

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08309

研究課題名(和文) -カテニン経路を標的にする悪性黒色腫患者の抗腫瘍免疫応答改善法と評価法の開発

研究課題名(英文) Evaluation of the role of beta-catenin pathway in human melanoma in anti-cancer immune responses

研究代表者

谷口 智恵 (Yaguchi, Tomonori)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：40424163

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：抗PD-1抗体は悪性黒色腫で優れた臨床効果を示したが、単独使用では不十分で、併用療法の開発とバイオマーカーの探索が必要である。研究代表者は以前、悪性黒色腫で活性化している  $\beta$ -catenin 経路が、免疫抑制分子を産生させ免疫抑制を誘導している事を示した。本研究では、 $\beta$ -cateninの間接的阻害剤として用いた脂肪酸代謝阻害薬が、抗腫瘍免疫応答を増強できる事、そのメカニズムの一つとして、がん細胞の  $\beta$ -catenin経路に作用し、ケモカイン産生を増強している事、さらに、T細胞などの免疫細胞にも直接活性化作用がある事を示した。本阻害薬は、抗PD-1抗体の併用薬として有用であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性黒色腫において、抗PD-1抗体などの免疫チェックポイント阻害薬は、優れた臨床効果を示したが、単独使用では不十分で、併用療法の開発とバイオマーカーの探索が必要である。本研究では、脂質代謝を標的とした阻害薬を用いて、抗PD-1抗体の治療効果を増強できることを示した。このような作用はこれまでに報告がなく、学術的に新規のものである。また、本分子を標的とした治療薬は、既に高脂血症などの脂質代謝疾患の治療薬として、臨床試験が行われ安全性が確認されている物も多い。そのため、抗PD-1抗体との併用療法の開発もより早く実施できる可能性があり、臨床的、社会的にも価値がある。

研究成果の概要(英文)：Although anti PD-1 Ab showed significant anti-tumor effects in melanoma patients, there are still a lot of non-responders. It is important to develop new combined therapies and to identify biomarkers. We previously reported that activated beta-catenin pathways in melanoma cells induced immune suppression through ectopic production of immunosuppressive molecules. In this study, we showed a drug targeting fatty acid metabolism could enhance anti-tumor immune responses such as anti PD-1 Ab therapeutic effects through targeting beta-catenin pathways in cancer cells, which resulted in enhancement of their chemokine production. We also found this drug directly activated T cell and dendritic cell functions. These results suggest that this drug can be used in combined therapies with anti PD-1 Ab through targeting both cancer cells and immune cells.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：悪性黒色腫 beta-catenin

## 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫など数種のがん種で、抗 PD-1 抗体が本邦でも認可され、明らかな臨床効果が示されている。しかし単独療法の奏効率は 20%程度であり、不応例に対する併用療法の開発と、奏効例を選別するバイオマーカーの探索が、重要な課題となっている。現在、抗 PD-1 抗体が単独で奏効するためには、治療前から腫瘍内に T 細胞浸潤がある事が重要であると考えられている。しかし、多くの症例では、免疫抑制的ながん微小環境が構築されており、がんに対する T 細胞応答(腫瘍内 T 細胞浸潤)が十分に起こっておらず、抗 PD-1 抗体単独では効果が得られにくい。研究代表者を含む複数のグループが、悪性黒色腫細胞では、 $\beta$ -catenin シグナルの活性化が、免疫抑制性分子の産生や、ケモカインの産生低下などを引き起こし、免疫療法耐性になる可能性を提唱した(Yaguchi et al. J Immunol. 2012)。よって、悪性黒色腫における  $\beta$ -catenin シグナルは、免疫抑制を解除し抗 PD-1 抗体の奏効率を向上させるための治療標的となる可能性、さらに、本シグナルの活性化状態の評価は、免疫抑制状態や抗 PD-1 抗体の治療効果を予測するバイオマーカーとなる可能性が考えられた。

さらに、 $\beta$ -catenin 阻害薬の全身投与を考えた場合、薬剤は、悪性黒色腫に加え免疫細胞にも作用する。担癌生体内の各種免疫細胞における  $\beta$ -catenin の役割については、報告が少ないが、他の動物モデルでは、制御性樹状細胞(DCreg)や制御性 T 細胞(Treg)などの免疫抑制性の細胞で、 $\beta$ -catenin が重要であると報告されている。よって、 $\beta$ -catenin 阻害薬は担癌生体において、免疫細胞にも直接作用し、免疫抑制解除に働く可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

悪性黒色腫において、 $\beta$ -catenin 経路による免疫抑制の機序を明らかにする事、および、担癌生体の免疫細胞における  $\beta$ -catenin 経路の役割を明らかにする事。

