

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16745

研究課題名(和文) 大腸癌に対する間質反応抑制剤と免疫チェックポイント阻害剤との併用療法の効果の検討

研究課題名(英文) Evaluation of the effect of combination therapy with stromal response inhibitor and immune checkpoint inhibitor for colorectal cancer

研究代表者

弓削 亮 (Yuge, Ryo)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：70794791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：免疫細胞の浸潤に着目したヒト大腸癌組織のphenotype分類 当初の予定より多い、200例近いヒト大腸癌切除標本に対して、免疫染色を行い免疫学的腫瘍微小環境のphenotype分類と予後との関連について解析を行った。5年全生存率はInflamed typeで良好な傾向を認めた。3つのphenotypeの同所移植マウスモデルを作成し、それらのマウスモデルを使用して、ICIとPDGFR阻害剤での治療実験を行った。4群のうち、併用群において最も抗腫瘍効果が高いという結果を得た。

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剤(ICI)の効果を増強させるための併用薬の探索は、様々な薬剤が試みられているが、有効性の高い組み合わせが見出だせていないのが現状である。また生体内でのCAFと腫瘍免疫の関連性についても報告がこれまでなかった。この理由として、腫瘍免疫微小環境を正確に再現した生体モデルが確立できていないことが挙げられる。本研究で用いたマウスモデルでの治療実験は、腫瘍免疫におけるCAFの役割の解明だけでなく、ICIの効果を増強させる新規治療標的の評価に有用であり、ICI単剤で効果がなかった大腸癌症例に対する併用療法の適応につながる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Phenotype classification of human colorectal cancer tissues focusing on infiltration of immune cells We performed immunostaining and phenotype classification of the immunological tumor microenvironment in nearly 200 resected human colorectal cancer specimens, more than originally planned. The relationship between these classifications and clinicopathological and prognostic factors was also analyzed. The 5-year overall survival rate showed a favorable trend in the Inflamed type. Combination effect of anti-PD-1 antibody and PDGFR inhibitor in orthotopic transplantation model of colorectal cancer We generated orthotopic transplantation mouse models of three phenotypes classified by clinical specimens. We confirmed immunohistochemically whether the created models could reproduce the microenvironment of each phenotype. Of the four groups, the combination group showed the highest anti-tumor efficacy.

研究分野：腫瘍間質

キーワード：大腸癌 腫瘍間質 免疫チェックポイント阻害剤

1. 研究開始当初の背景

腫瘍発育における癌・間質相互作用の重要性

腫瘍組織は癌細胞のみならず、各種免疫細胞を含む多様な間質細胞とともに形成されており、癌の発育と進展には、癌細胞と間質の相互作用が重要であることが明らかとなっている。間質の主な構成成分として癌関連線維芽細胞(carcinoma-associated fibroblast : CAF)が知られており、これらと癌細胞との相互作用が腫瘍の発育進展に促進的に機能するとされているが、詳細な分子機構については明らかとなっていない。大腸癌では癌細胞が粘膜下に浸潤する際に、癌胞巣周囲に線維性間質が増生することが知られており、間質反応と呼ばれている。我々は間質反応が強い癌は悪性度が高いことを以前より報告している。また、我々は PDGFR 阻害剤によって移植腫瘍の間質反応が強力に抑制されることを報告している。

大腸癌に対する免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) の有効性

近年、抗 programmed death-1 (PD-1) 抗体薬をはじめとする ICI の出現により、癌免疫療法は劇的な進歩を遂げ、現在本邦においても悪性黒色腫、肺癌などで ICI が保険承認されている。しかしながら大腸癌においてははまだ一部の腫瘍(高頻度マイクロサテライト不安定性症例)でしか、癌免疫療法の効果が認められないことがわかっている。他の薬剤との併用によって治療効果を高める試みがなされており、様々な分子標的薬や抗癌剤と ICI との併用に関する報告が散見されるが、有効性の高い組み合わせが見出せていないのが現状であり、間質反応を抑制する薬剤との併用効果に関しては報告がない。

CAF の腫瘍免疫に及ぼす影響

CAF の腫瘍免疫へ及ぼす影響として、CAF が放出する様々なケモカイン、サイトカイン等の分泌因子が抗腫瘍免疫応答を活性化することが様々な癌腫で報告されているが、いずれも in vitro 実験によるもので生体内での CAF と腫瘍免疫の関連性については報告がない。

