

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17971

研究課題名（和文）膠芽腫に対するPD-1抗体とCOX-2阻害薬併用効果の作用機序解明

研究課題名（英文）Combination therapy with anti PD-1 antibody and COX-2 inhibitor for glioblastoma

研究代表者

山口 泉（YAMAGUCHI, Izumi）

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：70780005

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）：抗PD-1抗体とセレコキシブの併用療法は悪性グリオーマモデルマウスにおいて抗腫瘍効果を増強した。セレコキシブはFKBP5を介した転写後の制御により、Glioma stem cells、グリオーマモデル、ヒトグリオーマ細胞においてPD-L1蛋白発現を低下させた。抗PD-1抗体とセレコキシブの併用療法は、glioblastomaに対する新たな治療方法となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FKBP5制御を介したPD-L1の蛋白発現低下が抗腫瘍効果増強に寄与している可能性があり、抗PD-1抗体医薬との併用療法におけるFKBP5の制御は新たな治療標的となる可能性がある。PD-1抗体を含めた免疫チェックポイント阻害剤は非常に高価であり、それらの併用療法はさらに高額な費用がかかる。そのため日本のみならず世界の医療財政を圧迫し、誰もが恩恵を受けられる治療とはならない可能性が危惧される。選択的COX-2阻害剤（セレコキシブ）は、鎮痛薬として承認されている薬剤であることや、治療費という観点からも医療経済効果においても非常に有用と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Combination of an anti-PD-1 antibody plus celecoxib augment antitumor effects in a malignant glioma model. Celecoxib reduces PD-L1 protein expression via post-transcriptional regulation by FKBP5 in murine Glioma stem cells, the glioblastoma model, and in human glioblastoma cells. Combination therapy with anti PD-1 antibody and celecoxib might lead to new immunotherapies to treat glioblastoma.

研究分野：Neuro-Oncology

キーワード：PD-1 PD-L1 FKBP5 glioblastoma COX-2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍の中で最も悪性度の高い膠芽腫 (glioblastoma, GBM) は治療抵抗性が高く、診断後の平均余命は 14.6 カ月であるため、早急な新規治療法の確立が要望されている。近年、免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1 抗体医薬の単剤もしくは併用療法の有効性が様々な癌において報告されているが、再発 GBM に対する抗 PD-1 抗体医薬単剤でのランダム化比較試験において、延命効果は認められなかった (文献)。研究代表者のグループは悪性度の低いヒト悪性神経膠腫細胞に対する COX-2 阻害薬単剤の殺細胞効果と作用機序および膠芽腫モデルマウスにおける抗腫瘍効果を報告しており (文献)、抗 PD-1 抗体の効果増強を図るために COX-2 阻害薬併用を試みることにした。本研究では、GBM 細胞および膠芽腫モデルにおける抗 PD-1 抗体医薬と COX-2 阻害薬併用による抗腫瘍効果増強作用とそのメカニズムを解明し、臨床応用への可能性を評価することとした。

2. 研究の目的

抗 PD-1 抗体医薬は、腫瘍細胞に発現している PD-L1 (Programmed cell death-ligand 1) と、T 細胞抑制性免疫補助受容体 PD-1 (Programmed cell death-1) の結合により、腫瘍に対して免疫抑制状態となったがん細胞に働き (文献) 抗原特異的な T 細胞の増殖や活性化および細胞障害活性を増強し、腫瘍増殖を抑制する。そのため、悪性黒色腫をはじめ様々な悪性新生物に対する抗 PD-1 抗体医薬治療の適応が広がっているが、脳腫瘍に関する有効性は一定でない。COX-2 阻害薬 (celecoxib) は低悪性度の神経膠腫に対して AKT/survivin 経路、AKT/ID3 経路を介して抗腫瘍効果を示すことをこれまで報告している (文献)。また COX-2 阻害薬は myeloid derived suppressor cell (MDSC) を介して gliomagenesis を抑制すると報告されている (文献)。予備検討において、抗 PD-1 抗体医薬と COX-2 阻害薬の併用効果をマウス glioma 幹細胞由来の GBM モデルを用いて調べ、併用群では各単剤治療群に比べて有意な生存期間の延長効果を認めていた。本研究では、抗 PD-1 抗体医薬と COX-2 阻害薬の併用療法における抗腫瘍効果の増強をもたらすメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス GSC およびヒト GBM 初代培養細胞 TGB-00 における COX-2 阻害薬 (celecoxib) 添加による殺細胞効果と PD-L1 発現低下作用とそのメカニズムを調べる。培養 GSC、TGB-00 を 3 群 [Celecoxib (30 μ M) 添加群、 Celecoxib (60 μ M) 添加群、 溶媒コントロール群] に分け、24 時間後に WST-8 により殺細胞効果を評価すると共に、細胞を回収し、Western blotting (WB)、qRT-PCR にて PD-L1 の蛋白レベルと mRNA レベルを解析する。タンパク合成系および分解系のいずれかで PD-L1 の発現が低下し、この作用が celecoxib の用量依存的な影響であるかどうかについて解析する。

