

平成30年6月22日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11293

研究課題名(和文) PD-1を標的としたHDAC阻害剤とOK-432による口腔癌に対する新規免疫療法

研究課題名(英文) Novel immunotherapy with HDAC inhibitor and OK-432 targeting PD-1

研究代表者

大江 剛 (OHE, Go)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：60432762

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)：担癌マウスに対して抗PD-L1抗体とOK-432を用いた実験的治療を行い、その効果とメカニズムを解析した。

未処理SCCはPD-L1を発現していなかったが、IFN- γ を添加するとPD-L1が発現した(FACS)。抗PD-L1抗体はSCCに対する直接的な増殖抑制効果を示さなかった(MTT assay)。抗PD-L1抗体とOK-432の併用により、担癌マウスの腫瘍増殖は有意に抑制された(動物実験)。

抗PD-L1抗体とOK-432の併用は口腔癌に対して有効な治療となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tumor bearing mice were treated with anti PD-L1 Ab and/or OK-432, and the mechanism of antitumor effect was analyzed. PD-L1 was not expressed on untreated SCCVII cells, but after adding IFN- γ , PD-L1 was expressed. anti PD-L1 Ab couldn't demonstrate directly effective on SCCVII proliferation (MTT assay). Combination therapy anti PD-L1 Ab and OK-432 inhibited tumor growth of SCCVII bearing mice.

It was suggested that combination therapy anti PD-L1 Ab and OK-432 could be an effective therapy against oral cancer.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：PD-L1 PD-1 免疫チェックポイント OK-432 口腔癌

1. 研究開始当初の背景

がんは、自己の細胞に遺伝子異常が蓄積して制御不能な増殖浸潤能を獲得し、正常臓器を破壊する致死性疾患であり、三大標準治療として外科手術、化学療法、放射線治療が広く行われている。癌免疫療法の三大標準治療に続く治療として期待されながらも、近年まで十分確立されていなかった。しかしながら、最近、がんの免疫抑制機構が明らかになりつつあり、その結果、癌免疫療法がにわかに注目されるようになってきた。Schreiberらは、免疫原性の強い腫瘍抗原を持つがん細胞は排除されるが、がん細胞と免疫細胞の共存状態を経て、ゲノム不安定性を基本性質とするがん細胞は、高免疫原性腫瘍抗原の消失、免疫抵抗性や免疫抑制能の獲得により、免疫防御を逃れて増殖すると報告している (Science, 331, 1565, 2011)。このようながんの免疫抑制機構を解除することががん免疫療法の開発につながると考え、免疫抑制受容体 PD(programmed death)-1 が着目されている。PD-1は活性化T細胞に発現しT細胞の機能を抑制する。多くのがん細胞はPD-1リガンド(PD-L1)を発現することによって、がんを攻撃するT細胞を、PD-1を介して抑制し、宿主の免疫監視機構から巧妙に逃れる。現在、悪性黒色腫、非小細胞性肺癌、腎がん、卵巣癌などに対してPD-1をターゲットとした抗免疫チェックポイント分子抗体療法が進められ、高い治療効果を示している。

前述のように、がんは自己の細胞に遺伝子異常が蓄積して起きる疾患であり、がん細胞の遺伝子発現には多くの変化がみられる。この遺伝子発現の変化は主にDNAの突然変異によって起こるとされており、がんに特異的なこれらの遺伝子変異をターゲットとした分子標的治療の研究が盛んに行われている。しかしながら、実際のがんでは変異を高率に起こしている遺伝子数は少なく、一部の症例にしか利用できないという問題点がある。最近、遺伝子の塩基配列の変化を伴わない遺伝子の発現異常、すなわちエピジェネティックな変化が発がんに関与していることが明らかになってきた。このエピジェネティックな変化の主なものとして、DNAのメチル化やヒストンタンパク質のメチル化・アセチル化等のヒストン残基修飾が知られており、これらの異常によって、細胞周期の調節やアポトーシス、癌の転移や浸潤のみならず腫瘍免疫に関連する遺伝子までもが不活化されている。ヒストンのアセチル化は、ヒストンアセチル化酵素(HAT)およびヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)によって制御されていて、そのバランスによって種々の遺伝子の発現を調節していることから、抗がん剤の分子標的として大きな注目を集めている。申請者らも、HDAC阻害剤であるバルプロ酸が培養唾液腺癌細胞株の増殖を抑制すること、唾液腺癌細胞株を移

植したヌードマウスに対して抗腫瘍効果を発現すること、これらの抗腫瘍効果が癌抑制遺伝子 p21 と p27 の発現増強を介して行われることを報告している (Oncol Rep, 31, 1453, 2013)。FanらはHDAC阻害剤がT細胞に作用しPD-1の機能を阻害することを報告している (Sci Signal 5, 32, 2012)。すなわち、HDAC阻害剤は癌に対する直接的な抗癌作用のみならず、抗腫瘍性サイトカインの産生や免疫チェックポイントPD-1を介した抗腫瘍効果を誘導する可能性を秘めている。

