

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462015

研究課題名(和文) 転移性進行大腸癌に対するMDSCを標的とした新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of new therapy targeting MDSC for metastatic advanced colon cancer.

研究代表者

山本 将士 (Yamamoto, Masashi)

神戸大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号：20645212

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)：肺転移モデルマウスにおける外科切除および化学療法(5-FU)の治療によるMDSCの動態を解析した。原発巣切除を行うことで、MDSCの減少を認め、肺転移数や生存期間の延長を認めた。5-FU治療でも、同様の結果を得た。MDSCは免疫抑制による腫瘍の進展や転移形成に寄与するが、手術および化学療法により減少し、治療効果を示すことが示された。担癌状態における末梢血中MDSCのモニタリングを行い、病勢を反映した。MDSCを標的とした治療を行う際にも、末梢血中のMDSCを測定することで治療効果判定が可能となることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：The outcome of patients with malignant tumors is poor if they suffer from lung metastases. Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), a major player for tumor-induced immunosuppression, can be suppressed by certain chemotherapeutic agents, such as low-dose 5-fluorouracil (5-FU) or surgical treatment. Early-phase treatment by low-dose 5-FU chemotherapy and resection of primary tumors improved survival, which was concomitant with a reduction of lung-accumulating MDSCs and lung metastases. Early-phase treatment may provide therapeutic values to prevent MDSC-mediated lung metastasis formation in tumor-bearing hosts. Secondly, the frequency of MDSCs in the peripheral blood of tumor-bearing mice reflects the status of tumor progression as well as tumor recurrence. Continuous monitoring of MDSCs in the peripheral blood might be a useful indicator of tumor recurrence.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 MDSC 負の制御 原発巣切除

1. 研究開始当初の背景

本研究は、転移性進行大腸癌に対し骨髄由来免疫抑制性細胞（myeloid derived suppressor cell; MDSC）を標的とした新規治療戦略を確立し、臨床応用を目指すものである。切除不能遠隔転移を伴う大腸癌では、化学療法など全身療法を行っても、効果が不十分であることが多い。これは、原発巣-転移巣の抗腫瘍免疫反応に対し抑制的に働く、“免疫回避”を介した制御関係が成立することが一因である。MDSCはこの中心的な介在細胞となり、腫瘍の進展と共に生体内に出現し、腫瘍の進展・転移に深く関与するとされる。骨髄由来免疫抑制性細胞（myeloid derived suppressor cell; MDSC）は、腫瘍が樹立されたマウスにて血液中に蓄積され、腫瘍の進展を促進する。原発巣の進展により MDSC は増加し、転移が成立する時期の MDSC の状態により、転移の程度が異なることが予測される。このため、“免疫回避”を介した制御ループを遮断する方法として、MDSC を治療標的とした治療が肺転移の進展を制御する可能性がある。MDSC の制御方法として、次の3つが挙げられる。①原発巣切除による制御、② MDSC に対する殺細胞効果のある 5-FU 系やジェムザールなどの化学療法の投与、及び③ NKT 細胞の活性化である。特に③では、NKT 活性化の際に、MDSC の分化を DC にまで進め、減少させる可能性が示唆されている。これらの治療を行うことにより、肺転移が抑制されるか否かを検討する。さらには、免疫チェックポイントに関与する分子標的薬（CTLA4 関連、PD-1 関連分子）を用いて、原発巣樹立により記憶 T 細胞形成のあるモデルで、切除後 MDSC を調節下においた抗体治療の効果を明らかにすることにより、これらの薬剤の使用方法を検討したい。本研究は①MDSC の評価により“免疫学的負の制御”関係の成立を障害するための予防的原発巣切除の有効性の検討、②外科的切除をさらに有効にするため

の MDSC を標的とする治療の検討、③より有利な条件下での免疫チェックポイント分子標的治療の有効性の検証を行うものである。癌治療における免疫学的抗腫瘍治療の目指すべきゴールは、免疫機能の抑制性調節機構である。

2. 研究の目的

免疫チェックポイント分子標的薬の開発、さらに臨床使用され、癌の進展における免疫学的側面が注目されている。近年、腫瘍による免疫抑制環境を形成する上で主な役割を担う MDSC が着目されており、MDSC に関する報告が散見される。この MDSC をターゲットとした治療法が期待され、化学療法、分子標的薬、手術などの治療により MDSC は減少する。われわれは、外科切除や化学療法に着目し、免疫学的な負の制御関係の成立を遮断するための原発巣切除および化学療法による MDSC の治療効果の検討を行うこととした。本研究では、腫瘍の進展・転移における MDSC の抗腫瘍効果抑制の働きを明確にし、MDSC を標的とした新規治療戦略の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 原発巣外科切除の意義

