

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15708

研究課題名(和文) 卵巣癌に対する統合的がん免疫ゲノミクス解析に基づく新規がん治療開発の基礎的検討

研究課題名(英文) A basic study of a new therapy based on an integrated cancer immune-genomic analysis for ovarian cancer

研究代表者

越山 雅文(Koshiyama, Masafumi)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：50724390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌臨床検体を用いて病態の変化や治療前後でのT細胞解析を行い、T細胞の免疫状態の多様性の変化と治療効果とが一定の相関を示すことが分かった。マウス卵巣癌腹膜播種モデルを用いて、病態の変化や抗がん剤投与前後での変化を解析しこれらを比較解析により免疫学的因子としてB7ファミリーの特定の分子を同定した。これらを標的とし遺伝子発現導入した卵巣癌細胞株に対するT細胞を共培養したところ、免疫抑制活性を示した。さらに同因子発現を抑制をしたり中和抗体により阻害すると、T細胞は再活性化した。マウス卵巣癌 *in vivo* モデルでも *in vitro* 同様に免疫抑制を示し、抗体による阻害実験で生存期間の延長が確認できた。

研究成果の概要(英文)：Using an ovarian cancer surgical specimen, we analyzed the pathologic changes and performed a T cell analysis before and after treatment. We recognized a consistent correlation between the changes in the T cell immunity state and the curative effect. Furthermore, we also identified specific molecules of the B7 family as immunologic factors, by comparing the pathologic changes before and after treatment with anticancer drugs using a mouse model of ovarian cancer peritoneum dissemination. We recognized that co-cultivating T cells for ovarian cancer cells expressing each gene induced these targets showed immunosuppressive activity. In addition, the T cells were re-activated when we suppressed the B7 family expression and inhibited the expression using a neutralizing antibody. In our *in vitro* mouse model of ovarian cancer, we demonstrated immunosuppressive activity similar to that observed *in vitro* and confirmed the prolonged survival by inhibition experiments using its antibody.

研究分野：婦人科癌治療

キーワード：免疫ゲノミクス解析 機能ゲノム解析 がん免疫機構 T細胞解析 卵巣癌腹膜播種モデル B7ファミリー PD-1抗体 PD-L1抗体

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は、半数以上が進行がんで診断され、その60%以上が再発しその多くが抗がん薬抵抗性となるため、婦人科がんの中で最も予後不良であり、新たな治療戦略が求められている。近年の分子生物学の発展により、がん細胞が免疫細胞の攻撃から逃れる「がん免疫逃避機構」の存在が明らかとなり、同機構を標的とした新しいがん治療が注目されている。

2. 研究の目的

本研究では、卵巣癌の進行や抗がん治療によって、腫瘍微小環境のなかでもがん免疫機構がどのように変化するかを、オミックス解析として統合的にがんゲノム解析をがん細胞と免疫細胞にわけてそれぞれ網羅的遺伝子変異解析Mutanome解析および、免疫細胞レパトア解析Immunome解析および網羅的遺伝子発現解析により解明し、同解析から得られるがん新規抗原 (neo-antigen) 候補を探索し、卵巣癌に対する新しい治療開発の基礎的検討を行うことを目的として主にヒト検体を用いた基礎研究を進めている。

今回の研究の主な目的は、(1) 卵巣癌臨床検体を用いて、病態の変化や治療の前後でのT細胞レパトア解析を行い、免疫状態の変化と治療効果や生存期間などの様々な臨床情報との関連を検討する。(2) マウス卵巣癌腹膜播種モデルを用いて、病態の変化や抗がん薬投与前後での変化を解析し(3)(1)(2)の比較解析により得たがん新規抗原による新しい治療法開発の基礎的検討を行うことである。

今回の研究の意義は、卵巣癌に対する宿主免疫の詳細な変化をモニタリングすることにより、現行の抗がん薬や分子標的薬とは異なる新たながん治療が生まれることが期待できる。また本研究では、従来の共通抗原を標的とする治療では不可能であった究極の個別化治療に繋がる可能性が期待できる。

(

3. 研究の方法

卵巣癌の臨床検体を用いた病態や抗がん薬治療前後でのImmunome解析による免疫変化の解明や卵巣癌患者の手術・生検標本・がん性腹水および末梢血を用いた次世代T細胞レパトア解析(NTR解析)を、抗がん薬治療前後や再発の前後などの複数のタイムポイントで行い、病態の変化や抗がん薬投与による全身あるいは局所のT細胞免疫の状態の変化(T細胞クローン数の多様性とその定量による評価)を解析する。さらに同解析と抗がん薬の治療効果や生存期間との関連性について検討する。

