

p53 異常子宮体癌における TAM 関連分子の抗腫瘍免疫応答に対する作用の解明

Elucidation of the effects of TAM-related molecules on anti-tumor immune response in p53-abnormal endometrial cancer

横浜市立大学大学院医学研究科 免疫学教室 講師 藩 龍馬

要 約

子宮体癌においてp53異常は悪性度が高く予後不良な分子サブタイプであり、有効な治療法が未だに確立されていない。近年、腫瘍微小環境を標的とした治療戦略が注目されているが、p53異常子宮体癌における腫瘍微小環境の詳細は不明な点が多い。著者らはこれまでに、p53異常子宮体癌において腫瘍関連マクロファージ (TAM) の浸潤、およびTAMに高発現するオステオポンチン (OPN) が予後不良因子であることを明らかにした。OPNは細胞の接着や遊走、浸潤に関与する分泌型タンパク質であるが、p53異常子宮体癌におけるOPNの関与については不明である。著者らが作製したマウスp53異常子宮体癌モデルを用いて、OPNとその受容体の結合を阻害する抗OPN抗体と抗PD-1抗体を用いて投与実験を行ったところ、抗OPN抗体と抗PD-1抗体の併用投与は腫瘍増大を有意に抑制し、さらに活性化CD8陽性T細胞の割合を増加させることを見出した。本研究では、p53異常子宮体癌に対するTAMの抗腫瘍免疫応答におけるOPNの作用を解明することを目的とし、上記の抗体投与実験において、腫瘍へ浸潤するTAMをフローサイトメトリーで解析し、さらにTAMの網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、抗体投与によってTAMの割合や、炎症促進性・抑制性、抗原提示能および貪食に関連する遺伝子群に変化は認められなかった。一方、併用投与では酸化リン酸化から解糖系への代謝シフトが示唆された。これらの結果から、OPN阻害はTAMの代謝プログラムに影響を与え、それに伴う腫瘍微小環境の変化がCD8陽性T細胞機能の増強と関連する可能性が示唆された。以上から、p53異常子宮体癌におけるOPN阻害は、TAMの代謝制御を介した抗腫瘍効果を示すものであり、新たな免疫治療戦略につながることを期待される。

緒 言

2023年に改訂された子宮体癌進行期分類では、近年の網羅的遺伝子解析に基づく4つの分子サブタイプへ分類することが提唱されたが、その中でp53異常は最も予後不良であり有効な治療法が確立されていない¹。子宮体癌を含む多くの固形癌では、多様な免疫細胞が腫瘍内に浸潤しており、それらが相互作用することで複雑な腫瘍微小環境を形成している。腫瘍微小環境を構成する免疫細胞のひとつである腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage, TAM) は、サイトカイン産生等を介して発癌や悪性を促進することが知られている²。

著者らはマウスp53異常子宮体癌モデルを作製しており、本モデルにおいてCSF1受容体阻害剤であるPLX3397によるマクロファージの除去を行ったと

ころ、腫瘍の成長が抑制され、TAMがp53異常子宮体癌における腫瘍進展に重要な役割を果たす可能性が示された (図1A-C)。しかし、PLX3397は固形癌を対象とした臨床試験において一部を除き有効性が限定的である。そこで、より有望な治療標的を探索する目的でモデルマウスおよび患者検体の遺伝子発現を網羅的に解析した結果、TAMで高発現し、その発現量が予後不良と相関するTAM関連分子としてオステオポンチン (osteopontin, OPN; 遺伝子名は *SPPI*) を同定した (図1D)。OPNは分泌型の多機能分子で、細胞接着や細胞外マトリックス制御に関与する³。OPNは腫瘍微小環境において、主に腫瘍細胞とマクロファージなどのミエロイド系細胞から産生され、様々なメカニズムで腫瘍促進性に作用すると考えられているが、p53異常子宮体癌の悪性化に

におけるOPNの役割や治療標的としての有用性については不明である。そこで著者らは、マウスp53異常子宮体癌モデルを用いて、OPNとその受容体の結合を阻害する抗OPN抗体と免疫チェックポイント阻害剤である抗PD-1抗体を用いて投与実験を行ったところ、抗OPN抗体と抗PD-1抗体の併用投与は腫瘍増殖を有意に抑制し、さらに活性化CD8陽性T細胞の割合を増加させることを見出した(図1E-G)。

