

平成30年 8月27日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04309

研究課題名(和文) 卵巣癌における抗VEGF抗体療法感受性・耐性機序の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the mechanisms of sensitivity and resistance to anti VEGF antibodies in ovarian cancer

研究代表者

越山 雅文 (KOSHIYAMA, MASAFUMI)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：50724390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌において抗VEGF抗体治療抵抗性の解明は臨床的に重要であるが、マウスモデルを用いて抗VEGF抗体抵抗性には腫瘍局所の免疫抑制が関与することを見出した。抗VEGF抗体治療は腫瘍局所に骨髄由来免疫抑制性細胞(MDSCs)を誘導し、腫瘍局所のリンパ球活性を抑制していた。抗体治療により腫瘍局所に低酸素環境が惹起され、腫瘍細胞におけるGM-CSF発現が亢進し、MDSCsを腫瘍局所に誘導していることが判明した。GM-CSF経路を阻害すると、腫瘍の局所免疫が改善し、抗VEGF抗体治療抵抗性が解除されることがわかった。腫瘍免疫を標的とする、抗VEGF抗体との新規併用治療の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：The elucidation of the mechanism underlying the development of resistance to anti-VEGF antibodies in ovarian cancer is urgently required. We found that immunosuppression in the tumor microenvironment is associated with resistance to anti-VEGF therapy with the use of preclinical models. Anti-VEGF therapy induced myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), which suppressed lymphocyte activity. Anti-VEGF therapy induced tumor hypoxia, which up-regulated the GM-CSF expression in tumor cells and recruited MDSCs into the tumor site. The blockade of GM-CSF signaling improved tumor immunity and enhanced the efficacy of anti-VEGF therapy. Treatments targeting MDSCs induced by VEGF signaling may improve prognosis in patients with high-grade serous ovarian cancer. The development of therapies combining anti-VEGF therapy with drugs targeting tumor immunity is expected.

研究分野：婦人科癌治療

キーワード：抗VEGF抗体 感受性 耐性 免疫抑制 骨髄由来免疫抑制性細胞(MDSCs) GM-CSF

## 1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は難治性の癌であり、近年卵巣癌として初の新規分子標的治療薬として抗 VEGF 抗体(ペバシズマブ)が臨床応用され、その効果が期待されたが、その治療耐性症例が少なからず存在することが分かってきた。治療抵抗性メカニズムの解明は喫緊の課題と考えられた。また、我々は、卵巣癌における抗腫瘍免疫が患者予後に関わる事を示しており、抗 VEGF 抗体耐性における腫瘍免疫の関連の有無についての解析を行った。

## 2. 研究の目的

発現マイクロアレイデータ解析は、間質や免疫細胞の情報も含めて癌の全体像を把握することを可能とするため、ペバシズマブのバイオマーカーを探索するために有用と思われる。

我々は、websiteに公開されている大腸癌のデータにおいて、ペバシズマブ併用化学療法の効果が予測できることを見いだした。このような機能ゲノミクスによるアプローチによって、癌において創薬のターゲットとなりうる腫瘍進展や薬剤感受性に重要な役割をもつ遺伝子を抽出することが可能である。

本研究では機能ゲノミクスによるアプローチを用いたゲノムワイドな解析を行い、下記を行う。

- 1) 卵巣癌においてペバシズマブの感受性を予測するバイオマーカーを確立する。
- 2) ペバシズマブに対する耐性獲得機構について明らかにする。
- 3) ペバシズマブによる免疫活性化機序を明らかにし、抗 PD 1 抗体療法との併用の有用性について検証する。

