

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09570

研究課題名(和文) 前立腺癌における腫瘍微小免疫環境の変化に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Evaluation of the tumor microimmune environment using mouse models of prostate cancer

研究代表者

デベラスコ マルコ (De Velasco, Marco)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：20449838

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)：前立腺癌の局所の免疫環境について、前立腺癌マウスモデルでアンドロゲン受容体標的治療(ARTA)について検討したところ、新規抗アンドロゲン薬であるアバルタミド薬は腫瘍内に細胞傷害性T細胞の浸潤や活性化が認められた一方、ARの発現を抑制しても免疫抑制的な骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)の発現が上昇し、MDSCは治療の抵抗性に関連していることが分かった。腫瘍微小環境を変化させmonotherapyで効果を引き出すのが難しいPD-L1抗体はSTAT3阻害薬と併用することで腫瘍増殖を抑制することが分かった。これらの成果は米国癌学会(AACR)や日本癌学会(JCA)にて報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍の免疫微小環境変化は免疫チェックポイント阻害治療を開発する上で非常に重要であり、動物実験モデルの有用性は際立っている。我々が開発した前立腺癌マウスモデルは、immunocompetent syngeneicであり、局所の腫瘍内免疫反応のさらなる理解と全身の免疫環境について検証を可能とした。実臨床で使用されている新規抗アンドロゲン薬の治療抵抗に関連する免疫抑制性細胞の同定や新たな免疫チェックポイント阻害薬と分子標的治療薬を組み合わせた併用療法の前臨床試験を本マウスモデルで迅速に検証し、臨床へフィードバックできる意義は大きく、前立腺癌治療への極めて重要なベネフィットとなるであろう。

研究成果の概要(英文)：Immune checkpoint blockade has transformed the landscape of cancer therapy but has been ineffective in patients with advanced prostate cancer (PCa). The tumor microenvironment (TME) is a major determinant of antitumor immune response. We have used a transgenic mouse of Pten-null PCa to characterize the TME. Our studies showed that myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) were associated with PCa progression. Moreover, androgen deprivation therapy further exacerbated MDSC infiltration and was associated with disease progression in castration-resistant tumors. Targeting MDSCs by neoadjuvant blockade of JAK1/2 plus anti-PD-L1 blockade reinvigorated antitumor T cell immune response resulting in improved therapeutic efficacy. Our studies provide additional insights into the role of MDSCs in PCa. Our system provides a robust tool to further develop strategies targeting the immunosuppressive TME of advanced PCa. Our findings were presented in part at the AACR and JCA annual meetings.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：前立腺癌 腫瘍微小環境 複合免疫療法 遺伝子改変マウスモデル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

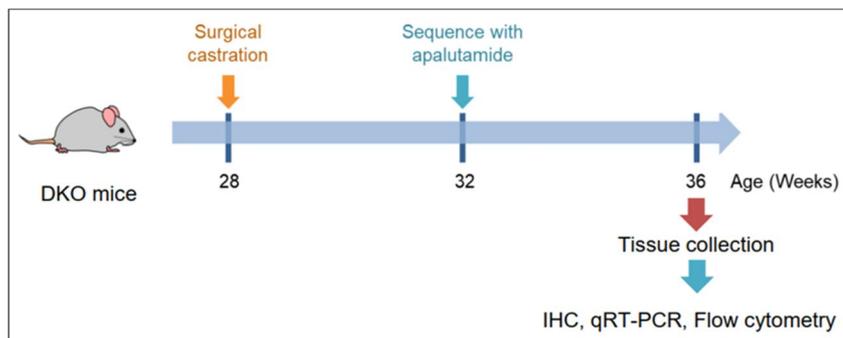
最近使用可能となったアンドロゲン受容体 (AR) シグナルをターゲットとする第 2 世代の新規抗アンドロゲン薬は進行性前立腺癌患者に臨床的なベネフィットをもたらしたが、奏効期間は満足いくものではない。また、AR は前立腺上皮においてのみ発現しているわけではなく、癌に関連した線維芽細胞や免疫担当細胞、胸腺上皮などに発現している。これまでの Preclinical 研究では、ホルモン治療により、抗腫瘍免疫は正にも負にも賦活され、それは AR ターゲット治療の種類に依存していると思われた。また、前立腺癌において CTLA-4 や PD-1/PDL-1 のプライミングおよびエフェクター pathway は明らかに major な pathway であり、臨床的に治療の開発に連結しているが、それらによる治療のポテンシャルは durable な免疫反応を惹起できず、前立腺癌においては何らかの adaptive immune resistance が働いているものと推察される。また、前立腺癌は本質的に遺伝子異常から後天的に変化する極めて複雑なシグナル経路を有しており、IL6/IL6R/JAK 経路を介した STAT3 の活性化などによる多くのシグナルネットワーク異常を引き起こす。進行性前立腺癌でよく見られる STAT3 の活性化は AR シグナル経路をアンドロゲン非依存性に活性化することによって、去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) の増殖を promote することは周知のことである。腫瘍細胞の分化増殖や EMT、血管新生を調節することに加え、STAT3 は免疫抑制の微小環境を惹起すると考えられている。