本研究では、上記の投与実験におけるTAMの解析により、p53異常子宮体癌の抗腫瘍免疫応答におけるTAM関連分子の作用を解明することを目的とした。各抗体投与後、腫瘍の計測および腫瘍へ浸潤する免疫細胞の数や機能についてフローサイトメトリー法で解析し、さらにTAMの網羅的遺伝子発現解析を行った。

方法

本研究における全ての実験は横浜市立大学動物実験委員会並びに遺伝子組換え実験安全委員会によって承認された実験計画書に従って実施された。

マウスp53異常子宮体癌モデル

本研究では申請者らが作製したp53異常子宮体癌の同所移植モデルを用いた。子宮体癌自然発癌マウス(*Pten*^{flox/flox}*p53*^{flox/flox}*PR*^{Cre/+})⁴から樹立した細胞株(金沢大学より供与)をC57BL/6野生型マウス(日本エスエルシー株式会社から購入)の子宮内へ移植した。腫瘍細胞株移植後4週で腫瘍塊が確認でき、腫瘍はp53異常を有し、子宮癌肉腫の像を呈する。全てのマウスはspecific pathogen-free (SPF)環境下で飼育した。

抗体投与実験

p53異常子宮体癌モデルマウスへ抗OPN抗体⁵(福山大学より供与, 300 μg/匹)単独あるいは抗PD-1抗体(200 μg/匹)との併用で3日毎に腹腔内投与し、計6回投与した。投与群の割り付けは、細胞株同所移植後4週間時点の平均腫瘍体積に群間差が生じないように行った。腫瘍体積は動物用超音波装置を用いて経時的に測定した。最終投与後に安楽死させ、腫瘍を摘出して重量を測定した。さらに腫瘍組織から単細胞懸濁液を調製し、腫瘍へ浸潤するTAMおよびCD8陽性T細胞の数や機能をフローサイトメトリーにより解析した。

RNA-seq

各投与群より単離したTAMを用いてRNAを抽出後、ライブラリー作製を行った。次世代シーケンサー(NextSeq 500, Illumina)を用いて網羅的遺伝子発現解析を実施した。取得したシーケンスデータのマッピングおよびリードカウントを行い、遺伝子発現データを取得した。マクロファージの表現型および機能に関連する既報の遺伝子群に基づくsignature scoreを算出し⁶、各治療群間で比較した。

結果

抗OPN抗体および抗PD-1抗体投与による子宮体癌進展への影響

著者らのこれまでの研究から、コントロール抗体投与群ならびに各抗体単剤投与群では腫瘍の増大が認められるが、併用投与群では腫瘍体積および腫瘍重量が有意に減少し、腫瘍増大が抑制されることが示されている(図1E、F)。CD8陽性T細胞については腫瘍内に浸潤する割合に有意な変化は認められなかったものの、活性化マーカーであるIFN- γ を発現するCD8陽性T細胞の割合は併用投与群において有意に増加していた(図1G)。本研究において、腫瘍内に浸潤した免疫細胞をフローサイトメトリー法で解析した結果、TAMの割合や、炎症促進性(M1) TAMの表面マーカーCD86、ならびに炎症抑制性(M2) TAMの表面マーカーCD163の発現量には有意な変化は認められなかった(図2)。以上より、併用投与はTAMの炎症促進性(M1)・炎症抑制性(M2)の性質を変化させずに、CD8陽性T細胞の浸潤割合ではなく活性化の増強を介して腫瘍進展を抑制すると考えられた。

抗OPN抗体および抗PD-1抗体投与によるTAMへの影響

併用投与群における抗腫瘍免疫応答機構へのTAMの関与を明らかにするため、各治療群から単離したTAMを用いてバルクRNA-seq解析を行った。M1型およびM2型に関連するsignature scoreを算出したが、いずれも治療群間で有意な差は認められなかった(図3A、B)。また、抗原提示能および貪食能に関連するsignature scoreについても群間差は認められなかった(図3C、D)。以上より、OPNおよびPD-1の同時阻害は、TAMの炎症促進性(M1)・炎症抑制性(M2)・抗原提示ならびに貪食に大きな

