

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670703

研究課題名(和文)腎細胞癌に対するImmune checkpoint阻害薬を用いた新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a new treatment method against renal cancer using immune checkpoint inhibitors

研究代表者

江藤 正俊(Eto, Masatoshi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90315078

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):分子標的薬は進行腎癌患者の予後を明らかに改善させたが、その限界も明らかになってきた。そこで分子標的薬と新たな免疫チェックポイント阻害薬である抗CTLA-4抗体を併用するマウス腎癌モデルを作成した。併用による抗腫瘍効果の増強が認められ、メカニズムはCTLA-4 moleculeを經由したT細胞に対する負のシグナルの抗CTLA-4抗体によるブロックと分子標的薬による骨髄由来抑制細胞(MDSC)が産生する免疫抑制性サイトカインの分泌抑制に起因することが示された。抗CTLA-4抗体と抗PD-1抗体の2つの免疫チェックポイント阻害薬を併用するマウス腎癌モデルの作成にも成功し、今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文):Recently, molecular targeted drugs including tyrosine kinase inhibitors (TKIs) and mTOR inhibitors have clearly prolonged overall survival of patients with metastatic RCC (mRCC). However, we have already known their limitations in the treatment of mRCC. To improve the antitumor effects, we have established a murine model of renal cancer treatment where a combined treatment with a TKI, sorafenib, and an immune checkpoint inhibitor, anti-CTLA-4 mAb is performed. Two possible mechanisms have been considered. One is a blockade of negative signals via CTLA-4 molecules on T cells by anti-CTLA-4 mAb. The other is an inhibition of immune suppressive genes, such as TGF-beta and IL-10, in myeloid derived suppressor cells (MDSC) by sorafenib. We have also established a murine model of renal cancer treatment where a combination therapy of two immune checkpoint inhibitors, anti-PD1 mAb and anti-CTLA-4 mAb, is performed. A clinical application of this combination therapy is awaited.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：癌 免疫学

1. 研究開始当初の背景

分子標的薬は進行腎癌患者の予後を明らかに改善させたが、その限界も明らかになってきた。一方、癌に対する免疫療法は新しい局面を迎えている。生体内では活性化 T 細胞上に CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen-4)や PD-1(programmed cell death protein-1)等が誘導され、それらを経由して負のシグナルが入ることで T 細胞の過剰反応を抑えることがわかってきた。さらにこれらの molecule に対する blocking 抗体を用いることで、T 細胞が再活性化され、抗腫瘍効果が増強されることが示され、メラノーマにおいては抗 CTLA-4 抗体が FDA から既に承認されている(N Engl J Med 363:711,2010)。また抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果も腎癌を含めた様々な癌で示されつつあり(N Engl J Med 366:2455, 2012)、両薬剤は免疫反応の調節制御に関わることから Immune checkpoints 阻害薬と言われて注目されている。

2. 研究の目的

(1) 分子標的薬と抗 CTLA-4 抗体あるいは抗 PD-1 抗体を併用するマウス腎癌モデルを作成し、抗腫瘍効果の増強について検証する。

(2) 抗 CTLA-4 抗体と抗 PD-1 抗体の 2 つの Immune checkpoint 阻害薬を併用するマウスモデルも作成し、抗腫瘍効果の増強およびメカニズムについて検討する。

本研究により新たな併用療法のモデルが確立されれば、腎癌やその他の癌に対する臨床応用への礎という点でも意義は大きい。

3. 研究の方法

(1) まず最も重要な 2 つのマウス腎癌モデルの確立を最優先に行う。分子標的薬と Immune checkpoint 阻害薬 (抗 CTLA-4 抗体あるいは抗 PD-1 抗体) を併用するモデルと 2 つの Immune checkpoint 阻害薬 (抗 CTLA-4 抗体と抗 PD-1 抗体) を併用するモデルを作成する。再現性のある in vivo の強力なデータがなければ、その後の腫瘍局所や in vitro の機能解析等は無意味であるので、使用薬物の詳細な用量設定を行い、併用による抗腫瘍効果の増強を誘導する。

(2) 2 つのモデルの確立後、腫瘍局所の免疫染色、フローサイトメトリーで浸潤細胞の解析を行う。

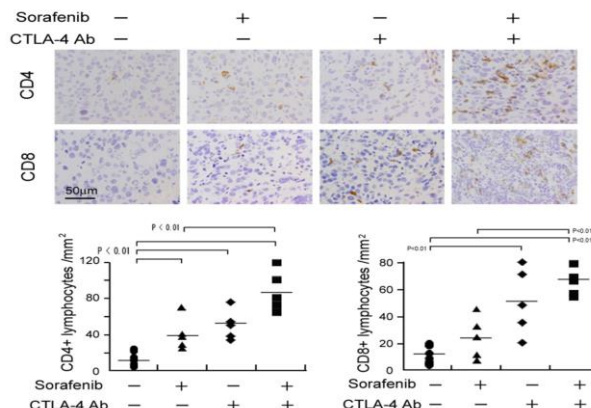
(3) 宿主における effector 細胞の同定や acquired immunity の確認等の機能解析を行う。

