

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16652

研究課題名(和文) 骨肉腫と免疫細胞の相互作用の解明による骨肉腫に対する新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Investigation of relationship between osteosarcoma and immune cells

研究代表者

吉田 和薫 (Yoshida, Kazushige)

信州大学・医学部・特任助教

研究者番号：60770774

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)：本研究は骨肉腫に対する抗PD-1抗体の有用性の評価と投与時の腫瘍微小環境における免疫細胞の動態について評価したものである。今回の結果から、骨肉腫異所性移植マウスモデルにおいて抗PD-1抗体(4H2)の長期投与により腫瘍体積の増大が抑制され、全生存率が改善することが分かった。また、抗PD-1抗体投与により制御性T細胞(Treg)が減少したが、中でも活性化型Treg(Ki67+)が減少していた。また、骨肉腫臨床検体においてWnt3a, Lrp5, Wnt5a陽性が相関することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、抗PD-1抗体が骨肉腫の腫瘍体積の増加を抑制し、全生存率を改善することを示した。また、抗PD-1抗体投与により腫瘍内のTregが減少することが分かり、抗PD-1抗体の抗腫瘍効果における新しいメカニズムを示唆している。これらの研究成果は骨肉腫の治療における抗PD-1抗体を考えるうえで重要な基礎データとなる。また、臨床検体を用いた検討の結果は骨肉腫においてWnt古典経路及び非古典経路が協調的に働いている可能性を示しており、病態の理解やそれに伴う新規治療法の確立において有用な結果である。

研究成果の概要(英文)： In this research, we evaluated the efficacy of anti-PD-1 antibody for osteosarcoma and the dynamics of immune cells in tumor microenvironment. According to the results, the long-term administration of anti-PD-1 antibody suppressed the increase of tumor volume and improve the overall survival in the osteosarcoma heterotopic transplantation model mouse. Also, the regulatory T cells (Treg) especially the activated Treg(Ki67+) decreased by the administration of anti-PD-1 antibody.

On the other hand, Wnt3a, Lrp5 and Wnt5a positive are correlated in the clinical specimen of osteosarcoma.

研究分野：整形外科

キーワード：骨肉腫 抗PD-1抗体 Wnt

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

初診時に肺転移を認める骨肉腫症例での5年生存率は20%程度と低く、既存の治療が無効な症例も存在するため、新規の治療法が切望されている。骨肉腫の腫瘍細胞の異型の強さや形態、間質の状態は様々で、多彩な組織像を呈し、原因遺伝子も複数報告されている。その多様性が分子標的薬などの腫瘍自体を標的とした新規薬剤開発が進まない一因となっている。

後述する免疫チェックポイント阻害薬による治療は腫瘍の多様性の影響を受けにくい治療であり、治療に関連した骨肉腫の挙動の更なる解明は、新しい視点からの治療標的の発見につながる可能性を有する。

がんは免疫からの攻撃を回避している(免疫寛容)。がんの排除にはCD8陽性の細胞障害性T細胞が重要とされるが、それらのT細胞表面のPD-1分子とそのリガンドであるPD-L1分子(腫瘍表面)の結合によるT細胞機能の抑制が、免疫寛容の一因と考えられている。抗PD-1抗体は抑制シグナルを解除し、T細胞の再活性化によってがんの排除を行うため抗がん剤として作用する。現在悪性黒色腫や肺癌に対し目覚ましい治療効果を上げているが、骨肉腫に対する臨床試験は複数種類のがんに対する試験の一部として数例に行われているのみで有効性は明らかではない。先行研究(JSPS科研費JP16K20045, H28-H29)において申請者は骨肉腫に対する抗PD-1抗体の有効な治療効果を動物実験レベルで明らかにした。この研究結果は骨肉腫に対して抗PD-1抗体が有効である可能性を強く示唆しており、今後の臨床応用に向けた有力な後押しになると考えている。その研究過程で抗PD-1抗体の投与を行うと腫瘍におけるWnt古典経路の標的遺伝子発現が抑制されるという*in vivo*試験の結果を得た(図1)。

