

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10179

研究課題名(和文) 免疫チェックポイント薬と局所免疫の併用による悪性黒色腫の治療

研究課題名(英文) The treatment of malignant melanoma with the combination of immunosuppressant inhibitors and local immunotherapy

研究代表者

門野 岳史 (Kadono, Takafumi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：80292910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：悪性黒色腫に対する治療として免疫チェックポイント阻害薬は画期的な効果を示したが、効果を示すのは3割程度に過ぎない。免疫チェックポイント阻害薬との相乗効果を期待して局所免疫の併用による悪性黒色腫に対する治療効果を検討した。悪性黒色腫細胞をマウス背部に注射し、腫瘍が形成された段階で、免疫チェックポイント阻害薬である抗PD-1抗体もしくは抗CTLA-4抗体を腹腔内に投与した。それに加えて、腫瘍局所に異種の免疫グロブリンを注射し、さらに、免疫を賦活化するpoly ICを加えることで、一層の腫瘍抑制効果を示した。こうした腫瘍抑制効果は、IL-6の増加及びIL-10の低下を反映していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性黒色腫に対する治療として免疫チェックポイント阻害薬が用いられるが、全ての患者さんに効果を示すわけではなく、種々の併用療法が模索されている。今回の研究で、免疫チェックポイント阻害薬に加えて局所免疫療法として異種の免疫グロブリンと免疫賦活薬を加えることで、抗腫瘍効果が高まることが判った。今回の動物実験の結果を人に応用することで、より効果的な免疫チェックポイント阻害薬を活用した悪性黒色腫の治療に繋がる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although immunosuppressant inhibitors have revealed unprecedented therapeutic effect for malignant melanoma, they are effective for only 30% of the patients. To synergistically enhance the effect of immunosuppressant inhibitors, we added local immunotherapy against melanoma and examined its therapeutic effect. Melanoma cells were injected into the back of the mice. After the tumor was formed, immunosuppressant inhibitors, such as anti-PD-1 antibodies and anti-CTLA-4 antibodies were intraperitoneally administered concomitant with local injection of allogeneic immunoglobulins and poly IC, an immuno-stimulator. This therapy significantly retarded the tumor growth, and this tumor growth inhibition was mediated by the increase of IL-6 and the decrease of IL-10.

研究分野：皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫 PD-1 CTLA-4 poly IC

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は近年本邦で増加傾向の見られる悪性腫瘍で、死亡数は増加の一途を辿っている。外科的切除が治療の原則であるが、進行期に対する治療は困難であり、化学療法や放射線療法の効果も限定的である。近年、抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体が免疫チェックポイント阻害薬として華々しく登場し、一定の治療効果を挙げているものの、抗 PD-1 抗体を使用した場合の無増悪生存期間が 5-6 ヶ月、抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体を併用しても無増悪生存期間が 11 ヶ月程度に止まり、未だ 1 年弱の延命効果が得られる程度にとどまっている。

悪性黒色腫は他の癌腫と比べると比較的免疫療法が効果を挙げやすいとされている。PD-1 は免疫を負に制御する分子で、主に活性化した CD8 陽性 T 細胞の抑制に重要と考えられている。抗 PD-1 抗体はこれらの CD8 陽性 T 細胞を再活性化することにより、腫瘍免疫を高めると考えられており、抗 PD-1 抗体が効果を発揮するためには、活性化が抑えられた腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞が存在することが重要とされている。従って、抗 PD-1 抗体による治療は新しい腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞を生み出すというよりは、既に存在するが抑制のかかった腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞を再活性化することにより働くと考えられている。一方の、CTLA-4 も免疫を負に制御する分子であるが、こちらは新たに活性化 T 細胞が形成される際に重要である共刺激分子の CD28 を抑制することによって免疫を制御する。従って、抗 CTLA-4 抗体は主に新しく腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞を生み出すことによって効果を発揮すると考えられている。

これら免疫チェックポイント薬の欠点としては、PD-1 および CTLA-4 は免疫全般に働き、腫瘍特異的に働くとは言いがたいことである。従って、抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体の治療により、免疫が全般的に活性化する結果、副作用として様々な自己免疫性疾患が誘発される。