### 2. 研究の目的

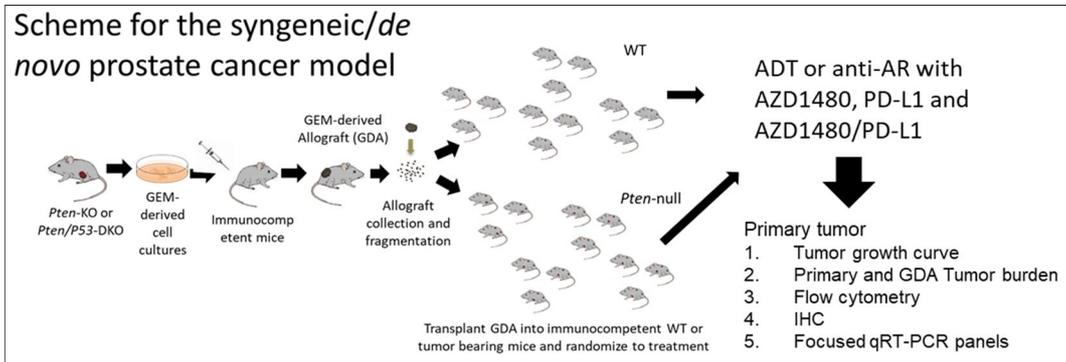
われわれが独自に開発した前立腺癌マウスモデルを用いて、(1) AR が腫瘍内および全身の免疫環境にどのような役割を果たしているか検討し、AR をターゲットする治療 (ART) の違いにより、腫瘍免疫環境の違いについて検討する。(2) 免疫チェックポイント阻害療法 (ICI) の治療効果を高めるため免疫賦活療法と抗アンドロゲン治療と相加相乗効果について検討することにある。現在、免疫学的に active いわゆる「Hot Cancer」は免疫チェックポイント阻害薬によく反応することが知られているが、残念ながら前立腺癌は「Cold」すなわち poor immunogenicity であり、腫瘍免疫微小免疫環境 (TIME) が強く抑制された状態である。また、CRPC と CSPC (ホルモン感受性前立腺癌) では TIME が異なることがよく知られている。アンドロゲン除去療法 (ADT) が T 細胞の腫瘍浸潤をエンハンスすると同時に免疫抑制性 T 細胞 (Treg) や骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) の誘導を促進することも知られているが、第 2 世代の抗アンドロゲン薬については十分解明されていない。今回、これらの腫瘍免疫環境について我々の開発した免疫学的に評価可能な immunocompetent syngeneic マウス前立腺癌モデルを用いて、分子レベルの解析を行う。前立腺癌における AR-immune modulation の役割についての知見が得られ、前立腺癌治療における免疫療法の方向性を見いだすことを到達目標とした。