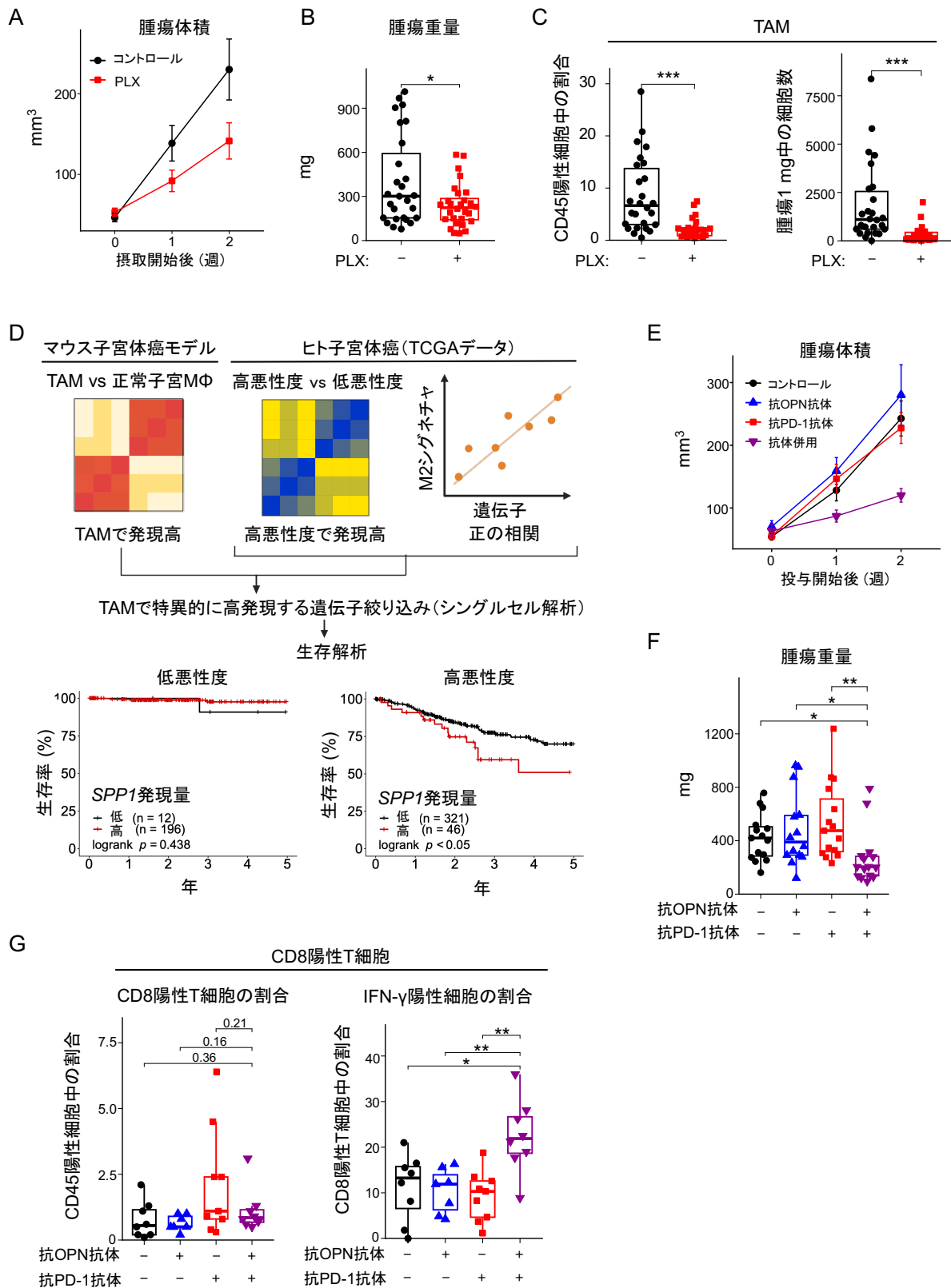


図1 TAM関連分子としてのOPNの同定とマウスモデルにおける抗体投与実験

(A) p53異常子宮体癌モデルマウスにおけるPLX含有餌摂取開始後の腫瘍体積の推移 (mean ± SEM)。 (B) PLX3397 (PLX) 含有餌摂取開始後2週における腫瘍重量。 (C) TAMの割合と細胞数。 (D) 治療標的候補遺伝子同定のための解析戦略の模式図。まず、マウス子宮体癌TAMと正常子宮マクロファージを比較し、TAMで高発現する遺伝子を抽出した。次に、ヒトTCGAデータを用いて高悪性と低悪性の子宮体癌腫瘍を比較し、高悪性度で高発現する遺伝子を抽出した。さらに、M2型マクロファージ (TAM) の signature scoreと正に相関する遺伝子を選別した。マウスとヒトの解析で共通して同定された遺伝子について、TAM特異的に発現する遺伝子を同定した。