

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：10101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K09818
研究課題名(和文) 卵巣がんの血管新生阻害薬耐性の発生を予防するためのCCR2阻害薬併用療法の開発

研究課題名(英文) Combination therapy with bevacizumab and CCR2 inhibitor for women with ovarian cancer

研究代表者
三田村 卓 (Mitamura, Takashi)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：90625641
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫不全マウスを用いて卵巣がん患者の連続した3つの移植腫瘍モデルを作製し、ベバシズマブ単剤治療に対するCCR2阻害薬の上乗せ効果を検証した。ベバシズマブとCCR2阻害薬との併用療法(BEV/CCR2i)は、ベバシズマブ単剤治療(BEV)と比較して有意な腫瘍増殖抑制効果を示し、その機序は血管新生阻害効果の上乗せ効果、あるいは腫瘍細胞CCR2B-MAPK経路の直接的な阻害効果によるものであった。これらの結果はBEV/CCR2iの抗腫瘍免疫非依存的な相乗効果を立証しており、臨床応用が望まれる。特に漿液性がん患者において有用と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義
血管新生阻害薬であるベバシズマブは進行再発卵巣がんに対する標準治療として用いられるが、薬剤耐性が発生するために一時的な治療効果しか得られない場合が多い。我々は、患者から摘出した腫瘍をマウスに移植してベバシズマブ/CCR2阻害薬併用療法の治療効果を検討し、併用療法が有意に優れていることを発見した。また機序が、ベバシズマブによる血管新生阻害作用の上乗せ効果のみならず、腫瘍細胞に対する直接的な増殖抑制効果もあることを発見した。本研究の成果は、臨床第2相試験を実施する上での科学的根拠なると思われる。

研究成果の概要(英文)：Experimental Design: We established three consecutive PDXs (first high-grade serous, second clear cell, and third high-grade serous carcinoma) using immunodeficient mice. We randomly assigned mice to receive bevacizumab (BEV) or a combination of BEV and the CCR2 inhibitor BMS CCR2 22 (BEV/CCR2i).
Results: BEV/CCR2i demonstrated significant growth suppression in the first BEV-resistant PDX and third BEV-sensitive PDX compared with BEV, and treatment cessation did not attenuate this effect. Angiogenesis on the tumor surface was suppressed in BEV/CCR2i compared with BEV. Although the second PDX did not respond to BEV/CCR2i after the fifth cycle, two additional cycles of high-dose BEV/CCR2i demonstrated significant growth suppression compared with BEV by inhibiting the CCR2B-MAPK pathway.
Conclusions: BEV/CCR2i showed a sustained and antitumor immunity-independent synergistic effect in human ovarian cancer. This benefit is more significant in serous carcinoma than in clear cell carcinoma.

研究分野：産婦人科学

キーワード：卵巣がん 血管新生阻害薬 ベバシズマブ CCR2 併用療法 CCR2阻害薬 前臨床試験

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

がん細胞が分泌する血管新生誘導分子VEGFに対する抗体であるベバシズマブ(BEV)は、卵巣がんの治療において有効であるが、長期投与により耐性が発生して悪性度の高い腫瘍に形質が変化すると、急速に増悪することがある。そのため、BEV耐性の発生を抑えて長期投与を可能とする治療法が待ち望まれている。先行研究により、BEV耐性にはがん細胞が分泌するMSMPタンパクと血管内皮細胞上の受容体であるCCR2により構成される内分泌経路の活性化が関わっていることがわかった。

2. 研究の目的

- (1) CCR2阻害薬であるBMS CCR2 22とBEVの併用効果を動物実験により証明し、臨床試験を行う上での科学的根拠とする。
- (2) CCR2経路の活性化に関わる患者の体質を、患者生殖細胞系列遺伝子の解析により明らかにする。