### 3. 研究の方法

(1) コンディショナル PTEN/p53 ダブルノックアウト (DKO) マウス前立腺癌モデルにおいて、Preclinical な比較検討を行う。まず前立腺癌を発症していない野生型 (WT) マウスと CNPC マウスの免疫環境について、前立腺局所 TIME について免疫担当細胞の変化について検討する。次に ADT と第 2 世代の抗アンドロゲン薬による腫瘍免疫微小環境に与える変化について、28 週齢時の除精術による ADT と第 2 世代の抗アンドロゲン薬であるアパルタミドの 4 週間の治療試験による前立腺腫瘍について、免疫担当細胞の変化について検討した。(下図参照)

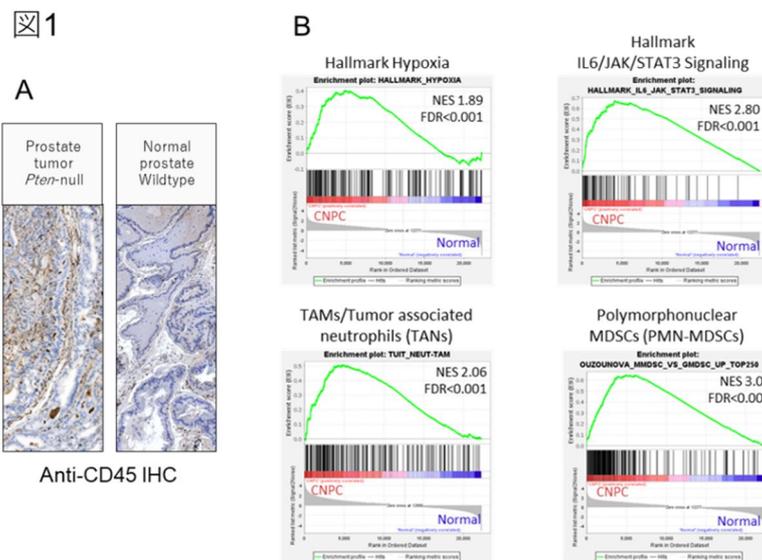


(2) Syngeneic な Allograft モデルを用いて、ADT や第 2 世代抗アンドロゲン薬に STAT3 阻害薬と抗 PDL-1 抗体を組み合わせた Pre-clinical study を行った。当教室で確立した GEM-derived allograft (GDA) モデルはマウスの CRPC 腫瘍から腫瘍片を宿主のマウスに移植し腫瘍サイズをそろえてランダム化し、腫瘍の増殖について調べることができる。今回は宿主のマウス WT と KO マウスの 2 種類にそれぞれ STAT3 阻害薬や抗 PDL-1 抗体を投与し、腫瘍増殖抑制効果について検討した。(下図参照)



