

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461176

研究課題名(和文) 抗血管新生及び抗リンパ管新生療法による抗腫瘍免疫療法の効果増強作用の検討

研究課題名(英文) Sunitinib improves tumor microenvironment and augments the T cell infiltration and the effect of immunotherapy by DR-5

研究代表者

岡崎 達馬 (Okazaki, Tatsuma)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：40396479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍モデルに抗リンパ管新生療法と抗血管新生療法及び抗腫瘍免疫療法を併用し、より強力な増大抑制作用をもたらすか確認した。抗腫瘍免疫療法としては抗DR-5抗体を用いてがんへ細胞死を誘導した。抗リンパ管新生療法及び抗血管新生療法としてsunitinibを用いた。癌細胞をマウスの足裏に皮下注射し腫瘍と所属リンパ節を解析した。腫瘍の血管とリンパ管はコントロールに比べ併用処置群でより正常化していた。所属リンパ節で免疫細胞の活性度が併用処置群で増強し腫瘍内の免疫細胞数も増えていた。その結果腫瘍の成長速度は併用処置群で各々の単独処置群より低下した。

研究成果の概要(英文)：VEGFR-2 in angiogenesis and VEGFR-3 in lymphangiogenesis are the key players. An anti-DR-5 Ab, the apoptosis inducing antibody, has antitumor effects. Here, we combined anti-DR-5 Ab with VEGFR1-3 inhibitor sunitinib as anti-angiogenic and lymphangiogenic therapies. Mice were injected with 4T1 cells into the footpad and treated with sunitinib and/or anti-DR-5 Ab. The tumors and popliteal lymph nodes were isolated. The growth rate of 4T1 or CT26 tumors was measured. Sunitinib decreased the blood vessel and hypoxic area densities in the tumors, suggesting blood vessel normalization. Sunitinib decreased the amount of tumor injected Evans blue and hyaluronic acid in tumors, suggesting better lymphatic flow. The combination increased the ratio of activated dendritic cells and CD8+ T cells in lymph nodes and the numbers of CD8+ and effector CD4+ T cells in tumors compared to controls. The combination decreased the tumor growth rate compared to each mono-therapy.

研究分野：癌

キーワード：腫瘍微小環境 血管新生 リンパ管新生 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

腫瘍血管の大部分は支離滅裂に増殖し血液が循環せず腫瘍内は低酸素となる。血管新生因子の vascular endothelial growth factor (VEGF) 等を阻害する抗血管新生療法は動物実験では単独で抗腫瘍効果を示したが、臨床では肺癌等に単独では効かず、抗癌剤と併用して効果を示す。その機序は抗血管新生療法が腫瘍血管を正常化し腫瘍内の血液循環と低酸素を改善し抗癌剤の到達量を高めその効果を強める、という blood vessel normalization による。抗血管新生療法の腫瘍免疫への影響はほぼ不明だが、その効果を高めるとい報告が多い。これまでマウスの VEGF receptor-2 (VEGFR-2) 阻害等によりその機序は不明だが腫瘍内の cytotoxic T 細胞数が増え免疫抑制系の regulatory T 細胞数が減った、血管内皮の接着分子発現量が上昇した等報告されてきた。しかし種々ある抗血管新生療法の免疫細胞への影響は不明な点が多い。また抗血管新生療法による血管の正常化と免疫細胞の関係は不明である。我々の予備実験では正常な形に近い腫瘍血管の周囲に CD4 や CD8 陽性の免疫細胞が多く存在し異常な形態の血管周囲には少なかった。更に抗血管新生療法と抗腫瘍免疫療法の併用の効果はほぼ不明だった。

我々の予備実験では腫瘍内や周辺に異常な形態のリンパ管が多い。これらが正常に機能するか不明だが血管同様、機能しないと推測される。このため 1) 腫瘍内の間質液が排出されず間質圧が高まり腫瘍内循環が悪化し低酸素となり免疫細胞が腫瘍に到達できずその効果も発揮できない。2) 腫瘍内の抗原提示細胞等の免疫細胞がリンパ管を通過してリンパ節に到達できない。3) このため T 細胞等の免疫細胞が成熟できない、と推測される。当時抗リンパ管新生療法の抗腫瘍効果及び腫瘍免疫への影響はほぼ不明である。

