

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21652

研究課題名（和文）次世代ヒト化シンジェニックマウスによる腎癌免疫ニッチの再現と治療評価モデルの樹立

研究課題名（英文）Establishment of an evaluation model for renal cancer immune niche replication and treatment using next-generation humanized syngeneic mice.

研究代表者

小川 修（Ogawa, Osamu）

京都大学・医学研究科・名誉教授

研究者番号：90260611

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：免疫チェックポイント阻害剤（ICI）の腎癌治療への効果を調査するため、患者由来の腫瘍組織と免疫細胞を移植したヒト化マウスモデルを開発した。NOGとNOG-DKO免疫不全マウスへ健康人の末梢血単核細胞を移植し、新たなPDX（患者由来のゼノグラフト）を3系統作成。ヒト抗PD-1抗体との相互作用を比較し、ヒト抗PD-1抗体投与群でヒトCD45+細胞の割合とヒトCD8+細胞が有意に増加し、癌組織への浸潤も増加したことが確認された。また、抗PD-1抗体と新規標的治療薬の併用療法により腎癌の増殖を有意に抑制することができた。この結果から、この新規PDXモデルは癌免疫研究に有用なツールと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、同一患者由来の腫瘍組織と免疫細胞を利用した次世代ヒト化シンジェニックマウスモデルを開発に成功した。その結果、免疫チェックポイント阻害剤（ICI）の効果を評価する新しい前臨床モデルが確立された。本研究結果は、ICIの治療効果や耐性・不応性機序をより深く理解し、新たな治療法の開発へとつながる可能性を持つ。さらに、この研究モデルは他の固形癌へも応用が期待され、癌免疫療法研究全体の発展に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, a humanized mouse model was developed, implanting patient-derived tumor tissue and immune cells, to investigate the effectiveness of immune checkpoint inhibitors (ICIs) in renal cancer treatment. Healthy human peripheral blood mononuclear cells were transplanted into NOG and NOG-DKO immunodeficient mice, establishing three new lines of Patient-Derived Xenografts (PDXs). Upon comparing interactions with human anti-PD-1 antibodies, it was found that the proportion of human CD45+ cells and human CD8+ cells significantly increased in the group treated with human anti-PD-1 antibodies. Additionally, an increase in tumor infiltration was confirmed. Furthermore, combined therapy of anti-PD-1 antibody and a new therapeutic target significantly inhibited the growth of renal cancer. These findings suggest that this novel PDX model can serve as a useful tool in cancer immunology research.

研究分野：腎泌尿器腫瘍

キーワード：免疫チェックポイント阻害剤 腎細胞癌 ヒト化シンジェニックマウス 患者由来ゼノグラフト 抗PD-1抗体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

近年癌に対する新たな治療選択肢として ICI が登場し、癌免疫環境を再現する前臨床モデルの必要性が高まっている。しかし、免疫不全マウスによる PDX では、ヒト癌組織を再現できても癌免疫環境が再現できない。この問題を解決するために、新たな癌免疫研究のツールとして前述の NOG-DKO が開発された (Clin Can Res 2016)。既報では、ヒト癌細胞株とアロの PBMC を用いた in vivo 実験でモデルの有用性が示されているが、同一ドナー由来の免疫細胞と腫瘍組織を用いていないため、主にはアロ反応が惹起されており生理的な癌免疫環境を再現出来ていないと考えられる。我々は、臨床教室として年間約 50 例の腎癌手術を行っており手術検体へのアクセスがよいこと、加えて臨床データへの良好なアクセスも確保されていることから、同一患者由来の免疫細胞と腫瘍組織をセットで用いることが可能であるため、NOG-DKO を用いて腎癌の次世代前臨床モデルを開発するという構想に至った。

他癌種では CD8 陽性 T 細胞の腫瘍浸潤は予後良好と相関するのに対して、腎細胞癌では予後不良と相関しており、また、遺伝子変異量や PDL1 発現量の少なさに比して ICI の治療効果が高いことも特徴的である。腎癌は従来から癌免疫環境に強く依存することが示唆されてきたが、癌免疫動態を知る上で他癌種と若干異なる特殊なニッチを持つ腎癌での前臨床モデル構築には非常に大きな意義がある。また、前述の通り、NOG-DKO を用いて同一患者由来の腫瘍組織および免疫細胞を用いた次世代ゼノグラフト樹立は未だ報告されておらず、本研究が世界初の試みである。同一患者由来のヒト化シンジェニックマウスモデルの開発に成功した場合、これまでのヒト免疫細胞を用いた in vivo モデルでは避けられなかったアロ反応の影響を最小限とし、ヒト免疫系と腫瘍環境を忠実に再現することができると考えられる。本研究の最大の利点としては、臨床腎癌での ICI 奏功・非奏功を模倣する複数のモデルを樹立し、双方の比較が可能である点が挙げられる。本戦略が実現すれば他の固形癌への応用も強く期待され、癌免疫療法研究全体の発展に大きく寄与し得る。我々は臨床教室の強みを生かし、本モデル実験結果と、PDX を作製した患者の臨床情報とをドッキング解析することで、ICI 耐性・不応性機序の解明という現状の癌免疫療法が抱える困難を克服し、新しい治療薬の創出のための基盤を構築する。