(2) 転写レベルでの制御を受けていない場合は、co-chaperon として PD-L1 の転写後の folding process にかかわる FKBP5 の発現を評価する。FKBP5 依存性作用を確認するために FKBP5 阻害剤 (FK506 およびラパマイシン) での FKBP5 および PD-L1 の発現への影響を調べる。

(3) 抗 PD-1 抗体医薬に celecoxib を併用することによる腫瘍周囲の micro environment への影響を解析する。GSC1 $\times 10^3$ 個を C57BL/6 マウスの右大脳半球に定位的手術にて移植し、GBM モデルマウスを作成する。GBM モデルマウスを以下の 4 群に分けて投薬する。

抗マウス PD-1 抗体を初回 20mg/kg、その後 6 日ごとに 10mg/kg を腹腔内投与

選択的 COX-2 阻害剤として Celecoxib 10 mg/kg/day を連日腹腔内投与

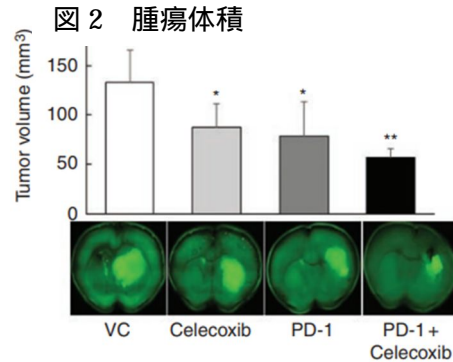
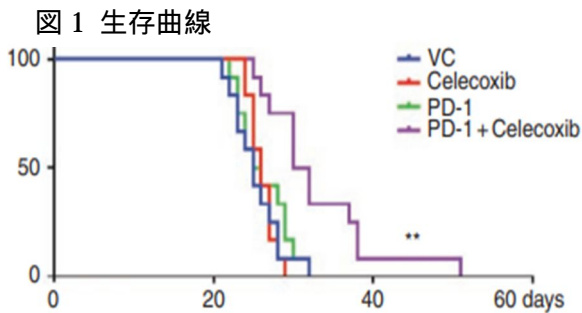
抗 PD-1 抗体と Celecoxib を併用投与

溶媒コントロール

術後 14 日目に sacrifice し、摘出した脳組織を用い、免疫組織学的評価による PD-L1 あるいは FKBP5 の局在を観察する。マクロファージや MDSC においても PD-L1 が発現していることがこれまでの報告で明らかとなっており (Romano S., Cancer Immunol Immunother, 2017)、腫瘍細胞のみならず CD16+ マクロファージ、CD163+ マクロファージ、及び PD-1+ 細胞の集積を免疫組織染色で評価する。

4. 研究成果

(1) グリオーマモデルでは、celecoxib と抗 PD-1 抗体を併用することで各単剤治療群に比べて生存期間延長 (図 1) と腫瘍サイズ縮小効果 (図 2) の増強作用を認めた。さらに celecoxib 投与により腫瘍組織における PD-L1 の発現低下を確認した。



(2) GSCsにおいて、celecoxib投与による用量依存的な細胞増殖抑制作用(図3)とPD-L1発現低下作用(図4)を認めた。しかし、PD-L1 mRNAレベルは逆に上昇しており、celecoxibによるPD-L1発現低下は転写レベルと関係しないと考えられた。

図3 Cell Viability

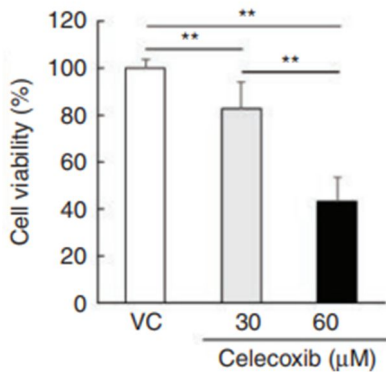
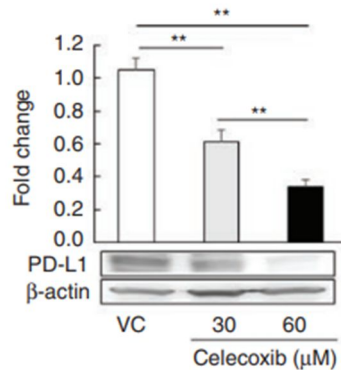


図4 Expression of PD-L1(Celecoxib投与)



(3) GSCsにおいてcelecoxibはPD-L1の転写後の蛋白生成に関連するFKBP5発現の減少を認め、FK506及びrapamycinでも同様にFKBP5とPD-L1発現を減少させ、細胞増殖抑制を示し、FKBP5を介したPD-L1発現減少が抗腫瘍効果に寄与する可能性が示唆された(図5、6)。