Wntは発生、幹細胞の維持や生体における恒常性の維持など多様な生命現象に関与する細胞外分泌タンパク質である。Wntシグナルの伝達形式には、古典経路と非古典経路が存在する。古典経路の代表的なリガンドであるWnt10bは受容体であるFrizzledおよび共受容体であるLRP5/6を介して細胞内にシグナルを伝達し、細胞質内のカテニンの蓄積を介した標的遺伝子の発現を誘導する。様々な研究でWnt古典経路活性の亢進は悪性腫瘍を活性化するとされている(Polakakis, P. Wnt signaling and cancer, *Genes Dev.* 2000)。骨肉腫においても古典経路は腫瘍の形成、浸潤、転移に促進的な影響を与えるとされている(Guo, Y., et al. Dominant negative LRP5 decreases tumorigenicity and metastasis of osteosarcoma in an animal model, *Clin Orthop Relat Res.* 2008. 10.1007/s11999-008-0344-y)。一方、Wnt非古典経路の代表的なリガンドであるWnt5aは古典経路を様々なメカニズムで抑制することが知られている。しかしWnt5a高発現の骨肉腫は転移が多い(Lu, B. J., et al. Expression of WNT-5a and ROR2 correlates with disease severity in osteosarcoma, *Mol Med Rep.* 2012. 10.3892/mmr.2012.772)など、腫瘍に対して促進的に作用するとの報告もある。本研究グループは、骨芽細胞においてWnt5aがLRP5/6の発現増加により古典経路に協調的に作用し、骨形成を促進することを見出した(Okamoto, M., et al. Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/beta-catenin signaling during osteoblastogenesis, *Sci Rep.* 2014. 10.1038/srep04493)。このWnt非古典経路と古典経路の協調という独自の着眼点は骨芽細胞系由来の悪性腫瘍である骨肉腫においてWnt活性の変化の原因を理解するうえで重要になると考えている。

申請者は骨肉腫において抗PD-1抗体を短期間投与した場合にWnt古典経路が抑制されるという予備実験結果を得た(図1)。抗PD-1抗体がCD8陽性T細胞の再活性化という本来の作用だけでなく、腫瘍自体のWnt経路(古典経路 and/or 非古典経路)を制御し腫瘍抑制的に作用している可能性に着目し、そのメカニズムの解明が抗PD-1抗体の抗腫瘍効果の増強法や新しい治療標的の発見につながると考えている。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は骨肉腫に対する新規治療法を開発することである。前述のとおり申請者は予備実験において、抗PD-1抗体治療で骨肉腫のWnt古典経路活性が低下することを発見した。これは抗PD-1抗体の投与が、本来のCD8陽性T細胞の再活性化という作用以外の影響を与えている可能性を示唆している。申請者は骨免疫学で蓄積されつつある骨芽細胞と免疫細胞の相互作用に注目して抗PD-1抗体の骨肉腫に対する作用を解明することを目標とする。

3. 研究の方法

骨肉腫細胞株KL6を背部皮下に移植した骨肉腫異所性皮下移植マウスモデルに抗PD-1抗体を投与し、Wntシグナル活性を評価する。抗PD-1抗体の投与方法は先行研究で行った短期間のみではなく、実際の臨床使用で行われている間欠的な長期投与を行う。腫瘍局所における浸潤T細胞の分画をFlowcytometryで評価し、IL17をはじめとするサイトカインをリアルタイムPCR、ウエスタンブロット法、ELISA、組織免疫染色で評価する。Wntリガンドの発現量、CD40L陽性T細胞の変化とIL17量の変化を検証し、骨免疫学的な知見を手掛かりに骨肉腫と免疫細胞の相互関

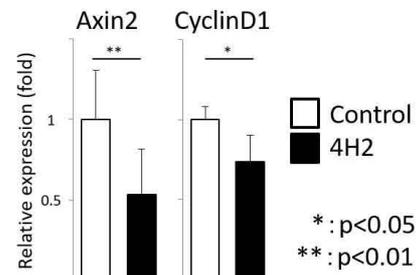


図1 抗PD-1抗体投与時のWnt古典経路標的遺伝子の変化

係を評価する。

骨芽細胞や他のがん腫と免疫細胞で報告されている相互作用が骨肉腫でも見られるかどうかを検証する。過去の文献(Kim H. PLoS One. 2015)を参考に CD40L を発現させたマウスリンパ球と骨肉腫細胞株の共培養を行い CD40/40L シグナルによる腫瘍の増殖能の変化を alamarBlue assay および scratch assay で評価する。その際に TGF や IL17 の産生の変化をリアルタイム PCR、ELISA、ウエスタンブロット法を用いて検証する。

臨床検体および骨肉腫モデルマウスを使用し、腫瘍局所での Wnt シグナル活性をリアルタイム PCR、ウエスタンブロット法、TOP Flash 法、ELISA、組織免疫染色などで解析する。それにより骨肉腫における CD40L 陽性 T 細胞の増加や Wnt10b の増加の有無を検証する。

