

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19392

研究課題名（和文）がんの抗PD-1抗体療法耐性メカニズム解明に向けた実験基盤構築

研究課題名（英文）Construction of the foundation for the elucidation of the resistance mechanisms of the anti-PD-1 cancer therapy

研究代表者

宮島 倫生（Miyajima, Michio）

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・客員研究員

研究者番号：80586404

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題ではがんのPD-1療法耐性メカニズムの解析基盤を構築した。PD-1の機能不全により亢進した抗腫瘍応答に対して耐性を獲得したがんをin vivoでノンバイアスにスクリーニングする実験系を確立し、PD-1欠損マウスへの接種時には排除されることが知られている親株のがん細胞から、PD-1欠損マウスに接種しても腫瘍を形成するような細胞株を取得した。この細胞株は野生型マウスに接種後の抗PD-1抗体や抗PD-L1抗体の投与にも耐性を見せた。このようにがんのPD-1療法耐性メカニズムの解析が可能な新たな細胞株が樹立された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんのPD-1療法は幅広い適応で開発が進められているが近年耐性がんも報告されてきており、耐性がんの治療法開発への社会的要望は強くなっている。しかしながらがんのPD-1療法耐性メカニズムは不明な点が多く治療法開発の障壁となっている。

耐性メカニズムに不明な点が多い理由の1つは解析する実験系が乏しいことである。本研究課題によりがんの抗PD-1抗体療法耐性メカニズム解明に向けた新たな実験基盤が構築された。

本研究結果を基にPD-1療法耐性がんの治療法や治療効果予測マーカーの開発といった応用研究が発展し、その波及効果は医療界や産業界へも及ぶことが想定されるため本研究成果は意義深いものとなったと言える。

研究成果の概要（英文）：In this research project, we established a basis for analyzing the mechanism of PD-1 therapy resistance in cancer: we established an experimental system for in vivo non-biased screening of cancers that have acquired resistance to anti-tumor responses enhanced by PD-1 dysfunction, which is known to be eliminated upon inoculation into PD-1-deficient mice. One cell line was obtained from the parental cancer cells that would form tumors when inoculated into PD-1-deficient mice. This cell line was also resistant to administration of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies after inoculation into wild-type mice. Thus, a new cell line was established that enables analysis of the PD-1 therapy resistance mechanisms in cancer.

研究分野：免疫学

キーワード：PD-1

1. 研究開始当初の背景

2018年のノーベル生理学・医学賞は免疫抑制の阻害によるがん治療法の発見により本庶佑博士と James P. Allison 博士に授与された。彼らの発見を基に開発された免疫チェックポイント阻害剤の中でも Programmed cell death-1 (PD-1) に対する抗体を使用した抗 PD-1 抗体療法 (PD-1 療法) は、1000 種類を超える関連の治療法が進められており、多くのがん種で治療の選択肢に加えられてきていた。一方で PD-1 療法の汎用化が進むに連れて耐性がんが報告されてきていた。PD-1 療法耐性がんの治療法の開発は近未来の医療課題として重要であるものの、その耐性メカニズムはほとんど明らかになっておらず治療法開発の障壁となっているという背景があった。

