

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16548

研究課題名(和文)新規免疫機能評価系を用いた癌転移の治療標的の探索

研究課題名(英文)Drug re-positioning screening by using a novel assessment method

研究代表者

野口 侑記(Noguchi, Yuki)

兵庫医科大学・医学部・病院助手

研究者番号：30771042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：Bispecific T-cell Engager(BiTE)を用いた新しい評価系で腫瘍内微小環境を模式的に再現し、それを用いて約1300種類の既存薬からリンパ球賦活効果のある薬剤のスクリーニングを行ったところ、テトラサイクリン系抗菌薬デメクロサイクリン(DMC)が検出された。DMCはリンパ球の分裂を促す量的効果と、抗腫瘍効果を示すサイトカインの産生を増強する質的効果を共に持っていた。さらにマウスモデルでin vivoでの効果も検証したところ、PD-L1阻害薬にDMCに追加したグループで有意に腫瘍増大が抑制されることが示され、末梢血中に腫瘍特異的リンパ球の割合も有意に上昇していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍内微小環境は腫瘍に対して免疫抑制状態にあり、腫瘍特異的な免疫反応を再賦活化することで抗腫瘍効果が期待できる。その戦略で開発・実践されている治療法が免疫チェックポイント分子を標的にした生物学的製剤である。これらの薬剤は効果が期待される反面、非常に高価であることから医療経済的な問題が浮上している。そこで免疫チェックポイント分子標的薬に代わり、同じように腫瘍微小環境の腫瘍特異的な免疫反応を賦活化することができる薬剤を、従来他の疾患の治療薬として開発された安価な既存薬の中から探し出し、ドラッグリポジショニングを行うことでより現実的な治療法が可能になるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Tumor microenvironment model that has been created using Bispecific T-cell Engager (BiTE) was used for screening old drugs potentially effective on tumor cells. Of 1300 old drugs that have been invented for other diseases except for tumor, one tetracycline antibiotics, demeclocycline (DMC) was found with potential lymphocyte-activation effect. DMC had both quantitative and qualitative abilities against lymphocytes, which means it can proliferate lymphocytes and make them produce much more anti-tumor cytokines, such as interferon gamma. In addition, when DMC was used with a PD-L1 blocker in in vivo mouse model, tumor expansion was significantly suppressed and the proportion of tumor-specific lymphocytes also significantly increased. On top of that, DMC had also an ability to activate tumor infiltrating lymphocytes (TILs) that were extracted from actual tumors of patients with cancer. These results may indicate that DMC enhances the effect of immune checkpoint inhibitors.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 腫瘍微小環境 免疫賦活 免疫チェックポイント分子 ドラッグリポジショニング テトラサイクリン系抗菌薬 デメクロサイクリン

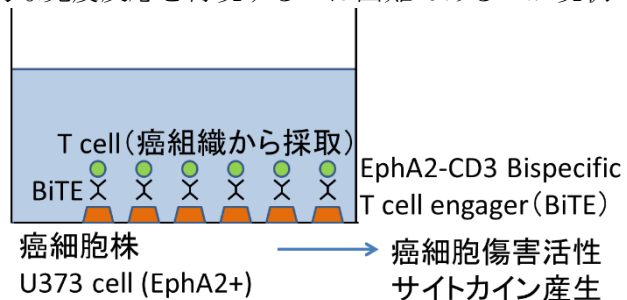
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、免疫チェックポイント阻害抗体が非小細胞肺癌などで有効性が実証されるも、奏効率は20%前後にとどまっている。癌の治療法は外科的根治療法、放射線療法、化学療法があるが、これらの内、化学療法は転移病巣を有する癌患者に適用されるケースが多いが。化学療法と同様に進行癌に適応されることが多くなると予測される免疫療法において、効果的な他の治療法との組み合わせを解明することは非常に重要である。