## 3. 研究の方法

$\beta$ -catenin 経路の活性化と相関が報告されている脂肪酸代謝阻害剤を用いて、担癌マウスモデルで、その抗腫瘍免疫応答への影響を評価した。*In vitro* では、本阻害剤の悪性黒色腫細胞株の  $\beta$ -catenin 経路への作用、免疫細胞への作用を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 脂肪酸代謝阻害剤は、悪性黒色腫細胞の $\beta$ -catenin 経路を阻害する

$\beta$ -catenin 経路への作用が報告されている、脂肪酸代謝阻害剤をヒト悪性黒色腫細胞に作用させると、 $\beta$ -catenin タンパクの発現量が減少し、同経路が抑制されていることが分かった(図 1)。さらに、同経路の下流で制御されていることが報告されている CCL4 の発現を評価したところ、脂肪酸代謝阻害剤によって発現が低下していることが分かった。以上より脂肪酸代謝阻害剤を

用いることで、悪性黒色腫細胞の  $\beta$ -catenin 経路を標的とできる可能性が示唆された。

## (2) 脂肪酸代謝阻害剤は、抗腫瘍免疫応答を増強させる。

上記の脂肪酸代謝阻害剤による  $\beta$ -catenin 経路の阻害作用は、マウスがん細胞株においても見られた。そこで、このがん細胞の担癌マウスに、脂肪酸代謝阻害剤を投与したところ、有意な抗腫瘍効果がみられた。この薬剤は、*in vitro* では、この腫瘍に増殖抑制効果を示さなかったため、マウスモデルでの抗腫瘍効果は、腫瘍への直接作用以外のメカニズムが考えられた。また、このマウスモデルでの抗腫瘍効果は、抗 CD8 抗体投与を用いて CD8 陽性 T 細胞を除去すると、減弱したことから、T 細胞免疫が関与していることが示唆された。そこで、腫瘍内やリンパ節内での腫瘍抗原特異的 T 細胞誘導を評価したところ、阻害剤投与群では、有意に誘導が増強していた。さらに、腫瘍内の CD8 陽性 T 細胞浸潤数も、阻害剤投与群で優位に増加していた(図 2)。また、樹状細胞を含む CD11c 陽性細胞の浸潤数の増加と、その遊走に關与するケモカイン CCL4 の mRNA の腫瘍内における増加も認めた。

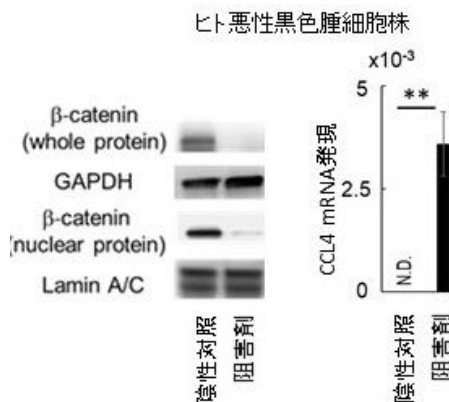
以上のことより、脂肪酸代謝阻害剤は、抗腫瘍免疫応答を増強させる事、そのメカニズムとして、CCL4 発現増強による樹状細胞浸潤の増強がある事が、考えられた。

## (3) 脂肪酸代謝阻害剤は、免疫細胞に対して直接活性化作用を有する。

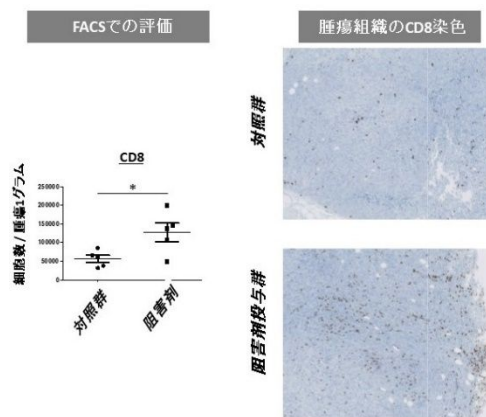
次に脂肪酸代謝阻害剤の免疫細胞に対する直接作用を検証した。ヒト末梢血、及びマウス脾臓より T 細胞を分離し、抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体で刺激培養時に、脂肪酸代謝阻害剤を加えると、有意に増殖が増強された。また、ヒト単球由来樹状細胞に、脂肪酸代謝阻害剤を作用させると、LPS 刺激時の炎症性サイトカインの産生量が有意に増加した。以上のことから、脂肪酸代謝阻害剤は、T 細胞や樹状細胞に対して、直接の活性化作用を有する事が示唆された。

## (4) 脂肪酸代謝阻害剤は、抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果を増強させる

これまでの結果から、脂肪酸代謝阻害剤は、悪性黒色腫細胞を含めたがん細胞で活性化している  $\beta$ -catenin 経路を抑制することで、CCL4 の産生を増強させ、その結果、樹状細胞の腫瘍内浸潤が増える事が分かった。さらに、この脂肪酸代謝阻害剤は、T 細胞や樹状細胞などの免疫細胞