## 3. 研究の方法

(1) マウス卵巣癌モデルに対する抗マウス VEGF 抗体(B20-4.1.1)による治療実験

- a. マウス卵巣癌モデル(HM-1, ID8-Vegf)に対する治療実験ならびに腫瘍のサンプリングと網羅的解析

HM-1 細胞を B6C3F1 マウスの皮下または腹腔内に投与しマウス卵巣癌モデルを作成し、抗 VEGF 抗体と RatIgG isotype control を用いて抗 VEGF 抗体の有効性を確認した。また ID8, ID8-Vegf マウス卵巣癌細胞をそれぞれ C57/BL6 マウスの腹腔内に播種し卵巣癌モデルを作成、同治療実験を施行した。HM-1 モデルの皮下腫瘍をサンプリングし Mouse Transcriptome Array 1.0(MTA1.0, Affymetrix)を用いて網羅的遺伝子発現解析を施行した。

- b. 腫瘍の免疫染色(Gr-1, CD8, PIMO)、サイトカインアレイ, ELISA

治療後の HM-1 皮下腫瘍を回収、凍結切片を作成し Gr-1, CD8, Pimonidazole の免疫染色、ならびに二重染色を施行した。さらに、回収した腫瘍ライセートを用いて Membrane base のサイトカインアレイ (Proteome profiler array, R & D)を解析した。ELISA を用いて validation を行った。

(2) 卵巣癌細胞株(SKOV3, HM-1, ID8-Vegf)の低酸素培養と定量 PCR を用いた遺伝子発現解析ならびにウエスタンブロッティング

- a. Myeloid cell 誘導因子の発現変化の解析

MDSC 誘導因子として知られる複数のサイトカインの発現が 02 1%1 低酸素環境下での変動の有無について解析した。

- b. NF B 経路の変動

サイトカインの転写因子として知られる NF B subunit である RelA やそのリン酸化蛋白の低酸素環境下における発現変動の有無を解析した。

- c. NF B 経路の silencing と発現変化

低酸素培養下の HM-1 細胞に、RelA のノックダウンを行い、GM-CSF の発現変動が認められるかどうか定量 PCR を用いて解析した。

(3)Ex vivo マウス骨髄由来骨髄球細胞を用いた機能実験

- a. 遊走能の解析

24well transwell chamber を使用、マウス骨髄細胞由来 Gr-1 陽性細胞を抽出後、well の下層に HM-1 細胞培養上清を置き、GM-CSF を添加する事による遊走能の解析を行った。

- b. 産生実験と免疫抑制能の解析

マウス骨髄細胞由来 Gr-1 陽性細胞を、ID8-vegf 培養上清中ならびに GM-CSF を添加することで免疫抑制能を持つ細胞への分化を機能解析を施行。

(4)抗マウス VEGF 抗体と抗 GM-CSF 抗体治療実験

HM-1 皮下腫瘍モデルに対し、抗 VEGF 抗体と抗 GM-CSF 抗体を用いて治療実験を施行。また、Nude マウスに HM-1 皮下腫瘍を接種し同実験を施行。

(5)卵巣癌臨床サンプルを用いた免疫染色  
卵巣癌 4 期症例で、初回手術にて腹膜播種を切除後、TC+bevacizumab による治療を行い、腫瘍マーカーが再上昇、二期的手術を行った症例の初回、二度目のサンプルのホルマリン切片を使用し免疫染色を施行。

#### 4. 研究成果

(1)

HM-1 皮下腫瘍モデル、ならびに腹膜播種モデル、ID8-Vegf 腹膜播種モデルにおいて、いずれも抗 VEGF 抗体は若干の治療効果を示すものの、治療継続しているにも関わらず腫瘍進展を認めることが分かった。一方で ID8 による腹膜播種モデルでは抗 VEGF 抗体は奏功し、マウスの腫瘍はほぼ完治した。形成される腫瘍 type により抗 VEGF 抗体の感受性が異なることが分かった。抗体治療を行った HM-1 皮下腫瘍をサンプリングし、MTA1.0 による網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、低酸素関連 pathway、NF B 関連 pathway、サイトカイン関連 pathway が複数亢進していることが判明した。