(4) 近年、新たな免疫抑制性細胞として注目を浴びている MDSC (myeloid derived suppressor cell) は分子標的薬との関連が報告されており、マウスモデルと腎癌患者における動態についても解析する。

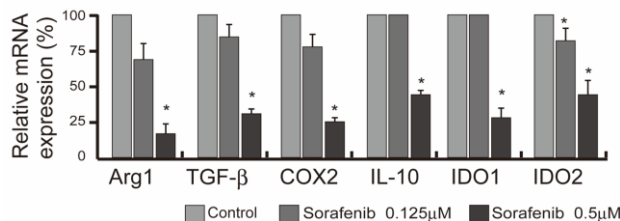
4. 研究成果

(1) 我々はまず、分子標的薬ソラフェニブと Immune checkpoint 阻害薬である抗 CTLA-4 抗体の併用のモデルを確立していたので、そのモデルにおけるメカニズムの解析を進めた。腫瘍浸潤リンパ球について免疫染色にて調

べたところ、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞共にソラフェニブと抗 CTLA-4 抗体の併用群において最も多く浸潤していた (下図)。

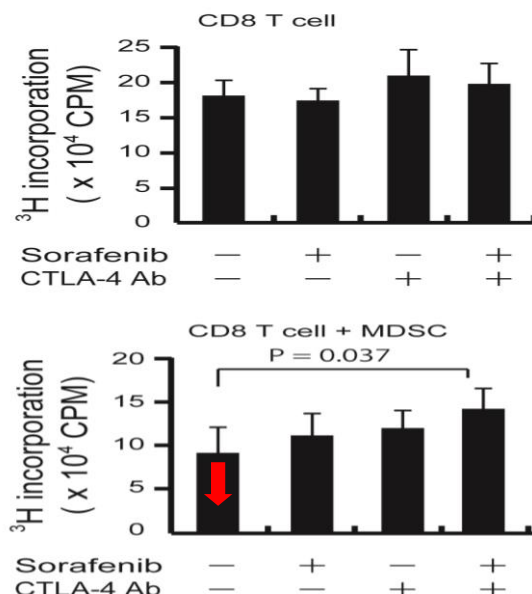


(2) 次に分子標的薬と抗 CTLA-4 抗体の併用のメカニズムを MDSC に焦点を当てて解析した。担癌マウスから MDSC を採取してソラフェニブと 24 時間共培養して免疫関連遺伝子の発現を real time PCR analysis で解析したところ、TGF-β、IL-10 をはじめとする以下の免疫抑制系遺伝子の発現が低下していた (下図)。

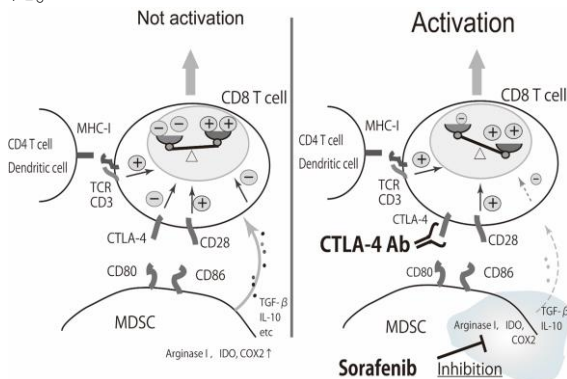


これより分子標的薬による MDSC における免疫抑制系遺伝子の発現抑制が併用による抗腫瘍効果の増強の一因であることが示された。

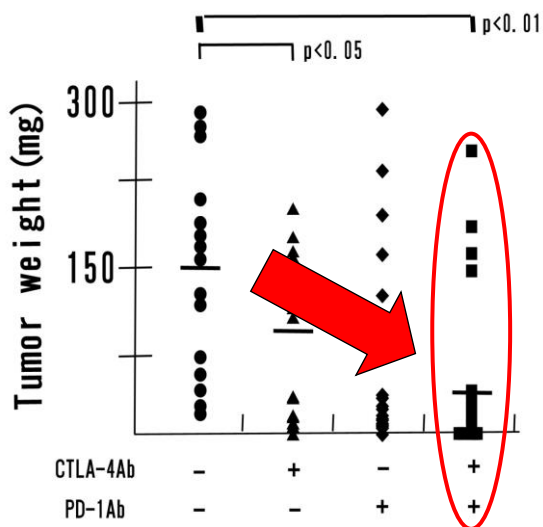
(3) 次に in vitro における MDSC の機能解析モデルで両薬剤の併用効果を解析した (下図)。