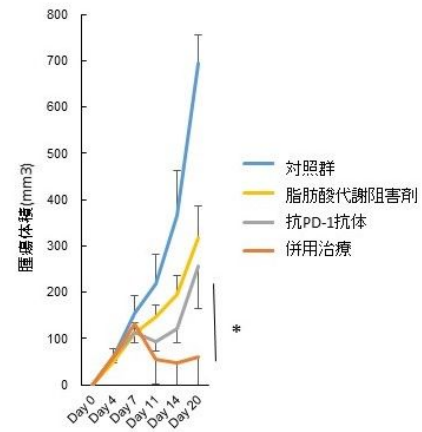


(図 1)ヒト悪性黒色腫細胞株に脂肪酸代謝阻害剤を作用させ、ウエスタンブロッティングで、 $\beta$ -catenin 発現を(左図)、qPCR で CCL4 の mRNA 発現を(右図)評価した。\*\*: $p < 0.01$



(図 2)脂肪酸代謝阻害剤を投与した担癌マウスの腫瘍組織内の CD8 陽性 T 細胞を FACS(左図)及び、免疫組織化学(右図)を用いて評価した。\*: $p < 0.05$

にも直接の活性化作用を有する事が分かった。以上の二つのメカニズムで、この脂肪酸代謝阻害剤は、 $\beta$ -catenin 経路が活性化しているがん症例で抗腫瘍免疫応答を増強させることが、分かった。そこで、次に、この脂肪酸代謝阻害剤が抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果を増強できるかを担癌マウスで検証した。その結果、抗 PD-1 抗体の投与に、この脂肪酸代謝阻害剤を併用すると、相乗的な抗腫瘍効果の増強が観察された(図 3)。



(図 3)担癌マウスを、脂肪酸代謝阻害剤、及び抗 PD-1 抗体で治療した。

\*:p<0.05

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2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 Kawakami Y, Ohta S, Sayem MA, Tsukamoto N, Yaguchi T.	4. 巻 25
2. 論文標題 Immune-resistant mechanisms in cancer immunotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 810-817
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-019-01611-x.	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 谷口智恵、河上裕	4. 巻 37
2. 論文標題 免疫抑制分子・細胞に対する阻害薬	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 152-156
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 谷口智恵、河上裕	4. 巻 24
2. 論文標題 Killer T細胞耐性とImmune editing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腫瘍内科	6. 最初と最後の頁 176-182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 谷口智恵、河上裕	4. 巻 3
2. 論文標題 複合免疫療法：分子標的治療薬と免疫チェックポイント阻害薬.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 がん免疫療法	6. 最初と最後の頁 39-41
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Inozume T, Yaguchi T, Ariyasu R, Togashi Y, Ohnuma T, Honobe A, Nishikawa H, Kawakami Y, Kawamura T.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Analysis of the tumor reactivity of tumor-infiltrating lymphocytes in a metastatic melanoma lesion that lost MHC class I expression after anti-PD-1 therapy.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol.	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2019.01.007	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Tomonori Yaguchi, Daiki Kato, Kenji Morii, Satoshi Serada, Tetsuji Naka, Yutaka Kawakami
2. 発表標題 CARTと免疫チェックポイント阻害薬の併用
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonori Yaguchi
2. 発表標題 IMMUNE MODULATION OF THE TUMOR MICROENVIRONMENT FOR ENHANCING THE CANCER IMMUNOTHERAPIES
3. 学会等名 The 3rd INTER-ACADEMY CANCER SYMPOSIUM (KEIO-NCC GCSP Communications in Cancer Science) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomonori Yaguchi
2. 発表標題 New humanized mouse models to investigate in vivo interaction of immune system and human cancer.
3. 学会等名 2nd Annual HuNIT (Humanized NOG mice for ImmunoTherapy) Platform Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 猪爪隆史、谷口智慧、河上裕、川村龍吉
2. 発表標題 抗PD-1抗体により長期安定後に悪化した病巣のメラノーマ細胞とTILの解析
3. 学会等名 第22回日本がん免疫学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 癌患者への癌免疫療法を含む癌治療法の適用の有効性を判定するマーカー及びその使用	発明者 谷口智慧, 加藤侑希, 久保亜紀子, 河上裕	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-106533	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	河上 裕  (Kawakami Yutaka)  (50161287)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特任教授    (32612)	

	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
連携研究者	木庭 幸子  (Kiniwa Yukiko)  (20436893)	信州大学・医学部附属病院・講師   (13601)	
連携研究者	猪爪 隆史  (Inozume Takashi)  (80334853)	山梨大学・医学部附属病院・講師   (13501)	
連携研究者	片野 いくみ  (Katano Ikumi)  (90442558)	公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・研究員   (72611)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	小路 弘行  (Kouji Hiroyuki)  (40563383)	大分大学・医学部・教授    (17501)	

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