骨肉腫臨床検体を用いて初診時(未治療時)での Wnt リガンド(Wnt3a, Wnt5a)、古典経路の共受容体(LRP5/6)、カテニンに mRNA 発現を測定する。保存してあるカルテを用いて最終転帰、肺転移の有無及び時期、抗がん剤に対する反応を評価する。

4. 研究成果

本研究は骨肉腫において抗 PD-1 抗体を投与した際の Wnt 古典経路標的遺伝子の発現低下をベースとして進めている。抗 PD-1 抗体の長期投与による治療効果増強作用があるかどうか評価を行う実験系を用いて Wnt 古典経路標的遺伝子発現がどう変化するか検証を行った。この実験系では抗 PD-1 抗体投与を短期群(週2回、合計4回)と長期群(週2回、安楽死基準を満たすまで)に分けて行った。結果として短期投与群はコントロールと比較して、また、長期投与群はコントロール群および短期投与群と比較して腫瘍体積の増大が抑制され、全生存率も改善した(図2)。

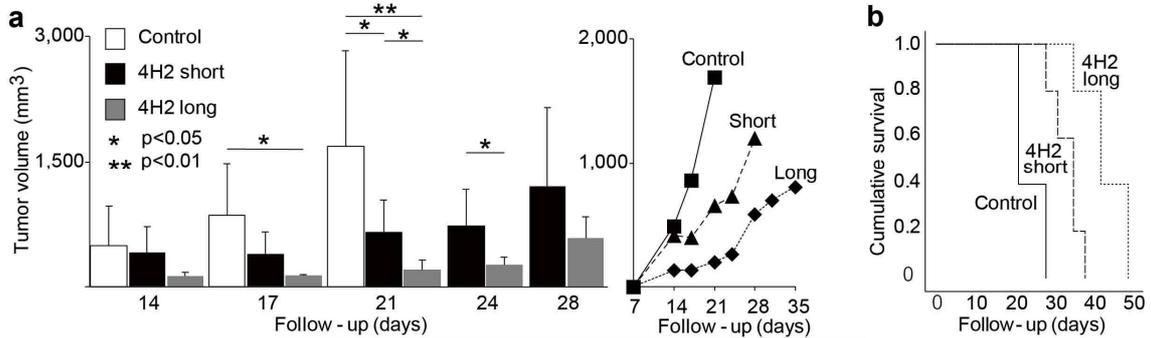


図2 抗 PD-1 抗体長期投与の抗腫瘍効果

長期群において Wnt 古典経路標的遺伝子の発現が低下する傾向がみられた。しかし、有意な差はみられず、より実臨床に近い使い方をした場合の Wnt 経路に対する影響の程度が大きくない可能性が示唆された(次頁図 3-a)。

一方で、Wnt 古典経路の代表的なリガンドである Wnt3a 発現が上昇する傾向がみられ、同時に Wnt 非古典経路の代表的なリガンドである Wnt5a の発現が有意に上昇した(図 3-b)。本研究のキーポイントの一つである Wnt 古典経路と Wnt 非古典経路の協調は、骨芽細胞においては LRP5/6 の発現上昇を介して起こっていたが、今回の結果では LRP5 発現は低下傾向、LRP6 発現は上昇傾向であり(図 3-c)、骨芽細胞における協調のメカニズムとは一致しない結果であった。以前行った 2 群間比較を行った実験データ(図 1 と同一条件)においては PD-1 抗体投与時の LRP5 発現は上昇する傾向があり(図 4)、骨肉腫は骨芽細胞系の悪性腫瘍であり、同一のメカニズムにより Wnt 古典経路と非古典経路が協調的に作用していることが予想されたが、少なくとも LRP5 の動態においてはほかに調節に関与する因子があることが予想される。

