

令和 3 年 4 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23905

研究課題名(和文) 癌微小環境のremodelingによる腫瘍免疫応答の活性化を用いた新規治療法開発

研究課題名(英文) A novel therapy to enhance the cancer immunity by remodeling tumor microenvironment in intrahepatic cholangiocarcinoma

研究代表者

青木 修一 (Aoki, Shuichi)

東北大学・大学病院・特任助手

研究者番号：30844451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ICB併用療法による治療効果を期待し、それぞれの治療法とICBとの併用療法を行い、マウスの生存期間を解析したが、抗PIGF療法に明らかなICB耐性克服の効果は認めなかった。しかし、GC療法とICBの併用療法により、生存期間の極めて長い延長効果を認めた。これは、GC治療が抗腫瘍免疫を増強させるといふ、我々の基礎的データを裏付けするものであった。フローサイトメトリーにおいても、GC治療により、activated CD8 T cellの腫瘍内浸潤を認めており、GC療法による腫瘍免疫の活性化が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝胆膵領域癌では、肝細胞癌において、抗VEGF療法による腫瘍内免疫環境のremodelingが腫瘍免疫の活性化をもたらし、抗VEGF療法とICBとの併用療法が、既に臨床に導入されている。胆道癌においても、本研究のように抗PIGF療法とICBとの併用療法の有効性が期待されている。しかしながら、本研究の結果からは、抗PIGF療法とICB併用療法が、生存期間の延長に寄与する可能性は少なく、一方で、現標準治療であるGC療法がICBとの併用により、抗腫瘍効果や生存期間の延長をもたらす可能性が高いことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) is a lethal liver malignancy with an increasing incidence. The success of programmed cell death 1 (PD-1) blockade in other cancers as a strategy of targeting immune checkpoint has brought great promise for ICC treatment. However, PD-1 blockade cannot enhance cytotoxic T lymphocyte infiltration and activation. This is likely due to other immunosuppressive cues in the ICC microenvironment, such as the abnormal vasculature and CAFs-induced secreted factors. We recently discovered that placental growth factor/neuropillin 1 (PIGF/Nrp1) pathway is activated in ICC and is a mediator of tumor growth and microenvironmental abnormalities. PIGF blockade resulted in tumor growth delay, reduced intratumoral hypoxia and increased cytotoxic T cell infiltration. We propose that anti-PIGF therapy could enhance the activity of chemotherapy with anti-PD-1 therapy by reprogramming the microenvironment of ICC to enhance delivery and reduce immunosuppression.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：肝内胆管癌 腫瘍免疫 癌関連線維芽細胞 CD8 T細胞 腫瘍血管 化学療法

1. 研究開始当初の背景

肝内胆管癌は肝細胞癌に続いて疾患数の多い原発性肝腫瘍であり、近年疾患数の増加を認める。ここ数十年、様々な分子標的薬の開発が試みられたが、有効な新規薬剤はなく、胆管癌は膵癌に続いて予後不良の癌である。現在の標準治療は、未だ、細胞障害性の抗癌剤である gemcitabine と cisplatin の併用療法(GC療法)である。胆管癌は、豊富な間質成分を含有し、癌細胞と間質により作り出される特徴的な癌微小環境こそが治療耐性の原因と考えられている。特に間質の主成分である癌関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblasts (CAFs))が、癌細胞の浸潤・転移に有利な微小環境を創出する(1)。近年、VEGF (vascular endothelial growth factor) family の一つである PlGF(placental growth factor)が、胆管癌において、腫瘍血管新生だけでなく CAFs の構築に重要な働きをすることが明らかとなり(2)、抗 PlGF 療法による CAFs の不活化が腫瘍内血管の正常化、及び腫瘍内低酸素環境の改善をもたらし、既存の薬剤である gemcitabine や cisplatin の腫瘍内到達を増加させ、抗 PlGF 療法と GC 療法の併存治療により、胆管癌の進展転移を抑制することを明らかにした(S. Aoki et al., Gut, 2021)。