受容体 death receptor (DR)5 への抗体 (抗

DR5 抗体)を用いるマウス抗腫瘍免疫療法は私が在籍した順天堂大学免疫学教室 (八木田秀雄准教授) の研究によると抗 DR5 抗体単独で腫瘍を縮小させ、免疫を活性化する他の抗体との併用では既に大きい腫瘍を縮小させた。これは腫瘍細胞に抗体が結合し antibody-dependent cellular cytotoxicity でその細胞死を起し腫瘍特異的な T 細胞が増える事による。

以上より腫瘍血管は正常に機能せず、腫瘍のリンパ管も機能しないと予測されるため免疫細胞がリンパ節と癌の間を移動できず抗腫瘍効果を発揮できない、と仮定された。

2. 研究の目的

予備実験で抗腫瘍免疫療法の抗 DR5 抗体と抗血管新生療法の VEGFR-2 阻害剤を併用してもその増強効果はなく、抗 DR5 抗体と VEGFR-2 と-3 を中心に他の受容体も阻害する sunitinib を併用すると増強効果が出て腫瘍の増大速度が低下した。VEGFR-3 はリンパ管新生に必須で血管とリンパ管両者の新生抑制が抗腫瘍免疫の増強に必須である可能性が示唆された。この結果より以下の仮説の解明を目指した。抗血管新生療法と抗リンパ管新生療法により;

- (1) 腫瘍血管の正常化、リンパ管新生抑制とリンパ管の正常化がおきる。
- (2) 血管とリンパ管の正常化に伴いそれらの内皮上の接着分子の発現量が上昇し免疫細胞が各々の内皮と接着し易くなる (リンパ管内皮の正常化と接着分子の関係はこれまで不明である)。
- (3) 血管、リンパ管の正常化と接着分子の発現上昇により腫瘍内の抗腫瘍免疫細胞の数が増え、免疫抑制細胞の数が減る。腫瘍血管周囲の抗腫瘍免疫細胞の数は血管の形態が正常化するにともない増加する。

- (4) 異常な形態のリンパ管の新生が抑制されリンパ管が正常化され免疫細胞がリンパ管に入り易くなり、リンパ管内での数が増える。
- (5) 抗原提示細胞のリンパ節への移行量が増えてその数と活性が上がる。
- (6) リンパ節中で抗原提示細胞による T 細胞の成熟化が改善し T 細胞の抗腫瘍活性が上がる。

3. 研究の方法

マウス乳腺腫瘍細胞 4T1 細胞とマウス肺癌細胞 KLN205 細胞の 2 種類の腫瘍モデルを用いる。抗腫瘍免疫療法として抗 DR5 抗体を投与し、抗血管及び抗リンパ管新生療法として VEGFR-2 と-3 及び他の受容体も阻害する sunitinib を投与する。腫瘍の免疫染色とその定量化により抗血管リンパ管新生療法が腫瘍の血管を正常化しリンパ管を減らし正常化するか、その結果腫瘍血管、リンパ管の接着分子の発現が上昇するのか免疫染色と低酸素を定量化する hypoxyprobe で解析する。またこれらが腫瘍内やリンパ管内の免疫細胞数へ影響するのか解析する。次に抗血管リンパ管新生療法による所属リンパ節での抗原提示細胞と T 細胞の数や活性化の上昇をフローサイトメトリーで解析する。抗血管リンパ管新生療法として sunitinib より強力な VEGFR-2, -3 阻害剤の axitinib の投与や抗リンパ管新生単独療法として VEGFR-3 阻害剤の SAR131675 の投与も投与し効果をみる。

4. 研究成果

腫瘍モデルとしてマウス乳癌細胞の 4T1 細胞を用いて抗リンパ管新生療法と抗血管新生療法及び抗腫瘍免疫療法を併用し、併用がより強力な増大抑制作用をもたらすか確認した。抗腫瘍免疫療法としては抗 DR-5 抗体を用いて DR-5 を発現しているがん細胞へ細胞死を誘導した。抗リンパ管新生療法及び抗血管新生療法としてはリンパ管新生作用