## 2. 研究の目的

近年、免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) が新たな癌治療薬として登場したが、固形癌における奏効率は約 11~40% と高くない。In vivo では多様な免疫細胞ネットワークと腫瘍微小環境が形成され動的に変化するため、横断的な臨床検体の解析のみでは不応性機序の全容を解明することは極めて困難である。そこで ICI 不応性機構の解明に向けて、癌免疫微小環境を動的に再現する in vivo モデルの開発が求められる。

これまで、マウス癌細胞株を同系ホストに移植した同種移植モデルが用いられてきたが、癌細胞のゲノム変異様式が異なるため、ヒトの癌免疫環境を反映できていないと言われている。本研究では、ICI の効果が高い固形癌の一つである腎癌を対象として、患者由来の癌組織と免疫細胞を同時に移植した新規マウスモデルを開発する。このモデルにより腎癌の特徴的な癌免疫環境を再現し、ICI 治療モデルでの癌免疫環境の動的解析を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 患者由来 “腫瘍組織” ゼノグラフトモデルの樹立

重度免疫不全マウス NOG に対して、手術で摘出した患者由来腎癌組織を皮下移植する。マウスに生着した腫瘍を継代し、安定して増殖可能となったものが元の癌検体の組織学的・遺伝学的特徴を維持していることを確認し、患者由来ゼノグラフト (Patient-Derived Xenograft: PDX) の樹立とする。

### (2) 患者由来 “免疫細胞” ゼノグラフトモデルの樹立

これまで NOG などの重度免疫不全マウスにヒト免疫細胞を移植することでニッチの再現を試みても、マウス組織に対する異種反応が惹起され有用なモデルとなっていなかった。しかし近年、マウス MHC クラス II クラス II をともにノックアウトした NOG (NOG-MHC double knockout mouse: NOG-DKO) が作製され、ヒト免疫細胞を移植したマウスモデルの作製が可能となった (Clin Can Res 2016)。本研究ではこの NOG-DKO を用いて、患者の免疫環境を再現した患者免疫細胞由来ゼノグラフトを樹立する。具体的には、腎癌患者の血液から分離した末梢血単核細胞 (Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMC) を NOG-DKO マウスに静脈注射し、マウスの末梢血、脾臓においてヒトの T 細胞、B 細胞、樹状細胞、NK 細胞などの免疫細胞が生着していることを確認する。

### (3) 同一患者由来 “免疫細胞および腫瘍組織” ゼノグラフトモデルの樹立

(1)(2) で確立したモデルを組み合わせることで、同一患者由来のヒト化シンジェニックマウスモデルを樹立する。具体的には、PDX 樹立に成功した患者の PBMC を NOG-DKO に静脈注射して免疫細胞の生着を確認し、同一患者のゼノグラフト腫瘍を皮下移植する。

元々患者体内で既に免疫寛容が成立しているため、同一患者由来シンジェニックマウス腫瘍に

においても、腫瘍に対する免疫寛容が再現されると予想される。免疫染色や浸潤細胞の flow cytometry を用いて、シンジェニックマウス腫瘍と、PDX 樹立に使用した元の患者腫瘍とを比較し、個々の患者の癌免疫環境が再現できているかどうかを評価する。

また、腎癌を発症する VHL 病患者から樹立したヒト VHL+/- iPS 細胞にさらに対側アレル VHL KO を行った VHL-/- iPS 細胞を分担研究者がすでに樹立している。同細胞はマウス腎被膜下へ移植するとヒト由来の微小血管構築を伴った淡明型腎癌様のゼノグラフトを形成する。VHL-/- iPS 細胞由来ゼノグラフトを上記の次世代ヒト化マウスモデルに応用することで、腎癌発生段階での免疫細胞応答を詳細に解析する。