生存解析によって高悪性度腫瘍における予後不良と関連する遺伝子として *SPP1* (OPNをコードする遺伝子) を同定した。 (E) 抗体投与実験における投与開始後の腫瘍体積の推移 (mean ± SEM)。 (F) 抗体投与開始後2週における腫瘍重量。 n=14-15。 (G) 腫瘍浸潤CD45陽性細胞中のCD8陽性T細胞の割合およびCD8陽性T細胞におけるIFN- γ 陽性細胞の割合。 n=7-9。箱ひげ図は中央値および四分位範囲を示す。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ (Student's t-test)。有意差が認められなかった場合は実測P値を図中に記載した。

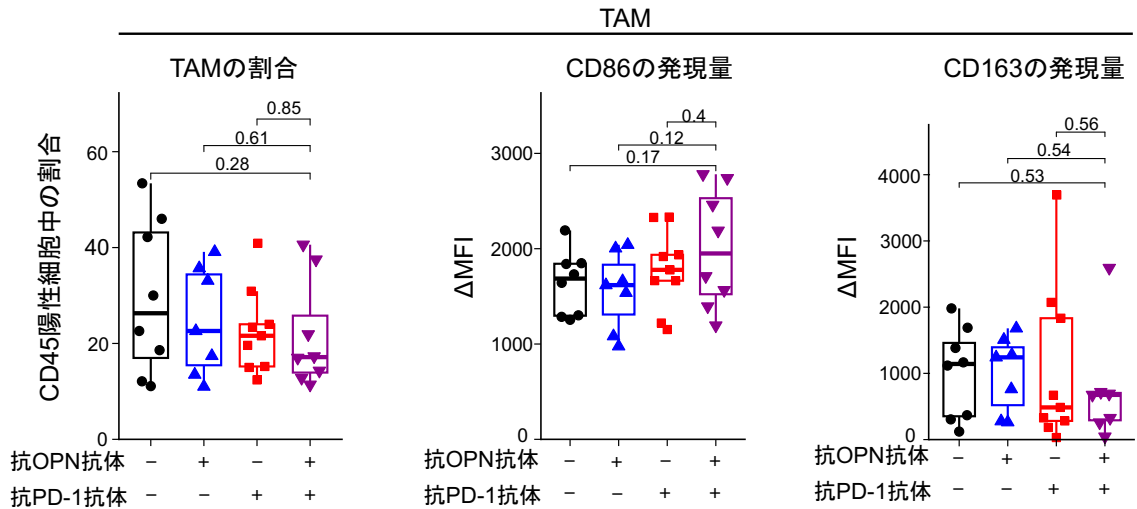


図2 抗体投与実験において抗OPN抗体および抗PD-1抗体投与がTAMの割合およびM1・M2マーカータンパク質発現に与える影響
腫瘍浸潤CD45陽性細胞中のTAMの割合、およびCD86、CD163のΔMFI。n=7-9。

