

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16969

研究課題名(和文)大腸癌におけるマルチキナーゼ阻害薬の腫瘍微小環境と腫瘍免疫への作用の検討

研究課題名(英文)The effect of multi kinase inhibitor in tumor microenvironment and tumor immunity in colorectal cancer

研究代表者

茂田 浩平(Shigeta, Kohei)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：30528790

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)：本研究は大腸癌におけるMulti kinase inhibitorの腫瘍微小環境への変化と腫瘍免疫の活性化を分子生物学的に検証することを目的とした研究を行っている。マウス大腸癌細胞株であるCT-26を用い、肝転移モデルとして肝臓に直接注入する肝注モデルとより臨床における肝転移の形成に近似した門脈から癌細胞が流入する脾注モデルの二つをマウス由来大腸癌肝転移モデルとして使用した。Regorafenib投与によるin vivo実験を行い、凍結切片を用いてCD8陽性T細胞と血管内皮細胞の分布について蛍光免疫染色で検証中である。大腸癌肝転移モデルを用いてさらなる腫瘍免疫活性化の仕組みを解明する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規治療として確立されつつある免疫治療が脚光を浴びているが、免疫治療が有効な大腸癌患者は10%未満とされ、大腸癌における免疫治療のさらなる開発が必要とされている。大腸癌における腫瘍免疫活性化のメカニズムの解明は必要な課題であり、本研究にて確立された人の大腸癌肝転移の発生機序に類似したマウスモデルを確立したことは大きな意義がある。今後はマウスモデルを用いたメカニズムの解明を進めていく。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study was to assess the correlation between the change of tumor microenvironment and improvement of tumor immunity by multi kinase inhibitor in colorectal cancer (CRC). We developed two different orthotopic model of CRC in mice with CT-26, a microsatellite stable murine CRC cancer cell line. First model was liver implantation model by injecting CT26 directly to the liver. Second model was liver metastasis model by injecting CT26 via splenic vein. In vivo experiment using orthotopic mouse mode was done with regorafenib treatment. We have collected the tumor from these mouse and are now under analysis of distribution of CD8 positive T cells by immunofluorescence. We are now planning to assess the mechanism of activation of tumor immunity by regorafenib treatment with this new mouse model.

研究分野：外科学

キーワード：大腸癌 腫瘍免疫 腫瘍微小環境

1. 研究開始当初の背景

大腸癌罹患患者は増加傾向であり、全癌腫の中では大腸癌による死亡数は男性で第3位、女性で第1位となっており、大きな割合を占めるようになってきている。その中でも切除不能進行再発大腸癌に対する治療は薬物療法が主役となる。これまでの数多くの臨床試験の結果から殺細胞性抗癌薬と抗血管新生薬や抗 EGFR 抗体などの分子標的治療薬により大きな生存期間の延長が得られることが知られている。

近年、免疫細胞の一つである T 細胞が腫瘍細胞を攻撃する際に腫瘍細胞が免疫抑制性のシグナルを出すことにより逃避することが知られている。その免疫抑制性シグナルをブロックする免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) が開発され、多くの癌腫でその有効性が示されている。しかし、大腸癌では ICI はマイクロサテライト不安定性が高頻度 (MSI-H)、またはミスマッチ修復機構の欠損が認められる症例のみでしか有効でないことが報告されており、このような症例は全大腸癌患者の 10%未満とされる (Overman MJ et al, Lancet Oncol, 2017)。

このような背景の中、全大腸癌患者を対象として Regorafenib と Nivolumab 併用療法の有効性が初めて報告された (Fukuoka et al, J Clin Oncol 2020)。大腸癌における奏効率は 36%であることが示され、大腸癌でも免疫治療が大きな役割を果たす可能性が示唆された。しかし、この二つの異なる薬剤がどのような相互作用を起こし、腫瘍免疫を活性化しているのかはいまだに不明である。本研究では、ICI 単独では効果が得られなかった中で、どのようにして腫瘍免疫を引き起こし、治療効果を発揮しているのか、治療メカニズムを理解することを目的とした。

2. 研究の目的

近年、ICI とともに併用薬剤を追加することにより治療効果が向上するという報告が多く、腫瘍微小環境への効果が注目されている。腫瘍微小環境は線維芽細胞、血管内皮細胞、血液・免疫系細胞など様々な細胞により構成される。本研究では、マウス大腸癌細胞株を用いた肝注および門脈注肝転移モデルを使用し、Multi kinase inhibitor がもたらす腫瘍微小環境への変化を細分化して評価し、免疫細胞が活性化される分子メカニズムを追求することを目的とした。

3. 研究の方法

大腸癌の転移臓器として肝臓が最も多く、その制御は予後延長のために非常に重要とされる。大腸癌肝転移モデルとしてマウス由来大腸癌細胞株を用いて同所移植モデルまたは門脈注および脾注肝転移モデルを採用する (Rahbari et al, Sci Transl Med, 2016; Millar et al, Nat Biotechnol, under review)。脾注肝転移モデル作成では、背中を切開して背側より脾臓を体外に露出し、免疫機構の温存のため脾臓半分を結紮してマウス由来大腸癌細胞株を投与し、その後脾注した半分の脾臓は切除して播種病変を作らないように作成する。門脈注肝転移モデルではマウスの門脈に直接大腸癌細胞株を打ち込んで作成する。同所移植モデル、門脈・脾注肝転移モデルともにマウス由来の細胞株を用いることで正常な免疫機能を持ち、免疫能についても評価可能となる。

マウスモデルに投与する治療薬は Regorafenib と抗マウス抗 PD-1 抗体を選択した。これまでの腫瘍微小環境と腫瘍免疫の関連性の研究、Regorafenib を用いた肝細胞癌における研究成果 (Shigeta et al, J Immunother Cancer. 2020) からこの 2 剤併用による相乗効果は、腫瘍血管の正常化に伴う腫瘍内への drug delivery の向上、T 細胞の腫瘍内リクルートメントの向

上, の2点が大きな役割を担っていると考えられ, マウスを用いた *in vivo* 実験を予定することとした.

