

令和 2 年 5 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11128

研究課題名(和文) 免疫チェックポイントを標的とした去勢抵抗性前立腺癌に対する複合がん免疫療法の構築

研究課題名(英文) Development of combined immune-oncology therapy targeting immune checkpoint for castration-resistant prostate cancer

研究代表者

小中 弘之 (KONAKA, Hiroyuki)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：40334768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アンドロゲン受容体シグナルが抑制されると前立腺癌細胞の増殖は抑制されるが、転移能は亢進する。去勢抵抗性前立腺癌でしばしば致命的な経過をたどるリンパ節転移増悪に関しては、アンドロゲン受容体シグナルの抑制によりNF- κ B経路が活性化され、さらにTNF- α の自己分泌作用により、CCR7の発現亢進、p38の活性化がもたらされ、遊走のが亢進することが明らかとなった。また、去勢抵抗性前立腺癌でのタキサン系薬剤耐性にはNF- κ B経路の下流としてp38やSTAT3の活性化が生じ、同時にCCL2の自己分泌作用が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CRPCのリンパ節転移内で前立腺癌細胞がさらなる転移能を獲得するメカニズムの一つとして、NF- κ B-TNF- α -CCR7-p38の活性化経路が関与する可能性が示唆された。また、CRPCの治療であるタキサン系薬剤の耐性化にも、NF- κ Bの活性化が関与していることが明らかにされており、の下流であるp38とSTAT3の活性化が関与することがあきらかになった。さらにタキサン耐性株で著しく分泌亢進するCCL2は自己分泌作用でタキサン耐性に寄与している。CCL2-CCR2経路の遮断はPD-1阻害薬の効果を著しく改善することが報告されており、CRPCについても極めて有望な治療となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The strong effect of androgen-deprivation therapy may become severely compromised when the prostate cancer cells develop into a castration-resistant stage. Although blockade of androgen-androgen receptor signaling inhibited prostate cancer cell proliferation, metastatic ability of prostate cancer cells increases. In lymph node metastasis that is problematic in castration-resistant stage, blockade of androgen-androgen receptor signaling activates NF- κ B and TNF- α , inducing subsequent CCR7 upregulation resulting in cell migration via p38 activation. Regarding taxane-resistance in castration-resistant stage, p38 and STAT3 activation, downstream of NF- κ B, were activated with CCL2 secretion. CCL2 contributed taxane-resistance in the autocrine manner.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：去勢抵抗性前立腺癌 再燃メカニズム 免疫チェックポイント分子 クロストーク

1. 研究開始当初の背景

進行前立腺癌に対するアンドロゲン除去療法は極めて有効な第一選択となる治療法であるが、いずれ多くの症例で無効な状態、すなわち去勢抵抗性前立腺癌 (castration-resistant prostate cancer: CRPC) となる。CRPC に対してはタキサン系抗癌剤や新規アンドロゲン受容体シグナル阻害薬、骨転移に有効なラジウム製剤などが承認されているものの、根治を期待できる治療法は未だ確立されていない。2010 年にアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) が CRPC に対して世界で初めて癌免疫細胞製剤 sipuleucel-T を承認したことを契機に、癌免疫療法に対する関心が一気に高まった。2011 年と 2014 年にはメラノーマに対して抗体医薬品である免疫チェックポイント阻害薬 ipilimumab (抗 cytotoxic T-lymphocyte-associated protein: CTLA-4 抗体) と pembrolizumab (抗 programmed cell death-1: PD-1 抗体) が FDA でそれぞれ承認され、2014 年には日本でも抗 PD-1 抗体である nivolumab が免疫チェックポイント阻害薬として初めて承認された。これらの作用は癌免疫抑制系を解除し癌免疫を賦活化することによって抗腫瘍効果を期待するものである。その後、これらの薬剤は幅広い癌種に適応が拡大され、多くの癌において癌免疫抑制系の活性化が癌の増悪に大きく関与していることが明らかになってきた。