3. 研究の方法

[動物実験] BEVとCCR2阻害薬(BMS CCR2 22)との併用効果を明らかにする。

- (1) 3人の卵巣がん患者の腫瘍組織を免疫不全NOGマウスに移植および継代して、連続した患者腫瘍移植片モデルを作成した。本NOGマウスは、抗腫瘍免疫力を持たない。
- (2) それぞれのモデルを治療開始前の腫瘍容積が一致するように以下の4群に割り付けて治療を3～4日ごとに治療を行う。
 - ・ 対照群：実薬を含まない溶媒のみ投与
 - ・ BEV群：ベバシズマブ 10mg/kg
 - ・ CCR2i群：BMS CCR2 22 20mg/kg
 - ・ BEV/CCR2i群：ベバシズマブ 10mg/kg + BMS CCR2 22 20mg/kgあるいは40mg/kg

[遺伝子解析研究]

CCR2阻害薬の治療効果が高い体質を有している患者かどうかを治療前に予測して、選択的に適用するためのバイオマーカーを発見する。

【選択基準】組織診により上皮性卵巣、卵管、原発性腹膜がんと確定診断され、BEVによる血管新生阻害療法を受ける患者。

目標症例数 BEVによる治療開始から12ヶ月後に再発あるいは再燃なし：感受性群 10人、BEVによる治療開始から12ヶ月後に再発あるいは再燃あり：耐性群 10人。

【方法】参加患者より10mlの血液を採取する。血液5mlを用いてDNAを抽出し、次世代シーケンサーにより生殖細胞系列遺伝子の全エクソン解析を行う。

【主要評価項目】血管内皮細胞および腫瘍細胞のCCR2発現に影響を与える可能性のある各種代謝関連酵素やサイトカインなどの遺伝子学的特徴を2群間で比較する。

4. 研究成果

[動物実験]

表1 患者背景

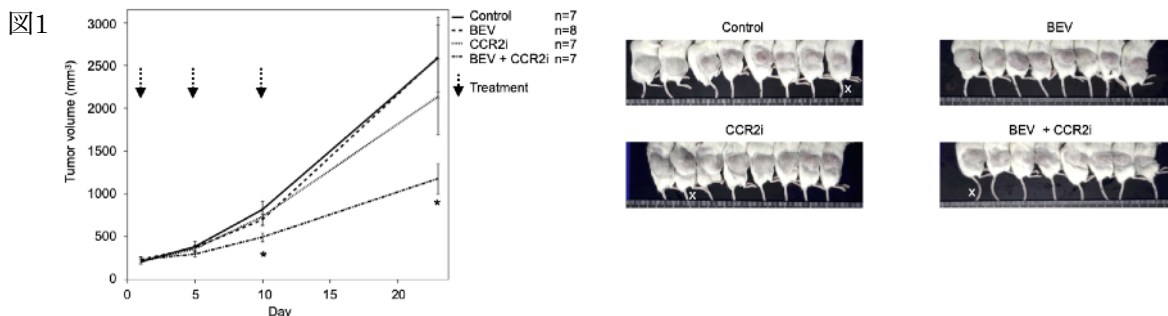
番号	組織型	年齢	性別	検体採取前の化学療法	検体採取の方法	Stage
(1)	高異形度漿液性がん	70	女性	なし	化学療法前の試験開腹術	IVB
(2)	明細胞がん	58	女性	バクリタキセル、カルボプラチン、ベバシズマブに対して抵抗性	転移性皮膚腫瘍	IC
(3)	高異形度漿液性がん	61	女性	なし	化学療法前の試験開腹術	IIIC

