

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17654

研究課題名(和文)血管新生阻害剤を用いた悪性胸膜中皮腫に対するがん免疫療法の発展と臨床応用

研究課題名(英文) Preclinical evaluation of the antitumor effect of cancer immunotherapy augmented by antiangiogenic agent in malignant pleural mesothelioma

研究代表者

柰木 芳樹 (Negi, Yoshiki)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：70814515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：悪性胸膜中皮腫(Malignant Pleural Mesothelioma: MPM)は予後不良の難治性悪性疾患だが、抗Programmed cell death (PD)-1抗体による、がん免疫療法はMPMにおいても新たなbreakthroughとなると期待されている。

本研究で、申請者はMPMマウス皮下腫瘍モデルを用いて、血管内皮細胞増殖因子阻害薬が、細胞障害性T細胞による抗腫瘍免疫を数的にかつ機能的にも活性化することで、抗PD-1抗体がMPM細胞に対して惹起する抗腫瘍免疫が増強される可能性を見出し、血管新生阻害薬がMPMの治療選択肢の一つになりうる事を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性胸膜中皮腫は稀少がんの一種ではあるが、本邦における過去のアスベスト使用状況から今後も患者数、死亡者数は増加すると予想されている。2018年に世界に先駆けて免疫チェックポイント阻害薬ニボルマブが、再発悪性胸膜中皮腫に保険適応となった。がん免疫療法が今後の中皮腫治療の軸となっていくと予想され、その効果をどうすれば高める事ができるかを検討する事は非常に重要である。申請者は血管新生阻害薬と免疫チェックポイント阻害薬の併用が従来の免疫チェックポイント阻害薬単剤での効果を上回る可能性を見出した。今回使用した血管新生阻害薬は実臨床で用いられており、速やかに臨床試験等の計画・実行につながる。

研究成果の概要(英文)：Malignant pleural mesothelioma is refractory malignant neoplasm with extreme poor prognosis. Recently, anti-programmed cell death (PD)-1 antibody, nivolumab, has been approved for the treatment of relapsed-MPM, and actually exerts remarkable antitumor effect in certain cases. Thus, anticancer immunotherapy is expected to be a breakthrough therapy in MPM as well as lung cancer.

In the present study, we established mouse subcutaneous MPM xenograft model and showed that antiangiogenic agent, nintedanib, enhanced antitumor immunity against MPM cells induced by anti PD-1 antibody via through activating cytotoxic T cell not only numerically but also functionally. These results indicate that antiangiogenic agent is a promising candidate as a novel molecular targeted therapy in MPM.

研究分野：胸部悪性腫瘍

キーワード：悪性胸膜中皮腫 抗PD-1抗体 血管新生阻害薬 がん免疫療法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫(Malignant Pleural Mesothelioma: MPM)は、稀少がんの一種ではあるが、本邦における過去のアスベスト使用状況から今後も患者数、死亡者数は増加すると予想されていて (Murayama T et al. *Am J Ind Med.* 2006; 49: 1-7.)、診断から死亡までの生存期間中央値が 7.9 カ月と極めて予後不良の難治性悪性疾患である。MPM について最も根治度の高い治療法は、術前化学療法の後 EPP を行い、術後に放射線治療を加える trimodality treatment であるが、診断時の進行度や侵襲の強さから実施が不可能な症例も多く、治療成績の改善には内科的治療の向上が不可欠である。MPM の化学療法は、2003 年に Pemetrexed と Cisplatin の併用療法が標準治療として確立されたものの (Vogelzang NJ et al. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 2636-44.)、その後長らく科学的根拠のある治療法は確立されなかった。2017 年に抗 PD-1 抗体 Nivolumab の再発 MPM に対する有用性が報告され (Goto Y et al. *J Thorac Oncol.* 2017; 12: s1883.)、2018 年より実臨床でも使用できるようになったことで、がん免疫療法が MPM 治療においても breakthrough となると期待されていて、実際に実臨床でその効果を経験する事もあるが、必ずしも期待通りの効果が現れるわけではなく、治療成績の改善にはさらなる工夫が不可欠である。