前立腺癌、特に根治的治療法がない CRPC に対する新規治療法の開発には、前立腺癌再燃メカニズムの解明が必要不可欠である。CRPC においても他の癌と同様に癌免疫抑制系が活性化していることが容易に想像される。実際、CRPC を対象とした免疫チェックポイント阻害薬を用いた臨床試験・治験が進んでいる。しかしながら、その効果を裏付ける根拠・エビデンスは未だ不十分と言わざるを得ない。基礎的な研究成果の一端として、我々の研究室においても、腫瘍随伴性マクロファージ (tumor-associated macrophage: TAM) が CRPC における癌細胞の転移能獲得に重要な役割を果たしていることを明らかにした (Izumi et al. EMBO Mol Med. 2013 Sep;5(9):1383-401, Izumi et al. Oncotarget. 2016 Feb 16;7(7):8389-98)。アンドロゲン受容体シグナルの抑制下では免疫抑制系の免疫細胞が活性化していることが明らかになりつつある。また、一方で CRPC のメカニズムとして転写因子 nuclear factor kappa-B: NF- κ B の活性化に焦点を当てて研究を行ってきた (Konaka et al. Biochem J. 2004 Apr 15;379(Pt 2):421-31)。NF- κ B も前立腺癌細胞においてアンドロゲン受容体シグナルの抑制下で活性化することが報告されている。さらにこの NF- κ B の活性化は STAT3 の活性化や各種サイトカイン・ケモカインの活性化と密接に関連することが知られている。STAT3 の活性化は CRPC における前立腺癌細胞の活性化においてはカギとなる重要な経路の一つである。また、ケモカインの活性化は TAM のみならず、引き続き免疫抑制系細胞、制御性 T リンパ球 (regulatory T lymphocyte: Treg) や骨髄由来抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cell: MDSC) などの活性化を引き起こすことが知られている。このように、アンドロゲン除去療法を起点とした長期間のアンドロゲン受容体シグナルの抑制による前立腺癌細胞の再燃・活性化メカニズムには免疫抑制系細胞の活性化が重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられる。

本研究において、知見が集積されつつある癌免疫逃避メカニズムの観点から、アンドロゲン除去療法 (去勢) に伴い顕在化する CRPC においては免疫抑制的な癌微小環境が惹起されているという仮説を立てた。この仮説のもと、再燃メカニズムの一つとして NF- κ B の下流経路としての癌免疫抑制経路に着目したアプローチを展開する。さらに、免疫チェックポイント分子の活性化とのつながりを解明し、最終的には CRPC に対する免疫チェックポイント分子を標的とした完全奏効を目指しうる免疫療法を模索する。

2. 研究の目的

CRPC に対しては近年、様々な薬剤が承認され、生存期間が延長しているものの、根治を期待できる治療法は未だ確立されていない。根治を目指しうる革新的治療の開発につながる研究成果が望まれている。多くの癌において癌免疫抑制系の活性化が癌の増悪に大きく関与していることが明らかになってきており、CTLA-4 および PD-1 を標的とした免疫チェックポイント阻害薬が有効であることが明らかにされている。一部の癌では進行癌であるにもかかわらず一定程度の患者で完全奏効を得られているという報告も散見される。CRPC のメカニズムとして、アンドロゲン受容体シグナルに依存しない経路として、免疫チェックポイントを介するメカニズムが明らかとなれば、一部の癌と同様に、既存の薬剤と免疫チェックポイント阻害薬の併用により完全奏効が期待できるかもしれない。しかし、多くの癌では、免疫チェックポイント阻害薬で完全奏効に至る可能性は高くはなく、より強力かつ、免疫チェックポイント阻害薬では抑制できない経路の補完的な抑制が必要と考えられる。他の癌種と異なり、前立腺癌ではアンドロゲン受容体シグナルは細胞増殖のドライバーとして明確なエビデンスが存在する。CRPC・再燃においては長期間のアンドロゲン受容体シグナルの抑制が、免疫抑制系活性化のトリガーとなっていることも明らかにされつつある。つまり、他の癌種と異なり、免疫チェックポイント阻害薬の効果を増強させるためのユニークな機構が存在する可能性が高い。

本研究のゴールは、CRPC に対する NF- κ B 経路～免疫チェックポイント分子活性化までのメカニズムを明らかにし、既存の免疫チェックポイント阻害薬と新たな経路上の阻害薬の併用

