

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15319

研究課題名(和文) がん免疫研究モデルとして免疫ヒト化MSI-H大腸がん異種移植マウスモデルの開発

研究課題名(英文) Microsatellite instability-high colorectal cancer patient-derived xenograft models for cancer immunity research

研究代表者

船越 洋平 (Funakoshi, Yohei)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50566966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫原性の高いマイクロサテライト不安定性(MSI-H)大腸がんを用いてPDXモデルを作製し、がん組織を採取した同一患者からの末梢血単核球(PBMC)をこのモデルに輸注することで、がん免疫研究に適した免疫ヒト化PDXモデルの作製を試みた。

3モデルのMSI-H大腸癌PDXモデル(PDX1-3)を作成し、組織学的解析、遺伝学的解析を行った。PDX腫瘍においてもMSI-Hが維持されていたPDX1にPBMCを尾静脈より輸注し、PDX腫瘍を解析したところ、ヒトCD45陽性細胞とCD3陽性細胞が確認された。このモデルに免疫チェックポイント阻害薬を投与したところ浸潤リンパ球の増加傾向を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害薬は、がん患者の生存期間の延長に寄与している。しかしながら、免疫チェックポイント阻害薬単剤の奏効割合は各がん種で概ね20%とその効果は限定的である。従って、更なるがん免疫および免疫療法の研究開発が必要であるが、現在の動物実験モデルではヒトがん免疫の再現が十分でないため、前臨床試験モデルを用いた免疫療法の薬効評価やバイオマーカーの探索を行うことが難しい。

今回の研究は、ヒトのがん免疫をマウス内に再現することを目指したものである。これによりがん免疫療法の薬効評価が進めば、がん免疫療法の奏効率の上昇に寄与する研究が加速するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： There has been an increasing demand for appropriate preclinical mice models for evaluating the efficacy of cancer immunotherapies. Because conventional mouse models have limitations in cancer immunity research, we newly established a humanized patient-derived xenograft (PDX) model using microsatellite instability-high (MSI-H) colorectal cancer (CRC) tissues and patient-derived PBMCs.

PDX models were established from three patients with MSI-H CRC. PDX tumors were compared to the original patient tumors in terms of histological and genetic characteristics. PDX with the germline mutation (PDX1) was histologically similar to the patient tumor, and retained the genetic characteristics, including MSI-H. When T cells from the same patient with MLH1 mutation were injected into the PDX1 through the tail vein, they were detected in the PDX tumor. Finally, we performed drug (anti PD-1 antibody) test by using humanized PDX1, and we found tendency for the increased number of infiltrating T cells.

研究分野：がん免疫

キーワード：がん免疫 PDXモデル 免疫ヒト化 免疫チェックポイント阻害薬 マイクロサテライト不安定性

1. 研究開始当初の背景

近年、がんに対する免疫応答の理解と解明が進み、抗 PD-1 抗体など免疫チェックポイント阻害薬が臨床応用されている。これら薬剤はがん治療で大きな成果を上げているが、治療費が極めて高額であるにも関わらず、単剤の奏効率は 20%程度と十分ではない。そのため、より効率的な治療戦略を開発することが、臨床的にも保険財政的にも喫緊の課題となっている。しかし、ヒトがん組織とヒト免疫細胞の応答を正確に再現する動物実験モデルがなく、十分な前臨床試験やトランスレーショナルリサーチは行われていない。

2. 研究の目的

一般に、がんの前臨床試験やトランスレーショナルリサーチに使用する動物実験モデルとして、患者のがん組織を超免疫不全マウス (NOD/SID/IL2rgKO マウス (NSG マウス)) に直接移植して継代培養する「患者由来がん異種移植マウスモデル (Patient-Derived Xenograft (PDX) mouse model)」が広く活用されている。しかしながら、がん免疫研究に関しては、この従来の PDX モデルを用いることは以下の 2 つの理由から適していない。1 つ目は免疫チェックポイント阻害薬の奏効割合の低さからも、がん組織の多くは免疫原性が低いと考えられている。そのため、たとえ PDX モデルを作製しても、がん免疫研究に適さないことが多い。2 つ目は PDX モデルの作製に用いる重度免疫不全マウスには免疫システムがほとんど備わっておらず、ヒト免疫機構が存在しない点である。

これら 2 つの課題を克服するため、免疫原性の高いマイクロサテライト不安定性 (Microsatellite instability-high ; MSI-H) 大腸がんを用いて PDX モデルを作製し、がん組織を採取した同一患者からの末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells ; PBMC) を MSI-H PDX モデルに輸注することでヒト免疫を付与することを着想した。これら手法にてがん免疫研究に適した免疫ヒト化 PDX モデルの作製し、免疫療法の前臨床モデルとして使用する。