2. 研究の目的

申請者は抗 PD-1 抗体が惹起する抗腫瘍免疫効果をさらに高め、MPM の治療成績を向上させるため、血管新生に関わる最も重要な因子である血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) に注目した。VEGF は肺癌、大腸癌、卵巣癌などで治療標的分子となっているが、近年 VEGF の免疫抑制作用についても次々に明らかとなっており (図 1)、がん免疫療法においても鍵分子である可能性が示唆されている。即ち、VEGF は直接的に細胞障害性 T 細胞 (Cytotoxic T cell: CTL) の増殖を抑えるだけでなく、樹状細胞 (Dendritic Cell: DC) の成熟化を妨げ、制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) を活性化することで、CTL を機能的にも抑制している (Fukumura D et al. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018; 15: 325-40.)。これらから、VEGF を阻害する効果を持つ血管新生阻

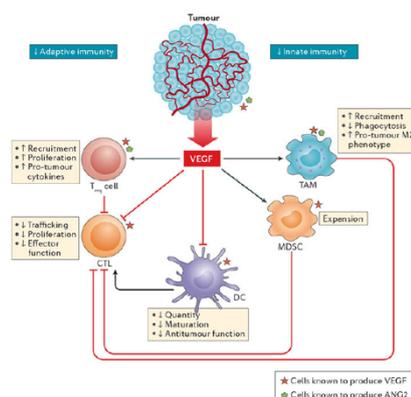


図 1 VEGF の免疫抑制作用

害薬 Nintedanib を抗 PD-1 抗体と併用する事で、抗腫瘍免疫を高める事ができるのではないかと考え、これらの薬剤の併用療法の効果を MPM のマウス皮下腫瘍モデルで検証する事とした。

3. 研究の方法

➤ 材料

(1) 細胞

ヒト正常中皮細胞 Met-5A, ヒト MPM 細胞 MSTO-211H, H2452, H2052, H28 およびマウス中皮腫細胞 AE-17 については、ATCC より購入し、いずれも 10%胎児牛血清を含む RPMI11640 培地を用いて、5% CO₂, 37°C に設定したインキュベーター内で培養維持した。

(2) 試薬および抗体

抗ヒト PD-1 抗体 Nivolumab は Medchemexpress (MCE) 社より、抗マウス PD-1 抗体 (RMP1-14) は BioXCell 社より、in vitro および in vivo で使用した Nintedanib はそれぞれ Selleckchem 社および MCE 社より購入した。

➤ 方法

(1) 細胞増殖 assay

AE17 細胞を 96 穴プレートの各 well に 5000 個ずつ播種し、10µg/ml の control Rat IgG または nivolumab と 0~10µM の各濃度に調整した nintedanib に 72 時間曝露した後、Cell counting Kit-8 で生細胞を発色させ、その吸光度を測定し定量化した。

(2) フローサイトメトリー

AE17 細胞を Accutase で detach し、抗マウス PD-L1 抗体 (Biolegend 社) を 1:100 で加え、45 分 4°C で incubate した。その後、2 回 wash し、Alexa488 conjugate anti Rat IgG を 1:400 で添加し、再び 45 分 4°C で incubate した。再度 2 度 wash した上、PBS に再懸濁し、FACSCantoII で蛍光強度を測定し、解析ソフト FlowJo を用いてデータの解析を行なった。

(3) MPM マウス皮下腫瘍モデル

MPM マウス皮下腫瘍もでる樹立のため、6-8 週齢の雌の C57BL/6 マウスの側腹部皮下に 0.1ml の Phosphate buffered saline に再懸濁した 1×10⁷ 個のマウス中皮腫細胞 AE17 を移植した。腫瘍体積が約 100mm³ に達した時点で、vehicle と control IgG を投与する対照群、nintedanib 単剤群、RMP1-14 単剤群、nintedanib と RMP1-14 の併用群の 4 群に randomize し、nintedanib 群にはマウス 1 匹当たり 50mg/kg の nintedanib を 1 日 1 回週 5 日間フィーディングニードルを用いて経口投与し、RMP1-14 群には、マウス 1 匹当たり 10mg/kg の抗 PD-1 抗体の腹腔内投与を 1 日 1 回、週 2 回投与した。併用群は nintedanib と RMP1-14 の両者を投与し、対照群には vehicle および control IgG を投与した。

4. 研究成果

(1) in vitro では抗 PD-1 抗体と Nintedanib は MPM 細胞に対する相乗効果を惹起しない。

申請者はまず nintedanib が抗 PD-1 抗体 (α PD-1 Ab) の効果を増強するかを in vitro で検証する事とした。マウス MPM 細胞 AE17 を 96 穴プレートに播種し、control IgG または α PD-1 Ab の存在下で 0-10 μ M の nintedanib に 72 時間曝露し、CCK-8 を用いた細胞障害アッセイで解析した。結果は図 2 に示すように、in vitro の実験系では、 α PD-1 Ab と nintedanib は AE17 の増殖抑制効果に関して相乗効果を示さなかった。これらの結果、やはりもし α PD-1 Ab と nintedanib が synergic な効果を示すとすれば、免疫担当細胞や新生血管の影響が不可欠と考えられ、マウス皮下腫瘍モデルを用いて in vivo の実験を行う事とした。

