

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20140

研究課題名(和文) 卵巣癌においてベバシズマブ抵抗性をもたらす腫瘍免疫抑制機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of immune-suppression causing Bevacizumab resistance in ovarian cancer

研究代表者

安彦 郁 (Abiko, Kaoru)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20508246

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)：卵巣癌における抗VEGF抗体の治療抵抗性となる原因の解明を行った。卵巣癌マウスモデルにおいて、抗VEGF抗体抵抗性腫瘍では、低酸素領域が多く、また、GM-CSFが発現亢進していた。GM-CSFは骨髄細胞からの骨髄由来抑制性細胞(MDSC)産生を増加させること、また、GM-CSF存在下ではより免疫抑制能の強いMDSCが産生されることを証明した。VEGF抗体への治療抵抗性には、低酸素により誘導されるGM-CSFによるMDSCの産生と免疫抑制能の亢進が関与していることが示された。

研究成果の概要(英文)：We explored the mechanisms of resistance to anti-VEGF therapy in ovarian cancer. In mouse models, anti-VEGF-antibody-resistant tumor showed larger hypoxic area and higher expression levels of GM-CSF. GM-CSF enhanced the production and immune-suppressive property of Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) from myeloid cells. Our data indicated that targeting the hypoxia-induced cytokine, GM-CSF, may overcome the resistance to antiangiogenic therapy in ovarian cancer.

研究分野：医学

キーワード：卵巣癌 骨髄由来抑制性細胞 低酸素 VEGF

1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣癌と VEGF

卵巣癌は、本邦で年間約 8000 人が罹患、4000 人以上が死亡していて、罹患数死亡数ともに増え続けている。卵巣癌は容易に腹膜播種をおこすが、自覚症状が少ないため、多くが 3・4 期の進行期で診断される。化学療法が一時的に効果を示すことが多いものの、ほとんどが再発を来し、長期予後は極めて不良であるため、新規治療法の開発が求められている。

我々の研究室では、卵巣癌における VEGF の発現と、その臨床的意義について 1997 年に初めて報告し (Yamamoto S, Br J Cancer, 1997)、以後も VEGF と卵巣癌の関連を報告してきた。最近の症例の検討でも、卵巣癌腹膜播種における VEGF 高発現例は予後不良である。

(2) 卵巣癌とベバシズマブ

近年、卵巣癌に対して、抗 VEGF 抗体であるベバシズマブの有効性が示され、本邦でも保険適用となった。現在卵巣癌に対して唯一保険適用の分子標的薬である。ベバシズマブは、血管新生を阻害して腫瘍の増大を抑制する作用に加えて、腫瘍血管を正常化して抗がん剤の組織移行性を高める作用や、癌性腹膜炎の際に腹水産生を抑制する作用があることが知られている。しかし、ベバシズマブが無効である症例もある。また通常の抗がん剤と同様、いったんはベバシズマブが効果を示しても、後にその効果がなくなることも知られている。このベバシズマブ抵抗性獲得のメカニズムについては解明されていない。

(3) 卵巣癌と免疫逃避機構

近年、癌が免疫逃避機構を持つことが注目されているが、我々は、これまで、卵巣癌の腹膜播種の分子機構と免疫との関わりについて研究を行い、卵巣癌において、免疫逃避機構が腫瘍進展に重要な役割を果たしていることを報告してきた。特に、マウスモデルで、

微小環境の分泌分子を操作し免疫抑制を解除することができることを報告した。また、免疫抑制分子 PD-L1 が腹水中で卵巣癌細胞に発現し、リンパ球上の受容体 PD-1 を介して細胞傷害性リンパ球 (CTL) の機能を低下させ、腹膜播種を促進することを報告した。この結果を踏まえ、抗 PD-1 抗体による卵巣癌の新規免疫療法の医師主導治験を行った。本治験で PD-1 抗体 Nivolumab は再発卵巣癌に対し異例の高い奏効率・腫瘍制御率を得た。今後卵巣癌における臨床応用が強く期待される。このように、腫瘍の免疫逃避は卵巣癌の予後に強く影響していて、免疫逃避機構を抑えることが予後不良の卵巣癌の治療法となる可能性がある。

(4) 卵巣癌と MDSC

癌の免疫逃避機構の一つに、MDSC (骨髄由来抑制性細胞) の誘導がある。MDSC は、悪性腫瘍や炎症の存在下で、未熟な状態の骨髄球が末梢に出てきたものであると考えられている。MDSC は免疫抑制性のサイトカインや表面分子を発現し、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の機能を抑制して、腫瘍の免疫逃避を助けていることが知られている。卵巣癌における MDSC の働きはこれまであまり解明されていなかったが、我々は、90 例の卵巣癌の腹膜播種の臨床サンプルを用いて、免疫染色および遺伝子発現マイクロアレイにより、MDSC の腫瘍内浸潤を解析した。すると、腫瘍内 MDSC の多い症例では、腫瘍内リンパ球が少なく、予後が悪いくわかった。すなわち、MDSC は、卵巣癌腹膜播種においても、癌の免疫逃避機構に深く関わっていることが示唆されるが、ヒトで MDSC を直接減少させる方法はこれまで報告されていない。マウスの実験系においても、MDSC を直接減らして抗腫瘍効果を示すことができた報告は非常に少なく、MDSC そのものを標的とした治療法の開発にはまだ成功していない。