マウス卵巣癌腹膜播種モデルの病態変化におけるImmunome解析による免疫変化の解明、C57BL/6マウスに同系由来の卵巣癌細胞株ID8を腹腔内投与により卵巣癌腹膜播種モデルを作成し、腹膜播種および癌性腹水形成に合わせて継時的に採血を行い、腫瘍や末梢血液のNTR解析を行う。さらに検討群を増やして、複数のタイムポイントで継時的に腹膜播種巣・がん性腹水・脾臓細胞を用いてNTR解析を行い、病態変化に伴う全身および局所のT細胞免疫の状態(多様性)の変化について検討する。

マウス卵巣癌腹膜播種モデルの抗がん薬投与によるImmunome解析による免疫変化の解明腹膜播種モデルを用いて、それぞれに抗がん薬(Paclitaxel, Carboplatin, Gemcitabineなど)を用いて、治療前後での腹膜播種病変や癌性腹水、脾臓、末梢血を用いて、複数のタイムポイントでNTR解析を行い、がん治療に伴うT細胞免疫の多様性についてその変化や生存期間、薬剤感受性との関連性を検討する。

卵巣癌の腫瘍検体を用いたMutanomeを含むゲノム解析による変異遺伝子の探索次世代シーケンス技術を用いて、腫瘍組織の網羅的変異遺伝子解析(Mutanome解析)を行い、～のNTR解析(Immunome)で推定されたがん新規抗原(変異抗原)候補との間で

の統合的解析（統合的免疫ゲノム解析）を行い、新たながん新規抗原（変異抗原）を同定する。

新たながん新規抗原の免疫応答の確認と新規がん治療開発の基礎的検討

同定した新規がん抗原(変異抗原)を合成し、患者末梢血単核球による免疫活性や同免疫反応の際に生じる免疫抑制因子の解明を行う。さらにヒト卵巣癌を異種移植した免疫不全マウスモデルを用いて、変異抗原単独投与による治療効果だけではなく、免疫抑制因子阻害薬(抗PD-1抗体など)との併用療法による、腫瘍縮小効果や生存期間の延長などを確認する。

4. 研究成果

本研究では、卵巣癌の進行や抗がん治療によって、腫瘍微小環境のなかでもがん免疫機構がどのように変化するかを、オミックス解析として統合的にがんゲノム解析をがん細胞と免疫細胞にわけてそれぞれ網羅的遺伝子変異解析Mutanome解析および、免疫細胞レパトア解析Immunome解析および網羅的遺伝子発現解析により解明し、同解析から得られるがん新規抗原(neo-antigen)候補を探索し、卵巣癌に対する新しい治療開発の基礎的検討を行うことを目的として主にヒト検体を用いた基礎研究を進めている。

今回の研究の主な目的は、(1)卵巣癌臨床検体を用いて、病態の変化や治療の前後でのT細胞レパトア解析を行い、免疫状態の変化と治療効果や生存期間などの様々な臨床情報との関連を検討する。(2)マウス卵巣癌腹膜播種モデルを用いて、病態の変化や抗がん薬投与前後での変化を解析し(3)、(1)(2)の比較解析により得たがん新規抗原による新しい治療法開発の基礎的検討を行うことである。今回の研究の意義は、卵巣癌に対する宿主免疫の詳細な変化をモニタリングすることにより、現行の抗がん薬や分子標的薬とは異なる新たながん治療が生まれることが期

待できる。また本研究では、従来の共通抗原を標的とする治療では不可能であった究極の個別化治療に繋がる可能性が期待できる。

まずは卵巣癌臨床検体を用いて、病態の変化や治療の前後でのT細胞解析を行い、T細胞の免疫状態の多様性の変化と治療効果(臨床情報)とが一定の相関を示すことがわかった。さらにマウス卵巣癌腹膜播種モデルを用いて、病態の変化や抗がん薬投与前後での変化を解析しこれらを比較解析により免疫学的因子としてはB7ファミリーの特定の分子を同定した。

そこで、これらを標的としてそれぞれの遺伝子発現導入した卵巣癌細胞株に対するT細胞を共培養したところ、免疫抑制活性を示すことが分かった。さらに同因子発現抑制をしたり、さらに中和抗体により阻害を行うと、T細胞は再活性化することが分かった。またマウス卵巣癌 *in vivo* モデルにても、*in vitro* 同様に免疫抑制活性を示し、さらに抗体による阻害実験にて生存期間の延長が確認できた。今後は同因子の臨床検体での発現メカニズムや宿主免疫に対するモニタリングにより、治療(併用)時期の最適化など、さらなる臨床応用に向けた検討を行う予定であり、それらの成果は、従来のがん治療を補完する個別化治療に繋がる可能性が期待できる。

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4件)

Hamanishi J, Mandai M, Konishi I
Immune-checkpoint inhibition in ovarian cancer.