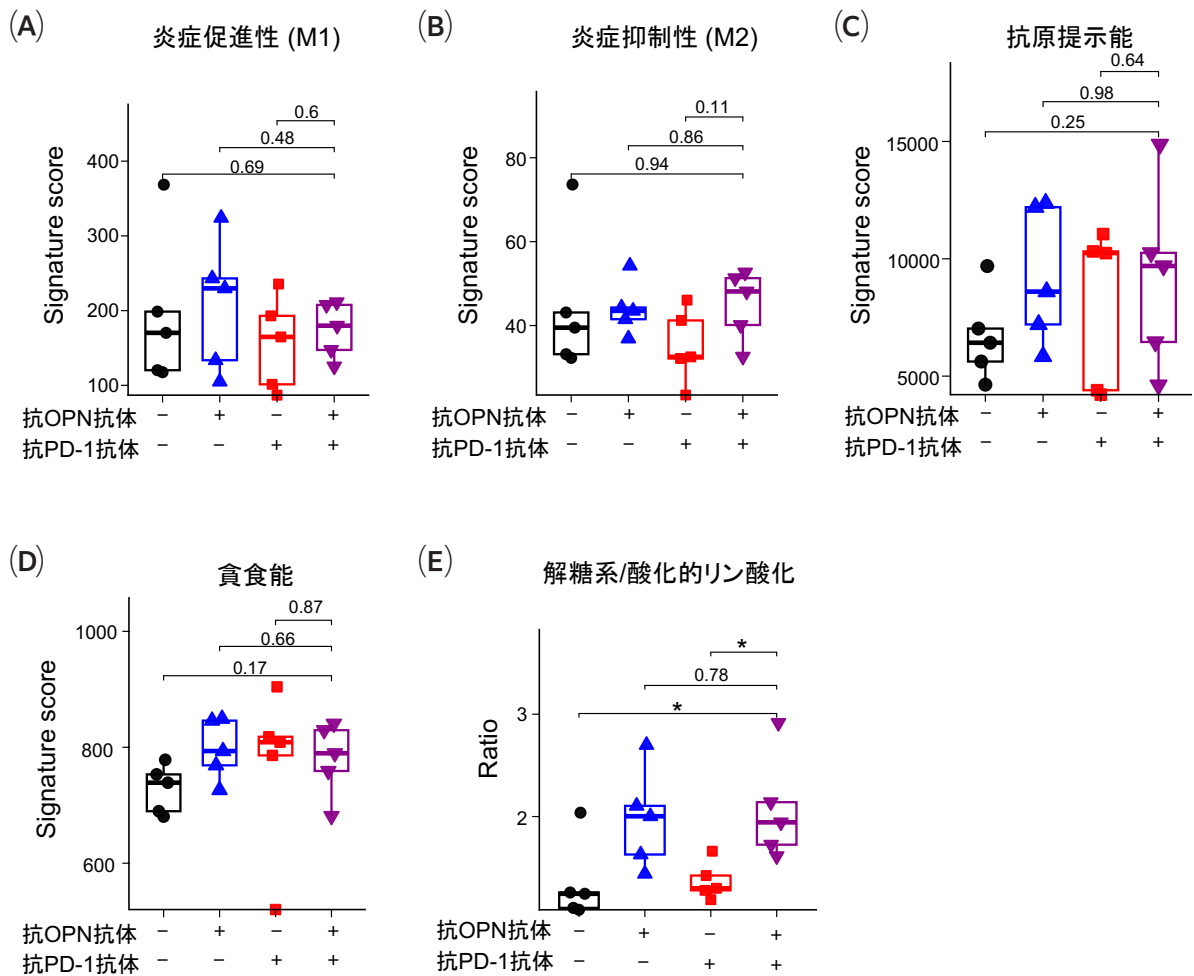


図3 抗体投与実験において抗OPN抗体および抗PD-1抗体投与がTAMの遺伝子発現に与える影響
(A)-(D) 各抗体投与群のsignature scoreの比較。(E) 解糖系・酸化的リン酸化のsignature score比の比較。n=5。

