

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09276

研究課題名(和文) エリ布林による腫瘍免疫を介した難治性卵巣癌に対する新たな治療戦略

研究課題名(英文) Target therapy of ovarian cancer including immunotherapy via Eribulin

研究代表者

藤原 聡枝 (FUJIWARA, SATOE)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：90707960

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)：卵巣癌は婦人科悪性腫瘍の中で最も予後不良であり、その致死率が高い。本研究は卵巣癌における免疫応答を介したエリ布林の治療効果を検証するものである。

エリ布林の卵巣癌における殺細胞効果を、卵巣癌細胞株を用いて増殖抑制を示すことで証明した。さらにヒト末梢血と卵巣癌細胞株を共培養し、エリ布林添加を行うと細胞増殖抑制のみならず免疫応答を誘引することが示された。現在はヌードマウスを用い生体内での殺細胞効果と腫瘍免疫応答について証明を行っている。この証明が可能であればエリ布林と免疫チェックポイント阻害薬併用による治療効果の増強が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌は婦人科悪性腫瘍の中で最も予後不良であり、致死率が高い。2000年以降本領域では殺細胞効果を持つ新規薬剤の開発はなく、近年他癌腫で効果が示される免疫チェックポイント阻害薬も複数の臨床試験で効果が証明されなかった。これは卵巣癌の発癌機構から腫瘍免疫にも別の戦略が必要である事が推察される。エリ布林は卵巣癌での有用性について報告はない。本研究では卵巣癌への殺細胞効果だけでなく腫瘍免疫にも作用することが証明された。エリ布林は既に乳癌治療薬として日常診療で投与されており、安全性は証明され新規薬剤と比較して安価である。本研究は新たな治療戦略の開発のみでなく医療経済的にも優れ、意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ovarian cancer is the 3rd frequent gynecologic malignancy, characterized by a high mortality in advanced stages where conventional therapies are not effective. Based on the role of the immune system in the progression of this disease, immunotherapy using checkpoint blockade has been considered as a therapeutic alternative. Nevertheless, its results do not match up to the positive results in other malignancies. It suggests that we need to find other strategy to be used alone or in combination.

Our research showed that Eribulin, a non-taxane microtubule dynamics inhibitor, has the potential in vitro. Our data revealed that Eribulin reduced cell viability in ovarian cancer cell lines and induced the immune response against ovarian cancer cell lines. In summary, Eribulin may be considered for future combined immunotherapy approach against ovarian cancer.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：難治性卵巣癌 エリ布林 腫瘍免疫

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在卵巣癌に対する薬物療法は様々な研究がなされているが、1990 年台後半より新規抗がん剤の導入は行われていない。分子標的治療薬や遺伝子解析などによるテーラーメイド医療が進む一方で、殺細胞効果を持ち腫瘍の根絶を可能とする抗がん剤の開発は他癌腫に比較し非常に難渋している。また過去に我々は、EMT 現象を起こしている癌細胞こそ治療抵抗性であることに着目し、CD24 がそのマーカーとなることを証明し、今後治療のターゲットとすることを検討していた。当初、既に EMT 現象の抑制にむけて様々な研究を進めており、その一部が播種病巣へのドラッグデリバリー治療の応用や、播種病巣側の環境の変化であった。播種を来した腹膜の環境変化に關与する検討を行っている際、播種病巣を病理組織学的に観察したところ、病巣周囲を取り囲む免疫細胞(T 細胞)の浸潤を多数認め、播種病巣への腫瘍免疫の關与の重要性に着目した。腹膜に発生する広汎な播種病巣の制御には、抗がん剤による殺細胞効果や EMT 現象の制御のみならず、周囲の免疫細胞を利用した腫瘍免疫を活性化することが可能であれば、さらに治療効果が増大し生命予後につながるのではないかと考えた。今回注目した Eribulin は、卵巣癌初回治療で使用されるパクリタキセルと同じ微小管重合阻害を作用機序とする抗がん剤であるが、他癌腫の報告からパクリタキセルにはない EMT 現象の制御と抗腫瘍免疫への關与が示唆されている。また他癌腫で臨床応用が既に行われており、投与の簡便性や有害事象の少なさは証明されている。これらのことから Eribulin は、EMT 現象の制御と抗腫瘍免疫の活性化により白金製剤耐性となった難治性卵巣癌においても治療効果が望める新規の抗がん剤として有用ではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では卵巣癌における EMT 現象の制御と CTLA-4 を介した抗腫瘍免疫との關連を解明し、難治性進行卵巣癌に対する新たな治療戦略として、Eribulin を早期に臨床応用に向けて臨床試験への導入を最終目標とした。卵巣癌に対し Eribulin を投与することで殺細胞効果と腫瘍免疫応答の活性化を促し播種病巣の制御を行う新規治療開発にむけた基礎的・臨床的検討を行うことを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