免疫療法として、T細胞の賦活・活性を抑制する機能をもつ免疫チェックポイント分子であるCTLA-4やPD-1/PD-L1経路を阻害する抗体療法が開発され、臨床試験で有効性が確認されている。これら抗体療法では一部の患者群で長期生存が報告されており、これまで奏効率は高いが生存期間の延長がみられない傾向にあった分子標的治療薬とは異なる特徴が示唆されている。このように大きな可能性が期待される癌免疫療法であるが、CTLA-4やPD-1/PD-L1阻害抗体療法の奏効率は20%前後と報告されており、その効果の限界も明らかとなりつつある。この要因としては大きく分けて腫瘍側の要因と宿主の免疫側の要因が考えられる。宿主の免疫側の要因については、CTLA-4やPD-1/PD-L1経路の他にT細胞の賦活・活性を抑制する機能をもつTim-3やLAG-3などの新たな免疫チェックポイントが注目されており、これら分子を標的とした免疫療法の開発が進められている。その他に制御性T細胞(Treg: regulatory T cell)や腫瘍関連マクロファージ(TAM: tumor-associated macrophage)、骨髄由来抑制細胞(MDSC: myeloid-derived suppressor cell)などが癌免疫の抑制因子と考えられ、動物実験などでの検証が進められている。しかしこれら様々な抑制性因子が、複雑な抗腫瘍免疫応答のなかでいかなる役割を果たしているのか、実際に担癌患者体内においては未知の部分が多いのが現状である。さらには、癌転移巣の腫瘍微小環境については未だ解明の糸口がみられない状況にある。

一つのアプローチとして臨床検体(外科的切除を行った腫瘍組織など)を用いたex vivo解析が進められているが、癌抗原特異的な免疫反応を再現するのは困難であるのが現状である。そこで、がん抗原およびT細胞抗原の双方に対して特異性を持つ二重特異性分子(BiTE: Bispecific T cell Engager)が、癌抗原とT細胞抗原CD3の両方に同時に結合することによってT細胞が活性化され癌抗原特異的に抗腫瘍効果を発揮するという特性を利用して、当研究室ではBiTE(Bispecific T cell engager)を用いてヒト腫瘍内のT細胞のTCR依存的な抗腫瘍活性の評価系を開発した(右図)。



2. 研究の目的

本研究は、BiTEを用いて腫瘍微小環境を再現し、多くの進行期固形癌内で腫瘍細胞の生存に有利となっている微小環境に対して、宿主免疫反応の再賦活化を促すような薬剤をスクリーニングし、さらに現在免疫療法の主流として用いられている免疫チェックポイント分子阻害薬との相乗効果を示す薬剤を発見することを目的としている。特に免疫チェックポイント分子阻害薬は医療経済的な面から問題点を指摘されており、他の治療薬として開発された安価な既存薬の中からこの阻害薬の効果を相乗的に補助することができる薬剤が検出されれば、阻害薬の投与量を減らすことができる可能性がある。

3. 研究の方法

- 1) 約1300種類の既存薬を含んだ薬剤ライブラリーを用いて、健常人の末梢血細胞の癌細胞(U373株)に対する傷害活性の賦活効果をMTSアッセイを用いて評価した。
- 2) 健常人末梢血からCD8+ T細胞を単離し、1)で検出された薬剤がCD8+ T細胞に対して賦活効果を発揮するかMTSアッセイを用いて評価した。
- 3) 賦活の質的効果として、T細胞のサイトカイン産生能(インターフェロンγ(IFNγ)及びグランザイムB(GzB))をキャッチアッセイを用いて評価した。
- 4) 賦活の量的効果として、T細胞の増殖能をCytoTellアッセイを用いて評価した。
- 5) 抗原特異的なT細胞の増殖能をCMV抗原を用いたペプチドリンパ球混合培養試験(MPLC: Mixed peptide-lymphocyte culture)によって評価した。
- 6) 健常人だけでなく、担癌患者から採取した腫瘍内のリンパ球に対しても、同様に癌細胞への傷害活性が賦活されるかどうかをMTSアッセイを用いて評価した。さらに免疫チェックポイント分子阻害薬である抗PD-1抗体との併用効果を評価した。
- 7) マウスを用いたin vivo実験系で、CT26株に対する腫瘍縮小効果を検証した。