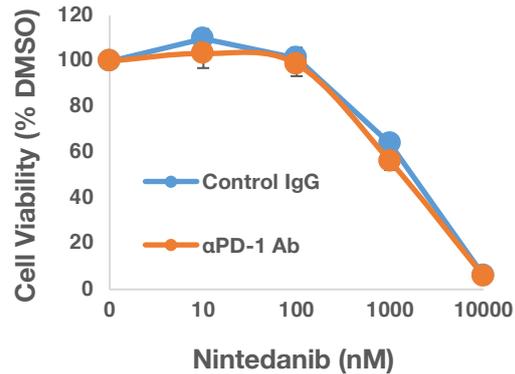


図 2 Nintedanib と抗 PD-1 抗体併用療法 (in vitro)

(2) 抗 PD-1 抗体と nintedanib 併用療法はマウス MPM 皮下腫瘍に抗腫瘍効果を惹起する。

次にマウス MPM 細胞 AE-17 を C57BL/6 マウスの皮下に移植し、 α PD-1 Ab、nintedanib およびその両者の併用による治療実験を行う事で、nintedanib が α PD-1 Ab の抗腫瘍免疫活性を高め、両者の併用による相乗効果が得られるかを検討するため、AE17 細胞を皮下に移植したマウスを治療薬毎に control 群、 α PD-1 Ab 群、nintedanib 群、 α PD-1 Ab + nintedanib 群の 4 群に randomize し、caliper を用いて、週 2 回腫瘍径を測定した。その結果、腫瘍移植後 14 日目の時点で、腫瘍体積は、control 群 $2878 \pm 1030\text{mm}^3$ 、 α PD-1 Ab 群 $2230 \pm 808\text{mm}^3$ 、nintedanib 群 $1078 \pm 338\text{mm}^3$ 、 α PD-1 Ab+nintedanib 群 $573 \pm 116\text{mm}^3$ と nintedanib 群および α PD-1 Ab + nintedanib 併用療法群で control 群に比べ有意に腫瘍の増大を抑制した。さらに、nintedanib 群と α PD-1 Ab + nintedanib 群の比較では有意に併用療法の上乗せ効果が示され ($p < 0.01$)、両者を併用する事でより強い抗腫瘍効果が得られる事が確認され (図 3)、下痢や体重減少といった副作用の発症は認めなかった。

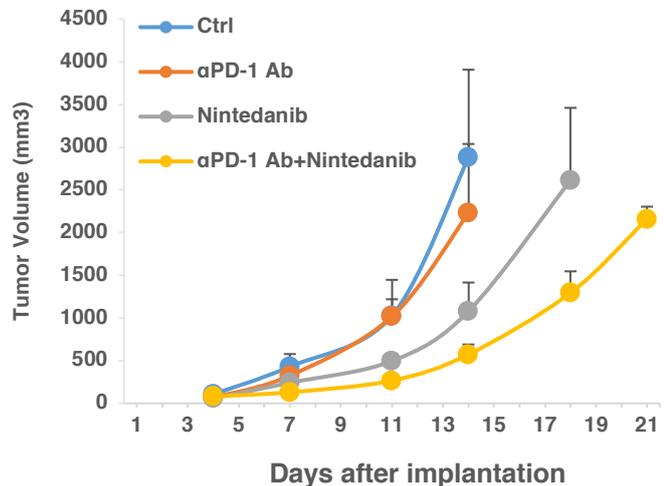


図 3 Nintedanib と抗 PD-1 抗体併用療法 (in vivo)

5. 考察等

MPM 症例では、高頻度で VEGF receptor (VEGFR) 2 が強発現している事が知られており (Miettinen M et al. Am J Surg Pathol. 2012; 36: 629-36.)、VEGFR 阻害剤である nintedanib は MPM 細胞を使用した preclinical study において、単独あるいはシスプラチンとの併用で強い抗腫瘍効果を惹起し、実臨床への応用が期待された (Laszlo V et al. Clin Cancer Res. 2018; 24(15): 3729-40.)。しかしながら、cisplatin + pemetrexed の標準治療への上乗せ効果を第 III 相試験で示すことができず (Lancet Respir Med. 2019; 7(7): 569-580)、以後血管新生阻害薬の MPM に対する効果を示した報告はない。