2. 研究の目的

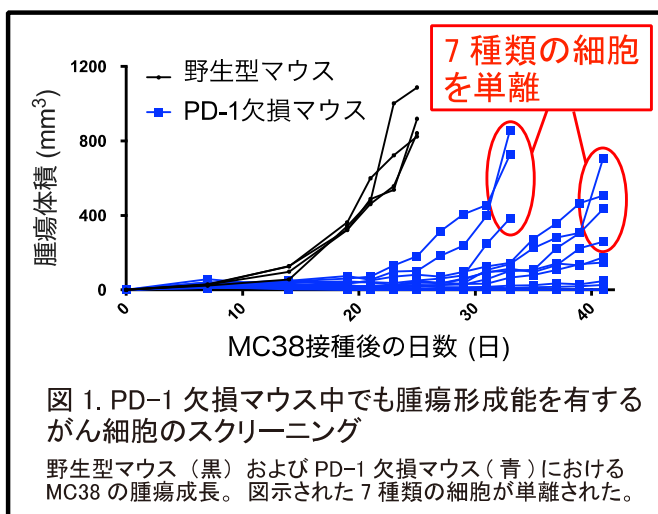
PD-1 療法耐性がんの耐性メカニズムの解明が進んでいない理由の 1 つは解析する実験系が乏しいことである。特にがん細胞および宿主免疫系の両者の視点から耐性メカニズムを解析できる実験系は少ない。本研究課題では、がんの PD-1 療法耐性メカニズムを明らかにするための実験基盤を構築することを目的とする。具体的には PD-1 欠損マウスにおける増強した抗腫瘍活性への耐性を持つがん (耐性がん) 細胞を *in vivo* でスクリーニングするシステムを確立し、スクリーニングにより耐性細胞株を樹立することで、その耐性メカニズムを明らかにするための実験基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題では第一に実験系の構築を実施する。具体的には、耐性がんを *in vivo* でノンバイアスにスクリーニングし、がん細胞側の遺伝子発現変化や宿主免疫系の変化といった耐性メカニズムの解析を可能とする実験系を構築する。MC38 細胞 (MC38) はマウス大腸がん細胞株であり、野生型マウスに接種すると腫瘍組織 (腫瘍) を形成するが、PD-1 欠損マウスへの接種時には腫瘍が退縮し排除されることが幅広く知られている。しかしながら申請者は予備的データとして、がん細胞が PD-1 欠損マウスに接種された場合であっても、完全には腫瘍が排除されないケースが稀にあることを見出した。そこで多数の PD-1 欠損マウスに MC38 を接種すれば長期的には耐性がん細胞により形成される腫瘍が出現するのではないかと考えた。そこで本研究では、この構想を実行に移し、PD-1 欠損マウスに出現するがん細胞をセルソーターを用いて単離・回収し再度 PD-1 欠損マウスに接種することで、耐性能を持つがん細胞のみを濃縮することを試みた。さらにこの過程を繰り返すことにより、耐性細胞の濃縮を進め、耐性がん細胞を樹立するということを試みた。さらに樹立した耐性がん細胞を解析して耐性がんの特性を明らかにするという手法をとった。あらかじめセルソーターでの単離・回収時に凍結保存しておいた細胞を *in vitro* で増殖させ細胞株を樹立した後、野生型マウスおよび PD-1 欠損マウスに接種して腫瘍体積を基に腫瘍形成能のパターンを解析した。この手法で耐性がんの特性を明らかにするという手法で研究を遂行した。

4. 研究成果

MC38 は野生型マウスに接種すると腫瘍組織 (腫瘍) を形成するが、PD-1 欠損マウスへの接種時には腫瘍が退縮し排除されることが幅広く知られている。しかしながら申請者は上述の通り、がん細胞が PD-1 欠損マウスに接種された場合であっても、完全には腫瘍が排除されないケースが稀にあることを見出した。そこで多数の PD-1 欠損マウスに MC38 を接種すれば長期的には PD-1 欠損耐性能を持つがん細胞が出現するのではないかと仮説を立てた。実際に野生型マウスと PD-1 欠損マウスに MC38 を接種し腫瘍成長を解析したところ、図 1 に示す通り野生型マウスと比較して日数は要するものの、PD-1 欠損マウスであっても腫瘍を形成する個体が出現した。そこで図 1 に示した 7 個体からフローサイトメトリーによりがん細胞を回収し、再度野生型マウスや PD-1 欠損マウスに接種して、腫瘍体積を継続的に測定した。その結果、図 2 に示すような 3 種類の腫瘍形成パターンを示すがん細胞が得られた。具体的には、野生型マウスと同様に PD-1 欠損マウスでも腫瘍を形成するがん細胞 (A)、野生型マウスと比較して PD-1 欠損マウスで腫瘍形成能が高いがん細胞 (B)、PD-1 欠損マウスで一過的に大きな腫瘍が形成されるがその後退縮するがん細胞 (C) が得られた。



型マウスと比較して日数は要するものの、PD-1 欠損マウスであっても腫瘍を形成する個体が出現した。そこで図 1 に示した 7 個体からフローサイトメトリーによりがん細胞を回収し、再度野生型マウスや PD-1 欠損マウスに接種して、腫瘍体積を継続的に測定した。その結果、図 2 に示すような 3 種類の腫瘍形成パターンを示すがん細胞が得られた。具体的には、野生型マウスと同様に PD-1 欠損マウスでも腫瘍を形成するがん細胞 (A)、野生型マウスと比較して PD-1 欠損マウスで腫瘍形成能が高いがん細胞 (B)、PD-1 欠損マウスで一過的に大きな腫瘍が形成されるがその後退縮するがん細胞 (C) が得られた。