免疫療法の一つの柱を免疫チェックポイント薬とするならば、もう一つの柱は腫瘍ワクチンと考えられる。悪性黒色腫に対する腫瘍ワクチンは様々なものが試みられ、腫瘍抗原である MAGE-A3 を標的としたもの、GM-CSF 産生悪性黒色腫細胞やアロの悪性黒色腫細胞を使ったものなどが知られているが効果は満足のいくものとは言いがたい。悪性黒色腫に比較的特異的な gp100 を用いたペプチドワクチンも用いられ、抗 CTLA-4 抗体との併用も試みられたが、ペプチドワクチンの効果は限定的であった。しかしながら、腫瘍ワクチンなどといった悪性黒色腫腫瘍細胞により特異的に働く治療と、免疫に対して普遍的に働く免疫チェックポイント薬との併用は、相乗効果が期待できるとともにまだまだ改善の余地があると考えられる。

腫瘍に対する免疫を増強する方策として、対象をある特定の抗原に絞るか、それとも不特定多数の抗原を目標とするかという 2 つの方策が考えられる。特定の抗原に絞る例としては上記の MAGE-A3 や gp100 といったワクチン、また免疫とは少しずれるが BRAFV600E に対する vemurafenib が挙げられる。これらに対する反応は腫瘍細胞に対して極めて選択的に働くが、逆にその抗原が消失したり、別の変異が生じたりすることにより、無効となる。不特定多数の抗原を狙う場合は効率が悪いとか、腫瘍に対する特異性が劣るといった問題がある。しかしながら、悪性黒色腫細胞 B6F10 担癌マウスにおいて、遺伝子変異に伴う neoepitope の 30% に対して、免疫応答が起こっていることを鑑みると (Kreiter S, et al. Nature 2015)、不特定多数の抗原を標的として、多様な抗腫瘍免疫を誘導する手法がより有効なのではと考えられる。

免疫チェックポイント薬との併用で相乗効果が期待できる治療には幾つかの候補があげられる。一つはアロの免疫グロブリンを腫瘍局所に投与すること、もう一つはイミキモドの局所外用を行うことである。

近年、アロの免疫グロブリン、ことに IgG 分画を腫瘍内に投与することで、腫瘍免疫が増強することが B16 悪性黒色腫細胞の系を用いて示された (Carmi Y, et al. Nature 2015)。アロの免疫グロブリンは自己の免疫グロブリンよりも選択的に腫瘍細胞に結合し、Fc レセプターを介して樹状細胞を活性化させることにより効果を発揮すると考えられる。これらの免疫増強は比較的腫瘍に選択的であることが考えられ、免疫チェックポイント薬との併用が功を奏することが期待できる。

もう一つはイミキモドの腫瘍局所外用である。イミキモドは TLR7 もしくは TLR8 を介して局所における I 型インターフェロンの産生を誘導する。I 型インターフェロンは抗原提示を含め、多様な免疫調節作用を有し、外用によって腫瘍局所における免疫応答を増強することで、ある程度選択的に腫瘍免疫を誘導すると考えられる。実際早期で上皮内の悪性黒色腫に対して一定の臨床効果を上げることが報告されている。

今回、腫瘍局所に着目し、腫瘍局所に種々の操作を加えることで抗原提示を高め、悪性黒色腫腫瘍細胞に対してより特異的に腫瘍免疫を誘導することを狙い、本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗 PD-1 抗体もしくは抗 CTLA-4 抗体を悪性黒色腫担癌マウスに使用する系を用いて、これら免疫チェックポイント薬と相乗的に働くものを探索することである。本研究では B16 悪性黒色腫細胞を C57BL/6 マウスの背部に皮内注射を行う。腫瘍が形成された後、抗 PD-1 抗体もしくは抗 CTLA-4 抗体を投与する。これに加えて、アロの免疫グロブリンの腫瘍内注射、イミキモドの腫瘍局所への外用などといった局所における腫瘍免疫の誘導を行い、相乗効果がみられるかどうかについてマウスの腫瘍の大きさを比較することにより検討を行う。また、その際にどのような現象が起こっているのかについて、免疫組織学的検討、局所のサイトカイン産生などを検討し、具体的な機序についての検討を行う。