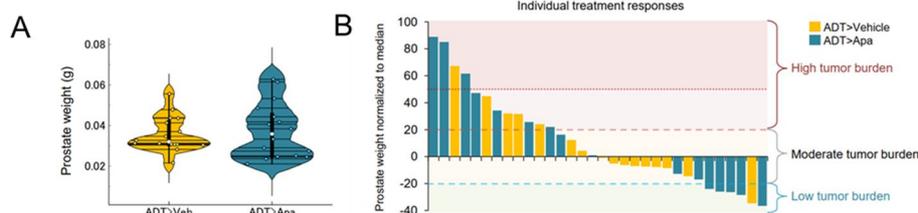
#### 4. 研究成果

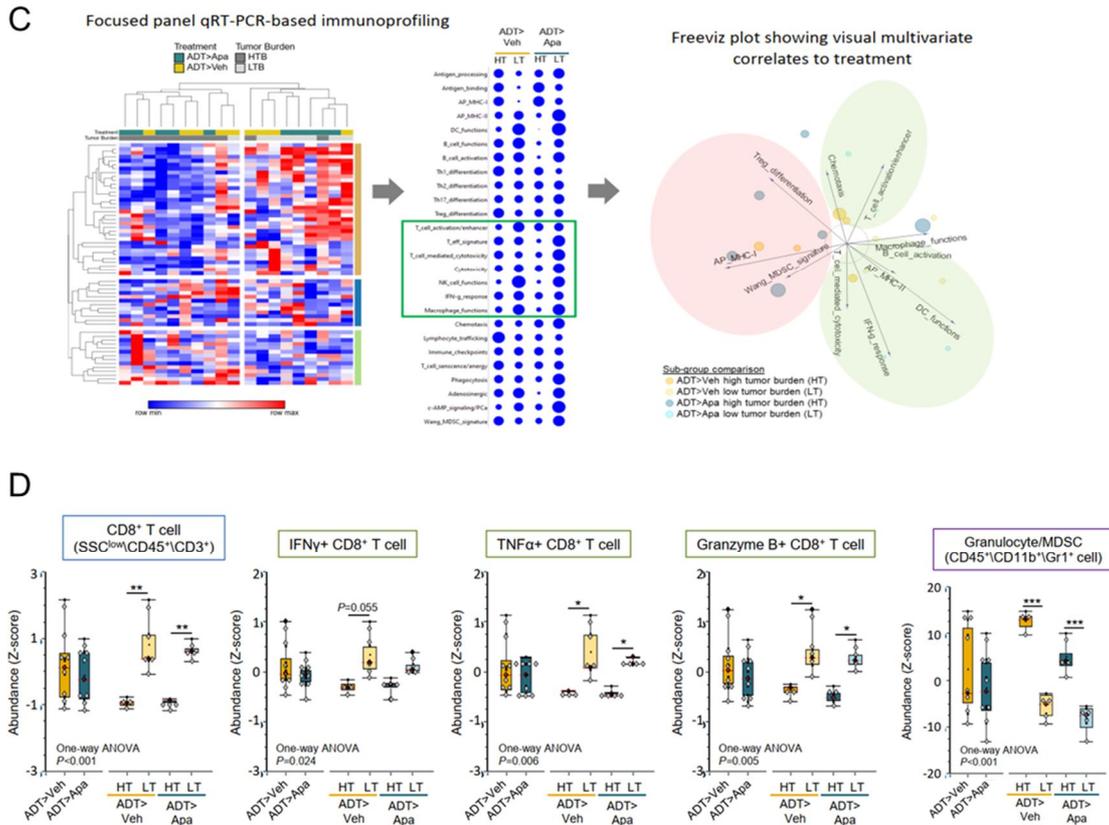
(1) マウス前立腺腫瘍では、CD45 抗体で免疫組織染色を行った際に、WT と比較して白血球の浸潤が増加する特徴があるが、(図 1A) トランスクリプトームプロファイリングから early-stage の前立腺癌では免疫抑制活性に関連する MDSCs の発現が亢進していることが示された。(図 1B)



AR をターゲットとする治療の違いによる腫瘍免疫環境の影響について検討する為に、ADT 単独と ADT にアパルタミドを併用した際の前立腺腫瘍微小環境について調べたところ、前立腺重量の平均値に有意差はなかった。(図 2A) しかしながら AR 標的治療法の違いにより個々の腫瘍サイズにはばらつきがあり、中央値から 20%以上の High tumor burden 群と Low tumor burden 群に分類することができ、同じ AR を標的とした治療でも反応性の違いと抵抗性との関連が示唆された。(図 2B) AR 標的治療の違いが TIME にどの様に影響しているか検討する為、治療抵抗性免疫反応のプロファイリングを qPCR-based の 144 gene set panel (免疫関連遺伝子) で High tumor burden 群と Low tumor burden 群について調べたところ、T 細胞活性関連遺伝子や INF- $\gamma$  など抗腫瘍免疫に関連する遺伝子は Low tumor burden 群で発現が上昇していたが、Treg や MDSC の発現は High tumor burden 群で亢進していた。(図 2C) フローサイトメトリーと免疫組織染色の解析結果により、治療法に関わらず MDSCs は High tumor burden 群と関連し、細胞傷害性 T 細胞は Low tumor burden 群のサンプルで高く、活性化マーカーである INF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、Granzyme-B を発現することが示された。(図 2D) これらの結果は第 2 世代の抗アンドロゲン薬であるアパルタミドは AR 発現を抑制しつつ腫瘍内に T 細胞の浸潤を認めるが、一方で MDSC が治療の抵抗性と関連していることが分かった。