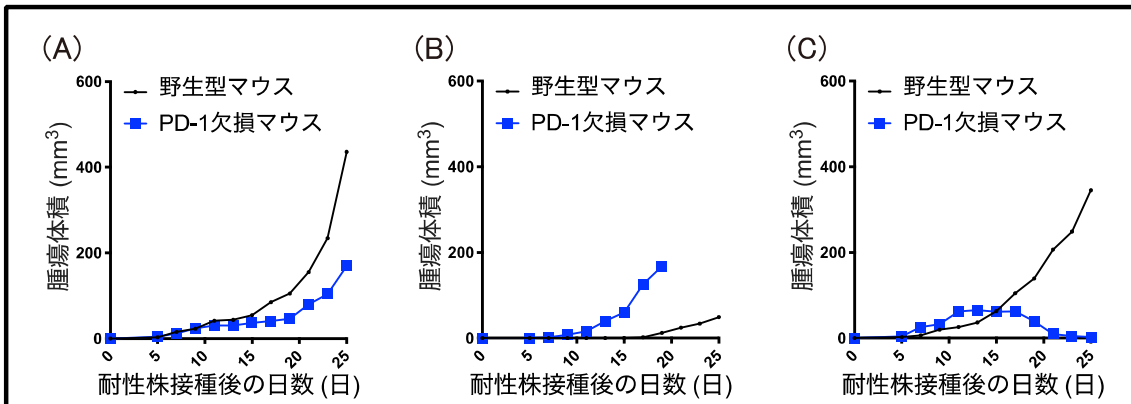


図 2. スクリーニングにより単離されたがん細胞の PD-1 欠損マウス中での腫瘍形成能

図 1 で単離されたがん細胞の野生型マウス (黒) および PD-1 欠損マウス (青) における腫瘍成長。野生型マウスと同様に PD-1 欠損マウスでも腫瘍を形成するがん細胞 (A)、野生型マウスと比較して PD-1 欠損マウスで腫瘍形成能が高いがん細胞 (B)、PD-1 欠損マウスで一過的に大きな腫瘍が形成されるがその後退縮するがん細胞 (C) の 3 パターンを示した。

胞 (C) の 3 種類であった。(A) については PD-1 欠損耐性がん細胞である。一方で (B) については PD-1 療法時の腫瘍増大を模倣するがん細胞、(C) については PD-1 療法時の腫瘍の偽増悪を模倣するがん細胞と捉えることができる。この結果は、本スクリーニング系が PD-1 欠損マウスの増強した抗腫瘍活性を選択圧として PD-1 欠損耐性を持つがん細胞をノンバイアスにスクリーニングする系として実際にワークしていることを示している。さらに、取得したがん細胞は形質が安定化すれば PD-1 療法の耐性メカニズムや PD-1 療法時の腫瘍増大、腫瘍の偽増悪が生じるメカニズムを解析するツールになる可能性があることを示唆している。

さらにこの 3 パターンの中で (A) のパターンを示した 1 種類については、「がん細胞の *in vitro* での培養」、「PD-1 欠損マウスへの接種」、「耐性株の単離」というサイクルを 3 回繰り返すことで、形質を安定させた細胞株を樹立した。親株の MC38 が野生型では腫瘍を形成する一方で PD-1 欠損マウスでは腫瘍を形成できないのに対し、この細胞株 (MC38 #3-3) は野生型、PD-1 欠損マウスのいずれにおいても腫瘍を形成できた (図 3)。

次に、実際に MC38 #3-3 が免疫チェックポイント阻害剤に耐性を示すかどうかについて解析した。親株の MC38 および MC38 #3-3 を野生型マウスに接種し、抗 PD-1 抗体接種時の腫瘍退縮効果を解析した。その結果、親株の MC38 については抗 PD-1 抗体接種群の腫瘍サイズはコントロール抗体接種群の腫瘍サイズと比較して有意に低下していたのに対して、MC38 #3-3 については抗 PD-1 抗体接種群とコントロール抗体接種群との間で腫瘍サイズに変化は認められなかった (図 4)。

免疫チェックポイント阻害剤は PD-1 に加えてそのリガンドである Programmed cell death ligand 1 (PD-L1) に対する抗体も臨床応用されている。そこで MC38 #3-3 を野生型マウスに接種し、抗 PD-L1 抗体接種時の腫瘍退縮効果を解析した。その結果、MC38 #3-3 については抗 PD-L1 抗体接種群とコントロール抗体接種群との間で腫瘍サイズに変化は認められなかった (図 5)。これらの結果は、新たに樹立した MC38 #3-3 が抗 PD-1 抗体や抗 PD-L1 抗体といった PD-1 経路を標的とした免疫チェックポイント阻害剤に対して耐性を獲得していることを示唆している。