Naïve mouse から CD8 陽性 T 細胞を採取して抗 CD3 抗体と抗 CD28 抗体を固相化したプレート上で増殖させるモデルにて、MDSC を共培養しない場合、上段に示すようにソラフェニブや抗 CTLA-4 抗体を加えてもその反応に変化は認められなかった。一方、下段に示すようにその培養系に MDSC を加えると赤矢印のように CD8 陽性 T 細胞の増殖は抑制されるが、そこにソラフェニブと抗 CTLA-4 抗体を加えることで、その抑制は解除されることが示された。この結果はマウスの vivo のモデルで示されたソラフェニブと抗 CTLA-4 抗体の併用効果をサポートするものである。(4) 以上より下図のメカニズムが考えられた。

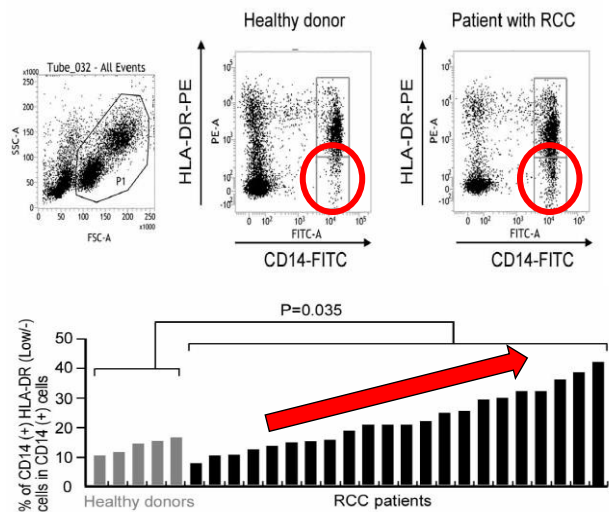


通常は担癌状態の CD8 陽性 T 細胞においては MDSC から CTLA-4 を介した負のシグナルが入り、MDSC が産生する TGF-β、IL-10 をはじめとする免疫抑制系サイトカインの影響で活性化が阻害されている。そこに抗 CTLA-4 抗体を投与することで CTLA-4 を介した負のシグナルがブロックされ、さらにソラフェニブを投与することで MDSC が産生する TGF-β、IL-10 等の免疫抑制系サイトカインの産生が抑制されることで、CD8 陽性 T 細胞の活性化が誘導されると考えられた (以上は文献①)。(5) 2 つの Immune checkpoint 阻害薬 (抗 CTLA-4 抗体と抗 PD-1 抗体) を併用するモデルを作成にも成功した。下図に示すように抗 CTLA-4 抗体と抗 PD-1 抗体の両者を併用した群において最も腫瘍体積の縮小を認めた。



メカニズムについても解析を進め、腫瘍浸潤リンパ球については分子標的薬との併用の場合と同様に、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞共に抗 CTLA-4 抗体と抗 PD-1 抗体の併用群において最も多く浸潤していた (未発表データ)。また、(3) で示した T 細胞増殖アッセイにおいても MDSC による CD8 陽性 T 細胞の増殖抑制は抗 CTLA-4 抗体と抗 PD-1 抗体を加えることで解除されることが示された (未発表データ)。(2) で示した real time PCR analysis を用いた MDSC の機能解析については現在最終解析を行っており、今後は以上をまとめて論文作成の予定である。

⑥我々は MDSC の解析を進めていく過程で、腎癌患者における MDSC の動態を調べる必要があると考え、健康人と腎癌患者の末梢血における MDSC の割合を解析した。腎癌患者における MDSC は Lymphoprep density gradient media (Axis-Shield, Oslo, Norway) を使用して PBMC を分離した後、フローサイトメトリーにて CD14+HLA-DR low/- monocytes の fraction に MDSC が多く存在することが示されているので、その population について評価した (下図上段) と、腎癌患者の末梢血では健康人と比して MDSC の割合が有意に上昇していることが示された (下図下段)。



さらに興味深いことに腎癌摘除後に採血した 3 人/4 人中で CD14+HLA-DR low/- monocyte の割合が有意に減少していた。以上の結果は腎癌患者の担癌状態における MDSC の重要性を示すものである (文献②)。

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 4 件)

① Motoshima T, Komohara Y, Horlad H, Takeuchi A, Maeda Y, Tanoue K, Kawano Y, Harada M, Takeya M, Eto M. Sorafenib enhances the antitumor effects of anti-CTLA-4 antibody in a murine cancer

model by inhibiting myeloid-derived suppressor cells、Oncol Rep、査読有、Vol. 33、No. 6、2015、pp. 2947-2953
DOI: 10.3892/or.2015.3893.