①外科切除による MDSC への影響を検討するため、B16F10 メラノーマ細胞株を皮下投与し、day7、day14、day18 に腫瘍切除を行い、day21 に肺における MDSC をモノクローナル抗体とフローサイトメトリーを用いて探索した。

②B16F10 メラノーマ細胞株を皮下投与し、同細胞株を day10 に静脈投与による肺転移を引き起こす。これを肺転移モデルとし、皮下腫瘍を原発巣として、原発巣切除を行う。至適切除時期を検討するために、切除時期は皮下腫瘍樹立後 day7、day14、day18 に設定し、21 日目に肺 MDSC の割合及び数を評価した。また、肺転移個数および生存期間を検討し、宿主に与える影響を検討する。

(2) MDSC を標的とした治療法としての化学療法の治療効果

同様に、肺転移モデルを用いて、5-FU 系抗がん剤の早期投与(腫瘍皮下投与後 day3)に行った。Day21 に肺 MDSC の変化および、肺転移個数および生存期間を検討し治療効果进行评估する。

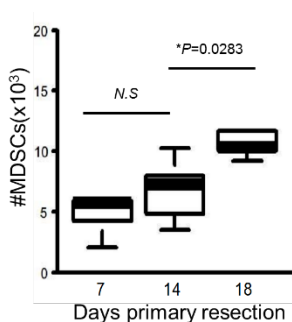
(3) 末梢血中 MDSC モニタリングの意義

B16F10 メラノーマ細胞株を皮下投与し、12 日目に切除する。その後、局所再発をきたす。これを再発モデルとして、末梢血中の MDSC をモニタリングし、病勢と MDSC の相関およびを検討する。

4. 研究成果

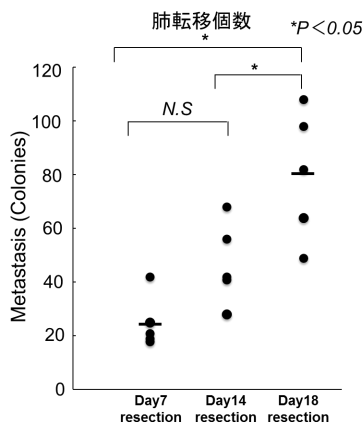
(1) B16F10 メラノーマ細胞株を皮下投与し、腫瘍の増殖に伴って肺、脾臓において MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺) 増加することを確認した。