近年、新たな癌治療として immune-checkpoint blockade (ICB)が注目されているが、胆管癌や膵癌のような固形癌では、ICB 療法の不応が報告されている(3)。その一因として CAFs による低酸素環境が、IFN を介し Treg や M2-type マクロファージを誘導し腫瘍内環境を免疫抑制的にすることで、細胞障害性 T 細胞(CD8 T cell)の腫瘍内浸潤を阻害する(“immune-cold”)ことが明らかになりつつある。CAFs により作り出される低酸素環境は宿主の免疫応答抑制をもたらす鍵と考えられ、CAFs をターゲットとした新規治療により、腫瘍免疫応答の活性化、さらには、ICB との併用によるさらなる抗腫瘍効果をもたらす可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗 PlGF 療法による CAFs への治療効果により、抗腫瘍免疫の担い手である CD8 T cell が腫瘍内へ浸潤し(“immune-hot”)、ここに ICB 療法を併用することで、宿主の抗腫瘍免疫効果が加わったより効果的な combination therapy の可能性を探ることである。

3. 研究の方法

遺伝子改変肝内胆管癌マウスモデル(*p53/Kras* mutation)由来のマウス肝内胆管癌細胞株(425)をマウスの肝臓に注入し、肝内胆管癌同種同所移植モデルを完成させる。マウスを全身麻酔下で開腹し、肝臓内に 425 細胞を 1×10^5 個注入する。肝内胆管癌腫瘍が 5mm に達したら、抗 PlGF 療法として 5D11(抗 PlGF 抗体)を 25mg/kg 週 3 回、GC 療法として gemcitabine を 60mg/kg 週 2 回、cisplatin を 0.3mg/kg 週 2 回腹腔内投与する。コントロールとして、IgG を週 3 回投与する。ICB 治療は、抗 PD1 抗体を 10mg/kg、抗 CTLA4 抗体を 12.5mg/kg、週 2 回投与する。

マウス生存解析として、上記治療を 2 週間行い、腫瘍サイズの変化及びマウスの生存期間を検討する。またサンプル解析として、投与開始後 10 日目に全マウスから腫瘍を摘出し、

qPCR や免疫染色を用いて腫瘍内微小環境の変化を評価する。

a)抗 PIGF 療法もしくは GC 療法、またはそれらの併存治療による腫瘍増殖抑制効果、マウス生存期間の延長効果を検討する。さらに、治療後の腫瘍サンプルを解析し、低酸素環境の改善効果、腫瘍内免疫応答の活性化を免疫染色やフローサイトメトリーを用いて検討する。

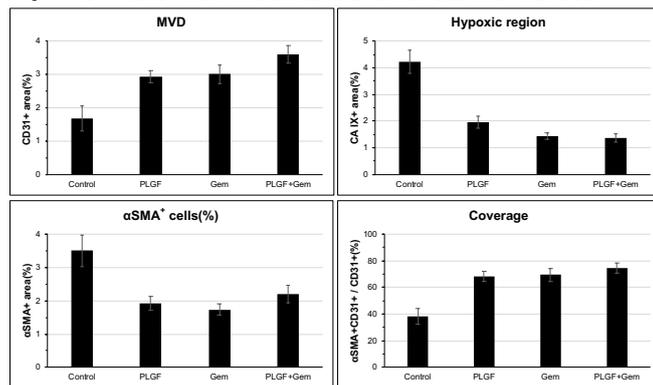
b)ICB との併用療法による治療効果を評価するために、ICB 療法のみ、抗 PIGF 療法と ICB との併用療法、GC 療法と ICB との併用療法、抗 PIGF 療法と GC 療法と ICB との併用療法の治療効果を検討する。

4. 研究成果

結果：肝内胆管癌同種移植マウスモデルを用いて、抗 PIGF 療法、GC 療法及びそれらの併存治療を検討した。マウス腫瘍において CD31 の免疫染色により腫瘍血管密度(MVD)を測定し、 α SMA との二重染色により腫瘍血管に占める pericyte coverage(PC)率を算出した。抗 PIGF または GC 療法により MVD は有意に増加し、同時に PC 率も有意に上昇した。さらに、抗 PIGF 療法は GC 療法と併存治療することで、さらに MVD の増加や PC 率の上昇を認め、腫瘍血管の正常化を認めた(tumor vessel normalization)。この治療効果を反映するよう

に、CAIX 染色により、これら治療により腫瘍内低酸素環境の改善を認めた。 α SMA 染色による CAFs の評価では、抗 PIGF 療法もしくは GC 療法により CAFs の発現低下を認め、さらに抗 PIGF 療法と GC 療法の併存治療により、さらなる CAFs の発現低下を認めた(Figure 1)。