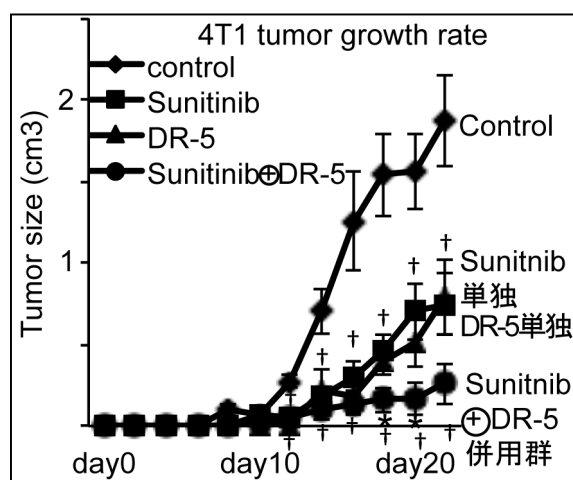


図 1) マウスに癌細胞を植え sunitinib、抗 DR-5 抗体、両者の併用群を比べ Sunitinib と抗 DR-5 抗体併用群は各々の単独群より癌の増大速度が低下した。* $P < 0.05$ vs 他の全群、† $P < 0.05$ vs コントロール。

をもつ VEGFR-3 と血管新生作用を持つ VEGFR-2 等を同時に阻害する sunitinib を用いた。腫瘍細胞をマウスの足裏に皮下注射し 2 週間後に腫瘍と所属リンパ節の膝下リンパ節を解析した。腫瘍の血管の正常化を hypoxyprobe を用いて低酸素の改善で評価したところコントロールに比べ Sunitinib 処置群と DR-5 と Sunitinib 併用処置群でより正常化していた。またリンパ管の正常化を腫瘍内に注射したエバンスブルーのリンパ節中の濃度で評価したところ Sunitinib 処置群でコントロール群より濃度が上昇しておりリンパ管の正常化が示唆された。所属リンパ節での dendritic cell (DC) や T 細胞の活性化をフローサイトメトリーで評価した。DC と CD8+ T 細胞の活性化は DR-5 抗体処置群と DR-5 と Sunitinib 併用処置群で増強していた。腫瘍を背中に皮下注射し成長速度をみたところ、DR-5 と Sunitinib 併用処置群で各々の単独処置群より増大速度が低下した(図 1)。またコントロールと比べ、全ての処置群で増大速度が低下した。同様の結果はマウス大腸癌細胞の CT-26 を用いても得られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)以下全て査読あり

- (1) Dysphagia, dystussia, and aspiration pneumonia in elderly people.
Ebihara S, Sekiya H, Miyagi M, Ebihara T, Okazaki T.
J Thorac Dis. 2016 Mar;8(3):632-9.
- (2) Numakura T, Tamada T, Nara M, Muramatsu S, Murakami K, Kikuchi T, Kobayashi M, Muroi M, Okazaki T., Takagi S, Eishi Y, Ichinose M.
Simultaneous development of sarcoidosis and cutaneous vasculitis in a patient with refractory crohn's disease during infliximab therapy. *BMC Pulm Med* 16: 30, 2016
- (3) Hahimoto Y, Sugiura H, Onodera K, Tanaka R, Sato K, Yanagisawa S, Okazaki T., Tamada T, Kikuchi T, Hoshikawa Y, Okada Y, Ichinose M. 27-hydroxycholesterol accelerates cellular senescence in human lung resident cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 310: L1028-41, 2016
- (4) Abe K, Sugiura H, Hashimoto Y, Ichikawa T, Koarai A, Yamada M, Numakura T, Onodera K, Tanaka R, Sato K, Yanagisawa S, Okazaki T., Tamada T, Kikuchi T, Ichinose M. Possible role of Krüppel-like factor 5 in the remodeling of small airways and pulmonary vessels in chronic obstructive pulmonary disease. *Resp Res* 17: 7-20, 2016
- (5) Nihei M, Okazaki T., Ebihara S, Kobayashi M, Niu K, Gui P, Tamai T, Nukiwa T, Yamaya M, Kikuchi T, Nagatomi R, Ebihara T, Ichinose M.
Chronic inflammation, lymphangiogenesis, and effect of an anti-VEGFR therapy in a mouse model and in human patients with aspiration pneumonia.