一方、OK-432は、ヒト由来A群溶血性連鎖球菌 *Streptococcus pyogenes* 弱毒 Su 株を H₂O₂ 処理後、ペニシリン G カリウム処理し凍結乾燥させた菌体制剤である。OK-432は強力な癌免疫療法剤として、口腔癌を含め多くの領域の悪性腫瘍において、有効性が報告されている。当教室でも口腔扁平上皮癌に対して、OK-432の皮内投与あるいは局所投与が有効であり、さらに放射線療法および化学療法(UFT)との併用によって極めて強い相乗効果を発揮することを報告している (Apoptosis, 2, 227, 1997)。その抗腫瘍効果の機序は、T細胞や抗原提示細胞に作用しIL-12、IFN- γ などの抗腫瘍性サイトカインを誘導し、エフェクターT細胞はヘルパー1型(Th1)へと分化させる。その結果、Th1の産生するサイトカインにより細胞傷害性T細胞を活性化することが報告されてきた。さらに申請者は癌悪液質が免疫低下の一因であることに着目し、口腔扁平上皮癌細胞株の培養上清を末梢血単核球に添加することで癌患者の免疫抑制シミュレーションモデルを確立し、OK-432の末梢血単核球に対するIL-12、IFN- γ 誘導能および細胞障害活性が低下することを報告している (Oncol Rep, 30, 945, 2013)。

2. 研究の目的

本研究では、バルプロ酸を含めた種々のHDAC阻害剤が直接的に癌細胞の増殖を抑制するのみならず、T細胞に発現したPD-1を阻害することで免疫抑制状態を解除し、さらにOK-432の抗腫瘍効果を増強する可能性について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) バルプロ酸を含む種々のHDAC阻害剤が口腔癌細胞株に対して増殖抑制効果を示すことを確認する
- (2) バルプロ酸を含む種々のHDAC阻害剤がPD-1を阻害することを確認し、最も効果的な投与量、処理時間などを確立する
- (3) バルプロ酸を含む種々のHDAC阻害剤とOK-432を併用することで、末梢血単核球あるいはT細胞がIL-12やIFN- γ などの抗腫瘍性サイトカインを産生すること、細胞傷害性T細胞を誘導することを明らかにす

る

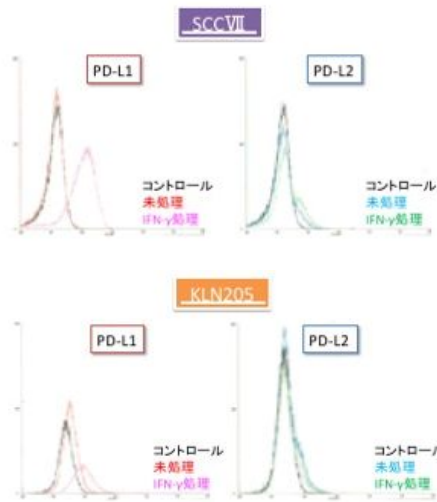
- (4) ノードマウスに口腔癌細胞株を移植して形成させた口腔癌に対する *in vivo*での抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

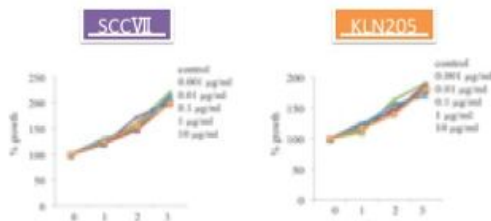
近年、免疫チェックポイント阻害剤が強力な抗腫瘍効果を示すことが知られ、なかでもPD-1/PD-L1 経路を阻害する抗 PD-L1 抗体は種々の癌腫に対して認可が広がっている。一方、OK-432 は口腔癌に適応があり、IL-12、IFN- γ の誘導、細胞傷害性T細胞の活性化などを介して抗腫瘍効果を発揮する癌免疫療法剤である。今回、担癌マウスに対して抗PD-L1抗体とOK-432を用いた実験的治療を行い、その効果とメカニズムを解析した。

未処理あるいは IFN- γ で処理を行った口腔扁平上皮癌細胞株 SCC、肺扁平上皮癌細胞株 KLN205 における PD-L1 と PDOL2 の発現を FACS で検索した。次に SCC の細胞増殖に対する抗 PD-L1 抗体の影響を MTT で検討した。SCC 担癌マウスに抗 PD-L1 抗体と OK-432 を投与し抗腫瘍効果について確認した。

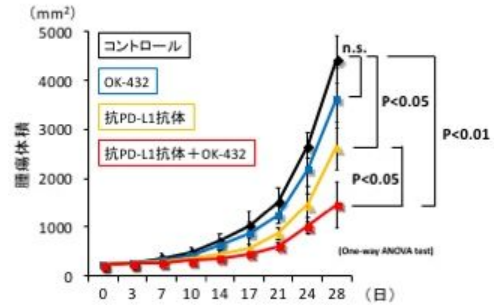
未処理 SCC は PD-L1 を発現していなかったが、IFN- γ を添加すると PD-L1 が発現した。PD-L2 は IFN- γ で処理しても誘導されなかった。KLN205 でも同様の結果であった(FACS)。



抗PD-L1抗体はSCC とKLN205に対する直接的な増殖抑制効果を示さなかった(MTT assay)。



コントロール群と比較して、抗 PD-L1 抗体投与群では優位な腫瘍増殖抑制効果を確認した。その効果は OK-432 と併用することで、さらに有意に抑制された (*in vivo*)。



抗 PD-L1 抗体と OK-432 の併用は口腔癌に対して有効な治療となりうる可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

大江剛、秋田和也、高丸菜都美、中川貴之、玉谷哲也、宮本洋二
免疫チェックポイント阻害剤抗 PD-L1 抗体と OK-432 の併用による口腔癌に対する抗腫瘍効果
第 62 回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会 (2017 年)

[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

大江 剛 (OHE, Go)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：60432762

(2)研究分担者

玉谷 哲也 (TAMATANI, Tetsuya)
徳島大学・病院・講師
研究者番号：30274236

高丸 菜都美 (TAKAMARU, Natsumi)

徳島大学・病院・助教
研究者番号：40513031

永井 宏和 (NAGAI, Hirokazu)

東北大学・歯学研究科・准教授
研究者番号：50282190

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()