

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19691

研究課題名(和文) 悪性黒色腫の免疫治療における骨髄由来抑制細胞の動態・機能解析とその制御

研究課題名(英文) Dynamics and function analysis of bone marrow-derived suppresser cells in immunotherapy of malignant melanoma and its control

研究代表者

藤原 進 (Fujiwara, Susumu)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：40645389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：当研究の目的は、マウス悪性黒色腫に対する腫瘍内CD4陽性細胞除去により増殖することが確認されているMDSCを抑制し、抗腫瘍効果が増強されるかどうかを検討することである。MDSCを除去するために抗Gr-1抗体および5-FUを用いた。結果、抗Gr-1抗体を投与しても明らかな抗腫瘍効果の増強は認められなかった。次に、5-FUによるMDSCの抑制を試みたが、MDSCの減数は認められず、明らかな治療的効果も認められなかった。次にMDSCの走化に関与すると考えられるCCL2の抗体による中和を試みたが、腫瘍を抑制できなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate whether MDSC, which has been confirmed to proliferate by removal of intratumoral CD4 positive cells to mouse malignant melanoma, is suppressed and whether antitumor effect is enhanced. Anti-Gr-1 antibody and 5-FU were used to remove MDSC. As a result, even when anti-Gr-1 antibody was administered, there was no clear enhancement of antitumor effect. Next, 5-FU was used to suppress MDSC, but MDSC reduction was not observed and no obvious therapeutic effect was observed. Next, we attempted to neutralize with anti-CCL2 antibody thought to be involved in chemotaxis of MDSC, but failed to suppress tumor growth.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：悪性黒色腫 MDSC 5-FU anti-Gr-1 antibody CCL2

1. 研究開始当初の背景

高齢化、オゾン層破壊、生活様式の変化に伴って、悪性黒色腫患者数は全世界的に急激に増加している。現在に至るまで、悪性黒色腫の治療は手術的に除去しきることによってのみ長期生存が期待でき、転移巣に対する化学療法で有効なものは皆無に等しく、予後の悪い悪性腫瘍の一つであった。古くから悪性黒色腫に対して免疫療法が試みられ、抗腫瘍免疫を増強するために、エフェクター細胞を活性化および増殖させる、もしくは腫瘍免疫を抑制する因子を阻害する試みがなされてきた。有効な抗腫瘍免疫療法のためには細胞障害性T細胞の活性化は必須と考えられるが、患者体内でエフェクター細胞を誘導するがんワクチン療法や、体外で細胞障害性T細胞を活性化させるもしくは増殖させる細胞移入治療を行っても効果は限定的であることが知られており、細胞障害性T細胞の活性化のみでは有効性は期待できない。腫瘍免疫を抑制する因子として IL-10 や TGF- β 、Arginase、IDO などが知られ、抑制性細胞として制御性T細胞 (Treg) や骨髄由来抑制細胞 (MDSC)、腫瘍浸潤抗炎症マクロファージなどが知られている。こうした抑制性の因子や細胞を除去・無効化することで抗腫瘍免疫反応を増強させる基礎研究も盛んに行われている。腫瘍免疫賦活化処置と抑制性細胞の制御処置を組み合わせることにより、マウスモデルでは腫瘍拒絶の成功例が報告されている。最近我々は、C57BL/6 マウスに B16F10 悪性黒色腫細胞を接種し腫瘍塊を形成させたのち、正の補助刺激因子である OX40 agonist の全身投与を行っても抗腫瘍効果は誘導できないが、腫瘍内 CD4 陽性細胞の一過性除去と OX40 agonist 投与を組み合わせると、相乗的な抗腫瘍免疫反応を誘導しうることを示した (J. Invest. Dermatol.134:1884-92, 2014)。この CD4 陽性細胞除去による効果は、Treg の除去に加えて、Type 1 regulatory T cell や T helper 3 などの CD4 陽性の誘導性制御性 T 細胞も除去されること、そして腫瘍周囲環境における免疫抑制性 T 細胞の大部分が除去されるため、細胞障害性 T 細胞などのエフェクターが活性化・浸潤しやすくなることに起因していると推測している。事実、CD4 陽性細胞除去によって、腫瘍周囲に多数の CD8 陽性細胞障害性 T 細胞およびナチュラルキラー細胞が浸潤し、IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-12 などの抗腫瘍性サイトカインの上昇、granzyme B や perforin といった細胞障害性因子の上昇を認めた。しかし、その一方で、MDSC が腫瘍内に多数増加する現象を確認しており、その現象は CD8 陽性細胞障害性 T 細胞の腫瘍内浸潤に反応していることから、生体のホメオスタシスによる働きの一環と推測され、重要な反応の一つと考えている。近年の基礎研究の集積により、分子標的薬をはじめとした新たな抗悪性腫瘍薬が多数生