3. 研究の方法

1) マウスの悪性黒色腫モデル

本研究に必要なマウスは野生型マウスである C57BL/6 マウスであり、日本エスエルシーより随時購入し、聖マリアンナ医科大学動物実験施設にて飼育を行った。また、アロのマウスとしては Balb/c を用いた。悪性黒色腫細胞としては B16 を用いた。B16 は C57BL/6 マウスに生着し、Balb/c マウスでは拒絶される。一般的には免疫原性は高くないとされる。腫瘍の発育速度を考慮して B16F1 で行った。実験には 7~12 週齢のマウスを用いた。2x10⁵ の腫瘍細胞を PBS に懸濁し、マウスの背部に皮内注射した。腫瘍の大きさが 9-25mm² に達した段階から治療を開始した。抗 PD-1 抗体 (RMP1-14) もしくは抗 CTLA-4 抗体 (9H10) 各々 5mg/kg の量を 5 日間隔で腹腔内に 2 回投与した。腫瘍局所に対しては 200 µg のアロもしくは同種の免疫グロブリンを 2 日間隔で腫瘍部に 2 回局注した。イミキモドを用いる場合は 5% イミキモドクリームを連日腫瘍部に外用した。腫瘍の測定は適宜 caliper を用いて行った。また、アロの免疫グロブリンに関しては、B16 で免疫した Balb/c マウスより血清もしくは免疫グロブリンを回収し、これを担癌 C57BL/6 マウスの腫瘍内に注射した。

2) 悪性黒色腫病変の組織学的検討

悪性黒色腫細胞を背部に接種して 3 週間の時点で、背部の腫瘍を全層性に採取した。組織を半割し、一方を 3.5% パラホルムアルデヒドで固定し、次いでパラフィンで包埋した。6 µm の厚さのセクションを作り、H&E 染色を行った。すべてのセクションは腫瘍の中心部より切り出した。好中球、リンパ球、組織球に関しては浸潤細胞数を、400 倍の拡大で、9 カ所の視野をランダムに選び、その中の細胞数をカウントした平均値について解析を行った。9 カ所の視野のうち、6 カ所は腫瘍辺縁から選び、残りの 3 カ所は腫瘍の中央から選んだ。また、トルイジンブルー染色によって肥満細胞を同定し、その数を同様に測定した。腫瘍組織半割した残りは凍結し、免疫組織学的解析を行った。凍結組織から 6 µm の厚さの切片を作り、アセトン固定し、phosphate-buffered saline (PBS) で希釈した 10% 正常ウサギ血清と 37 °C、10 分間反応させ、非特異的な染色をブロックした。切片は次いでマクロファージ特異的な抗体である F4/80、抗 CD4 抗体 (RM4-5)、抗 CD8 抗体 (53-6.7)、抗 CD11c 抗体 (HL3) と室温で 1 時間反応させた。また、抗 PD-1 抗体を用いた場合、PD-1 のリガンドが腫瘍に発現するかが予後因子として、知られているため抗 PD-L1 抗体 (10F.9G2) および抗 PD-L2 抗体 (TY25) による染色を行なった。非特異的染色のためのコントロールとしてラット免疫グロブリン G を用いた。切片は次いでビオチン化ウサギ抗ラット免疫グロブリン G 二次抗体と室温で、20 分間反応させた。次いで、horseradish peroxidase 標識アビディン-ビオチン複合体と反応させた。各反応間で、切片は PBS で 3 回洗浄を行った。切片を 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride と hydrogen peroxide と反応させることによって発色させた。また、メチルグリーンで counterstain を行い、各種浸潤細胞数を前述の方法で測定した。

3) 悪性黒色腫腫瘍病変に浸潤する炎症細胞のフローサイトメトリーによる検討

悪性黒色腫細胞を背部に接種して 21 日後に、腫瘍組織を採取した。組織を細かく裁断し、0.27% collagenase D、3000 IU/ml dispase、0.125% hyaluronidase、0.01% DNase を 10% FBS 入り RPMI1640 に加え、37 °C、2 時間 incubate した。この溶液をナイロンメッシュに通し、細胞を回収した。細胞は蛍光色素で標識した前述の抗体を用い、4 °C、30 分間反応させ、フローサイトメトリーにて解析した。

4) Real-time PCR によるサイトカイン、細胞成長分子の mRNA 発現の定量的解析

悪性黒色腫細胞を背部に接種して 21 日後の腫瘍組織におけるサイトカイン、細胞成長分子の mRNA 発現を real-time PCR 法にて定量的に測定した。全 RNA を凍結皮膚組織より QIAGEN RNeasy spin column (QIAGEN 社) を用いて単離した。RNA はその後 cDNA に Reverse Transcription System (Promega 社) にて逆転写した。プライマーとプローブは Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents (Applied Biosystems) にてデザインした。Real-time PCR を ABI Prism 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems) を用いて行った。GAPDH を用いて mRNA を標準化し、GAPDH PCR 産物と比較して、ターゲットとなる転写産物の相対発現量を $\Delta\Delta Ct$ method にて算出した。それぞれのサンプルは triplicate で流し、平均の Ct を解析に使用した。