図5 Expression of FKBP5 and PD-L1(FK506投与)

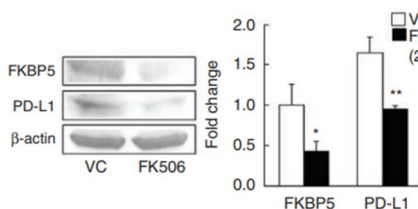
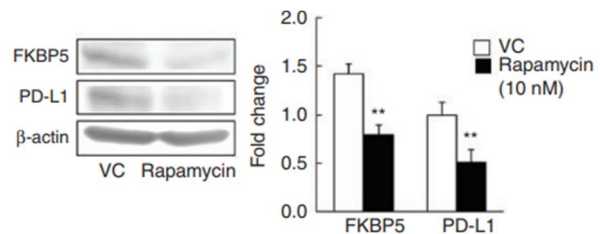


図6 Expression of FKBP5 and PD-L1(Rapamycin投与)



(4) ヒトGBM初代培養細胞においても、celecoxibによりPD-L1 mRNAに影響なく、FKBP5とPD-L1蛋白発現が減少し、細胞増殖抑制効果が認められた(図7、8)。

図7 Expression of FKBP5 and PD-L1(Celecoxib投与)

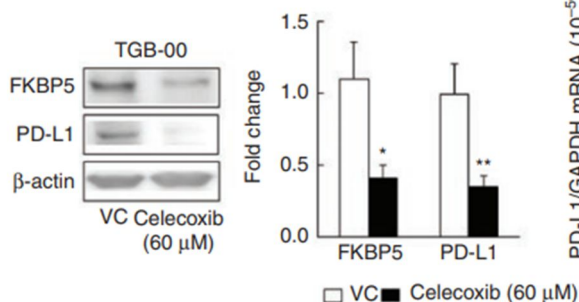
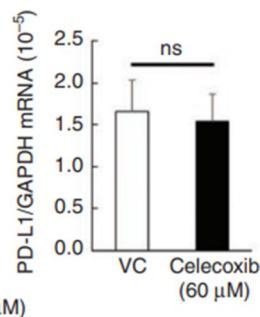


図8 Expression of PD-L1 mRNA(Celecoxib投与)



(5) 細胞系での結果と同様にマウスグリオーマモデルにおいても、celecoxibの投与によりCOX-2、FKBP5、PD-L1の発現低下が認められ(図9)、celecoxibと抗PD-1抗体併用は単独治療に比べてPD-1陽性細胞の腫瘍周囲への集積増加が確認された(図10)。

図 9 免疫組織染色(COX-2, FKBP5, PD-L1)

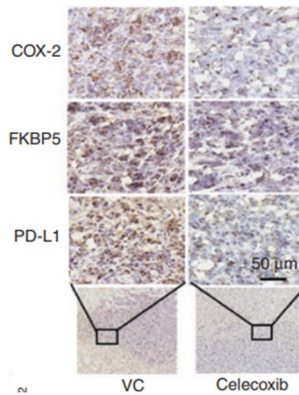
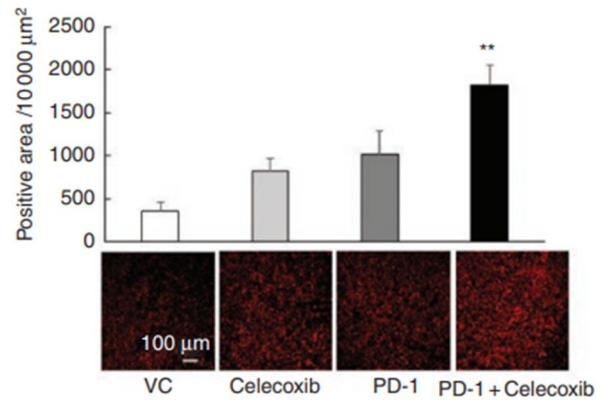


図 10 蛍光免疫組織染色 (PD-1)



以上から、FKBP5 制御を介した PD-L1 の蛋白発現低下が抗腫瘍効果増強に寄与している可能性があり、抗 PD-1 抗体医薬と celecoxib の併用療法における FKBP5 の制御は新たな治療標的となる可能性があると考えられた。

< 引用文献 >

- Filley AC, Henriquez M, Dey M. Recurrent glioma clinical trial, CheckMate-143: the game is not over yet. *Oncotarget*. 2017;8(53):91779–91794.
- Sato A, Mizobuchi Y, Nakajima K, et al. Blocking COX-2 induces apoptosis and inhibits cell proliferation via the Akt/survivin- and Akt/ID3 pathway in low-grade glioma. *J Neurooncol*. 2017;132(2):231–238
- Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol*. 2013;14(12):1212–1218.
- Fujita M, Kohanbash G, Fellows-Mayle W, et al. COX-2 blockade suppresses gliomagenesis by inhibiting myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*. 2011;71(7):2664–2674.

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