み出されてきているが、悪性黒色腫に関してようやく治療効果の期待できる新規薬剤が登場してきた。

主要な免疫細胞である T 細胞の活性化には、T 細胞受容体からのシグナルのほかに補助刺激受容体からのシグナルが必要と考えられているが、負の補助刺激受容体である Programed cell death 1 (PD-1) を阻害する薬剤が開発され、2014 年 9 月に悪性黒色腫に臨床応用されるに至った。この新規薬剤は世界に先駆けて日本で承認された薬剤である。もう一つの重要な負の補助刺激受容体である CTLA-4 に対する阻害抗体は海外では臨床応用が開始されており、悪性黒色腫に有効性が示されている。従来 of 細胞障害性抗がん剤では奏効率はせいぜい 20% ほどであったが、この 2 種の抑制性の免疫チェックポイント分子の両者を阻害する臨床試験では、高容量群で奏効率が 50% を超える良好な治療成績が示されており (N. Engl. J. Med.369:122-33, 2013)、今後の治療に大きな期待が寄せられている。

上記のように悪性黒色腫患者に対する免疫療法は今後ますます発展し、広く使用されていくことが予想される。その根幹を成すのが、細胞障害性 T 細胞による腫瘍細胞への攻撃であるが、我々の上述のマウスモデルの研究結果から、ヒトの悪性黒色腫においても細胞障害性 T 細胞の腫瘍内浸潤に対抗する形で MDSC が増加し、抗腫瘍免疫反応に影響を及ぼしているのではないかと推測している。そのため、本研究において、悪性黒色腫の新規免疫治療薬である PD-1 阻害剤使用前後における臨床検体の腫瘍周囲環境における免疫細胞の動態やサイトカインなどの液性因子の推移を検討するとともに、マウス悪性黒色腫モデルでは Treg を除去するなどヒト治療とは異なるタイプの抗腫瘍免疫療法を行い、腫瘍周囲の免疫抑制細胞の特性および動態に関して違いがあるのかを解析し、MDSC の浸潤増加が確認される系では、MDSC を制御するアプローチを併用することによって、さらに有効な抗腫瘍効果を得ることが可能かを明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

上述のマウス悪性黒色腫に対する腫瘍内 CD4 陽性細胞除去による免疫療法モデルにおいて、種々のアプローチによる MDSC の制御を加え、MDSC に対する効果と抗腫瘍効果を比較検討する。

3. 研究の方法

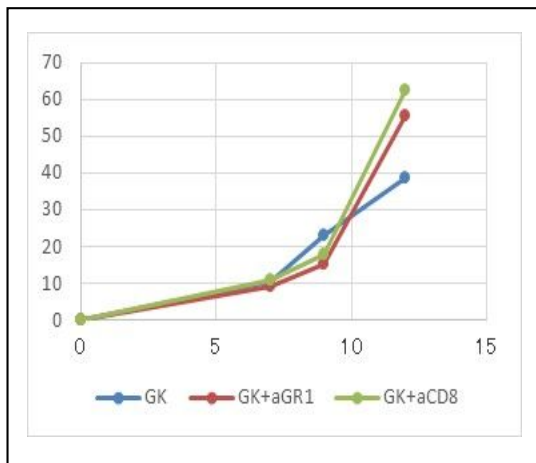
(1) 我々の最近の報告 (J. Invest. Dermatol.134:1884-92, 2014) に則して、C57BL/6 マウスに B16F10 マウス悪性黒色腫細胞を 1×10^5 個背部皮内に接種する。腫瘍塊として認められる day7 に抗 CD4 抗体 (GK1.5) の腫瘍内投与を行う。同日および以降 5 日毎に抗 Gr-1 抗体を腹腔内に投与し、週に 1 ~ 2 回の腫瘍径計測を行う。
(2) 5-FU を用いた検討では、先ほどと同

様に day7 に抗 CD4 抗体の腫瘍内投与を行い、同日 5-FU の投与を行う。day14 に腫瘍を計測する。同日腫瘍を採取し浸潤する MDSC 数をフローサイトメトリーを用いて計測する。