② Motoshima T, Komohara Y, Horlad H, Tsukamoto H, Fujita M, Saito Y, Tanoue K, Kasejima Y, Sugiyama Y, Kawano Y, Nishimura Y, Takeya M, Eto M. CXCL10 and CCL2 mRNA expression in monocytes is inversely correlated with the HLA-DR lower fraction of monocytes in patients with renal cell carcinoma、Oncol Lett、査読有、Vol. 11、No. 3、2016、pp. 1911-1916

③ Ma C, Komohara Y, Ohnishi K, Shimoji T, Kuwahara N, Sakumura Y, Matsuishi K, Fujiwara Y, Motoshima T, Takahashi W, Yamada S, Kitada S, Fujimoto N, Nakayama T, Eto M, Takeya M. Infiltration of tumor-associated macrophages is involved in CD44 expression in clear cell renal cell carcinoma、Cancer Sci、査読有、Vol. 107、No. 5、2016、pp. 700-707
DOI: 10.1111/cas.12917.

④ Maeda Y, Kawano Y, Wada Y, Yatsuda J, Motoshima T, Murakami Y, Kikuchi K, Imamura T, Eto M. C5aR is frequently expressed in metastatic renal cell carcinoma and plays a crucial role in cell invasion via the ERK and PI3 kinase pathways、Oncol Rep、査読有、Vol. 33、No. 4、2015、pp. 1844-1850
DOI: 10.3892/or.2015.3800.

〔学会発表〕(計 14 件)

2014 年度

① 学会名 ; 第 102 回日本泌尿器科学会総会、発表者(代表)名 元島 崇信、発表標題 ; 腎癌マウスモデルにおける Sorafenib と抗 CTLA-4 抗体併用による治療効果の検討、発表年月日 ; 2014 年 4 月 24 日、発表場所 ; 兵庫県神戸市

② 学会名 ; 第 73 回日本癌学会総会、発表者(代表)名 元島 崇信、発表標題 ; Enhanced anti-tumor effects of anti-CTLA-4 antibody and anti-PD-1 antibody to kidney cancer model in mice.、発表年月日 ; 2014 年 9 月 27 日、発表場所 ; 神奈川県横浜市

③ 学会名 ; 第 66 回西日本泌尿器科総会、発表者(代表)名 元島 崇信、発表標題 ; Sorafenib enhances the anti-tumor effects of anti-CTLA-4 antibody in a murine cancer model by inhibiting myeloid-derived suppressor cells.、発表年月日 ; 2014 年 11 月 7 日、発表場所 ; 岡山県倉敷市

④ 学会名 ; 第 29 回ヨーロッパ泌尿器科学会、発表者(代表)名 元島 崇信、発表標題 ; Enhanced anti-tumor effects of anti-CTLA-4 antibody and anti-PD-1 antibody to kidney cancer model in mice.、発表年月日 ; 2014 年 4 月 12 日、発表場所 ; スウェーデン、ストックホルム

⑤ 学会名 ; 2014 アメリカ泌尿器科学会、発表者(代表)名 元島 崇信、発表標題 ; Enhanced anti-tumor effects of anti-CTLA-4 antibody and anti-PD-1 antibody to kidney cancer model in mice.、発表年月日 ; 2014 年 5 月 18 日、発表場所 ; アメリカ、オーランド

2015 年度

⑥ 学会名 ; 第 103 回日本泌尿器科学会総会、発表者(代表)名 元島 崇信、発表標題 ; 腎細胞癌患者における抹消血抑制性ミエロイド細胞の解析、発表年月日 ; 2015 年 4 月 21 日、発表場所 ; 石川県金沢市

⑦ 学会名 ; 第 74 回日本癌学会総会、発表者(代表)名 元島 崇信、発表標題 ; 腎細胞癌患者における末梢血抑制性ミエロイド細胞の解析、発表年月日 ; 2015 年 10 月 10 日、発表場所 ; 愛知県名古屋

⑧ 学会名 ; 第 67 回西日本泌尿器科総会、発表者(代表)名 元島 崇信、発表標題 ; CXCL10 and CCL2 mRNA expression in circulating monocytes is inversely correlated with the HLA-DR lower fraction of monocytes in patients with renal cell carcinoma、発表年月日 ; 2015 年 11 月 6 日、発表場所 ; 福岡県福岡市

〔図書〕(計 0 件)

〔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

江藤 正俊 (ETO, Masatoshi)
九州大学・医学（系）研究科（研究院）・
教授
研究者番号：90315078

(2) 研究分担者

元島 崇信 (MOTOSHIMA, Takanobu)
熊本大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：60726355

(3) 連携研究者

()

研究者番号：