

令和 3 年 6 月 12 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09464

研究課題名(和文) 膵癌に対する線維化抑制ペプチドと膵癌特異的T細胞輸注併用免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of adoptive cell transfer using pancreatic cancer-specific genetically modified T cells combined with a desmoplasia-blocking peptide in pancreatic cancer

研究代表者

村橋 睦了(伊賀睦了)(Murahashi, Mutsunori)

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20422420

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)：線維化抑制ペプチドであるPatched1結合ペプチドが癌関連線維芽細胞(CAFs)におけるTGF- $\beta$ 1産生を減少させ、膵癌細胞のHLA-class Iの発現とリンパ球におけるIFN- $\gamma$ 産生を増大させることを見出した。免疫不全マウスに膵癌細胞株とCAFsを混合した皮下腫瘍を形成させ、ヒトリンパ球、抗-PD-1抗体、Patched1結合ペプチドを投与するマウス治療モデルを作製した。3剤併用群において、有意な腫瘍体積減少、癌浸潤CD3+Tリンパ球数増加を認めた。これらの結果は、Patched1結合ペプチドの直接的な抗腫瘍効果に加え、線維化軽減による免疫細胞増加が抗腫瘍効果を向上させることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の遺伝子異常に反応するTリンパ球の誘導は術後長期生存に貢献するとの報告があるが、線維成分を含む膵癌組織が免疫細胞のリクルートを阻害している可能性が指摘されており、我々は本研究においてその病態を証明した(Oyama Y, J Immunother. 2020)。この特徴的な病態を擬似した治療効果評価系の開発は、膵癌免疫療法開発を大きく前進させると考えられる。免疫細胞の抗腫瘍効果は三次元構造体での評価が必要であるが、実用的な治療評価系の開発が実現しないまま大きな課題であり続けている。この問題に対して、今後、我々は独自の細胞スフェロイド作製技術を応用して殺細胞効果評価系の臨床応用を目指していく。

研究成果の概要(英文)：We found that the anti-fibrosis peptide Patched 1 binding peptide reduces TGF- $\beta$ 1 production in cancer-related fibroblasts (CAFs) and increases HLA-class I expression in pancreatic cancer cells and IFN- $\gamma$  production in lymphocytes. We created a mouse treatment model in which immunodeficient mice were formed with a subcutaneous tumor mixed with a pancreatic cancer cell line and CAFs, and human lymphocytes, anti-PD-1 antibody, and Patched 1-binding peptide were administered. In the three-drug combination group, a significant decrease in tumor volume and an increase in the number of cancer-infiltrating CD3 + T lymphocytes were observed. These results indicate that, in addition to the direct antitumor effect of the Patched1-binding peptide, the increase in immune cells due to reduced fibrosis enhances the antitumor effect.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：膵癌 免疫治療 線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は腫瘍の中心に線維増生 desmoplasia とよばれる高度な線維化を伴っており、強い間質反応は局所浸潤、遠隔転移いずれにも認められ、癌細胞のみが単独で存在している像をみることはまれである。この線維増生は Hedgehog シグナルによって促進することが明らかにされており (Bailey JM, *Clin Cancer Res.* 2008) Olive らは Hedgehog 阻害剤の投与により膵癌間質が減少し、ゲムシタピンの腫瘍内への送達が改善されることを膵癌発生遺伝子改変マウスモデルを用いて報告した (Olive KP, *Science* 2009)。このように高度な線維化と Hedgehog シグナルの関与は膵癌における治療抵抗性のメカニズムの一つとして注目されてきた。

最近、多くの固形腫瘍において免疫チェックポイント阻害薬が有効性を示しているが、膵癌は同薬に抵抗性であることが明らかになりつつある (Royal RE, *J Immunother.* 2010; Brahmer JR, *N Engl J Med.* 2012)。すなわち、膵癌は「腫瘍に浸潤するリンパ球: tumor infiltrating lymphocytes (TILs)」に乏しく、その原因の一つとして Hedgehogシグナルが関与する線維増生によるTILsのリクルート阻害が予測されており、これと一致して膵癌動物モデルにおけるTCR導入Tリンパ球輸注の試みは治療抵抗性である (Stromnes IM, *Cancer Cell* 2015)。

最近、我々はこのHedgehogシグナルを抑制するペプチドを同定し、マウスモデルにおいて抗腫瘍効果を証明した (Nakamura M, *J Gastroenterol.* 2012)。本研究ではこのペプチドが膵癌における線維増生を阻害することを示し、同ペプチドを併用した免疫療法の開発を試みる。現在、免疫療法は対象癌のmutation loadと腫瘍に集積するTILs浸潤の程度によって最適なモダリティを選択する (Martin SD, *Ann Oncol.* 2015)。膵癌は低い mutation load から変異抗原特異的Tリンパ球の誘導は期待できず、Hedgehogシグナル抑制ペプチドによる線維増生の減少に引き続き、あらかじめ用意した腫瘍特異的Tリンパ球を併用することが合理的な戦略である。加えて免疫チェックポイント阻害薬の併用によりTリンパ球の抗腫瘍効果の持続が期待できる。

