMT93)を経門脈投与した同種同系肝転移モデルを構築した。この大腸がん肝転移モデルにおいて、抗 SIRPa 抗体と抗 CD47 抗体の2群に分けて比較検討を行った。また、大腸がん自然発生マウスモデル(CPC-APC マウス)を用いて、抗 SIRPa 抗体投与による腫瘍縮小効果と予後改善効果について検討した。ヒトサンプルでの抗腫瘍効果の検討においては、生体肝移植ドナー肝から抽出したマクロファージを用いて、ヒト肝癌細胞株 (Huh-7)に対する貪食機能への抗 CD47 抗体と抗 SIRPa 抗体の影響について検討した。

【結果】 Hepa1-6 と CMT93 の CD47 をノックダウンした細胞株を作成し、CD47 発現が有意に減少しているのを確認した。SIRP α は、Hepa1-6 や CMT93 には発現がなくマクロファージに強く発現していた。Hepa1-6 と CMT93 を標的とした腹腔内マクロファージによる貪食試験において、CD47 のノックダウンにより著明な貪食促進効果を認めた。次に、この解析系において抗 CD47 抗体と抗 SIRPa 抗体を用いてマウスマクロファージの貪食促進効果について評価した。抗 SIRPa 抗体では、*in vitro*と *in vivo*のいずれにおいても Hepa1-6 と CMT93 に対するマクロファージ貪食促進効果を認めた。抗 CD47 抗体によっても、*in vitro*貪食試験では Hepa1-6 と CMT93 に対するマクロファージ貪食促進効果を認めた。しかし、*in vivo*貪

食試験での抗 CD47 抗体の全身投与によって食食促進効果は得られなかった。そこで、抗 CD47 抗体により前処置することで食食が促進され、さらに、抗 SIRP α 抗体との併用によりさらなる食食促進の傾向を認めた。CD47 分子はマクロファージ上にも表出するため、抗 CD47 抗体の全身投与によるマクロファージの機能障害が懸念された。そこでマクロファージ遊走能試験において、抗 CD47 抗体の影響を解析した。その結果、抗 CD47 抗体はマクロファージ遊走能を低下させることが明らかとなった。次に、CD47-SIRP α シグナル遮断の長期観察のため、大腸がん肝転移および大腸がん自然発生モデルを用いて解析した。大腸がん肝転移マウスモデルでは、抗 SIRP α 抗体投与は、抗 CD47 抗体投与に比べ予後延長効果が示された。大腸がん自然発生マウスモデル(CPC-APC マウス)では、大腸内視鏡の経時的観察によって抗 SIRP α 抗体の抗腫瘍効果が確認できた。さらに isotype matched control 抗体投与と比較して有意な生存率の改善を認めた。12 週目における病理組織では、抗 SIRP α 抗体投与群の腫瘍内マクロファージ数の増加が認められた。これらのマウス実験結果がヒトにおいても応用可能か否かを評価するために、ヒト由来肝マクロファージによる腫瘍細胞の食食試験を行ったところ、抗 CD47 抗体に比べ、抗 SIRP α 抗体で明らかに食食効果が促進されていた。

【考察】

本研究では、正常免疫が保たれた同系マウスモデルにより、癌細胞が CD47 分子を細胞表面に表出することで、宿主免疫からの回避機構を構築していることが証明された。また、消化器癌に対する CD47-SIRP α 経路遮断によるマクロファージ抗腫瘍促進効果を証明した。CD47 分子は癌細胞だけでなく正常細胞にも表出しているため、抗 CD47 抗体の全身投与によってマクロファージ遊走能が低下することで食食促進効果が得られていないことを示した。さらに、ヒトマクロファージの食食促進効果も確認されたことから、抗 SIRP α 抗体は CD47-SIRP α 経路遮断薬として期待できる。