サンプリングした腫瘍の凍結切片を用いて腫瘍内の Gr-1 陽性細胞、CD8 陽性細胞の免疫染色を施行したところ、Gr-1 陽性細胞は抗 VEGF 抗体治療後には顕著に増加、CD8 は減少していることが判明した。また、Pimonidazole 陽性領域に優位に Gr-1 陽性細胞が集簇しており、低酸素環境と MDSCs の誘導に関連性を示唆する結果であった。MDSCs 誘導に関わる因子を探索するために行ったサイトカインアレイにおいて、抗体治療抵抗性腫瘍では GM-CSF や CXCL2、CCL2 が顕著に増加していることが判明した。ELISA を行うと、皮下腫瘍モデルの血清や他の腹膜播種モデルの腹水中でも同様にそれらの因子が亢進していることが分かった。

(2)

低酸素培養下では、すべての卵巣癌細胞株において GM-CSF、CXCL2 の発現が遺伝子発現、蛋白レベルでいずれも亢進していることが分かった。また、いずれの細胞においても抽出した核蛋白での RelA 発現ならびにそのリン酸化蛋白の発現が亢進しており、低酸素環境下での NFkB 経路の亢進を証明した。低酸素化に RelA の silencing を行うと、GM-CSF 発現は減弱し、低酸素環境下での GM-CSF 発現は NFkB 経路を介していることが証明された。

(3)

Ex vivo に抽出した Gr-1 陽性細胞は、transwell 下層に HM-1 腫瘍培養上清を置くと遊走が亢進することは知られていたが、低酸素培養を行った培養上清だとさらに遊走能が亢進した。低酸素培養上清に抗 GM-CSF 抗体を添加すると、遊走能は減弱することがわかった。低酸素下の Gr-1 陽性細胞の遊走には GM-CSF 経路が関与していることが分かった。さらに、Gr-1 陽性細胞の培養実験では GM-CSF を添加しない場合は F4/80+細胞や CD11c+細胞が増加、一方で培養上清に GM-CSF を添加した場合、F4/80 や CD11c+細胞が減少

した一方で Gr-1 陽性細胞が顕著に増加することが分かった。さらに培養下に産生した細胞を回収し、活性化リンパ球と共培養を行ったところ、腫瘍培養上清に GM-CSF を加えた群では顕著にリンパ球増殖を抑制していた。腫瘍局所の GM-CSF は骨髄由来免疫抑制性細胞を誘導することを証明した。

(4)

B6C3F1 マウスに接種した HM-1 皮下腫瘍モデルにおいて、抗 VEGF 抗体単独と比較し抗 GM-CSF 抗体を併用したほうが、腫瘍縮小効果が高いことが分かった。抗 VEGF 抗体と抗 CXCR2 阻害剤と併用した場合は、治療効果の増強は認められなかった。また、HM-1 細胞を Nude マウスに接種したモデルにおいては、抗 GM-CSF 抗体は治療効果を増強する事はなかった。これらの結果により、免疫正常マウスモデルにおける抗 GM-CSF 抗体の治療効果はリンパ球活性を介していることを証明した。

(5)

HIF1、GM-CSF、CD8、CD33 について免疫染色を施行した。アバスチン投与後のサンプルでは腫瘍細胞における HIF1、GM-CSF の発現が亢進しており、CD33 は増加、一方で腫瘍細胞上皮に浸潤する CD8 陽性リンパ球は顕著に減少していた。

以上の結果から、抗 VEGF 抗体は腫瘍局所に低酸素環境を誘導するとともに、代償的に GM-CSF 発現が亢進し、MDSC を腫瘍局所に誘導し、リンパ球活性を抑制していることがわかった。これら免疫抑制経路である GM-CSF や MDSCs を標的とする治療は、抗 VEGF 抗体との新規併用治療として期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、担当者は線)

##### 〔雑誌論文〕(2件)

\*Naoki Horikawa, Kaoru Abiko, Jyunzo Hamanishi, Tsukasa Baba, Ken Yamaguchi, Yumiko Yoshioka, Masafumi Koshiyama, Ikuo Konishi. Expression of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer inhibits tumor immunity through the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. Clin Cancer Res. 2016, Jan 15, 587-599 査読有

##### \*Masafumi Koshikyama

Potential efficacy of anti-PD-L1 antibody treatments for gynecologic cancers.