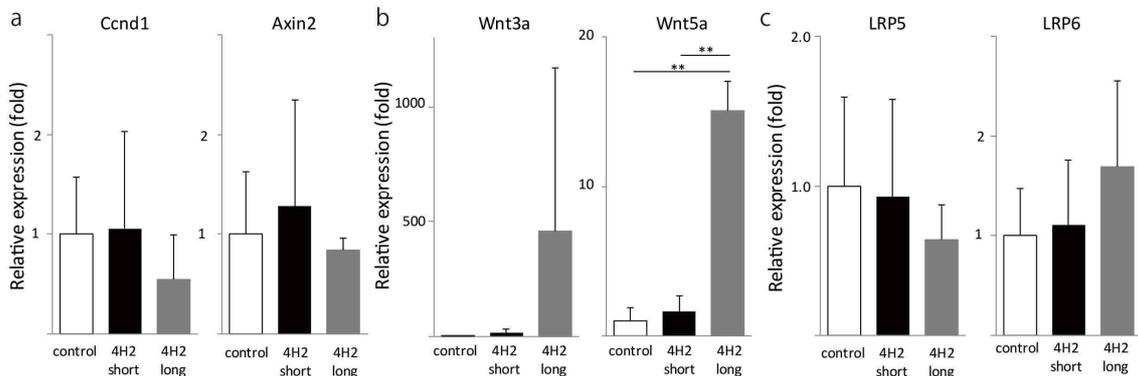


図3 抗 PD-1 抗体投与時の Wnt 関連遺伝子発現の変化

本研究の前提となる抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果はすべての実験において再現性良く確認されている。抗 PD-1 抗体が本来の T 細胞免疫を再活性化させるという働きのほかに、骨肉腫の Wnt 古典経路活性を低下させることで抗腫瘍効果を得ている可能性に関連し、ヒト骨肉腫において Wnt 経路抑制の予後に対する効果を予測するために臨床検体における Wnt 古典経路活性と予後の関係を評価した。

結果は LRP5 陽性、LRP6 陽性、カテニン陽性と早期の肺転移が有意に相関した(順に相関係数 0.558、 $p=0.013$ 、相関係数 0.520、 $p=0.023$ 、相関係数 0.597、 $p=0.007$)。また、LRP5、LRP6、カテニン陽性と最終転帰の良さが逆相関していた(順に、相関係数 -0.610、 $p=0.006$ 、相関係数 -0.613、 $p=0.005$ 、相関係数 -0.667、 $p=0.002$)。この結果は骨肉腫において Wnt 経路活性が生命予後と逆相関するという諸家の報告と一致するものである。また、LRP5 陽性はカテニン陽性(相関係数 0.575、 $p=0.010$)、Wnt5a 陽性(相関係数 0.607、 $p=0.006$)とも有意に正の相関を示した。また、LRP5 陽性と LRP6 陽性は強く相関した(相関係数 0.846、 $p<0.001$)。LRP6 はカテニン陽性と相関した(相関係数 0.530、 $p=0.020$)が、Wnt5a 陽性とは相関しなかった(相関係数 0.274、 $p=0.257$)。この結果は LRP5 が Wnt 古典経路と非古典経路の協調において LRP6 と異なる働きをしている可能性を示しており、マウスモデルでの結果がヒト骨肉腫においても成り立っている可能性を示唆している。

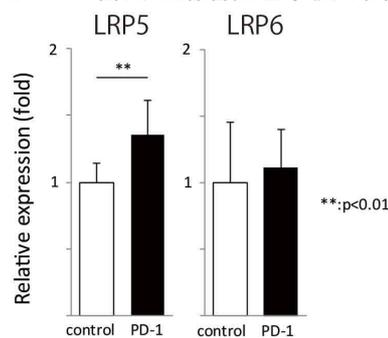


図 4 LRP5/6 発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Yoshida Kazushige, Okamoto Masanori, Sasaki Jun, Kuroda Chika, Ishida Haruka, Ueda Katsuya, Okano Satomi, Ideta Hirokazu, Kamanaka Takayuki, Sobajima Atsushi, Takizawa Takashi, Kito Munehisa, Aoki Kaoru, Uemura Takeshi, Haniu Hisao, Kato Hiroyuki, Saito Naoto	4. 巻 Volume 12
2. 論文標題 Clinical outcome of osteosarcoma and its correlation with programmed death-ligand 1 and T cell activation markers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 OncoTargets and Therapy	6. 最初と最後の頁 2513 ~ 2518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/OTT.S198421	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 -

1. 著者名 Yoshida Kazushige, Okamoto Masanori, Sasaki Jun, Kuroda Chika, Ishida Haruka, Ueda Katsuya, Ideta Hirokazu, Kamanaka Takayuki, Sobajima Atsushi, Takizawa Takashi, Tanaka Manabu, Aoki Kaoru, Uemura Takeshi, Kato Hiroyuki, Haniu Hisao, Saito Naoto	4. 巻 20
2. 論文標題 Anti-PD-1 antibody decreases tumour-infiltrating regulatory T cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-019-6499-y	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 -

〔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
研究協力者	岡本 正則 (Masanori Okamoto)		
研究協力者	佐々木 純 (Sasaki Jun)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	出田 宏和 (Ideta Hirokazu)		
研究協力者	椋野 みどり (Mukuno Midori)		
研究協力者	齋藤 直人 (Saito Naoto)		
研究協力者	加藤 博之 (Kato Hiroyuki)		