3. 研究の方法

当院で手術予定の大腸がん患者のがん組織を用いて術前に MSI 検査を行い、手術時に MSI-H 大腸がん検体を採取した。採取された検体は NOD/LtSz-scid /IL-2R^{-/-} (NSG) マウスの皮下に移植した。患者腫瘍と樹立された MSI-H 大腸がん PDX モデルの腫瘍に対して、組織学的解析 (H&E 染色) やミスマッチ修復 (mismatch repair ; MMR) 蛋白である MLH1、PMS2、MSH2、MSH6 の発現解析、BAT25、BAT26、NR21、NR24、NR27 の 5 つのマイクロサテライトマーカーを用いた MSI 検査を施行し、患者腫瘍の性質が PDX モデル腫瘍でも維持されているかを検討した。さらに、作製したモデルにヒト免疫を付与するため、腫瘍を採取した同一患者の PBMC を尾静脈より輸注した。輸注後 3 日目に PDX モデルより腫瘍を摘出し、腫瘍内のヒト免疫細胞の観察を行った。

4. 研究成果

(1) MSI の測定

当院にて大腸がん手術を行うことが予定されている患者に対し、文書による同意を得て、MSI の測定を行った。研究期間内に 100 名の患者を登録した。MSI-H 症例は 100 例中 6 例であり、概ねこれまでの報告と一致している。今回、MSI の測定に併せて詳細な家族歴の聴取も行っており、Amsterdam Criteria II や Revised Bethesda Guidelines の評価も行っている(6 名中 2 名が RBG、AMS の両方に該当)。日本人 大腸がん患者の MSI-H の割合や背景について十分な報告はなく、現在これらの結果について論文作成中である。

(2) MSI-H 大腸がん PDX モデルの評価 (表 1)

3 人の MSI-H 大腸がん患者から MSI-H 大腸がん PDX モデル(PDX1-3)を樹立した。これらのうち早期に樹立された、2 つのモデル(PDX1 及び PDX2)について詳細な解析が終了している(PDX3 については現在解析中)。MSI-H 大腸がん患者のうち、1 人は *MLH1* (c.1990-2A>G) に生殖細胞変異をもつ患者で、もう 1 人は *MLH1* プロモーター領域の高メチル化による大腸がん患者であった。*MLH1* (c.1990-2A>G) に生殖細胞変異を持つ患者から樹立された PDX モデル (PDX 1) の腫瘍は患者腫瘍と同様に、H&E 染色で高分化な組織像を呈した。免疫染色でも患者腫瘍と PDX 1 腫瘍は同様に、*MLH1* と *PMS2* の発現が低下し、MSI-H が維持されていた。加えて、患者にみられた *MLH1* (c.1990-2A>G) の変異が PDX 1 腫瘍においても確認された。一方、*MLH1* プロモーター領域の高メチル化による大腸がん患者から樹立されたモデル (PDX 2) の腫瘍は患者腫瘍と異なり、H&E 染色では低分化な組織像を呈した。また、免疫染色でも患者腫瘍でみられた *MLH1* と *PMS2* の発現低下及びマイクロサテライト不安定性が PDX 2 腫瘍ではみられなかった。興味深いことに、患者腫瘍でみられた *MLH1* プロモーター領域の高メチル化は PDX 2 腫瘍では著しく低下していた。

	Patient 1	PDX 1	Patient 2	PDX 2
Histological differentiation	Well	Well	Well	Poor
MSI status	MSI-H	MSI-H	MSI-H	MSS
BAT25	+	+	+	-
BAT26	+	+	+	-
NR21	+	+	-	-
NR24	+	+	-	-
NR27	+	+	+	-
Loss of MMR				
MLH1	-	-	-	+
PMS2	-	-	-	+
MSH2	+	+	+	+
MSH6	+	+	+	+
MMR gene alternation	<i>MLH1</i> c.1990-2A>G	<i>MLH1</i> c.1990-2A>G	<i>MLH1</i> promoter methylation	

表 1 MSI-H 大腸がんより作成した PDX モデルの評価

(3) PDX モデルの免疫ヒト化 / 前臨床試験

MSI-H が維持されている PDX1 を用いて研究を継続した。ヒト免疫を付与する目的で、PDX 1 に腫瘍を提供した同一患者の PBMC を尾静脈より輸注した。輸注後 3 日目に PDX 1 より PDX 腫瘍を摘出し、免疫染色にてヒト T 細胞の浸潤が確認した(図 1)。

次に、免疫チェックポイント阻害薬の薬効評価として、これら免疫ヒト化マウスに抗 PD-1 抗体であるニボルマブの投与を行った。少数の実験例であるが、ニボルマブ非投与群に比較して投与群では T 細胞浸潤が増加している傾向がみられた。今後も繰り返し実験を行い、免疫治療の薬効評価モデルとして評価を重ねていく。