4. 研究成果

B16F1 悪性黒色腫細胞を C57BL/6 マウス背部に打ち、腫瘍が形成された段階で、抗 PD-1 抗体もしくは抗 CTLA-4 抗体を 10mg/kg 腹腔内に 2 回投与し、これら免疫チェックポイント阻害薬に加えて、腫瘍局所に異種もしくは同種の免疫グロブリンを注射し相乗効果が得られるかどうかについて検討を行った。免疫チェックポイント阻害薬単独で使用した場合は、抗 PD-1 抗体の方が抗 CTLA-4 抗体よりも良好な結果が得られたため、以降は抗 PD-1 抗体を主に用いた。これに腫瘍局所に異種の免疫グロブリンを注射したところ、やや腫瘍の成長が抑制される結果が得られたが、明らかな差が出るころまでは到達しなかった。次に、poly IC の局所注射やイミキモド外用もしくは局所注射を組み合わせ、どの組み合わせが最適かについての検討を継続した。イミキモド外用もしくは局所注射を加えた場合には相乗効果は確認できなかったが、抗 PD-1 抗体腹腔内投与、異種免疫グロブリン及び poly IC 局所注射を加えることで、一層の腫瘍抑制効果が見られた。

これらのマウスより腫瘍組織を取り出し、CD4 や CD 8、さらには Gr-1 及び F4/80 を用いた免疫染色を行い、浸潤細胞のプロファイルについて検討を行った。浸潤細胞数は腫瘍の大きさに影響を受けるため、腫瘍の大きさを揃えて数値化したところ、抗 PD-1 抗体腹腔内投与、異種免疫グロブリン及び poly IC 局所注射を加えることで、腫瘍周囲の CD4 や CD 8 及び F4/80 陽性細胞が増加していた。さらに追加で免疫染色を行なったが、あまり明確な結果は得られなかった。抗 PD-L1 抗体および抗 PD-L 2 抗体を用いた染色も試みたがあまり明確な結果は得られなかった。

さらに、腫瘍局所の組織より、TNF- α 、IL-6、IL-10 といった各種サイトカインの real-time PCR を行った。IL-10 に関しては抗腫瘍効果が高い場合に発現が低下し、IL-6 が増加していた。また、IL-10 に関しては血清中の IL-10 を ELISA で測定したところ、抗腫瘍効果が高い場合に低値を示した。これらの結果より、抗 PD-1 抗体もしくは抗 CTLA-4 抗体に加えてアロ免疫グロブリン、さらに、poly IC を加えることで、IL-6 の増加及び IL-10 の低下により腫瘍抑制効果が増強したことが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miura S, Asano Y, Saigusa R, Yamashita T, Taniguchi T, Takahashi T, Ichimura Y, Toyama T, Yoshizaki A, Sato S, Kadono T	4. 巻 97
2. 論文標題 Regulation of skin fibrosis by RALDH1-producing dermal dendritic cells via retinoic acid-mediated regulatory T cell induction: A role in scleroderma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci	6. 最初と最後の頁 125-134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2020.01.002	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 -

1. 著者名 Hau CS, Shimizu T, Tada Y, Kamata M, Takeoka S, Shibata S, Mitsui A, Asano Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S, Watanabe S	4. 巻 92
2. 論文標題 The vitamin D3 analog, maxacalcitol, reduces psoriasiform skin inflammation by inducing regulatory T cells and downregulating IL-23 and IL-17 production.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Dermatol Sci	6. 最初と最後の頁 117-126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdermsci.2018.08.007	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 -

1. 著者名 Taniguchi T, Miyagawa T, Tamaki Z, Nakamura K, Yamashita T, Saigusa R, Takahashi T, Toyama T, Ichimura Y, Yoshizaki A, Tada Y, Sugaya M, Kadono T, Sato S, Asano Y	4. 巻 309
2. 論文標題 A possible implication of reduced levels of LIF, LIFR, and gp130 in vasculopathy related to systemic sclerosis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arch Dermatol Res	6. 最初と最後の頁 833-842
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00403-017-1786-4	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3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 門野岳史
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬による免疫関連副作用の実際
3. 学会等名 第44回日本臨床免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 門野岳史
2. 発表標題 悪性黒色腫 Up to Date
3. 学会等名 神奈川県皮膚科医会総会・第160回例会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 門野岳史
2. 発表標題 メラノーマ
3. 学会等名 第228回日本皮膚科学会熊本地方会（招待講演）
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
--	---------------------------	-----------------------	----