(5) MDSC と VEGF

本研究を申請するにあたり予備実験を行い、卵巣癌腹膜播種臨床サンプルの免疫染色を行ったところ、MDSC の浸潤が多い症例ほど、VEGF の発現が高いことがわかった。また、マウス卵巣癌細胞株 ID8 に VEGF を強制発現し免疫正常マウスに接種すると、コントロールの ID8 に比べて早期に腹膜播種を形成したが、その播種巣には MDSC の浸潤が有意に多くなっていた。逆に、VEGF を発現抑制した株では、MDSC 浸潤も抑えられていた。腫瘍内 MDSC を抽出し活性化リンパ球と共培養すると、リンパ球の増殖が抑制された。また、マウスの骨髓細胞に ID8 の培養上清を加えて培養することで、MDSC が産生されるが、VEGF の投与によって MDSC 産生が促進され、抗 VEGF 抗体投与によって MDSC 産生が抑制されることを見出した。以上の予備実験の結果から、VEGF は、腫瘍血管新生に働くのみならず、MDSC 産生を促進させ、腫瘍内の MDSC を増やすことによっても、腹膜播種巣の増大に働くことが示唆される。

(6)ベバシズマブ耐性の機序

我々は、抗マウス VEGF 抗体を入手し、予備実験として、卵巣癌腹膜播種モデルマウスへの投与実験を行った。VEGF 抗体はマウス体内の VEGF を低下させるので、MDSC も減少することが予想された。ところが、抗体投与により、血管新生の抑制作用がみられるものの、抗 VEGF 抗体投与回数に比例して逆に腫瘍内の MDSC の数が増えていくことがわかった。その結果、腫瘍内 CTL 浸潤も減少し、免疫正常マウスでは、抗体投与による治療効果は限定的であった。この、VEGF 抗体による腫瘍内 MDSC の著増は、ベバシズマブ耐性に関与している可能性が高い。卵巣癌臨床症例においても、TCGA マイクロアレイデータで抗腫瘍免疫が強く働いていると考えられている「immunoreactive」と呼ばれる群に分類された症例では、ベバシズマブによる治療効果がみられにくい、という臨床試験の解析結果が

2014 年 ASCO で注目を浴びた。腫瘍血管新生の抑制・低酸素などの環境で上昇する免疫抑制分子が MDSC 増加を介してベバシズマブの耐性機序に関わっている可能性が示唆される結果であり、この分子は有力な治療標的となり得る。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、ベバシズマブの耐性を克服する、卵巣癌の新規免疫療法を開発することである。そのために、以下の点を明らかにする。

(1)抗 VEGF 抗体投与により卵巣癌微小環境において発現し、MDSC を誘導することで免疫逃避能を獲得する分子を同定し、動物実験を行い、MDSC を標的とした新規免疫療法を開発する臨床試験へとつなげる。

(2)臨床サンプルを用いて、上記分子の症例間の発現変化や MDSC 数等の免疫マーカーとの関連を解析することにより、ベバシズマブ耐性と抗腫瘍免疫との関わりを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)マウス卵巣癌モデルを用いた抗 VEGF 抗体投与による治療実験

免疫正常マウスに腫瘍ができるマウス卵巣癌細胞株 HM-1 を同系の B6C3F1 マウスに接種し、抗マウス VEGF 抗体を投与し、腫瘍の増大を観察する。

で作成した抗 VEGF 抗体耐性マウス皮下腫瘍における、局所の免疫細胞浸潤および低酸素状態を解析する。解析にはフローサイトメトリーおよび免疫染色、発現マイクロアレイの手法を用いる。

で作成した腫瘍のサイトカインアレイを行い、抗 VEGF 抗体投与により増加するサイトカインを同定する。

(2) 卵巣癌細胞株を低酸素条件下で培養し、ウェスタンブロット法や定量 PCR 法で(1) で同定したサイトカインが増加するかどうかを確認する。

(3) 同定したサイトカインによりマウス MDSC の産生量や免疫抑制能が変化することを T 細胞増殖抑制アッセイで明らかにする。

(4) マウス卵巣癌モデルを用いた抗 VEGF 抗体および抗 GM-CSF 抗体の併用治療実験

上記で用いたマウスモデルに抗マウス VEGF 抗体と抗マウス GM-CSF 抗体を併用投与し、腫瘍の増大を観察する。

併用治療およびそれぞれの単独治療後の腫瘍内の MDSC 数をフローサイトメトリーで解析する。

(5) 卵巣癌臨床サンプルの免疫染色を行い、ベバシズマブ投与前後の免疫状態の変化を明らかにする。

4. 研究成果

(1)