4. 研究成果

- 1) 薬剤スクリーニングの結果、健常人末梢血細胞の腫瘍細胞に対する傷害活性を賦活化する効果をもつ薬剤が検出されたが、特にテトラサイクリン系抗菌薬が複数検出できた(図1)。

中でもデメクロサイクリン(DMC)はその効果が強く、以下の一連の実験は DMC を用いて検証を行った。

- 末梢血細胞の中でも特に CD8+ T 細胞を単離した場合でも、DMC は腫瘍細胞に対する傷害活性を賦活化する効果を確認でき、この賦活効果が CD8+ T 細胞を介して生じている可能性が示唆された(図 2)。

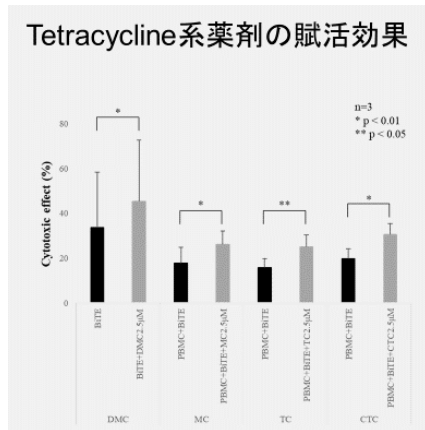


図 1

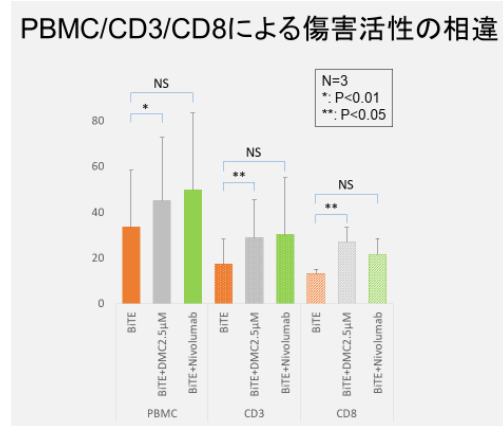


図 2

- 健康人末梢血細胞の IFN γ 産生能は、DMC によって有意に増強することが示唆された(図 3)。同様に GzB 産生も DMC により有意に増強することが示され、特に薬剤暴露後 24 時間から 36 時間においてその産生能の増加が著しかった(図 4)。

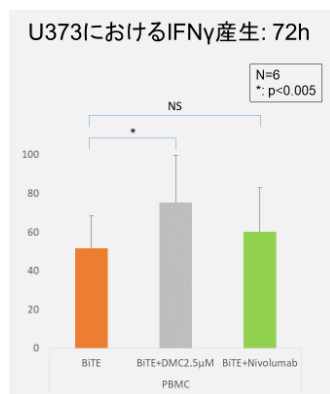


図 3

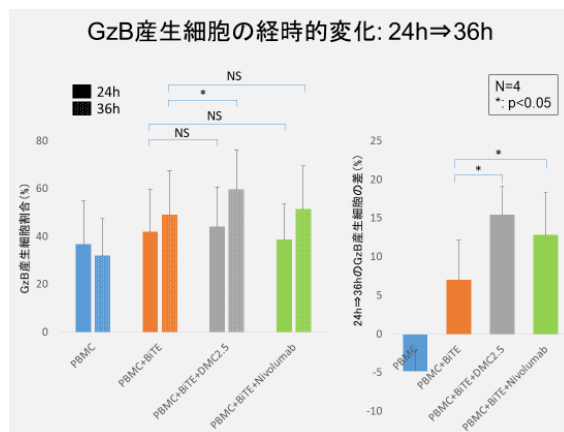


図 4

- CytoTell アッセイによる細胞増殖評価では、DMC により図 5 で定義された細胞分裂の程度を示す Mean intensity reduction rate (MIRR) が有意に増加しており、DMC は分裂を促進することが示された(図 6)。