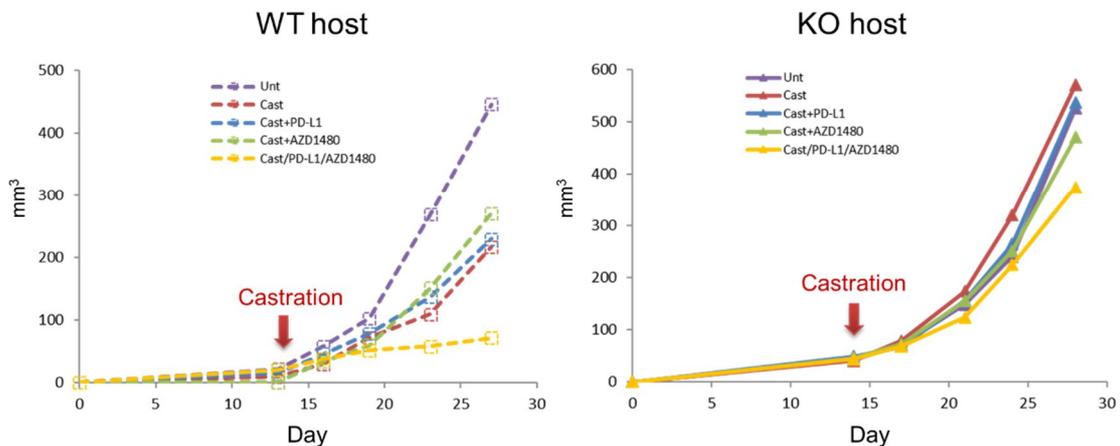
#### 図 2





(2) 腫瘍免疫微小環境を変化させ、免疫チェックポイント阻害治療をエンハンスできるのかを検討する為、GDA モデルで腫瘍増殖について検討した。無治療群、去勢群、去勢+PD-L1 抗体群、去勢+AZD1480 (STAT3 阻害薬) 群、去勢+PD-L1/AZD1480 併用群の 5 群で比較検討を行い、腫瘍増殖は前立腺腫瘍を持たない WT マウスに移植した際に去勢+PD-L1/AZD1480 併用群で有意に腫瘍増殖を抑制した。しなしながら、同様の投薬を宿主に前立腺癌を発症する KO マウスに行ったところ、併用群は腫瘍増殖を抑制しなかった。(図 3) STAR3 阻害薬を併用することで、腫瘍免疫微小環境は変化し抗 PD-L1 抗体が作用するが、宿主の全身性免疫により治療結果に違いが見られた。

図3 *Pten*-deficient CRPC-derived GDA



前立腺癌は heterogeneity な腫瘍であるが、腫瘍と宿主の免疫環境を考慮したマウスモデルで基礎的研究を行う意義は大きい。ADT とアパルタミドを併用した治療は AR を発現低下させているにも関わらず、腫瘍が増殖したマウスでは MDSCs の発現も高かった。抵抗性のメカニズムを明らかにするにはさらなる研究が必要だが、免疫抑制性の腫瘍微小環境を標的とすることが腫瘍縮小効果や survival benefit に繋がる可能性が示唆された。PDL-1 抗体 monotherapy では効果を引き出すのが難しいが、STAT3 阻害薬を組み合わせることで一定の抗腫瘍効果を示した。

しかし宿主の全身免疫環境では効果にリミットがあることも分かり、局所の腫瘍免疫環境だけでなく全身性の免疫環境について調べていく必要性があることが示された。我々が開発したPTEN ノックアウト前立腺癌マウスモデルは、免疫学的に評価可能な前臨床ツールとして有用であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 De Velasco MA, Kura Y, Ando N, Sako N, Banno E, Fujita K, Nozawa M, Yoshimura K, Sakai K, Yoshikawa K, Nishio K, Uemura H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Context-Specific Efficacy of Apalutamide Therapy in Preclinical Models of Pten-Deficient Prostate Cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers (Basel).	6. 最初と最後の頁 3975-3975
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13163975.	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 Sakurai T, De Velasco MA, Sakai K, Nagai T, Nishiyama H, Hashimoto K, Uemura H, Kawakami H, Nakagawa K, Ogata H, Nishio K, Kudo M.	4. 巻 16
2. 論文標題 Integrative analysis of gut microbiome and host transcriptomes reveals associations between treatment outcomes and immunotherapy-induced colitis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol.Oncol.	6. 最初と最後の頁 1493-1057
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1878-0261.13062	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 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 0件／うち国際学会 7件）