J Pathol 2015 235: 632-45

- (6) Mojumdar K, Liang F, Giordano C, Lemaire C, Danialou G, Okazaki T., Bourdon J, Rafei M, Galipeau J, Divangahi M, Petrof BJ.
Inflammatory monocytes promote progression of Duchenne muscular dystrophy and can be therapeutically targeted via CCR2.
EMBO Mol Med 2014 6:1476-92
- (7) Okazaki T., Liang F, Li T, Lemaire C, Danialou G, Shoelson SE, Petrof BJ.
Muscle-specific inhibition of the classical nuclear factor- κ B pathway is protective against diaphragmatic weakness in murine endotoxemia.
Crit Care Med 2014 42:501-9
- (8) Niu K., Guo Y., Okazaki T., Yoshikawa T., Ohru T., Furukawa K., Ichinose M., Kazuhiko Y., Arai H., and Nagatomi R.
Coffee intake prevents the progression of sarcopenia in aged mice *in vivo* and *in vitro*
Experimental Gerontology 50:1-8, 2014

〔学会発表〕(計 12 件)

- (1) 岡崎 達馬 他、一般演題
抗血管新生療法と抗リンパ管新生療法の組み合わせは抗腫瘍免疫療法の効果を増強する 2016年10月7日
日本癌学会総会 パンフィコ横浜、横浜市
- (2) 岡崎 達馬 他、一般演題
誤嚥性肺炎はマイオカイン及び筋萎縮を誘導する～動物モデルを用いた解析～ 2016年6月10日
日本老年医学会総会 金沢公会堂、金沢市
- (3) 岡崎 達馬 他、一般演題
Aspiration pneumonia induces atrophy in respiratory, skeletal, and swallowing muscles in a mouse model 2016年5月18日
American Thoracic Society, San Francisco, USA

- (4) 岡崎 達馬 他、一般演題
Lymphatics in pleura in normal, malignant pleural effusion, and septic mouse models 2016年5月17日
American Thoracic Society, San Francisco, USA
- (5) 岡崎 達馬 他、シンポジウム脈管、免疫系をターゲットとした呼吸器疾患解析と治療応用 2016年4月10日
日本呼吸器学会総会 京都国際会議場、京都市
- (6) 岡崎 達馬 他、一般演題
正常及び敗血症マウスの胸膜（横隔膜）のリンパ管の解析 2016年4月9日
日本呼吸器学会総会 京都国際会議場、京都市
- (7) 岡崎 達馬 他、シンポジウム
誤嚥性肺炎におけるサルコペニア誘導のメカニズム及び脈管系の役割の解析 2015年6月15日 パシフィコ横浜、横浜市
日本老年医学会総会
- (8) 岡崎 達馬 他、一般演題
誤嚥性肺炎は呼吸筋、骨格筋、嚥下筋の委縮を誘導する 2015年4月22日
日本呼吸器学会総会 東京国際フォーラム、東京都
岡崎 達馬 他、一般演題
- (9) Chronic inflammation, lymphangiogenesis, and effect of an anti-VEGFR therapy in a mouse model and in human patients with aspiration pneumonia 2015年4月22日
日本呼吸器学会総会 東京国際フォーラム、東京都
- (10) 岡崎 達馬 他、一般演題
Chronic inflammation and exaggerated lymphangiogenesis in a mouse model and human patients of aspiration pneumonia 2014年5月15日

- American Thoracic Society, Philadelphia, USA
- (11) 岡崎 達馬 他、一般演題
誤嚥性肺炎マウスモデルにおけるリンパ管新生の意義の検討 2014年4月20日
日本呼吸器学会総会 大阪国際会議場、大阪府
- (12) 岡崎 達馬 他、一般演題
東北大学病院呼吸器バイオバンクの現状と課題 2014年4月18日日本呼吸器学会総会大阪国際会議場、大阪府
- 〔図書〕(計 1件)
1. 岡崎 達馬 他、
イラストでわかる呼吸器内科学
呼吸器の解剖 文光堂 2-3 ページ
2014
〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)
- 名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：
- 取得状況(計 0件)
- 名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：
- 〔その他〕
ホームページ等
6. 研究組織
(1)研究代表者
岡崎 達馬 (Okazaki, Tatsuma)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号：40396479
- (2)研究分担者 ()

研究者番号：

(3)連携研究者

八木田 秀雄 (Yagita, Hideo)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号： 30182306

(4)研究協力者

以下 東北大学病院呼吸器内科

小林 誠 (Kobayashi, Makoto)

玉井 ときわ (Tamai, Tokiwa)

二瓶 真由美 (Nihei, Mayumi)

突田 容子 (Tsukita, Yoko)

小松 理世 (Komatsu, Riyo)