による相乗効果を期待できる包括的治療戦略を構築し、この新規複合がん免疫療法の臨床応用を目指すことにある。

3. 研究の方法

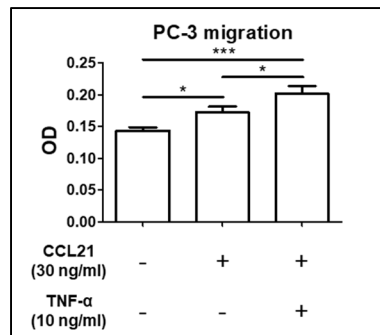
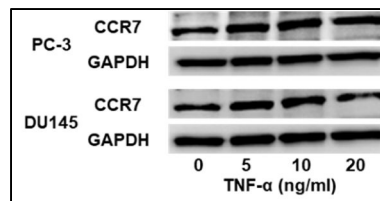
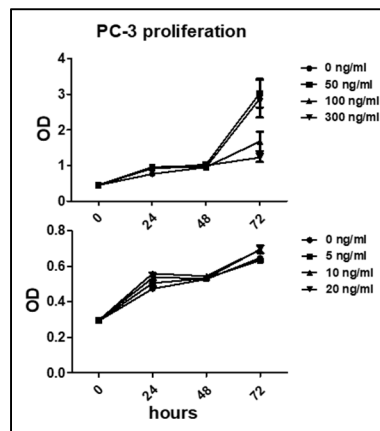
- (1) CRPC のモデルとして細胞株では主に PC-3 や DU145 などのアンドロゲン受容体シグナルに依存しない増殖様式を呈するものにおいて、NF- κ B 経路の下流に存在し、かつ癌免疫抑制につながるような経路、サイトカイン・ケモカインについて文献的検討を行い、標的分子を抽出した。
- (2) CRPC においては骨転移と同様にリンパ節転移の増悪の頻度が高いため、まずリンパ節転移機構の観点から tumor necrotic factor (TNF)- α を NF- κ B の下流経路にある分子として焦点をあて、TNF- α によるヒト前立腺癌細胞の表現型への作用、特に転移能に関する評価を行った。
- (3) 阻害薬などを用い、前立腺癌細胞の表現型の変化をもたらす TNF- α の下流経路で、かつ癌免疫を担う細胞と相互作用を生じうる経路(ケモカイン)をウェスタンブロット等で明らかにした。
- (4) さらに、アンドロゲン受容体シグナル遮断後の治療としてタキサン系薬剤を用いるが、その耐性化機構の観点から、ヒト前立腺癌細胞株 DU145 のドセタキセル耐性株 DU145-TxR およびカバジタキセル耐性株 DU145-TxR/CxR において(3)で見出した経路がどのような役割を担っているか検討した。

4. 研究成果

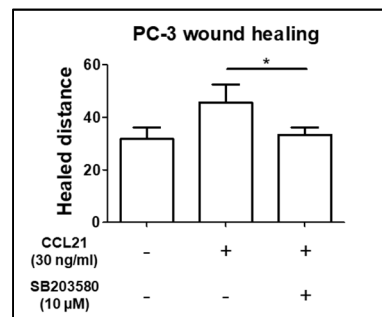
アンドロゲン受容体の発現がないヒト前立腺癌細胞株 PC-3 では、TNF- α が NF- κ B を活性化させることが知られている。非常に興味深いことに、NF- κ B の活性化はループ経路を形成するなどして、結果的に再び TNF- α の活性化を誘導することも報告されている (Clin Transl Oncol. 2020 Jan;22(1):111-121)。また合成された TNF- α は膜結合型から可溶性分泌型蛋白となり、自己分泌作用を持つことも知られている。NF- κ B の活性化と協調的に活性化する TNF- α によるヒト前立腺癌細胞 PC-3 への影響を明らかにするため増殖能試験を行ったところ、高濃度 (100-300 ng/ml) では強く増殖を抑制するが、低濃度 (<20 ng/ml) では増殖能に影響を与えなかった (右図)。また、増殖能に影響しない低濃度 (10 ng/ml) においては、遊走能についてもほとんど影響を与えなかった。

一方で、TNF- α がケモカイン CCL21 の受容体 CCR7 を介してリンパ節転移の増悪をもたらすことが報告されている (J Exp Clin Cancer Res. 2016 Mar 24;35:51)。リンパ節の構造上、最も体積の大きい傍皮質領域で組織の支持基盤を担っている細網線維芽細胞 (fibroblastic reticular cell: FRC) は CCL21 を大量に分泌しているため、リンパ節内には豊富に CCL21 が存在すると考えられる。ヒト前立腺癌細胞株においては、低用量 (10 ng/ml) の TNF- α によって CCR7 の発現が亢進していた (右図)。

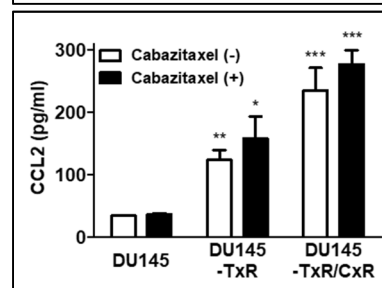
リガンドである CCL21 は単剤のみでは前立腺癌細胞株の遊走能をわずかに亢進させるのみであったが、低用量 TNF- α を添加したあとに、CCL21 を添加すると有意に遊走能を亢進させた。つまり、低用量 TNF- α で受容体 CCR7 の発現を亢進させ、そこにリンパ節内で FRC から大量に分泌されている CCL21 が作用することで遊走能が強く亢進することが明らかとなった (右図)。



さらに CCL21-CCR7 シグナルの下流についてウェスタンブロット等で各種シグナル経路の活性を検討した。転移能に関わるシグナル ERK および AKT のリン酸化は CCL21-CCR7 シグナルの刺激によってもほとんど変化がみられなかったが、p38 のリン酸化が誘導された。p38 の阻害薬 (SB203580) を添加すると、CCL21 で亢進した前立腺癌細胞の遊走能が阻害された (右図)。