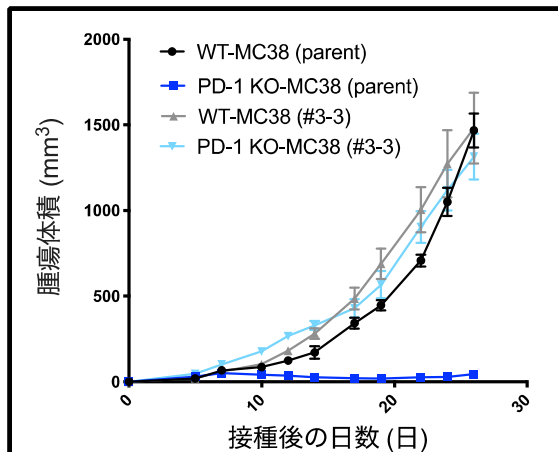


図 3. MC38 #3-3 の腫瘍形成能

MC38 および MC38 #3-3 の野生型マウスおよび PD-1 欠損マウスにおける腫瘍成長。

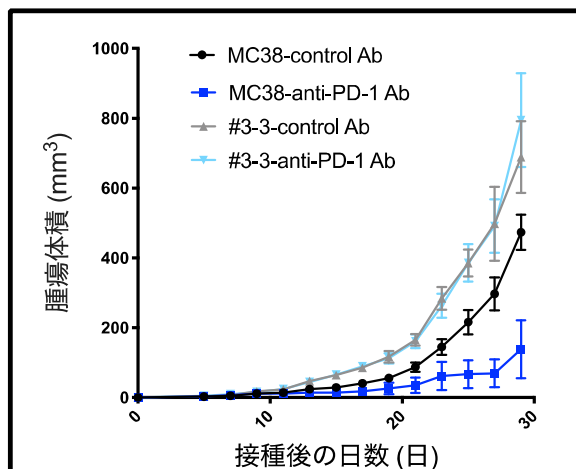
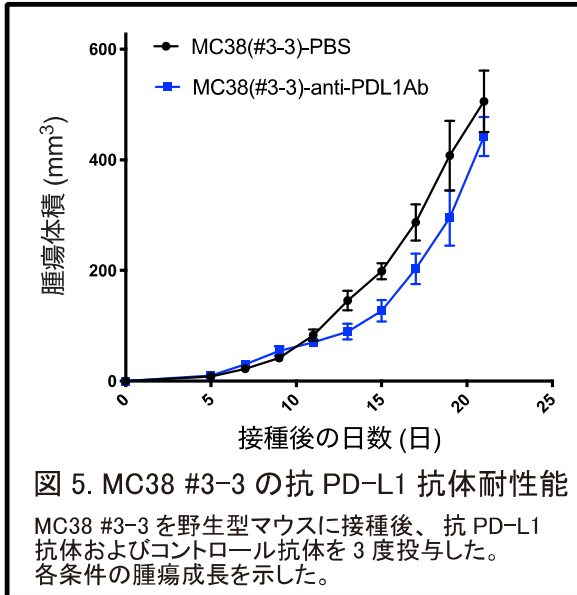


図 4. MC38 #3-3 の抗 PD-1 抗体耐性能

MC38 および MC38 #3-3 を野生型マウスに接種後、抗 PD-1 抗体およびコントロール抗体を 3 度投与した。各条件の腫瘍成長を示した。



このように、本研究課題により PD-1 療法耐性能を獲得した新たな細胞株が樹立され、がんの PD-1 療法耐性メカニズムを明らかにするための実験基盤が構築された。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asami Shohei, Tsutsui Yumi, Yamamoto Sachiko, Miyajima Michio	4. 巻 648
2. 論文標題 T-cell deficiency induces deficits in social behavior and dyslipidemia in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 81 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.01.059	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 Zhang B et al.	4. 巻 599
2. 論文標題 B cell-derived GABA elicits IL-10+ macrophages to limit anti-tumour immunity.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 471-476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-021-04082-1	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Miyajima M
2. 発表標題 A novel immune regulation governed by immunometabolism
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Zhang B, Miyajima M, Sugiura Y, Fagarasan S
2. 発表標題 A novel B cell-derived metabolite elicits anti-inflammatory macrophages and limits anti-tumor cytotoxic responses
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会（招待講演）
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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