(2) 腫瘍切除により、肺 MDSC は減少した。さらに、より早期に切除することで MDSC の減少を認めた。

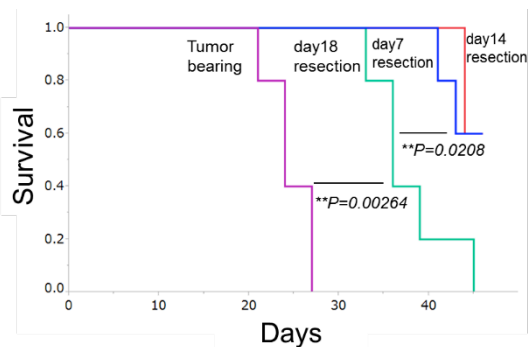


腫瘍切除は、肺 MDSC を減少させ、より早期の切除で抑制効果が高いことが示された。

(3) 肺転移モデルを作成し、原発巣切除を行った。肺転移個数では、day18 切除群と比較すると day7, day14 切除群で減少していた。

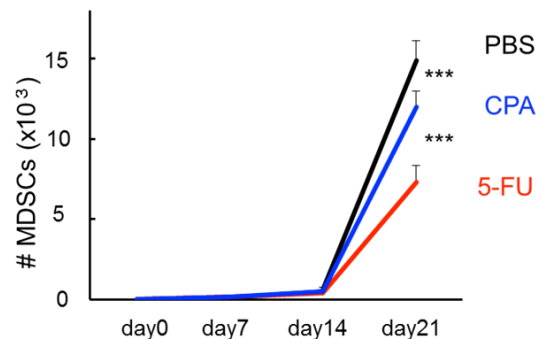


生存期間では、未治療群と治療群では、治療群で生存期間の延長を認めた。さらに、治療群では、より早期に切除した群で有意に延長していた。

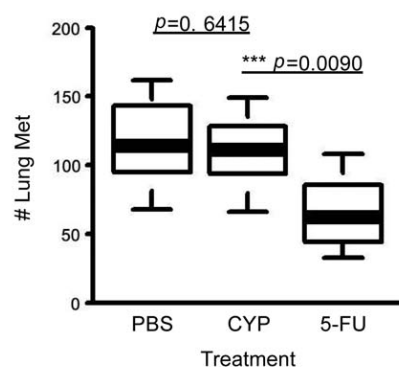


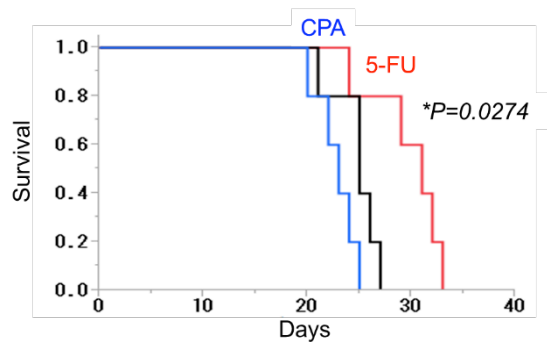
以上より、肺転移モデルにおける、原発巣切除は、肺転移個数を抑制し、生存期間を延長することが示された。

(4) 肺転移モデルを用いて、皮下腫瘍投与後 day3 に 5-FU 系抗がん剤の早期投与を行った。コントロールとして PBS 投与、シクロfosファミド(CPA)を投与した。それぞれの群における day2 の肺 MDSC は、5-FU 投与群で減少を認めた。



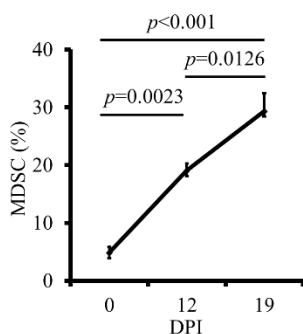
また、肺転移数は 5-FU 投与群で減少しており、生存期間においても、5-FU 投与群で有意に延長を認めた。





MDSC に対する 5-FU による治療効果が明らかとなった。

(5) B16F10 細胞株を皮下投与し、経時的に末梢血中の MDSC をモニタリングした。腫瘍の増殖とともに、末梢血中の MDSC は増加した。



末梢血中の CD8⁺T cell、CD4⁺T cell、制御性 T cell についても経時的に測定したが、変化に乏しかった。同検体で血清中の炎症性サイトカインを測定し、G-CSF、MCP-1、IL-6 は腫瘍の増殖とともに増加した。

末梢血 MDSC および炎症性サイトカインは、宿主の病勢を反映することが示された。

以上の検討により、MDSC を標的とした治療として外科切除や 5-FU 抗がん剤の投与は原発巣-転移巣の免疫抑制の解除をもたらし、MDSC の減少による治療効果が得られた。さらに、外科切除では、より早期の切除は MDSC の蓄積を抑制し、治療効果に影響することが示された。末梢血中の MDSC は、そのほかの免疫細胞と比較して宿主の病態をより反映するため、モニタリングすることで治療効果判定の指標になると考える。

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 Yamashita K, Hasegawa H, Fujita M, Nishi M, Tanaka T, Arimoto A, Suzuki S, Kamigaki T, Takeji Y. Host CD40 Is Essential for DCG Treatment Against Metastatic Lung Cancer. *Anticancer Res.* 査読有.36 巻.2016.pp3659-3665. <http://ar.iijournals.org/content/36/7/3659.long>
- ② 田中 智子、山下 公大、大坪 大、有本 聡、西 将康、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、押切 太郎、松田 武、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘、担癌状態における骨髄由来抑制細胞 (Myeloid derived suppressor cells) の治療による変化、*Cytometry research*、査読有、26 巻、2016、27-31、DOI:10.18947/cytometryresearch.26.2_27
- ③ Otsubo D, Yamashita K, Fujita M, Nishi M, Kimura Y, Hasegawa H, Suzuki S, Takeji Y. Early-phase Treatment by Low-dose 5-Fluorouracil or Primary Tumor Resection Inhibits MDSC-mediated Lung Metastasis Formation. *Anticancer Res.* 査読有.35 巻. 2015. pp4425-4431. <http://ar.iijournals.org/content/35/8/4425.long>
- ④ 山下 公大、西 将康、掛地 吉弘、癌の遺伝子診断・治療 (総説)、*消化器外科学レビュー* 2015-'16、査読有、2015、pp186-190