腫瘍免疫の組織学的な phenotype 分類

近年、腫瘍免疫の組織学的な phenotype 分類として、inflamed type (免疫細胞が癌胞巣に浸潤しているタイプ)、excluded type (免疫細胞の間質への集積はあるが癌胞巣内に浸潤できていないタイプ)、desert type (癌微小環境内に免疫細胞を認めないタイプ) の3つの phenotype が提唱されているが、大腸癌組織標本をこれらに分類した報告はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大腸癌に対して ICI と間質反応を抑制する薬剤との併用療法という新規の組み合わせで治療効果を詳細に検討することである。治療実験においては、腫瘍免疫における3つの組織学的 phenotype を再現した免疫同系応答マウスモデルを使用する。大腸癌に多いとされる excluded type に PDGFR 阻害剤を投与すると間質反応が抑制されることで phenotype が inflamed type に変化し、それにより免疫抑制が解除されることで ICI の効果の増強に繋がると考えている。

これまでマウスモデルで大腸癌の腫瘍免疫を評価する場合には、マウス大腸癌細胞株を同系マウスの皮下に移植して評価する報告がほとんどであったが、皮下移植では間質反応がほとんど生じないことから実際の腫瘍免疫微小環境を再現できていない点が問題であった。本研究では癌細胞と線維芽細胞を混合して同所移植することで豊富な間質反応を再現し、投与薬剤の効果が癌微小環境に及ぼす影響を正確に反映した研究ができると考えている

3. 研究の方法

本研究では、大腸癌の増殖・進展における抗 PD-1 抗体と PDGFR 阻害剤の効果を、癌細胞と間質細胞の相互作用に注目して [1] 臨床検体を用いた検討、[2] in vitro での検討、[3] in vivo での検討、にて検証した。

[1] 免疫細胞の浸潤に着目したヒト大腸癌組織の phenotype 分類

まず、大腸癌の外科切除標本(約 50 例)において CD8 による免疫染色を行い CD8 陽性 T 細胞の局在を見ることで、どのような割合で3つの phenotype が存在するかを検討した。inflamed type は間質内の CD8 陽性細胞が癌胞巣内に浸潤し、癌細胞に直接 CD8 陽性細胞が接している状態を認めた場合、excluded type は癌胞巣に連続する間質内に CD8 陽性細胞を認めた場合、desert type は 200 倍視野で CD8 陽性細胞が 10 個未満の場合と定義した。さらにそれぞれの phenotype と臨床病理学的な因子や予後との関連を検討した。大腸癌は SM 浸潤癌になると豊富な間質反応を伴うことや、ICI が効きにくいとされることから excluded type が多いことが想定された。

[2] 抗 PD-1 抗体と PDGFR 阻害剤が大腸癌細胞、線維芽細胞に与える影響

癌細胞、間質細胞(線維芽細胞)の相互作用が細胞機能(細胞増殖能、遊走能、浸潤能)に与える影響、抗 PD-1 抗体および PDGFR 阻害剤がそれらに与える影響についてタイムラプ

システムを用いて比較検討した。まず、Balb/c マウス由来の大腸癌細胞株 CT26 と Balb/c マウス由来の不死化した線維芽細胞株 JLS-V9 を用いて、癌細胞単独培養と癌細胞 + 線維芽細胞の共培養での細胞増殖能、遊走能、浸潤能を比較検討した。次にそれぞれの培養系に抗マウス PD-1 抗体 (4H2)、PDGFR 阻害剤 (イマチニブ) を単独もしくは併用で投与し、投与薬剤が細胞機能に与える影響を評価した。使用する癌細胞及び線維芽細胞は事前にそれぞれ蛍光標識 (GFP 及び PKH26)、2つの薬剤が癌細胞と線維芽細胞のどちらに影響を与えているかを評価した。上記の検討を行うことで、免疫細胞がない環境での抗 PD-1 抗体と PDGFR 阻害剤の抗腫瘍効果や間質成分 (線維芽細胞) に対する効果を評価した。