アンドロゲン受容体の発現がないヒト前立腺癌細胞株 DU145 のドセタキセル耐性株 DU145-TxR およびカバジタキセル耐性株 DU145-TxR/CxR においては、その耐性化メカニズムに p38 の活性化が関与することも明らかにした。また、NF-κB の下流である STAT3 のリン酸化も亢進していることも突き止めた。さらに、ケモカインアレイによって、CCL2 の発現がタキサン耐性株で著しく亢進していることがわかった (右図)。CCL2 は TAM に作用し癌細胞の活性化を助長するだけでなく、MDSC の刺激を介し Treg の活性化、延いては CD8+リンパ球の活性抑制をもたらすことが知られている。



これらの結果から CRPC のリンパ節転移内で前立腺癌細胞がさらなる転移能を獲得するメカニズムの一つとして、NF-κB→TNF-α→CCR7→p38 の活性化経路が関与する可能性が示唆された。また、CRPC の治療であるタキサン系薬剤の耐性化にも、NF-κB の活性化が関与していることが明らかにされており (Prostate. 2013 Apr;73(5):512-21) その下流である p38 と STAT3 の活性化が関与することが本研究であきらかになった。さらにタキサン耐性株で著しく分泌亢進する CCL2 は自己分泌作用でタキサン耐性に寄与している。CCL2-CCR2 経路の遮断は PD-1 阻害薬の効果を著しく改善することが報告されており (Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Jan 14;117(2):1129-1138) CRPC についても極めて有望な治療となる可能性が示唆される。

<引用文献>

- Izumi K, Fang LY, Mizokami A, Namiki M, Li L, Lin WJ, Chang C. Targeting the androgen receptor with siRNA promotes prostate cancer metastasis through enhanced macrophage recruitment via CCL2/CCR2-induced STAT3 activation. *EMBO Mol Med.* 2013 Sep;5(9):1383-401.
- Izumi K, Mizokami A, Lin HP, Ho HM, Iwamoto H, Maolake A, Natsagdorj A, Kitagawa Y, Kadono Y, Miyamoto H, Huang CK, Namiki M, Lin WJ. Serum chemokine (CC motif) ligand 2 level as a diagnostic, predictive, and prognostic biomarker for prostate cancer. *Oncotarget.* 2016 Feb 16;7(7):8389-98.
- Cinar B, Yeung F, Konaka H, Mayo MW, Freeman MR, Zhau HE, Chung LW. Identification of a negative regulatory cis-element in the enhancer core region of the prostate-specific antigen promoter: implications for intersection of androgen receptor and nuclear factor-kappaB signalling in prostate cancer cells. *Biochem J.* 2004 Apr 15;379(Pt 2):421-31.
- Mu HQ, He YH, Wang SB, Yang S, Wang YJ, Nan CJ, Bao YF, Xie QP, Chen YH. MiR-130b/TNF-α/NF-κB/VEGFA loop inhibits prostate cancer angiogenesis. *Clin Transl Oncol.* 2020 Jan;22(1):111-121.
- Hong H, He C, Zhu S, Zhang Y, Wang X, She F, Chen Y. CCR7 mediates the TNF-α-induced lymphatic metastasis of gallbladder cancer through the "ERK1/2 - AP-1" and "JNK - AP-1" pathways. *J Exp Clin Cancer Res.* 2016 Mar 24;35:51.
- Codony-Servat J, Marín-Aguilera M, Visa L, García-Albéniz X, Pineda E, Fernández PL, Filella X, Gascón P, Mellado B. Nuclear factor-kappa B and interleukin-6 related docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer. *Prostate.* 2013 Apr;73(5):512-21.
- Flores-Toro JA, Luo D, Gopinath A, Sarkisian MR, Campbell JJ, Charo IF, Singh R, Schall TJ, Datta M, Jain RK, Mitchell DA, Harrison JK. CCR2 inhibition reduces tumor myeloid cells and unmasks a checkpoint inhibitor effect to slow progression of resistant murine gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Jan 14;117(2):1129-1138.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maolake A, Izumi K, Natsagdorj A, Iwamoto H, Kadomoto S, Makino T, Naito R, Shigehara K, Kadono Y, Hiratsuka K, Wufuer G, Nastiuk KL, Mizokami A.	4. 巻 109
2. 論文標題 Tumor necrosis factor- induces prostate cancer cell migration in lymphatic metastasis through CCR7 upregulation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer science	6. 最初と最後の頁 1524-1531
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13586	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	角野 佳史 (KADONO Yoshifumi) (10397218)	金沢大学・医学系・准教授 (13301)	
研究分担者	泉 浩二 (IZUMI Kouji) (80646787)	金沢大学・附属病院・講師 (13301)	
研究分担者	北川 育秀 (KITAGAWA Yasuhide) (00452102)	金沢大学・医学系・協力研究員 (13301)	