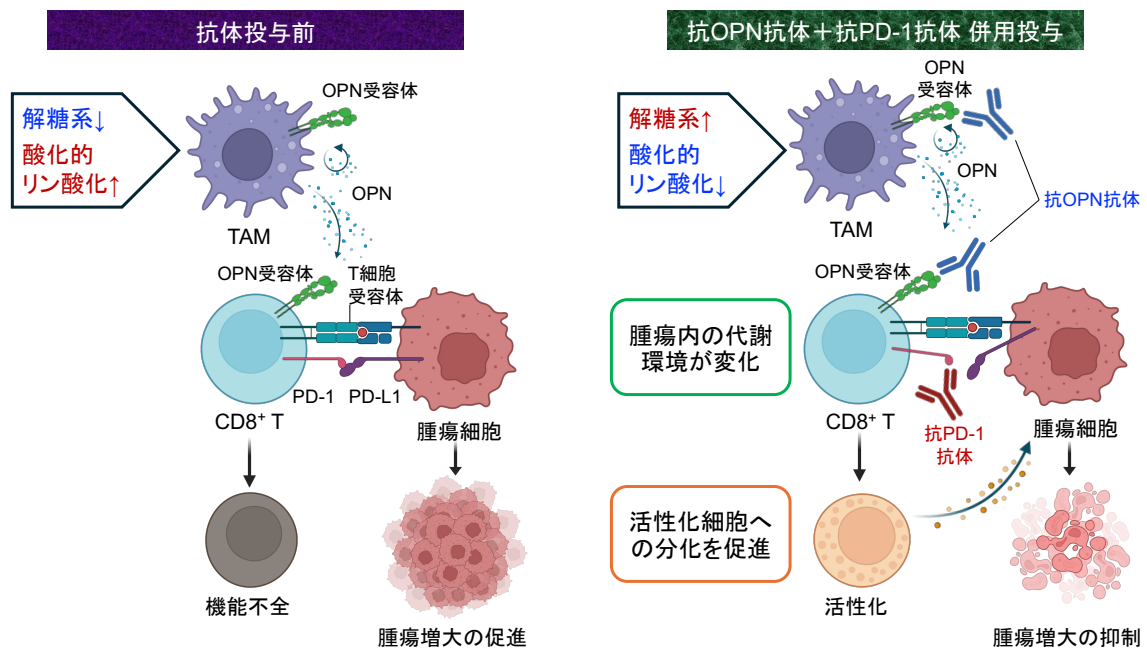


図4 抗OPN抗体と抗PD-1抗体の併用が腫瘍微小環境へ与える影響

抗体投与前(左)において、TAMは酸化的リン酸化優位の代謝状態を呈し、OPN分泌およびPD-1/PD-L1経路を介してCD8陽性T細胞の機能を抑制することで、免疫抑制性の腫瘍微小環境が形成され、腫瘍増大が促進される。抗OPN抗体+抗PD-1抗体併用投与前(右)では、抗OPN抗体によりTAM由来OPNシグナルが遮断され、TAMは解糖系優位へと代謝リプログラムされる。さらに、抗PD-1抗体によりCD8陽性T細胞への抑制シグナルが解除される。これらの協調的作用により腫瘍内の代謝環境が変化し、CD8陽性T細胞の活性化およびエフェクター分化が促進される。その結果、抗腫瘍免疫応答が増強され、腫瘍増大が抑制される。

変化を与えないことが示された。次に、TAMにおける代謝関連遺伝子発現の変化を解析した。解糖系関連遺伝子群および酸化的リン酸化関連遺伝子群からなるsignature scoreを算出したところ、個別解析では有意差は認められなかったものの、両者の比を評価したところ、抗OPN抗体を投与した2群において解糖系優位への代謝シフトが認められた(図3E)。これらの結果から、OPN阻害はTAMの代謝状態に影響を与え、酸化的リン酸化優位な代謝から解糖系優位な代謝へのリプログラミングを誘導している可能性が示された。

考察

著者らはこれまでに、マウスp53異常子宮体癌モデルにおける抗OPN抗体と抗PD-1抗体の併用投与が抗腫瘍効果ならびにT細胞依存的抗腫瘍免疫の増強を示す結果を得ていた。本研究では、この併用投与がTAMにおける腫瘍免疫応答の制御にどのように関与するかを検討した結果、炎症促進性(M1)・炎症抑制性(M2)・抗原提示・貪食といったTAMのよく知られた表現型に関わる表面マーカーや遺伝子群の発現に変化は認められなかった。一方で、TAMにおいて解糖系の関連遺伝子群が酸化的リン酸化のそれと比較して発現が亢進していた。従来、

腫瘍微小環境のグルコース消費はワールブルグ効果に基づく癌細胞の解糖系優位な代謝によると考えられてきた。しかし近年、腫瘍微小環境においては免疫細胞、特にTAMが主要なグルコース消費細胞として機能している可能性が報告されている⁷。これらの結果から、OPN阻害によりTAMの代謝プログラムが変化し、腫瘍微小環境におけるグルコース利用動態が変化していることが示唆される。

以上から、抗OPN抗体と抗PD-1抗体の併用投与が抗腫瘍効果を発揮する機序をまとめると以下のようになる(図4)。(1) OPN阻害がTAMにおける酸化的リン酸化を抑制し、解糖系を促進することで腫瘍微小環境を低グルコース状態へと変化させる。(2) 抗PD-1抗体の併用によりCD8陽性T細胞が活性化しエフェクター機能を獲得する。(3) 腫瘍増大が抑制される。