MPM に対するがん免疫療法としては再発 MPM に対して nivolumab の使用が本邦で世界に先駆けて承認されてから、最近では抗 Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein (CTLA) 4 抗体 ipilimumab と nivolumab の併用療法の初回治療での有用性が示され (Baas P et al. Lancet. 2021; 397(10272): 375-386)、今後の MPM 治療の主力となると予想される。

申請者は MPM のがん免疫療法の更なる発展を目指して、血管新生阻害薬 nintedanib と抗 PD-1 抗体の併用療法について、マウス皮下腫瘍モデルにより nintedanib が抗 PD-1 抗体が惹起する抗腫瘍免疫をさらに増強している可能性を見出した。安定した皮下腫瘍モデルの樹立に時間を要し、実際に nintedanib が CTL の活性を数的かつ機能的に高めているかの確認については、現在免疫組織染色を用いて解析中である。また、既報により予想される機序だけでなく、腫瘍関連マクロファージについての解析も同時に行い、今年度中の論文化を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Horio Daisuke, Minami Toshiyuki, Kitai Hidemi, Ishigaki Hirotohi, Higashiguchi Yoko, Kondo Nobuyuki, Hirota Seiichi, Kitajima Kazuhiro, Nakajima Yasuhiro, Koda Yuichi, Fujimoto Eriko, Negi Yoshiki, Niki Maiko, Kanemura Shingo, Shibata Eisuke, Mikami Koji, Takahashi Ryo, Yokoi Takashi, Kuribayashi Kozo, Kijima Takashi	4. 巻 111
2. 論文標題 Tumor associated macrophage derived inflammatory cytokine enhances malignant potential of malignant pleural mesothelioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2895 ~ 2906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14523	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 Nakajima Yasuhiro, Kuribayashi Kozo, Ishigaki Hirotohi, Tada Akio, Negi Yoshiki, Minami Toshiyuki, Takahashi Ryo, Doi Hiroshi, Kitajima Kazuhiro, Yokoi Takashi, Kijima Takashi	4. 巻 38
2. 論文標題 Adenosine Deaminase in Pleural Effusion and Its Relationship with Clinical Parameters in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Investigation	6. 最初と最後の頁 356 ~ 364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07357907.2020.1776313	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 Ishigaki Hirotohi, Minami Toshiyuki, Morimura Osamu, Kitai Hidemi, Horio Daisuke, Koda Yuichi, Fujimoto Eriko, Negi Yoshiki, Nakajima Yasuhiro, Niki Maiko, Kanemura Shingo, Shibata Eisuke, Mikami Koji, Takahashi Ryo, Yokoi Takashi, Kuribayashi Kozo, Kijima Takashi	4. 巻 519
2. 論文標題 EphA2 inhibition suppresses proliferation of small-cell lung cancer cells through inducing cell cycle arrest	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 846 ~ 853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.09.076	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Daisuke Horio, Toshiyuki Minami, Hidemi Kitai, Hirotohi Ishigaki, Yasuhiro Nakajima, Yoshiki Negi, Maiko Niki, Eisuke Shibata, Koji Mikami, Ryo Takahashi, Takashi Yokoi, Kozo Kuribayashi, and Takashi Kijima
2. 発表標題 Inflammatory cytokine derived from inflammasome in tumor-associated macrophages enhances malignant potential of malignant pleural mesothelioma
3. 学会等名 The 3rd International Cancer Research Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堀尾大介、南 俊行、幸田裕一、藤本英利子、祢木芳樹、金村晋吾、柴田英輔、三上浩司、高橋 良、横井 崇、栗林康造、木島貴志
2. 発表標題 悪性胸膜中皮腫 (Malignant Pleural Mesothelioma: MPM) 微小環境中の腫瘍関連マクロファージにおけるインフラマソームの役割
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石垣裕敏、南 俊行、森村 治、北井秀美、多田陽郎、中島康博、幸田裕一、藤本英利子、祢木芳樹、金村晋吾、柴田英輔、三上浩司、高橋 良、横井 崇、栗林康造、木島貴志
2. 発表標題 EphA2阻害はcell cycle arrestを誘導し小細胞肺癌細胞の増殖を抑制する
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019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
---------	---------