Women's Health open journal 査読有

3(3) 2017, e21-e23

Doi: 10.17140/WHOJ-3-e013

その他準備中

〔学会発表〕( 16 件)

\*Naoki Horikawa, Noriomi Matsumura, Junzo Hamanishi, Susan K Murphy, Tsukasa Baba, Ken Yamaguchi, Masafumi Koshiyama, Ikuo Konishi

Expression of VEGF in ovarian cancer suppresses tumor of myeloid derived suppressor cells. American Association for Cancer Research, oct 17-20, 2015. Orlando, USA

\*堀川直城、安彦郁、濱西潤三、松村謙臣、馬場長、山口建、越山雅文、吉岡弓子、小西郁生

卵巣癌大網転移巣における VEGF 発現は腫瘍内 MDSC 浸潤を介して局所免疫を抑制している。第 67 回日本産科婦人科学会学術講演会 4 月 9 日-4 月 12 日、2015 年、横浜市

\*Naoki Horikawa, Kaoru Abiko, Junzo Hamanishi, Noriomi Matsumura, Tsukasa Baba, Ken Yamaguchi, Masafumi Koshiyama, Yumiko Yoshioka, Ikuo Konishi. VEGF expressed in ovarian cancer suppresses tumor immunity via recruitment of MDSC.

第 57 回日本婦人科腫瘍学術講演会 8 月 7 日-8 月 9 日、2015 年、盛岡市

\*Naoki Horikawa, Kaoru Abiko, Junzo Hamanishi, Noriomi Matsumura, Tsukasa Baba, Ken Yamaguchi, Masafumi Koshiyama, Yumiko Yoshioka, Ikuo Konishi. VEGF expressed in ovarian cancer suppresses tumor immunity through induction of MDSC.

第 74 回日本癌学会、10 月 8 日-10 月 10 日、2015 年、名古屋市

\*Naoki Horikawa, Kaoru Abiko, Noriomi Matsumura, Junzo Hamanishi, Tsukasa Baba, Ken Yamaguchi, Yumiko Yoshioka, Masafumi Koshiyama, Ikuo Konishi. Expression of VEGF in ovarian cancer suppresses tumor immunity through recruitment of MDSC.

日本免疫学会学術集会、1 月 19 日、2015 年、札幌

\*堀川直城、安彦郁、松村謙臣、濱西潤三、松村謙臣、馬場長、山口建、越山雅文、小西郁生 卵巣癌における VEGF 発現と腫瘍免疫の関連。Gynecology Expert Meeting, 11 月 20 日、2015 年、京都

\*Naoki Horikawa, Kaoru Abiko, Noriomi Matsumura, Junzo Hamanishi, Tsukasa Baba, Ken Yamaguchi, Yumiko Yoshioka, Masafumi Koshiyama, Ikuo

Yoshioka, Masafumi Koshiyama, Ikuo

Konishi. Expression of VEGF in ovarian cancer suppresses tumor immunity through recruitment of MDSC. 日本免疫学会学術集会、11 月 19 日、2015 年、札幌

\*Naoki Horikawa, Kaoru Abiko, Noriomi Matsumura, Junzo Hamanishi, Tsukasa Baba, Ken Yamaguchi, Masafumi Koshiyama, Ikuo Konishi

Expression of VEGF in ovarian cancer suppresses tumor immunity via recruitment of myeloid derived suppressor cells (MDSC).