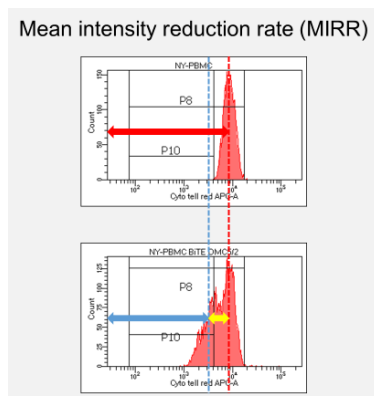


図 5

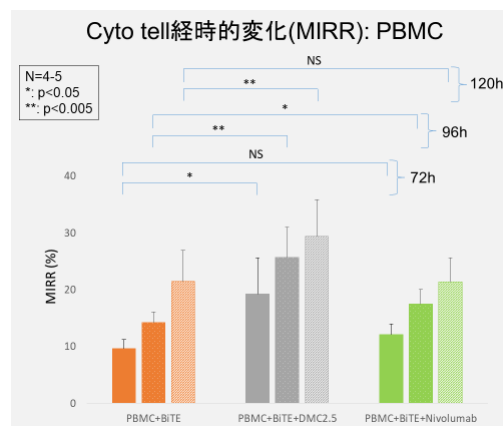


図 6

- 5). CMV 抗原を用いた抗原特異的な T 細胞に対しても DMC は有意に細胞増殖効果を示した (図 7)。これにより腫瘍微小環境内の癌抗原刺激された T 細胞に対しても同様の効果を発揮できる可能性が示唆された。

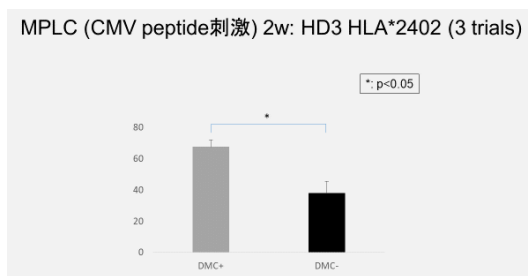


図 7

- 6). 肺癌患者から採取した肺癌組織より単離した腫瘍内浸潤リンパ球 (TIC: Tumor infiltrating cell) を用いて、DMC による癌細胞に対する傷害活性の賦活化作用を調査した結果、症例数が少ないため有意差までは検出されなかったが、賦活化増強作用を持つ傾向が示された。一方で担癌患者の末梢血細胞を用いた検証では健康人と同様、有意に賦活化の増強が認められた。末梢血細胞と異なり、浸潤リンパ球は単離時の質にバラツキが大きいため 4 症例では傾向のみしか示されなかったが、さらに症例数を追加することで浸潤リンパ球に対しても有意差が得られる可能性が高いものと考えられる。また一人の患者に対して、抗 PD-1 抗体との相乗効果を検証した結果、有意に細胞傷害活性が賦活されることが示された (図 9)。

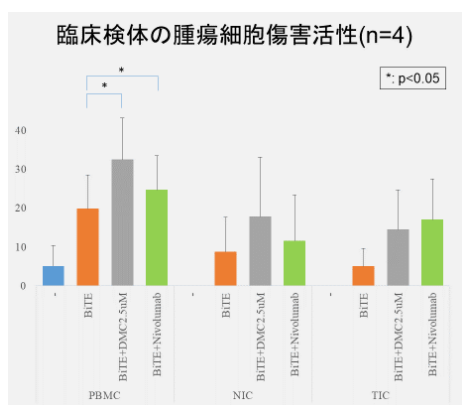


図 8

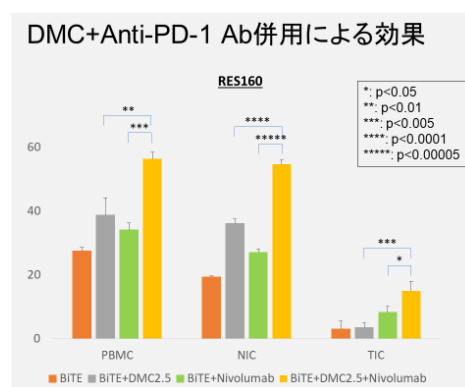


図 9

- 7). CT26 細胞株をマウスの皮内に投与し、その 7 日後から DMC を経口投与し、さらに一部の群には免疫チェックポイント分子阻害薬である抗 PD-L1 抗体の腹腔内投与を併用した。継時的に腫瘍径を計測してその成長速度を比較した (プロトコルは図 10 参照)。その結果、抗 PD-L1 抗体単独よりも DMC 単独群の方が腫瘍縮小効果が強く、DMC 及び抗 PD-L1 抗体併用群が最も縮小効果が強かった (図 11-13)。