Figure 1:抗PIGF療法とGC療法の併用療法が腫瘍血管の正常化、低酸素環境の改善をもたらす



CD8 T cell の免疫染色により、抗腫瘍免疫の主役を担う細胞障害性 T 細胞(CD8 T cell)の腫瘍内浸潤を解析すると、胆管癌は通常、CD8 T cell の腫瘍内浸潤を認めない免疫抑制的な微小環境であったが、抗 PIGF 療法もしくは GC 療法により、腫瘍内への CD8 浸潤を認め、さらに併存療法により、さらなる CD8 T cell の腫瘍内への浸潤増加を認めた(Figure 2,3)。一方で、フローサイトメトリーによる免疫細胞の評価では、腫瘍内の active な CD8 T cell (GZM+ CD8 T cell)もしくは Ki67+ CD8 T cell)は GC 単独療法や抗 PIGF+GC 併用療法で増強を認めた。抗 PIGF 療法のみでは、naïve CD8 T cell が多くを占めた(Figure 4,5)。

Figure 2:抗PIGF療法とGC療法の併用療法が CD8 T cell の腫瘍内浸潤を促す

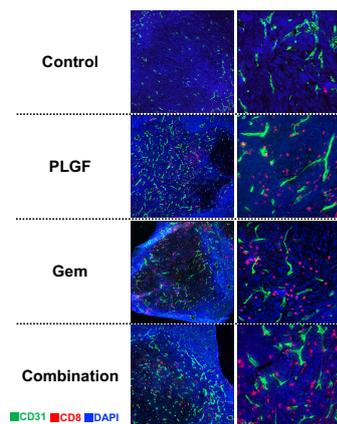
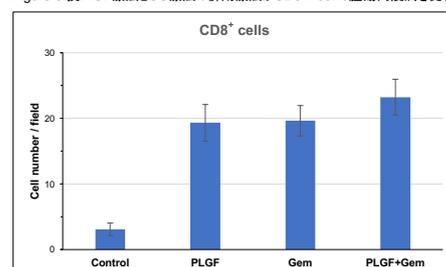


Figure 3:抗PIGF療法とGC療法の併用療法がCD8 T cell の腫瘍内浸潤を促す



同様に 425 細胞を用いた同種同所移植マウスに、①ICB 治療のみ、②抗 PIGF 療法と ICB との併用療法、③GC 療法と ICB との併用療法、

④抗 PIGF 療法と GC 療法と ICB との併用療法を加え、マウスの生存期間を比較した。腫瘍増殖において、ICB 治療のみでは腫瘍抑制効果を認めなかったが抗 PIGF 療法や GC 療法に ICB を併用、もしくは抗 PIGF 療法+GC 療法に ICB を併用することで、腫瘍抑制効果を認めた。マウスの生存期間解析では、ICB 単剤や抗 PIGF 療法+ICB 併用療法では、マウスの生存期間の延長を認めなかったが、GC 療法と ICB の併用療法で著明なマウス生存の延長効果を認め、GC 療法と ICB の併用療法において抗 PIGF 治療の上乗せ効果を認めなかった(Figure 6)。

考察：胆道癌や膵癌は免疫抑制的な癌微小環境を持っており、ICB 治療の効果が期待できない。実際に、ICB 効果予測として有用な、MSI high や TMB high の割合は、膵癌や胆道癌において数パーセントと言われている(3)。その主な原因として、胆道癌や膵癌は癌組織の大部分を間質が占めており、間質の主成分である CAFs

が免疫抑制的な癌微小環境に大きな役割を果たしているためである。PIGF は先行研究により肝内胆管癌の多くに発現を認め、間質に強く発現している。さらに PIGF は VEGF family の 1 つであり、抗 PIGF 療法は腫瘍血管の正常化をもたらす。本研究では、抗 PIGF 療法により腫瘍血管の正常化や CAF の不活化をもたらすことで、低酸素環境を改善し、CD8 の腫瘍内浸潤を促すことで抗腫瘍免疫の活性化をもたらすことを明らかにした。つまり、抗 PIGF 療法は、胆管癌において、immune-cold な腫瘍環境を immune-hot に remodeling する。本研究では、さらに、胆管癌の標準治療である GC 療法自体にも、腫瘍血管の正常化、CAFs の不活化の効果を認めた。これまでの報告では gemcitabine の腫瘍血管への作用を示す報告はほぼなく、本件では、gemcitabine や cisplatin のような細胞障害性化学療法による腫瘍血管への作用についてさらなる解明が必要と思われる。