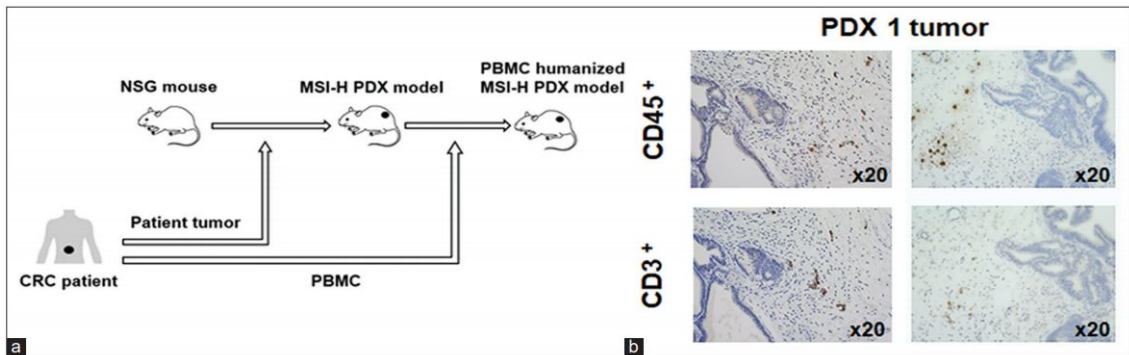


図 1. a 免疫ヒト化 PDX モデルの作成. b PDX1 腫瘍内に浸潤したヒト T 細胞

(4) 今後の展望

研究期間内に MSI-H 腫瘍より PDX モデルを 3 モデル樹立した。そのうちの 1 モデルは高い免疫原性を維持していることより、PBMC を用いてヒト免疫の付与し免疫チェックポイント阻害薬の薬効評価を行うことが出来た。これらの成果は、複数の学会及び英文での論文報告として発表している。

一方で、*MLH1* プロモーター領域の高メチル化による MSI-H 大腸がんにより作成された PDX が MSI-H を維持していなかったこともあり、予定していたモデル数を樹立することができなかった。MSI-H PDX モデルを増やすため、引き続きモデルの樹立を継続していく。また、複数のモデルを樹立することで、マウス内でのメチル化の減少が一般的なものかを確認していく。

MSI-H PDX モデルに同一患者からの PBMC を輸注し、腫瘍内にヒトリンパ球を認めるに至ったが、リンパ球の浸潤は患者腫瘍におけるリンパ球浸潤に比較して少なかった。リンパ球浸潤が豊富な腫瘍を PDX モデル内に再現するためには更なる研究が必要である。輸注リンパ球数や輸注方法も考慮した研究を継続していく。

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 0件）

1. 著者名 1.Suto H, Funakoshi Y, Nagatani Y, Imamura Y, Toyoda M, Kiyota N, Matsumoto H, Tanaka S, Takai R, Hasegawa H, Yamashita K, Matsuda T, Kakeji Y, Minami H.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Microsatellite instability-high colorectal cancer patient-derived xenograft models for cancer immunity research.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Cancer Res Ther	6. 最初と最後の頁 in press
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 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 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hirofumi Suto, Yohei Funakoshi, Yoshiaki Nagatani, Yoshinori Imamura, Masanori Toyoda, Naomi Kiyota, Hisayuki Matsumoto, Shinwa Tanaka, Ryo Takai, Hiroshi Hasegawa, Kimihiro Yamashita, Takeru Matsuda, Yoshihiro Kakeji, Hironobu Minami.
2. 発表標題 Microsatellite instability-high colorectal cancer patient-derived xenograft models for cancer immunity research.
3. 学会等名 Annual Meeting of the Japanese Society of Medical Oncology 2021.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高井亮, 山下公大, 須藤洋崇, 豊田昌徳, 船越洋平, 今村善宣, 清田尚臣, 井上潤, 田中心和, 松田武, 児玉裕三, 南博信, 掛地吉弘
2. 発表標題 本邦における高頻度マイクロサテライト不安定性大腸癌のスクリーニング方法の検討
3. 学会等名 第25回日本家族性腫瘍学会学術集会. 2019年
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高井亮, 山下公大, 須藤洋崇, 豊田昌徳, 船越洋平, 今村善宣, 清田尚臣, 井上潤, 田中心和, 松田武, 児玉裕三, 南博信, 掛地吉弘
2. 発表標題 当院における高頻度マイクロサテライト不安定性大腸癌のスクリーニング方法の検討
3. 学会等名 第30回日本消化器癌発生学会総会. 2019年
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroataka Suto, Masanori Toyoda, Hideaki Goto, Yohei Funakoshi, Kimihiro Yamashita, Satoshi Suzuki, Yoshihiro Kakeji, Hironobu Minami
2. 発表標題 Universal screening with microsatellite instability testing in Japanese patients with colorectal cancer
3. 学会等名 The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2018
4. 発表年 2018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

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