BEV/CCR2iの治療効果に関する検討

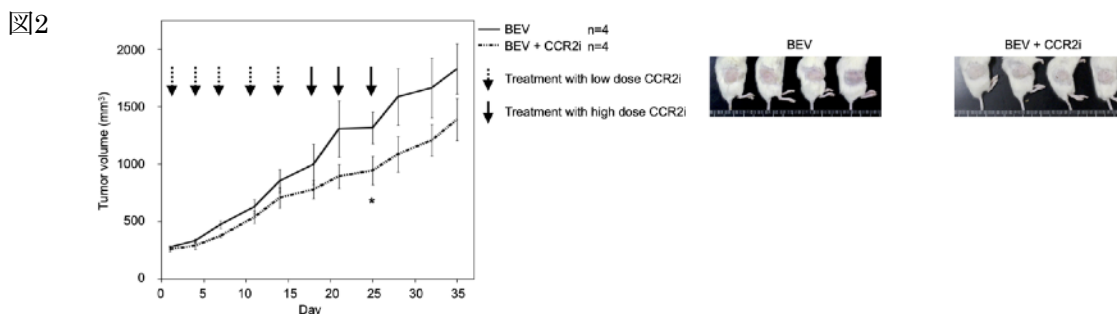
表1に示す3人の患者より採取した腫瘍をNOGマウスに移植した。生着したことを確認したのちに継代を繰り返して、治療実験に必要な数のマウスを確保した。

- (1) 32匹のマウスを4群に分けて実験を行った。最終的に対照群、CCR2i群、BEV/CCR2i群からそれぞれ1匹ずつ外れ値より除外した(Xマークのマウス)。2回の治療後に、対照群(Control)、BEV群、CCR2i群では腫瘍が同様に増大し、容積に差はなかった。一方、BEV/CCR2i群では腫瘍の増大が有意に抑制された(対照群と比較して30.4%の抑制効果、P

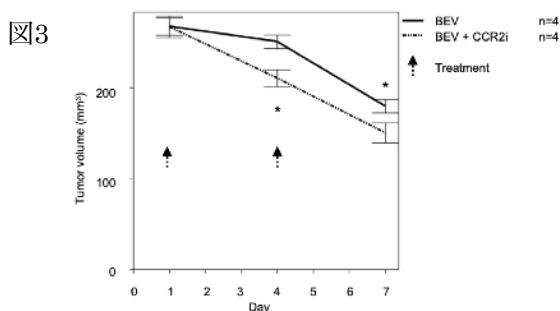
=0.03)。更に3回の投与で治療を終了した後もBEV/CCR2i群のみ有意に腫瘍の増大が抑制され、23日目の観察終了まで治療効果が持続した(図1)。



(2) この患者は臨床的にベバシズマブ抵抗性であることがわかっていたため、8匹のマウスをBEV群とBEV/CCR2iの2群に分けて治療実験を行った。5回目の治療を行うも、BEV/CCR2i群の有意な治療効果を認めなかった(14日目)。そこで、CCR2iを2倍の投与量へ増量して治療を続行したところ、追加2回の治療後に(25日目)有意な腫瘍増殖抑制効果を認めた(28.3%, $P=0.046$)。更に、追加3回目の投与で治療を終了した後もBEV/CCR2i群のみ有意に腫瘍の増大が抑制され、23日目の観察終了まで治療効果が持続した(図2)。



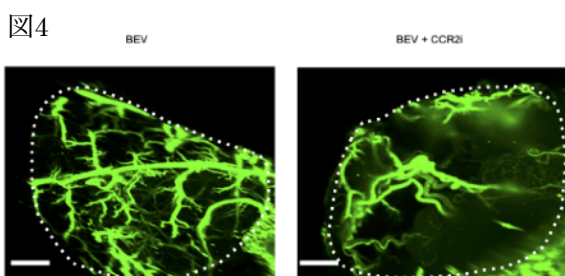
(3) 8匹のマウスをBEV群とBEV/CCR2iの2群に分けて治療実験を行ったところ、1回目の治療後より両群とも腫瘍容積が減少し、この患者はBEV感受性が高いことがわかった。さらに、BEV/CCR2i群ではBEV群と比較して有意に腫瘍の増大が抑制された(4日目で28.3%、7日目で19.3%の抑制効果, $P=0.01$ and 0.03) (図3)。



BEV/CCR2iの作用機序に関する検討

血管新生阻害効果

(3)の治療実験後に摘出した腫瘍を用いて、マウス血管抗原 α SMAを免疫染色したところ、BEV/CCR2iの腫瘍はBEVの腫瘍と比較して腫瘍表面の血管構造が乏しく、血管新生が抑制されていることが示唆された(図4)。