## 2. 研究の目的

Patched1 結合ペプチドの膵癌線維化、癌浸潤リンパ球、膵癌に対する免疫治療の効果に対する影響を評価し、その臨床応用の可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

膵癌細胞として膵癌細胞株 AsPC-1 および SUI-2、癌関連線維芽細胞 (CAF)、膵臓癌患者由来細胞株 YNPC 使用した。活性化リンパ球として、ヘルシードナーまたは PDAC 患者からの PBMC を使用した。NOD/SCID マウスを用いた皮下腫瘍移植モデルにおいて、Patched1 結合ペプチド、ニボルマブ、およびリンパ球を投与した。癌関連線維芽細胞 (CAF) を使用して Migration assay と WB による 細胞外マトリックス成分および TGFbeta1 の発現解析を行った。フローサイトメトリーを使用し癌細胞およびリンパ球に対するペプチドの免疫学的効果を検討した。癌細胞における HLA クラス II と PD-L1、HLA クラス I の発現および癌細胞と共培養されたリンパ球における IFN- の発現を評価した。膵癌細胞株 AsPC-1 および癌関連線維芽細胞 cancer-associated fibroblasts (CAFs)を混合し免疫不全マウスに皮下腫瘍を形成させ、ヒトリンパ球、抗 PD-1 抗体を腹腔内に投与、Patched1 結合ペプチドを腫瘍局所に投与するマウス動物モデルを作製し、治療による腫瘍の抑制効果、線維化の程度、癌浸潤 CD3+リンパ球数を評価した。