Int Immunol 28 2016, 339-348, 査読有

Mandai M, Hamanishi J, Abiko K,
Matsumura N, Baba T, Konishi I.
Anti-PD-L1/PD-1 immunne therapies in

ovarian cancer: basic mechanism and future clinical application. Int J Clin Oncol 21 2016, 456-461 査読有

Hamanishi J, Mandai M, Matsumura N, Abiko K, Baba T, Konishi I

PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. Int J Clin Oncol 21 2016, 462-473, 査読有

Koshiyama M

Potential efficacy of anti-PD-L1 antibody treatments for gynecologic cancers.

Women's Health open journal 査読有

3(3) 2017, e21-e23

Doi: 10.17140/WHOJ-3-e013

〔学会発表〕(計 10 件)

卵巣がんに対する抗 PD - 1 抗体の有効性と安全性

濱西順三、越山雅文、小西郁生

大阪大学大阪婦人科腫瘍研究会 平成 28 年 1 月 29 日、大阪市

Use of immunotherapy in platinum-resistant ovarian cancer..

Hamanishi J, Yoshioka Y, Abiko K, Koshiyama M, Konishi I

The 8th Asian Oncology Summit 2016, 3-6Mar, 2016, Kyoto

Combining chemotherapy, targeted agents and radiotherapy with immunotherapy.

Hamanishi J, Yoshioka Y, Abiko K, Koshiyama M, Konishi I.

Global Academic Programs of MD Anderson Cancer Center 2016, 27 Apr, 2016, San Paulo, Brazil

「卵巣癌ホルマリン固定組織由来の超微量 RNA を用いたシーケンスの可能性。

濱西潤三

イルミナゲノムサミット 2016、平成 28 年 6 月 1 日 東京

免疫チェックポイント PD-1 経路阻害薬の展望。 濱西潤三

第 26 回日本サイトメトリー学会、平成 28 年 7 月 23 日、福岡市

PD-1 signal inhibitors: Future perspective and issue.

Hamanishi J, Koshiyama M, Konishi I

The 24th Annual Meeting of Japanese Society of Medical Oncology.

28, Jul, 2016, Kobe

抗 PD-1 抗体ニボルマブ有効例に特徴的な遺伝子発現と B 細胞ればとアの症クローン性増幅は新たに効果予測バイオマーカーとなる。

第 75 回日本癌学会 平成 28 年 10 月 6 - 8 日、横浜市

濱西潤三、万代昌紀、松村謙臣、村上隆介、安彦郁、馬場長、山口建、小西郁生

卵巣癌における PD-L1/PD-1 を解した免疫逃避機構についての基礎検討。

安彦郁

第 3 回新潟産婦人科シンポジウム、平成 28 年 10 月 9 日、新潟市

卵巣がんに対する新規がん免疫治療への挑戦。

濱西潤三

第 9 回奈良婦人科腫瘍カンファレンス 平成 28 年 11 月 5 日、奈良市

Multi-omics analysis of anti-PD-1

antibody (Nivolumb) treated patients with ovarian cancer (PD-1 経路阻害薬に対するマルチオミクス解析とバイオマーカー探索). Hamanishi J, Koshiyama M
第 76 回日本癌学会学術総会 平成 29 年 9 月 28 日 パシフィコ横浜 神奈川県

〔図書〕(計 2 件)

濱西潤三

次世代のがん治療薬・診断のための研究開発
～免疫療法・遺伝子治療・がん幹細胞～
技術情報協会、2016

濱西潤三、万代昌紀、小西郁生

卵巣癌におけるがん免疫療法
Immuno-Oncology Up to date
がん免疫療法ハンドブック第 1 版、
メディカルレビュー社、2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越山 雅文(KOSHIYAMA, Masafumi)
京都大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号：5 0 7 2 4 3 9 0

(2) 研究分担者

吉岡 弓子(YOSHIOKA, Yumiko)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：1 0 4 0 2 9 1 8

安彦 郁(ABIKO, Kaoru)

京都大学・医学研究科・特定助教
研究者番号：2 0 5 0 8 2 4 6

濱西 潤三(HAMANISHI, Junzo)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号：8 0 3 7 8 7 3 6

小西 郁生(KONISHI, Ikuo)
京都大学・医学研究科・名誉教授
研究者番号：9 0 1 9 2 0 6 2