マウス卵巣癌皮下腫瘍モデルと腹膜播種モデルを作成し、抗マウス VEGF 抗体を投与する治療実験を行ったところ、皮下腫瘍モデル・腹膜播種腫瘍モデルともに、コントロール群と比べて腫瘍増大は抑制されたが、時間がたつと、腫瘍は治療抵抗性に増大することがわかった。

の抗 VEGF 抗体耐性腫瘍を免疫染色およびフローサイトメトリーで解析したところ、抗 VEGF 抗体耐性腫瘍では MDSC が増加、CD8 陽性 T 細胞が減少していた。

また、低酸素マーカーピモニダゾールの免疫染色法により、腫瘍局所の低酸素領域を調べたところ、抗 VEGF 抗体耐性腫瘍では低酸素領域が増加していることがわかった。また、抗 VEGF 抗体投与腫瘍とコントロール腫瘍を

発現マイクロアレイで解析したところ、抗 VEGF 抗体投与群では NF- κ B 経路や低酸素経路の遺伝子群が発現亢進していることがわかった。

腫瘍をすりつぶした液を用いてサイトカインアレイを行ったところ、抗 VEGF 抗体耐性腫瘍では GM-CSF が発現上昇していることが確認された。

(2) マウス卵巣癌細胞株 HM-1 を低酸素条件下で培養したところ、定量 PCR 法で、GM-CSF をはじめとするいくつかのサイトカイン・ケモカインの上昇が認められた。

また、ウェスタンブロット法で、ヒト卵巣癌細胞株 SKOV3 およびマウス卵巣癌細胞株 HM-1 両者を用いて、低酸素条件下では、GM-CSF が発現上昇することを確認した。

(3) GM-CSF を添加すると、マウス骨髄細胞からの MDSC 産生が促進された。また、GM-CSF 存在下で骨髄から作成した MDSC は、添加していない場合に比べて、より強く T リンパ球の分裂を抑制した。

(4)

マウス卵巣癌皮下腫瘍モデルを用いて、抗 VEGF 抗体および抗 GM-CSF 抗体の併用治療実験を行った結果、両者を併用した群で腫瘍増殖が抑制された。

両者併用治療群の腫瘍と単独治療群の腫瘍や無治療コントロール腫瘍内に浸潤する MDSC をフローサイトメトリーで比較したところ、抗 VEGF 抗体治療では腫瘍内の MDSC が増加し、抗 GM-CSF 抗体との併用によって MDSC の増加は打ち消された。

(5) ベバシズマブ治療前後の卵巣癌臨床サンプルの免疫染色を行ったところ、ベバシズマブ投与後のサンプルでは低酸素マーカーである HIF1 の増加、GM-CSF の増加、MDSC の増加、CD8 陽性細胞の減少が認められた。

以上より、抗 VEGF 抗体治療抵抗性には低酸素により誘導される GM-CSF によって MDSC の産生と免疫抑制能の亢進が関与している

ことが明らかとなった。

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)

[雑誌論文](計 1 件)

Horikawa N, Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Baba T, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Koshiyama M, Konishi I, Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Ovarian Cancer Inhibits Tumor Immunity through the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells, Clin Cancer Res., 査読あり、23(2) 2017: p587-599.

DOI:10.1158/1078-0432.CCR-16-0387

[学会発表](計 5 件)

Naoki Horikawa, Kaoru Abiko, Junzo Hamanishi, Tsukasa Baba, Ken Yamaguchi, Ikuo Konishi, Noriomi Matsumura, “VEGF in ovarian cancer suppresses T cell activity by eliciting Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) into tumor microenvironment”, 16th Biennial meeting of the International Gynecological Cancer Society, 2016/10/29, リスボン(ポルトガル)

堀川直城、安彦郁、濱西潤三、馬場長、山口建、吉岡弓子、小西郁生、松村謙臣、
「卵巢癌における抗 VEGF 抗体耐性には、低酸素誘導性の MDSC 浸潤が関与する」、
第 75 回日本癌学会学術総会、2016/10/6-8、
パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市、横浜市)

堀川直城、安彦郁、松村謙臣、
「卵巢癌における抗 VEGF 抗体耐性には、低酸素誘導性の MDSC 浸潤が関与する」、

第 32 回京都在がん研究会、2016/9/16、京都教育文化センター(京都府・京都市)

安彦郁、堀川直城、濱西潤三、村上隆介、山口建、馬場長、万代昌紀、松村謙臣、
「卵巢がんの免疫逃避機構を克服する～PD-L1 から VEGF へ 癌細胞との知恵比べ～」
島根大学産婦人科セミナー、2016.11.8、島根大学(島根県・出雲市)

安彦 郁、堀川直城、滝 真奈、濱西潤三、村上隆介、山口 建、馬場 長、松村謙臣、万代昌紀、
「卵巢癌の免疫逃避機構を克服する～PD-L1 から VEGF、EMT 研究へ 癌細胞との知恵比べ～」
2017 年兵庫温知会特別講演会、2017/1/14、
神戸医療センター中央病院(兵庫県・神戸市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

安彦 郁 (ABIKO, Kaoru)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20508246