1. 発表者名 森若千怜、デベラスコ マルコ、倉 由史恵、坂井 和子、橋本 士、坂野 恵里、藤田 和利、野澤 昌弘、吉村 一宏、西尾 和人、植村 天受
2. 発表標題 Pten欠損前立腺癌マウスにおける糞便中の微生物とアンドロゲン除去の関係について
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 デベラスコ マルコ、倉 由史恵、坂野 恵里、坂井 和子、清水 信貴、藤田 和利、野澤 昌弘、吉村 一宏、西尾 和、植村 天受
2. 発表標題 A2aR阻害はPten欠損前立腺癌マウスモデルにおいてCTLA4阻害薬の抗腫瘍活性を増強する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂野恵里、デベラスコ マルコ、倉 由史恵、坂井 和子、橋本 士、藤田 和利、野澤 昌弘、吉村 一宏、西尾 和人、植村 天受
2. 発表標題 前立腺癌マウスにおける抗PD-L1免疫療法およびJAK1/2阻害と糞便中の細菌について
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植村天受、倉 由史恵、坂野 恵里、橋本 士、坂井 和子、藤田 和利、野澤 昌弘、吉村 一宏、西尾 和人、デベラスコ マルコ
2. 発表標題 アパルタミドが惹起する短期免疫反応の前臨床評価について
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉由史恵、デベラスコ マルコ、坂井 和子、藤田 至彦、橋本 士、森 康範、南 高文、藤田 和利、掛谷 秀昭、植村 天受、西尾 和人
2. 発表標題 クルクミンモノグルクロニドはPten欠損前立腺癌の腫瘍微小環境を調節し抗腫瘍活性を示す
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森若千怜、デベラスコ マルコ、倉 由史恵、坂井 和子、藤田 和利、坂野 恵理、橋本 士、西本 光寿、野澤 昌弘、吉村 一宏、西尾 和人、植村 天受
2. 発表標題 マウス前立腺癌におけるアンドロゲン除去による腸内細菌叢の一時的変化について
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本 土、デベラスコ マルコ、倉 由史恵、坂井 和子、藤田 和利、坂野 恵理、西本 光寿、野澤 昌弘、吉村 一宏、西尾 和人、植村 天受
2. 発表標題 PTENノックアウトマウス前立腺癌におけるCD73およびアデノシン2a受容体阻害による細胞外アデノシンの制御について
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂野 恵里、デベラスコ マルコ、倉 由史恵、藤田 和利、坂井 和子、橋本 土、西本 光寿、吉村 一宏、野澤 昌弘、西尾 和人、植村 天受、
2. 発表標題 マウス前立腺癌モデルを用いた抗アンドロゲン受容体治療による分子および免疫学的反応の検討
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 デベラスコ マルコ、倉 由史恵、坂井 和子、藤田 和利、坂野 恵理、橋本 土、西本 光寿、野澤 昌弘、吉村 一宏、西尾 和人、植村 天受
2. 発表標題 細胞外アデノシンを標的とした治療は前立腺癌の抗腫瘍免疫を高める
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉由史恵、デベラスコ マルコ、坂井 和子、藤田 和利、坂野 恵理、藤田 至彦、橋本 土、西本 光寿、吉村 一宏、野澤 昌弘、西尾 和人、植村 天受、
2. 発表標題 クルクミンモノグルクロニドのPten欠損前立腺癌マウスに対する化学予防の可能性
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1 . 発表者名 Marco A.De Velasco,Yurie Kura, Noriko Sako, NaomiAndo, Kazuko Sakai, Masahiro Nozawa, Kazuhiro Yoshimura,Kazuhiro Yoshikawa,Alwin Schuller,Kazuto Nishio and Hirotsugu Uemura
2 . 発表標題 Targeting A2aR in mouse&nbsp;Pten-deficient prostate cancer
3 . 学会等名 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2020 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Marco A. De Velasco, Yurie Kura, Naomi Ando, Noriko Sato, Kazuko Sakai, Kazuhiro Yoshikawa, Kazuto Nishio, and Hirotsugu Uemura
2 . 発表標題 Androgen deprivation following JAK1/2 and PD-L1 inhibition improves antitumor efficacy in mouse models of Pten-deficient prostate cancer
3 . 学会等名 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2020 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Marco A. De Velasco, Yurie Kura,Kazuko Sakai, Hideki Nakagaki,Kazuto Nishio, and Hirotsugu Uemura
2 . 発表標題 Cross-species analysis and immunophenotyping using of a focused panel of immune-responsive genes
3 . 学会等名 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2020 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Marco A. De Velasco,Kazuko Sakai,Yurie Kura, Naomi Ando,Noriko Sako,Kazutoshi Fujita,Masahiro Nozawa,Kazuhiro Yoshimura,Kazuto Nishio,Hirotsugu Uemura
2 . 発表標題 Associations between gut microbiota and PD-L1 immunotherapy/JAK1/2 inhibition in mousePten-deficient prostate cancer
3 . 学会等名 Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2021 ( 国際学会 )
4 . 発表年 2021年