4. 研究成果

最初に, マウス由来大腸癌細胞株である CMT-93 と CT26 を用いて, 肝注同所移植モデルと門脈・脾注肝転移モデルの作成を行った. CMT-93 を用いたところ, どのモデルでも肝臓への生着が難しく, 肝転移作成が安定しないことが分かり, 実験系としては不適當と判断した. CT26 を用いたところ, 肝注同所移植モデルは早期に実験モデルとして確立し, 安定

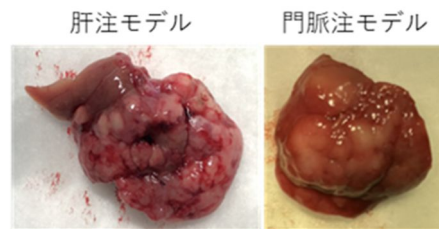


図1 マウスモデルにおける肝転移

してモデルの作成が可能であることが分かった(図1). 門脈・脾注肝転移モデルについても図にあるように多発肝転移を作成することに成功したが, こちらは門脈内に腫瘍栓を作ることや低体温に伴う移植後のマウス死亡が多く発生することが分かった. 死亡率が4-5割に達したため, 実験として成立させるために多くのマウスが必要となることが予想されたため, 肝注同所移植モデルでの実験系を先に採用することとした.

CT26 の STAT3 および pSTAT3 の発現を Western blotting 法で確認した(図2). また, Multi kinase inhibitor である Regorafenib による細胞増殖抑制試験を行い, IC50 が 6 μ M 程度であることを確認した(図2).

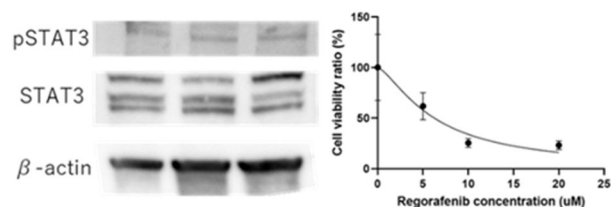


図2 CT26におけるSTAT3発現と細胞増殖試験

Regorafenib を用いて肝注同所移植モデルへの投与を行い, *in vivo* における腫瘍増殖抑制私見を行った. Regorafenib の投与濃度は 10mg/kg および 20mg/kg の二つとし, Control を加えて3群で比較を行った(図3). その結果, 既知の報告と同様に, 有意な腫瘍増殖抑制効果は認められなかった. また, 腹腔内播種病変も認められることが多く, 肝注移植を行う際の課題が認められた.

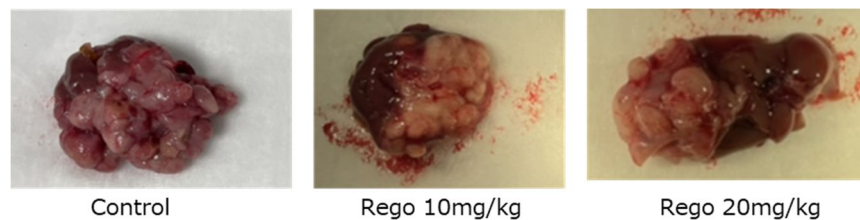


図3 肝注同所移植モデルにおけるRegorafenib投与実験

の一つである STAT3 阻害に伴う CD8+ T 細胞の誘導について検証を行うため, 治療7日目でマウスを sacrifice し, 得られた腫瘍検体の蛍光免疫染色を行った(図4). パラフィン切片及び凍結切片を用いているが, 既知の報告の通りパラフィン切片では CD8+細胞の染色はできなかった. 凍結切片では図4にあるように染色可能であり, 腫瘍内の CD8+細胞の分布を確認することが可能であったが, 血管内皮細胞も含めた複数の細胞の同時染色に難渋しており, 現在も条件の設定を行って評価中である.

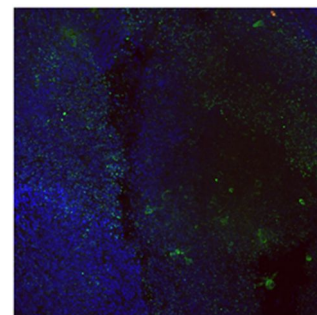


図4 腫瘍内CD8+細胞の分布 (緑: CD8, 青: DAPI)

上記のように, マウス大腸癌細胞株である CT26 を用いた肝注同所移植モデルの確立に成功し

た．一方で，当初予定していた CMT-93 を用いた同所移植モデルの確立に難渋し，門脈・脾注肝転移モデルでは当初想定していたよりも実験に使用できるマウス数が制限されることが分かり，研究遂行に難渋した．現在も *in vivo* 実験で得られた腫瘍検体を用いた免疫細胞の検討を継続しており，条件設定に難渋している．今後はこれらの条件設定を終了し，*in vivo* 実験で得られた腫瘍検体およびヒトの臨床検体で免疫細胞の分布について検証を進めていく予定である．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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