[3] 大腸癌同所移植モデルにおける抗 PD-1 抗体と抗 PDGFR 阻害剤の併用効果
間質を含めた癌微小環境をより反映するモデルである同所移植モデルを用いて、臨床検体で分類を行った3つの phenotype モデルを作成した。inflamed type は Balb/c マウスの回盲部に CT26 (1x10⁵ 個) を移植することで作成した。事前の検討で移植腫瘍はほとんど間質成分を認めず、癌細胞のみで腫瘍組織が構成されることを確認している。excluded type は Balb/c マウスの回盲部に CT26 (1x10⁵ 個) と JLS-V9 (1x10⁵ 個) を混合したものを移植することで作成した。desert type はヌードマウスの回盲部に CT26 (1x10⁵) を移植することで作成した。ヌードマウスでは胸腺由来の T 細胞が存在しないため T 細胞の浸潤を認めない移植腫瘍となる。3つの phenotype に対応する移植モデルを作成した後に 4H2 及びイマチニブによる治療実験を行った。イマチニブは我々の以前の検討に従い、50 mg/kg/day の容量を連日経口投与し、4H2 は推奨濃度である初回 20mg/kg、以後 6 日毎に 10mg/kg を腹腔内投与した。1) control, 2) イマチニブ単剤, 3) 4H2 単剤, 4) イマチニブ+4H2 併用の 4 群に分け、各群 10 匹にて治療実験を行った。移植する癌細胞にはルシフェラーゼ遺伝子を導入し、腫瘍量の変化や遠隔転移の有無といった腫瘍の動態を IVIS (Caliper-PerkinElmer) の発光モードにより経時的にモニタリングした。癌細胞株移植後 2 週間で治療を開始し、薬剤投与開始後 4 週間の時点でサクリファイスし、腫瘍重量、容積、転移の有無などを評価した。また間質反応、免疫細胞浸潤の状態などに着目した免疫組織学的検討に加え、腫瘍組織から核酸や蛋白を抽出し各種ケモカインの発現を Western blotting, PCR などで定量的に評価した。さらに各群の腫瘍組織から抽出した RNA をマイクロアレイ解析し、変動する遺伝子やパスウェイを同定した。

4. 研究成果

当初研究目的として挙げた以下の3点についての研究実績

[1] 免疫細胞の浸潤に着目したヒト大腸癌組織の phenotype 分類 当初の予定より多い、200 例近いヒト大腸癌切除標本に対して、免疫染色を行い免疫学的腫瘍微小環境の phenotype 分類を行った。それらの分類と臨床病理学的な関連、予後との関連についても解析を行った。年齢は Inflamed type で他群より有意に高齢で性別、局在、Stage、脈管侵襲、組織型に有意差は認めなかった。5 年全生存率は Inflamed type で良好な傾向を認めた。

[2] ICI (抗 PD-1 抗体) と間質反応抑制剤 (PDGFR 阻害剤) が大腸癌細胞株に与える影響 タイムラプシステムを用いた検討を行い、ICI が免疫細胞の存在しない *in vitro* の環境下では ICI が細胞増殖能に影響を与えていないことを示した。また PDGFR 阻害剤は線維芽細胞に対して細胞増殖能を抑制する効果を示した。

[3] 大腸癌同所移植モデルにおける抗 PD-1 抗体と PDGFR 阻害剤の併用効果 臨床検体で分類を行った3つの phenotype の同所移植マウスモデルを作成した。作成したモデルが各 phenotype の微小環境を再現できているかを免疫組織学的に確認した。それらのマウスモデルを使用して、ICI と PDGFR 阻害剤での治療実験を行った。4 群のうち、併用群において最も抗腫瘍効果が高いという結果を得た。

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 Naoki Yorita, Ryo Yuge, Hidehiko Takigawa, Atsushi Ono, Toshio Kuwai, Kazuya Kuraoka, Yasuhiko Kitadai, Shinji Tanaka, Kazuaki Chayama	4. 巻 1
2. 論文標題 Stromal reaction inhibitor and immune-checkpoint inhibitor combination therapy attenuates excluded-type colorectal cancer in a mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 111-120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2020.10.041	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 弓削 亮
2. 発表標題 大腸癌に対する間質反応抑制剤と免疫チェックポイント阻害剤との併用療法の効果の検討
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2020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
---------	---------