BEVによるCCR2発現誘導とCCR2iによるCCR2発現抑制

(1)の治療実験後に摘出した腫瘍を用いて、CCR2の2つのisoform CCR2AとCCR2Bの免疫染色を行ったところ、対照群と比較してBEV群ではCCR2Aの発現が変化しなかった(図示なし)。一方、対照群と比較してBEV群では腫瘍辺縁の卵巣がん細胞におけるCCR2Bの発現が上昇し、CCR2i群およびBEV/CCR2i群ではCCR2Bの発現は低下した(図示なし)。また、腫瘍から抽出したRNAを用いたPCR法でも、対照群と比較してBEV群のCCR2BのmRNA発現は平均で40倍も誘導されていることがわかった(図5)。同様に、(2)の腫瘍でもBEV群と比較してCCR2i群ではがん細胞のCCR2B発現が抑制されていた(図6)。

図5

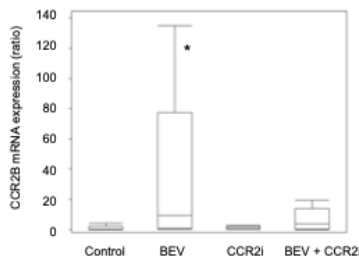
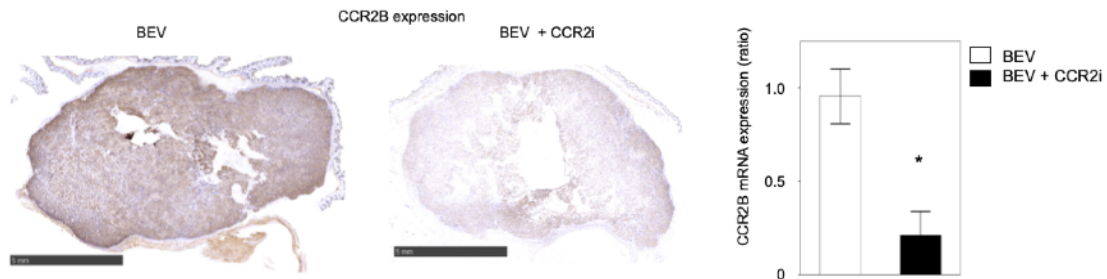
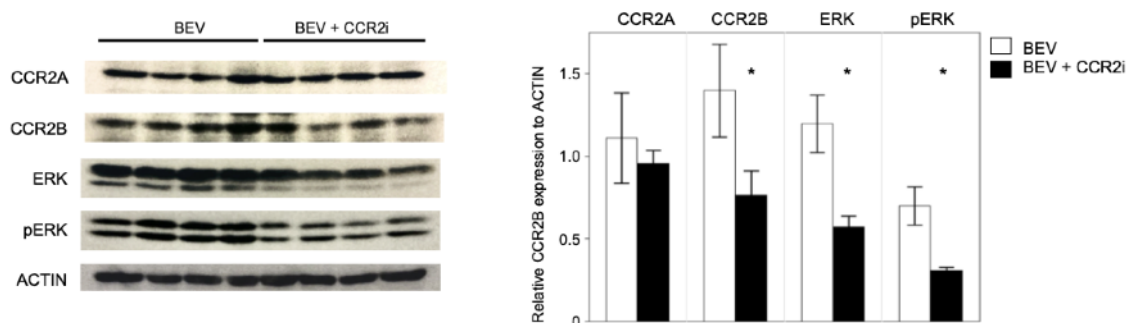


図6



これらの結果より、BEV/CCR2iには、BEVによる血管新生阻害効果の上乗せのほかに、腫瘍細胞のCCR2B isoformの発現を減弱して腫瘍の増大を抑制する効果のあることが示唆された。そこで、2番の腫瘍から蛋白を抽出し、CCR2経路の下流シグナル分子であるERKの発現とそのリン酸化度をウェスタンブロット法で確認したところ、BEVにCCR2iを追加することによりCCR2Bの発現が低下すると、下流のERKの発現が低下し、そのリン酸化度も低下していることがわかった(図7)。