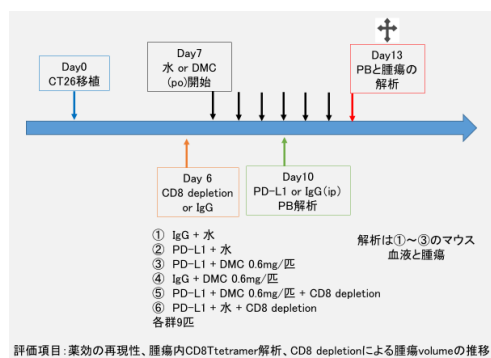


図 10

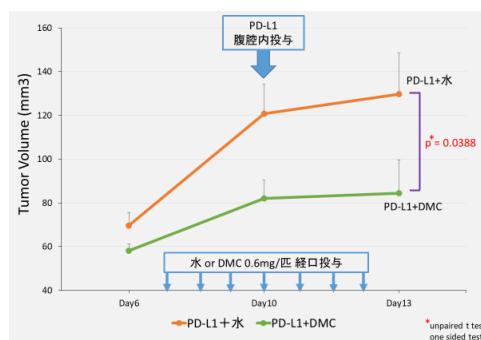


図 11

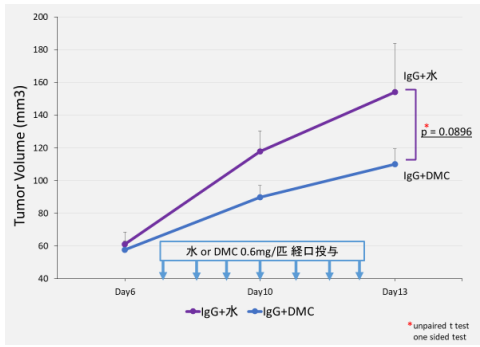


図 12

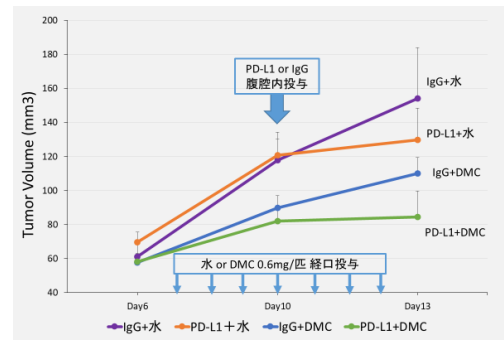


図 13

さらにこの効果が CD8+ T 細胞を介して生じていることを検証するため、CD8+ T 細胞を depletion した群を作成し、同様に腫瘍縮小効果を検証したところ、depletion 群では DMC や抗 PD-L1 抗体を用いた場合でも腫瘍縮小効果が認められなかった (図 14) ことから、これらの腫瘍縮小増強効果は CD8+ T 細胞を介している可能性が示唆された。

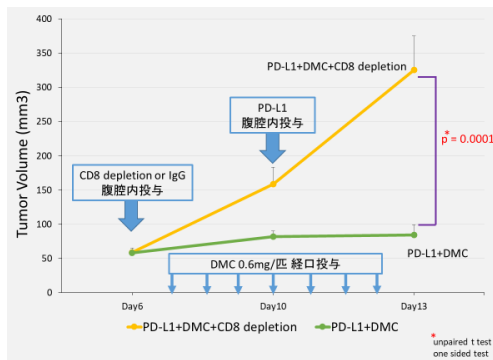


図 14

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----