(3)次に MDSC の走化に關与すると考えられる CCL2 の抗体による中和を試みる。従来手法と同じく、C57BL/6 マウスに B16F10 悪性黒色腫細胞を接種し腫瘍塊を形成させたのち抗 CD4 抗体のみを投与した群、抗 CD4 抗体と抗 CCL2 抗体を投与した群で腫瘍の縮小に差が出るかどうかを確認した。

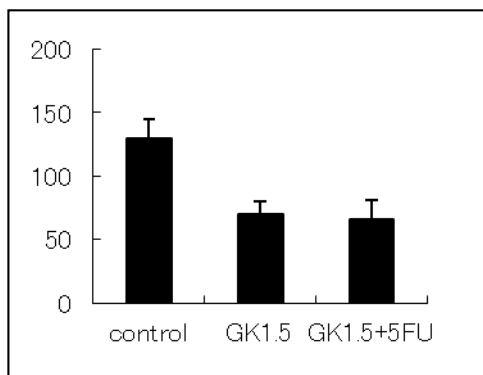
4. 研究成果

(1) 抗 CD4 抗体に抗 Gr-1 抗体を加えることによる明らかな抗腫瘍効果の増強は認められなかった。

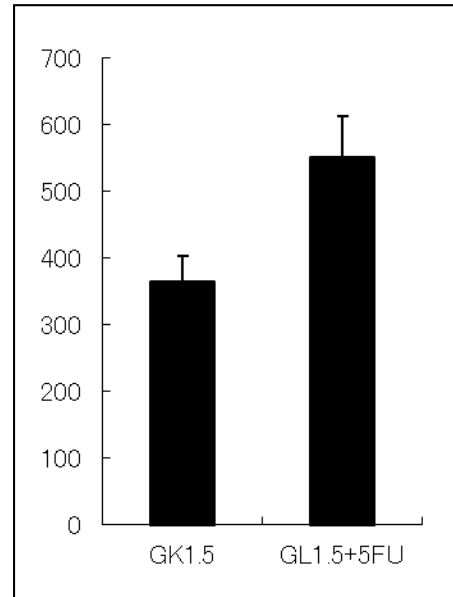


(2) day14 に腫瘍を計測したところ、無治療と比較して抗 CD4 抗体および 5-FU で治療した群は腫瘍の増大は抑えられていたが、抗 CD4 抗体のみの治療群とは明らかな差は認められなかった。同日腫瘍を採取し浸潤する MDSC 数をフローサイトメトリーを用いて計測したが、MDSC 数の減少は認められなかった。

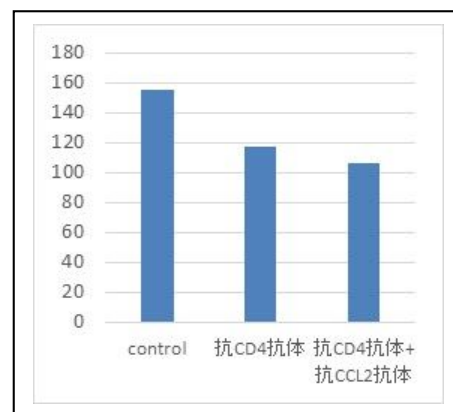
腫瘍の大きさ day14



MDSC 数



(3) C57BL/6 マウスに B16F10 悪性黒色腫細胞を接種し腫瘍塊を形成させたのち抗 CD4 抗体のみを投与した群、抗 CD4 抗体と抗 CCL2 抗体を投与した群で腫瘍の縮小に差が出るかどうかを確認した。結果、抗 CCL2 抗体を併用することでやや腫瘍の増加が抑制される傾向が認められたものの、有意差を認めるまでには至らなかった。



以上、残念ながら MDSC を優位に抑制し、抗腫瘍効果を示す結果が得られなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 2 件)

藤原進、神保晴紀、永井宏、錦織千佳子、田中朋代、井家益和、同一患者由来の悪性黒色腫と正常色素細胞のエピジェネヒックス解析および新規診断マーカー探索、第 116 回日

本皮膚科学会総会 2017年6月2日～4日、
仙台

Susumu Fujiwara, Hiroshi Nagai, Haruki
Jinbo, Tomoyo Tanaka, Masukazu Inoie, and
Chikako Nishigori、Genome-wide DNA
methylation analysis in melanocytes and
melanomas from the same individual, the
XXIII International Pigment Cell and
Melanoma Research Conference, 2017年8月
26日～30日, Denver, Colorado, US

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/dermat/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 進 (FUJIWARA, Susumu)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40645389