[学会発表] (計 9 件)

- ① 田中 智子、山下 公大、有本 聡、西 将康、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、押切 太郎、松田 武、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘、担癌状態における骨髄由来抑制細胞 (MDSC) の治療による変化とその治療成績への影響、第 27 回日本消化器癌発生学会総会、2016. 9. 15-16、城山観光ホテル (鹿児島県)
- ② 山下 公大、田中 智子、西 将康、山本 将士、金治 新悟、金光 聖哲、押切 太郎、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘、腫瘍に対する外科的切除の腫瘍誘導性骨髄由来抑制細胞 (MDSC) に対する影響とその臨床的意義、第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会、2016. 7. 21-22、米子コンベンションセンター (鳥取県)
- ③ 田中 智子、山下 公大、西 将康、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松

- 田 佳子、押切 太郎、松田 武、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘、担瘤状態における腫瘍誘導性骨髄由来抑制細胞 (MDSC) の与える影響と治療による変化、第 26 回日本サイトメトリー学会学術集会、2016. 7. 23-24、九州大学医学部百年講堂 (福岡県)
- ④ 田中 智子、山下 公大、西 将康、山本 将士、金治 新悟、金光 聖哲、押切 太郎、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘、腫瘍に対する外科的切除の腫瘍誘導性骨髄由来抑制細胞 (MDSC) に対する影響とその臨床的意義、第 37 回癌免疫外科研究会、2016. 5. 12-5. 13、川越プリンスホテル (埼玉県)
- ⑤ 山下 公大、西 将康、田中 智子、山本 将士、金治 新悟、金光 聖哲、押切 太郎、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘、腫瘍誘導性骨髄由来抑制細胞 (MDSC) に対する早期治療は肺転移を抑制する、第 26 回日本消化器癌発生学会総会、2015. 11. 19-20、米子全日空ホテル (鳥取県)
- ⑥ Yamashita K, Fujita M, Nishi M, Otsubo D, Suzuki S, Kakeji Y. Early-phase administration of low-dose 5-fluorouracil and early-phase resection of the established melanoma prevents the formation of lung metastases by inhibiting MDSC generation and accumulation. International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages 2015. 2015. 7. 9-7. 11. 東京大学 (東京都)
- ⑦ 西 将康、山下 公大、木村 裕、大坪大、田中 智子、山本 将士、金治 新悟、金光 聖哲、押切 太郎、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘、腫瘍誘導性骨髄由来抑制細胞 (MDSC) に対する早期治療は肺の転移を抑制する、第 25 回日本サイトメトリー学会学術集会、2015. 7. 11-7. 12、ソラシティカンファレンスセンター (東京都)
- ⑧ 山下 公大、木村 裕、西 将康、大坪大、山本 将士、金治 新悟、金光 聖哲、今西 達也、角 泰雄、中村 哲、鈴木 知志、田中 賢一、掛地 吉弘、転移性肺腫瘍に対する治療標的としての腫瘍誘導性骨髄由来抑制細胞、第 25 回日本消化器癌発生学会総会、2014. 11. 13-14、ホテル日航福岡 (福岡県)
- ⑨ 山下 公大、木村 裕、西 将康、山本 将士、大坪 大、角 泰雄、鈴木 知志、田中 賢一、掛地 吉弘、The significance of therapeutic elimination of MDSCs for metastatic cancer、第 23 回日本がん転移学会学術集会/総会、2014. 7. 10-7. 11、金沢市文化ホール、金沢ニューグランドホテル

(石川県)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 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 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

山本 将士 (YAMAMOTO, Masashi)
神戸大学医学部附属病院・特命助教
研究者番号：20645212

(2) 研究分担者

山下 公大 (YAMASHITA, Kimihiro)
神戸大学医学部附属病院・助教
研究者番号：80535427

角 泰雄 (SUMI, Yasuo)
神戸大学・大学院医学研究科・特命教授
研究者番号：00529521

掛地 吉弘 (KAKEJI, Yoshihiro)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80284488

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()