(4) ICI 奏功・非奏功マウスモデルにおける癌免疫環境の動的解析

(3) で樹立したヒト化シンジェニックマウスを用いて、抗 PD-1・抗 CTLA-4 抗体の投与実験を行う。免疫染色、flow cytometry による腫瘍浸潤免疫細胞の評価を行い、ICI 奏功・非奏功マウスでそれぞれコントロールと比較して変化を調べる。さらに IL2, IL6, IL10, VEGF, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  などの種々のサイトカインや分泌因子のトランスクリプトーム解析を用いた網羅的遺伝子発現解析や、CyTOF を用いた網羅的浸潤免疫細胞の動態解析を行い、ICI 奏功、非奏功により差のある因子を探索する。

## 4. 研究成果

(1) 患者由来“腫瘍組織”ゼノグラフトモデルの樹立

本研究の開始にあたり、開発元である実験動物中央研究所との間で NOG-MHC double knockout mouse (NOG-DKO) に関する有体物供給約款を締結し、重度免疫不全動物を飼育可能な個別換気装置を含めた specific pathogen free 環境を整備した上で NOG-DKO マウスを有償頒布にて導入した。NOG-DKO に対して我々が既に樹立した腎癌 patient-derived xenograft (PDX) 腫瘍である KURC1 を皮下移植し、腫瘍組織ゼノグラフトモデルとして安定的に継代可能であることを確認した。さらに同様の方法で秋田大学で 24 例の腎癌患者から手術検体を採取し、安定継代可能な新規 PDX を 3 系統樹立した。

(2) 患者由来“免疫細胞”ゼノグラフトモデルの樹立

NOG-DKO (n=3) および NOG (n=5) のそれぞれに、同一健康人ドナー由来の末梢血単核細胞を移植し、免疫細胞ゼノグラフトを樹立した。両グループを継時的に解析した結果、NOG では著大な体重減少及び GVHD スコアの上昇を認め、PBMC 投与 1 か月以内に全例が死亡した。一方で、NOG-DKO は PBMC 投与 1 か月時点で全例が有意な体重減少及び GVHD スコアの上昇無く生存していた。Flow cytometry 解析の結果、NOG-DKO に投与したヒト PBMC は投与 2 週間後からマウス末梢血中に検出可能となり、投与 1 か月目時点でも CD4+, CD8+, CD4+CD25+細胞が全例で検出可能であった。以上の実験結果から、本研究において NOG-DKO を用いることの妥当性が検証できた。

(3) 同一患者由来“免疫細胞および腫瘍組織”ゼノグラフトモデルの樹立

PDX に同一患者由来の末梢血単核細胞を移植することで、同一患者由来腫瘍組織 + 免疫細胞 PDX を作成した。

(4) ICI 奏功・非奏功マウスモデルにおける癌免疫環境の動的解析

(3) で樹立した新規 PDX モデルを用いて、免疫チェックポイント阻害薬であるヒト抗 PD-1 抗体投与群 (n=4) とアイソタイプコントロール投与群 (n=5) における治療開始 1 か月時点での腫瘍浸潤リンパ球および末梢血単核球細胞を解析して比較した。Flow Cytometry の結果、ヒト抗 PD-1 抗体投与群ではコントロール群と比較して、末梢血中・腫瘍組織中のいずれにおいてもマウス CD45+に対するヒト CD45+細胞の割合が有意に増加しており、また、末梢血中のヒト CD8+細胞も増加傾向であった。治療終了後に摘出した腫瘍に対して免疫染色を行った結果、ヒト抗 PD-1 抗体投与群において、ヒト CD8+細胞および Ki67+CD8+細胞が有意に多く浸潤していたことから、新規 PDX の生体内でヒト抗 PD-1 抗体による患者癌免疫反応を再現できたと考えられた。さらに、この新規 PDX を用いて抗 PD-1 抗体と新規治療標的の併用療法実験を行った結果、併用療法群は単剤療法群と比較して腎癌患者由来ゼノグラフトの腫瘍増殖を有意に抑制した。以上の結果から、同一患者由来の腫瘍組織および免疫細胞を移植した新規 PDX に対する免疫チェックポイント阻害薬治療モデルは、癌免疫研究において有用なツールになり得ると考えられた。

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
研究分担者	嘉島 相輝  (Kashima Soki)  (50842952)	秋田大学・医学系研究科・助教   (11401)	
研究分担者	中村 英二郎  (Nakamura Eijiro)  (90293878)	国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医長   (82606)	
研究分担者	後藤 崇之  (Goto Takayuki)  (90806605)	京都大学・医学研究科・講師   (14301)	

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