## 4. 研究成果

*in vitro* 実験により、線維化抑制ペプチドである Patched1 結合ペプチドが癌関連線維芽細胞 cancer-associated fibroblasts (CAFs) と膵癌細胞の増殖と遊走を阻害することを見出した。さらに同ペプチドは CAFs における細胞外マトリックスと TGF- $\beta$ 1 の産生を減少させ、膵癌細胞の HLA-ABC の発現とリンパ球における IFN- $\gamma$  産生を誘導した。上記の膵癌細胞株 AsPC-1 および CAFs を混合し免疫不全マウスに皮下腫瘍を形成させ、ヒトリンパ球、抗 PD-1 抗体を腹腔内に投与、Patched1 結合ペプチドを腫瘍局所に投与するマウス動物モデルを作製し、治療による腫瘍の抑制効果、線維化の程度、癌浸潤 CD3+リンパ球数を評価した。リンパ球輸注に Patched1 結合ペプチドおよび抗 PD-1 抗体投与を併用した群において、有意な腫瘍体積の減少、癌浸潤 CD3+T リンパ球数増加を認め、患者由来標的癌細胞と自己リンパ球を用いた実験においても同様の結果が得られた。これらの結果は、Patched1 結合ペプチドの直接的な抗腫瘍効果に加え、膵癌における線維化の減少により免疫細胞のリクルートを増大させ、結果として免疫療法の効果を向上させることを示している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Oyama Y, Onishi H, Koga S, Murahashi M, Ichimiya S, Nakayama K, Fujimura A, Kawamoto M, Imaizumi A, Umebayashi M, Ohuchida K, Morisaki T, Nakamura M.	4. 巻 43
2. 論文標題 1 Patched 1-interacting Peptide Represses Fibrosis in Pancreatic Cancer to Augment the Effectiveness of Immunotherapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Immunother.	6. 最初と最後の頁 121-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/CJI.0000000000000305.	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 Wang B, Ogata H, Takishima Y, Miyamoto S, Inoue H, Kuroda M, Yamada K, Hijikata Y, Murahashi M, Shimizu H, Okazaki T, Nakanishi Y, Tani K.	4. 巻 38
2. 論文標題 A Novel Combination Therapy for Human Oxaliplatin-resistant Colorectal Cancer Using Oxaliplatin and Cocksackievirus A11.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 6121-6126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.12963.	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 Onishi H, Ichimiya S, Yanai K, Umebayashi M, Nakamura K, Yamasaki A, Imaizumi A, Nagai S, Murahashi M, Ogata H, Morisaki T.	4. 巻 38
2. 論文標題 RBPJ and MAML3: Potential Therapeutic Targets for Small Cell Lung Cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 4543-4547
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.12758.	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 Shitaoka K, Hamana H, Kishi H, Hayakawa Y, Kobayashi E, Sukegawa K, Piao X, Lyu F, Nagata T, Sugiyama D, Nishikawa H, Tanemura A, Katayama I, Murahashi M, Takamatsu Y, Tani K, Ozawa T, Muraguchi A.	4. 巻 6
2. 論文標題 Identification of Tumoricidal TCRs from Tumor-Infiltrating Lymphocytes by Single-Cell Analysis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Res.	6. 最初と最後の頁 378-388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2326-6066.CIR-17-0489.	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 Kawamoto M, Onishi H, Koya N, Konomi H, Mitsugi K, Tanaka R, Motoshita J, Morisaki T, Nakamura M.	4. 巻 3
2. 論文標題 Stage IV gastric cancer successfully treated multidisciplinary therapy including immunotherapy: a case report.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Surg Case Rep	6. 最初と最後の頁 112-117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40792-017-0380-5	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 Murahashi M, Tsuruta T, Yamada K, Hijikata Y, Ogata H, Kishimoto J, Yoshimura S, Hikichi T, Nakanishi Y, Tani K.	4. 巻 41
2. 論文標題 Clinical Trial of a Cancer Vaccine Targeting VEGF and KIF20A in Advanced Biliary Tract Cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 1485-1496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.14907.	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12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 大山康博, 大西秀哉, 一宮脩, 中山和典, 藤村晶子, 川元真, 山崎章生, 村橋睦了, 中村雅史.
2. 発表標題 Ptc1結合ペプチドによる膵癌免疫治療奏効率向上の可能性.
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisanobu Ogata, Beibei Wang, Shoei Miyamoto, Yuto Takishima, Miyako Sagara, Mutsunori Murahashi, Hideya Onishi, Kenzaburo Tani.
2. 発表標題 Coxsackievirus A11 as a novel oncolytic viral therapy for human colorectal cancer
3. 学会等名 AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村橋 睦了, 大山 康博, 大西 秀哉, 一宮 脩, 中山 和典, 藤村 晶子, 川元 真, 山崎 章生, 中村 雅史.
2. 発表標題 Possibility for augmentation of responses by anti-PD-1 antibody against pancreatic cancer using Ptd1-binding peptide.
3. 学会等名 第11回日本血液疾患免疫療法学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村橋睦了, 鶴田敏久, 山田一成, 土方康基, 緒方久修, 岸本淳司, 船越公太, 戸高浩司, 中西洋一, 谷憲三朗
2. 発表標題 がんワクチンOCV-C01による標準療法不応進行再発胆道がんに対する医師主導治験
3. 学会等名 第16回日本免疫治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村橋睦了, 鶴田敏久, 山田一成, 土方康基, 緒方久修, 岸本淳司, 船越公太, 戸高浩司, 中西洋一, 谷憲三朗
2. 発表標題 Investigator initiated clinical trial of cancer vaccine OCV-C01 in advanced and recurrent biliary tract cancer
3. 学会等名 第16回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大山康博, 大西秀哉, 一宮脩, 中山和典, 藤村晶子, 川元真, 山崎章生, 村橋睦了, 中村雅史
2. 発表標題 Hedgehog シグナル阻害による膵癌免疫治療奏効率向上の可能性
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大山康博, 大西秀哉, 一宮脩, 中山和典, 藤村晶子, 川元真, 山崎章生, 村橋睦了, 中村雅史
2. 発表標題 Ptch1結合ペプチドによる肺癌免疫治療奏効率向上の可能性
3. 学会等名 第31回日本バイオセラピー学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mutsunori Murahashi, Hiroshi Hamana, Hiroyuki Kishi, Kotoe Katayama, Rui Yamaguchi, Satoru Miyano, Hisanobu Ogata, Hideya Onishi, Yasushi Takamatsu, Yoichi Nakanishi.
2. 発表標題 Characterization of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in diffuse large B cell lymphoma
3. 学会等名 Keystone Symposia Conference, C5: Cancer Immunotherapy: Combinations (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村橋 睦了、浜名 洋、岸 裕幸、山口類、宮野 悟、緒方 久修、岡崎 利彦、宮本 将平、谷 憲三朗、大西 秀哉、高松 泰、中西 洋一
2. 発表標題 びまん性大細胞型B細胞リンパ腫における腫瘍浸潤CD8+Tリンパ球の解析
3. 学会等名 第9回血液疾患免疫療法学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川元 真、大西 秀哉、山崎 章生、森崎 隆、村橋 睦了、緒方 久修、中村 雅史
2. 発表標題 活性化リンパ球のrandom migration能は癌免疫療法の効果予測因子となりうる
3. 学会等名 第23回国際個別化医療学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大山 康弘、大西 秀哉、川元 真、藤村 晶子、中山 和典、山崎 章生、中村 雅史
2. 発表標題 Hedgehogシグナル阻害による膵癌患者の免疫寛容改善の可能性
3. 学会等名 第30回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村橋 睦了、大山 康博、大西 秀哉、草森 浩輔、西川 元也、伊藤 正紀、小林 由紀子、一宮 脩、中山 和典、藤村 晶子、川元 真、今泉 晃、梅林 雅代、大内田 研宙、森崎 隆、中村 雅史。
2. 発表標題 Patched 1-interacting peptide represses fibrosis in pancreatic cancer to augment the effectiveness of immunotherapy.
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021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	大西 秀哉  (Onishi Hldeya)  (30553276)	九州大学・医学研究院・准教授   (17102)	
研究 分担者	岸 裕幸  (Kishi Hiroyuki)  (60186210)	富山大学・学術研究部医学系・教授   (13201)	

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
---------	---------