1. 発表者名	Marco A.De Velasco,Yurie Kura,Naomi Ando,Noriko Sako,Nobutaka Shimizu,Eri Banno,Masahiro Nozawa,Kazuhiro Fujita,Kazuhiro Yoshinura,Kazuto Nishio,Hirotsugu Uemura
2. 発表標題	Acute immune responses to apalutamide in mousePten-deficient prostate cancer
3. 学会等名	Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2021 (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Marco A.De Velasco,Yurie Kura,,Noriko Sako,Naomi Ando,,Kazuko Sakai, Alwin Schuller,Kazutoshi Fujita, Masahiro Nozawa, Kazuhiro Yoshimura, Kazuto Nishio, Hirotsugu Uemura
2. 発表標題	A2aR inhibition enhances the antitumor activity of CTLA4 blockade in mouse Pten-deficient prostate cancer
3. 学会等名	Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2021 (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Marco A. De Velasco,Kazuko Sakai,Yurie Kura,Eri Banno, Naomi Ando,Noriko Sako,Nobutaka Shimizu, Kazutoshi Fujita, Masahiro Nozawa, Kazuhiro Yoshimura, Kazuto Nishio, Hiroysugu Uemura
2. 発表標題	Correlates of androgen deprivation and gut microbiome in mousePten-deficient prostate cancer
3. 学会等名	Annual Meeting of the American Association for Cancer Research 2021 (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	デベラスコ・マルコ、倉 由吏恵、坂井 和子、清水 信貴、森 康則、野澤 昌弘、吉村 一宏、吉川 和宏、西尾 和人、植村 天受
2. 発表標題	アンドロゲン受容体標的治療による前立腺癌の腫瘍微小環境の変化
3. 学会等名	第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名 倉 由史恵、西本 光寿、清水 信貴、南 高文、坂井 和子、藤田 和利、野澤 昌弘、吉村 一宏、デベラスコ・マルコ、西尾 和人、植村 天受
2. 発表標題 アンドロゲン除去療法とJAK1/2およびPD-L1阻害による前立腺特異的Ptenノックアウトマウスモデルにおける抗腫瘍効果の改善について
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Marco A. De Velasco, Yurie Kura, Naomi Ando, Kazuko Sakai, Alwin Schuller, Kazuto Nishio, and Hirotetsugu Uemura
2. 発表標題 Targeting extracellular adenosine in mouse Pten-deficient prostate cancer
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究 分 担 者	植村 天受  (Uemura Hirotetsugu)  (90213397)	近畿大学・医学部・教授   (34419)	

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
---------	---------