本研究では、OPN阻害がTAMの解糖系促進を直接誘導しているかについては示していない。今後、TAMのグルコース取り込み量の測定や腫瘍微小環境におけるグルコース濃度の定量解析を行うことで、OPN阻害がTAMの代謝を介して腫瘍微小環境の代謝環境を変化させている可能性を、より直接的に検証できると考えられる。TAMによる腫瘍微小環境の低グルコース状態への変化がCD8陽性T細胞の活

性化につながる機構の解明は、興味深い今後の課題である。腫瘍微小環境における変化が、T細胞の代謝状態にも影響を与え、その結果活性化状態に変化をもたらしている可能性が考えられる。また、OPNは腫瘍細胞からも産生されることが知られているが、p53異常子宮体癌におけるOPNの主要産生細胞については不明である。今後、腫瘍細胞あるいはTAMにおけるOPN発現を選択的に制御し、腫瘍増大および免疫応答への影響を解析することで、OPNの機能的意義をより明確にできると考えられる。

本研究で得られた知見から、抗OPN抗体と抗PD-1抗体の併用療法はp53異常子宮体癌に対する新規の免疫療法となる可能性が期待される。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、多大なご支援を賜りました、公益財団法人 神澤医学研究振興財団並びに関係者の皆様に深く御礼申し上げます。

Abstract

p53 abnormalities in endometrial carcinoma represent a molecular subtype with high malignancy and poor prognosis, for which effective treatments remain unestablished. While therapeutic strategies targeting the tumor microenvironment have gained attention in recent years, details regarding the tumor microenvironment in p53-abnormal endometrial cancer remain unclear. We previously demonstrated that tumor-associated macrophage (TAM) infiltration and high expression of osteopontin (OPN) in TAMs are poor prognostic factors in p53-abnormal endometrial cancer. OPN is a secreted protein involved in cell adhesion, migration, and invasion, but its role in p53-abnormal endometrial cancer remains unclear. Using a mouse model of p53-abnormal endometrial cancer developed by our group, we administered anti-OPN antibodies that inhibit OPN binding to its receptor, as well as anti-PD-1 antibodies. The combination administration of anti-OPN and anti-PD-1 antibodies significantly suppressed tumor growth and further increased the proportion of activated CD8⁺ T cells. The present study aimed to elucidate the role of OPN in the TAM-mediated antitumor immune response against p53-abnormal endometrial cancer. In the aforementioned antibody administration experiments, tumor-infiltrating TAMs were analyzed by flow cytometry, and comprehensive gene expression profiling of TAMs was performed. The results showed no changes in the proportion of TAMs or in gene sets related to pro-inflammatory/anti-inflammatory activity, antigen presentation, or phagocytosis following antibody administration. However, co-administration provided a metabolic shift from oxidative phosphorylation to glycolysis. These findings indicate that OPN inhibition affects the metabolic program of TAMs, and the resulting changes in the tumor microenvironment may be associated with enhanced CD8⁺ T cell function. Thus, OPN inhibition in p53-abnormal endometrial cancer demonstrates antitumor effects mediated by TAM metabolic control, offering potential for novel immunotherapy strategies.

引用文献

1. Berek JS, Matias-Guiu X, Creutzberg C, et al. FIGO staging of endometrial cancer: 2023. *Int J Gynaecol Obstet.* 2023; 162: 383-394.
2. Bied M, Ho WW, Ginhoux F, et al. Roles of macrophages in tumor development: a spatiotemporal perspective. *Cell Mol Immunol.* 2023; 20: 983-992.
3. Tan Y, Zhao L, Yang YG, et al. The Role of Osteopontin in Tumor Progression Through Tumor-Associated Macrophages. *Front Oncol.* 2022; 12: 953283.
4. Daikoku T, Hirota Y, Tranguch S, et al. Conditional loss of uterine *Pten* unfaithfully and rapidly induces endometrial cancer in mice. *Cancer Res.* 2008; 68, 5619-27.
5. Honda M, Kimura C, Uede T, et al. Neutralizing antibody against osteopontin attenuates non-alcoholic steatohepatitis in mice. *J Cell Commun Signal.* 2020; 14, 223-232.
6. Cheng S, Li Z, Gao R, et al. A pan-cancer single-cell transcriptional atlas of tumor infiltrating myeloid cells. *Cell.* 2021; 184: 792-809.e23.
7. Reinfeld BI, Madden MZ, Wolf MM, et al. Cell-programmed nutrient partitioning in the tumour microenvironment. *Nature.* 2021; 593, 282-288.