ICB 併用療法による治療効果を期待し、それぞれの治療法と ICB との併用療法を行い、

Figure 4: GC療法や抗PIGF療法併用GC療法でactiveなCD8 T cellの腫瘍内浸潤を認める

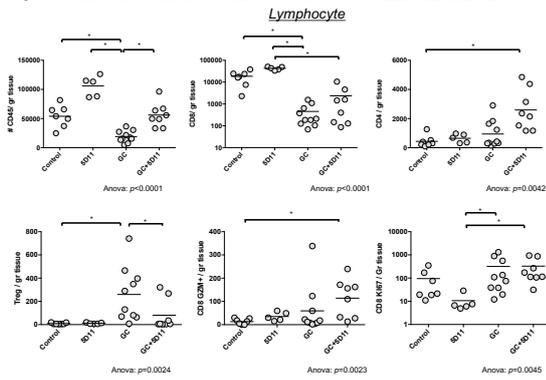


Figure 5: GC療法や抗PIGF療法併用GC療法ではexhausted CD8 T cellの腫瘍内浸潤を認める

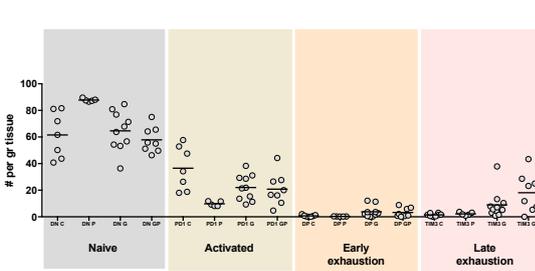
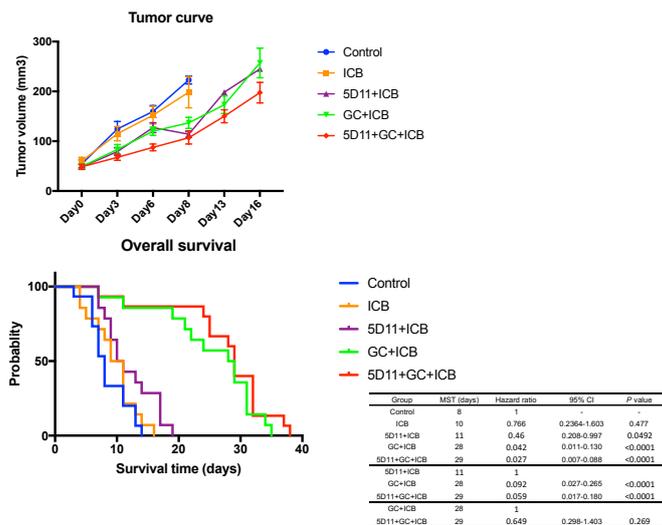


Figure 6: GC療法や抗PIGF療法+GC療法とICBとの併用療法で著明な生存期間延長効果を認める



マウスの生存期間を解析したが、抗 PIGF 療法に明らかな ICB 耐性克服の効果は認めなかった。しかし、GC 療法と ICB の併用療法により、生存期間の極めて長い延長効果を認めた。これは、GC 治療が抗腫瘍免疫を増強させるという、先ほどの結果を裏付けするものであった。フローサイトメトリーにおいても、GC 治療により、activated CD8 T cell の腫瘍内浸潤を認めており、GC 療法による腫瘍免疫の活性化が示唆された。

肝胆膵領域癌では、肝細胞癌において、抗 VEGF 療法による腫瘍内免疫環境の remodeling が腫瘍免疫の活性化をもたらし、抗 VEGF 療法と ICB との併用療法が、既に臨床に導入されている。胆道癌においても、本研究のように抗 PIGF 療法と ICB との併用療法の有効性が期待されている。しかしながら、本研究の結果からは、抗 PIGF 療法と ICB 併用療法が、生存期間の延長に寄与する可能性は少なく、一方で、現標準治療である GC 療法が ICB との併用により、抗腫瘍効果や生存期間の延長をもたらす可能性が高いことが示唆された。

1. Sahai E, Astsaturov I, Cukierman E, DeNardo DG, Egeblad M, Evans RM, et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(3):174-86.
2. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*. 2001;7(5):575-83.
3. Piha-Paul SA, Oh DY, Ueno M, Malka D, Chung HC, Nagrial A, et al. Efficacy and safety of pembrolizumab for the treatment of advanced biliary cancer: Results from the KEYNOTE-158 and KEYNOTE-028 studies. *Int J Cancer*. 2020.

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

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