第 68 回日本産科婦人科学会学術集会、4 月 21 日-24 日、2016 年、東京

\*堀川直城、安彦郁、松村謙臣、濱西潤三、馬場長、山口建、吉岡弓子、越山雅文、小西郁生

VEGF expression in ovarian cancer suppresses tumor immunity via induction of myeloid derived suppressor cells (MDSC). 第 58 回日本婦人科腫瘍学会学術集会、7 月 8 日-10 日、2016 年、米子市

\*堀川直城、安彦郁、濱西潤三、馬場長、山口建、小西郁生、松村謙臣、越山雅文

卵巣癌における VEGF 発現は、MDSC を誘導し腫瘍免疫を抑制している。

第 34 回日本ヒト細胞学術集会、7 月 16 日 2016 年、奈良市

\*堀川直城、安彦郁、松村謙臣、卵巣癌における抗 VEGF 抗体耐性には、低酸素誘導性の MDSC 浸潤が関与する。

第 32 回京都がん研究会、9 月 16 日、2016 年、京都市

\*堀川直城、安彦郁、濱西潤三、馬場長、山口建、吉岡弓子、小西郁生、松村謙臣、越山雅文

卵巣癌における抗 VEGF 抗体耐性には、低酸素誘導性の MDSC 浸潤が関与する。

第 75 回日本癌学会学術集会、10 月 6 日-8 日、2016 年、横浜

\*Naoki Horikawa, Kaoru Abiko, Junzo Hamanishi, Tsukasa Baba, Ken Yamaguchi, Ikuo Konishi, Noriomi Matsumura

VEGF in ovarian cancer suppresses T cell activity by eliciting Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) into tumor microenvironment.

16<sup>th</sup> Biennial Meeting of the International Gynecological Cancer Society, 29 Oct, 2016, Lisbon, Portugal

\*安彦郁、堀川直城、濱西潤三、村上隆介、山口建、馬場長、万代昌紀、松村謙臣、卵巣がんの免疫逃避機構を克服する

~ PD-L1 から VEGF へ 癌細胞との知恵比べ ~

島根大学産婦人科セミナー  
11月8日、2016年、松江

\*堀川直城、安彦郁、濱西潤三、馬場長、浮田真沙世、山口建、村上隆介、小西郁生、松村謙臣、万代昌紀

The resistance to anti-VEGF therapy in ovarian cancer is mediated through recruitment of hypoxia-induced MDSC.  
第69回日本産科婦人科学会学術講演会、4月13-16日、2017年、広島

\*堀川直城、安彦郁、濱西潤三、馬場長、浮田真沙世、山口建、村上隆介、小西郁生、松村謙臣、万代昌紀

The resistance to anti-VEGF therapy in ovarian cancer is mediated via infiltration of hypoxia-induced MDSCs.  
第59回日本婦人科腫瘍学会講演会、7月27日-29日、2017年、熊本

〔図書〕(計 2 件)

\*濱西潤三

次世代のがん治療薬・診断のための研究開発  
～免疫療法・遺伝子治療・がん幹細胞～  
技術情報協会、2016

\*濱西潤三、万代昌紀、小西郁生

卵巣癌におけるがん免疫療法  
-Immuno-Oncology Up to date-  
がん免疫療法ハンドブック第1版、  
メディカルレビュー社 2016

〔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

越山 雅文(KOSHIYAMA, Masafumi)  
京都大学・医学研究科・客員研究員  
研究者番号：50724390

### (2) 研究分担者

松村 謙臣(MATSUMURA, Noriomi)  
京都大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：20452336

馬場 長(BABA, Tsukasa)  
京都大学・医学研究科・講師  
研究者番号：60508240

濱西 潤三(HAMANISHI, Junzo)  
京都大学・医学研究科・講師  
研究者番号：80378736

小西 郁生(KONISHI, Ikuo)  
京都大学・医学研究科・名誉教授  
研究者番号：90192062