卵巣癌細胞株を用い Eribulin 投与による変化を確認する。卵巣癌細胞株は、プラチナ感受性株 (A2780) およびプラチナ抵抗性株 (Caov-3、RMG-1、A2780CP) を用いる。細胞増殖能抑制について MTT assay 法、浸潤能の抑制について invasion assay 法を用いて証明を行う。さらに Eribulin による EMT 現象の制御の検討として、EMT 関連遺伝子 (Snail、Slug、E-cadherine、AE1/AE3、N-cadherine、Vimentin) また接着分子 (integrin、ICAM-1 など) および MMP の発現 status を RT-PCR 法および Western blotting 法を用いて解析する。

次に卵巣癌白金製剤感受性株 (A2780) および白金製剤耐性株 (Caov-3、RMG-1、A2780CP) とヒト末梢血細胞の共培養を行う。各卵巣癌細胞株に Snail を強発現させ、制御性 T 細胞である CD4 陽性 T 細胞と細胞殺傷性 T 細胞である CD8 陽性 T 細胞の割合 (CD4/CD8 比) と、RNA レベルでの CTLA-4 の発現を解析する。さらに、卵巣癌細胞株に Eribulin を添加し、CD4/CD8 比と CTLA-4 の発現レベルの変化を確認し Eribulin の腫瘍免疫への影響を解析する。

In vitro における証明が行われた後、ヌードマウスを用いた *In vivo* での解析に移行する。EMT 現象の有無に關しては、我々の過去の研究より EMT 現象のマーカーとなる CD24 を用いて実験を行う。ヌードマウスの白金製剤感受性卵巣癌細胞株と白金製剤抵抗性卵巣癌細胞株および各細胞株で CD24 陽性 (EMT 陽性)、陰性細胞 (EMT 陰性) の播種モデルを作製する。Eribulin 投与による卵巣癌の EMT 現象の制御が可能か否かをマウスより摘出した腫瘍を用いて、EMT 関連遺伝子、接着分子の発現 status、CTLA-4 の発現 status を RT-PCR 法および Western blotting 法を用いて解析を行う。同様に摘出した腫瘍より、免疫組織染色を用いて腫瘍内の制御性 T 細胞 (CD4 陽性) と細胞殺傷性 T 細胞 (CD8 陽性) の割合 (CD4/CD8 比) と治療効果への影響について評価を行う。

4. 研究成果

プラチナ感受性卵巣癌細胞株 (A2780) と抵抗性細胞株 (CaOV3、RMG-1、A2780CP) を用いて Eribulin 添加による増殖抑制効果を MTT assay を用いて検証した。Eribulin は全ての細胞株で用量依存性に増殖抑制効果を認めたと、感受性細胞株に比較すると抵抗性細胞株での効果は低かった。また invasion assay 法を用いた浸潤能の評価においても全ての細胞株において Eribulin 投与より浸潤能の低下が認められた。Eribulin 添加により、EMT 関連遺伝子である Snail、Slug の発現増強と E-cadherine の減弱を RT-PCR 法および Western blotting 法を用いて証明した。しかし、integrin および ICAM-1 また MMP 発現の status については Eribulin 添加前後で変化はみられなかった。

さらに卵巣癌白金製剤感受性株 (A2780) および白金製剤耐性株 (Caov-3、RMG-1、A2780CP) とヒト末梢血細胞の共培養を行った。各卵巣癌細胞株に TGF- β を添加し EMT マーカーである Snail および Slug が強発現していることを確認した後、CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の割合

(CD4/CD8 比)と、RNA レベルでの CTLA-4 の発現を Eribulin 添加前後で比較した。Eribulin 添加前と比較して添加後は、CD4/CD8 比は増加し CTLA-4 の発現の増強が確認され、卵巢癌細胞株において Eribulin は抗腫瘍免疫を活性化させることが証明された。

以上のように、Eribulin による卵巢癌細胞株での増殖抑制と浸潤能低下作用と抗腫瘍免疫の活性化が *in vitro* で証明されたため、ヌードマウスに白金製剤感受性卵巢癌細胞株と白金製剤抵抗性卵巢癌細胞株および各細胞株で CD24 陽性(EMT 陽性)、陰性細胞(EMT 陰性)の播種モデルを作成し、これらのヌードマウスに Eribulin を経静脈投与を行い、治療効果およびそのメカニズムについて *in vivo* における検証を現在行っている。

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
研究分担者	林 正美 (HAYASHI MASAMI) (00551748)	大阪医科大学・医学部・准教授 (34401)	
研究分担者	大道 正英 (OHMICH I MASAHIDE) (10283764)	大阪医科大学・医学部・教授 (34401)	
研究分担者	田中 良道 (TANAKA YOSHIMICHI) (10625502)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	恒遠 啓示 (TSUNETOH SATOSHI) (70388255)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	佐々木 浩 (SASAKI HIROSHI) (80432491)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	寺井 義人 (TERAI YOSHITO) (90278531)	大阪医科大学・医学部・非常勤講師 (34401)	

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
研究分担者	田中 智人 (TANAKA TOMOHITO) (90411363)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	

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