図7



動物実験結果を裏付ける基礎研究結果

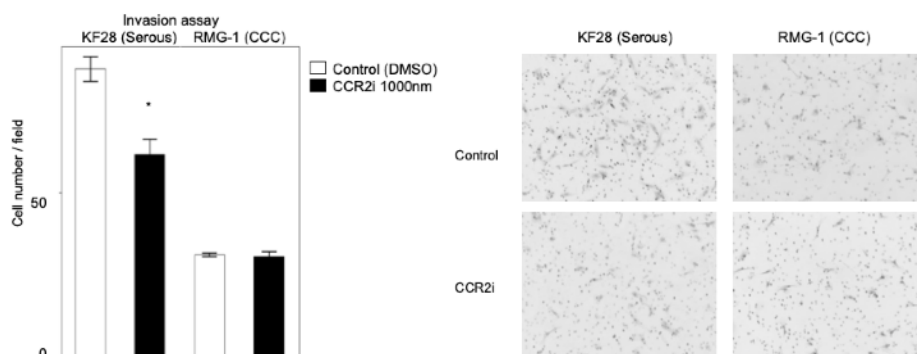
上記動物実験で認めた結果から、以下のような仮説が生まれた。

- ① CCR2iは、血管内皮細胞のCCR2を阻害することにより、卵巣がん細胞からの分泌されるVEGFやTGF-β等の血管新生誘導因子による血管新生を抑制しているのではないか？
- ② CCR2iは、血管新生非依存性に卵巣がん細胞の増殖を直接的に抑制しているのではないか？

これらを証明するための基礎実験を行った。まず最初に、(1)の患者と同じ卵巣漿液性がん細胞株KF28と、(2)の患者と同じ卵巣明細胞がん細胞株RMG-1を用意し、血管新生誘導因子であるVEGF、TGF-β、CCL2の転写活性をPCR法で確認した。すると、3因子のmRNAはKF28にのみ発現していた(図示なし)。これら2つの細胞株を、血管内皮細胞株であるHUVEC細胞と共

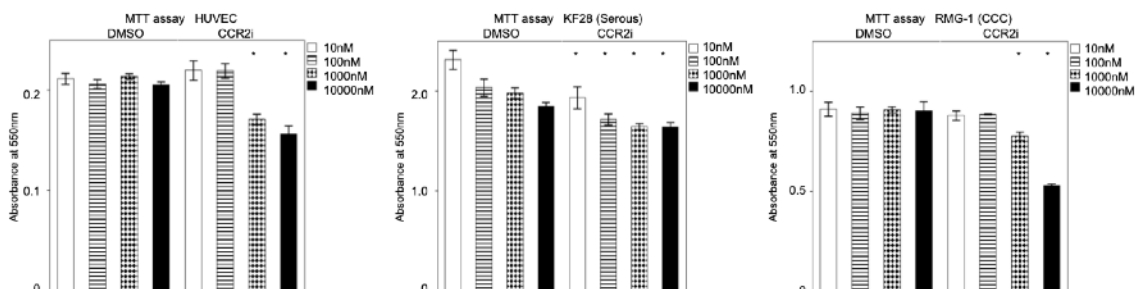
培養した。通常であれば卵巣がん細胞から分泌される血管新生誘導因子によりHUVECは移動浸潤するが、この培養系にCCR2iを加えると、KF28と共培養したHUVECは移動浸潤能が著明に低下したが、RMG-1と共培養したHUVECの移動浸潤能は変化がなかった(図8)。この結果は、漿液性がんの方が明細胞がんより血管新生阻害効果の上乗せが期待できることを示唆し、(2)の明細胞がん患者の動物実験で当初治療効果が乏しかった理由を示していると思われる。

図8



次に、CCR2iが卵巣がん細胞の生育能力を直接的に抑制するかどうかをMTTアッセイで確認した。すると、KF28は低濃度(10nM)のCCR2iにより生育能力が有意に阻害されたが、RMG-1は低濃度CCR2iでは生育能力が抑制されず、非常に高濃度(1000nM)のCCR2iを投与して初めて効果が現れた(図9)。この結果は、CCR2iががん細胞の生育能力を直接的に阻害することを示しているとともに、その効果は漿液性がんの方が明細胞がんより高いことを示し、動物実験結果と一致していると思われた。

図9



[遺伝子解析研究]

主目的に関する解析はまだ進行中である。一方、これまでの解析で得た卵巣がん患者の遺伝子情報を用いた多施設共同研究により、以下のような知見が得られたため、それぞれ論文発表を行なった。

- (1) 生殖細胞系列BRCA1遺伝子変異を有する遺伝性乳がん卵巣がん家系では、浸透率が低いほど発症者のリンパ節転移頻度が高い可能性がある。

Risk factors for lymph node metastasis of ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancer in hereditary breast and ovarian cancer syndrome. Japanese journal of clinical oncology 2020;50(12):1380-5 doi 10.1093/jjco/hyaa124.

- (2) 生殖細胞系列BRCA2遺伝子変異を有する遺伝性乳がん卵巣がん患者では、原発巣が卵巣ではなく卵管や腹膜に多い。

The disease sites of female genital cancers of BRCA1/2-associated hereditary breast and ovarian cancer: a retrospective study. World J Surg Oncol 2021;19(1):36 doi 10.1186/s12957-021-02151-3.

まとめ

CCR2阻害薬とベバシズマブの併用療法は

- (1) 血管新生阻害作用において相乗効果を示す
- (2) 血管新生阻害作用が期待できない患者においても、直接的に腫瘍細胞の増殖を抑制する
- (3) 治療を中止しても腫瘍の増殖抑制効果が長期間持続する
- (4) 組織型により効果が異なり、漿液性がんにて特に有望である

これらの結果は、臨床第2相試験でCCR2阻害薬とベバシズマブの併用療法の有効性を検証する上で理論的根拠になると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takashi Mitamura, Masayuki Sekine, Masami Arai, Yuka Shibata, Momoko Kato, Shiro Yokoyama, Hiroko Yamashita, Hidemichi Watari, Ichiro Yabe, Hiroyuki Nomura, Takayuki Enomoto, Seigo Nakamura and the Registration Committee of the Japanese HBOC consortium	4. 巻 19(1)
2. 論文標題 The disease sites of female genital cancers of BRCA1/2-associated hereditary breast and ovarian cancer: a retrospective study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World Journal of Surgical Oncology.	6. 最初と最後の頁 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12957-021-02151-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 三田村 卓, 王 磊, Tianyue Zhai, 渡利 英道	4. 巻 34(10)
2. 論文標題 血管新生阻害薬の有効利用	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 1020-1022
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takashi Mitamura, Masayuki Sekine, Masami Arai, Shiro Yokoyama, Hiroko Yamashita, Hidemichi Watari, Ichiro Yabe, Hiroyuki Nomura, Takayuki Enomoto, and Seigo Nakamura
2. 発表標題 Risk factors for lymph node metastasis of ovarian, fallopian tube and primary peritoneal cancer in hereditary breast and ovarian cancer syndrome.
3. 学会等名 ESGO State of the Art Conference 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Mitamura, Yosuke Konno, Tatsuya Kato, Hiroshi Asano, Ayako Nozaki, Kei Ihira, Yukako Kobayashi, Risa Ando, Akira Oku, Hidemichi Watari
2. 発表標題 Induction of anti-VEGF therapy resistance by upregulated expression of MSMP
3. 学会等名 ASGO (Asian Society of Gynecologic Oncology) 6th Biennial Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	渡利 英道 (WATARI HIDEMICHI) (10344508)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	畑中 佳奈子 (HATANAKA KANAKO) (10399834)	北海道大学・大学病院・特任講師 (10101)	
研究分担者	天野 虎次 (AMANO TORAJI) (20374514)	北海道大学・大学病院・特任助教 (10101)	
研究分担者	畑中 豊 (HATANAKA YUTAKA) (30589924)	北海道大学・大学病院・特任准教授 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------