

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20045

研究課題名(和文)骨肉腫に対する抗PD-1抗体の有用性の検証およびWntシグナルとの関連性の解明

研究課題名(英文) Verification of the usefulness of anti-PD-1 antibody against osteosarcoma and clarification of relevance to Wnt signal

研究代表者

吉田 和薫 (Yoshida, Kazushige)

信州大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60770774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：メラノーマ等に対する有効な新薬である抗PD-1抗体が、骨肉腫に対して有効かどうか検証を行った。マウス背部皮下に骨肉腫を移植したモデルを作製し、抗PD-1抗体を投与した群としていない群の生存、腫瘍体積を比較したところ、抗PD-1抗体を投与することで生存日数が延長し、腫瘍体積の増大を抑制することができた。また、抗PD-1抗体の投与で腫瘍に対する免疫反応を抑制する抑制性T細胞を減らすことが新たに分かった。

研究成果の概要(英文)：We examined whether anti-PD-1 antibody, an effective new drug against melanoma etc., is effective against osteosarcoma. We used a model in which osteosarcoma was implanted subcutaneously in the back of the mouse to compared treated with anti-PD-1 antibody group with control group. We observed the survival time and the tumor volume. As a result, administration of anti-PD-1 antibody prolonged the survival days, and it was possible to suppress an increase in tumor volume. In addition, it was newly found that the administration of anti-PD-1 antibody reduces suppressive T cells that suppress the immune response to the tumor.

研究分野：整形外科

キーワード：抗PD-1抗体 骨肉腫

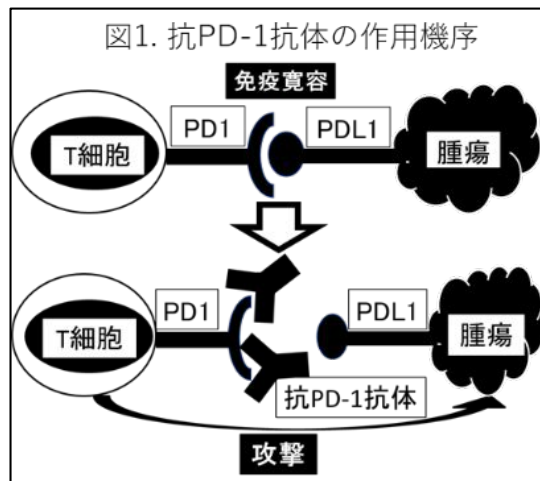
1. 研究開始当初の背景

【(1)骨肉腫】

骨肉腫は原発性悪性骨腫瘍の中で最も多い腫瘍だが、発症頻度は100万人に3例と比較的少ない。骨芽細胞系由来の悪性腫瘍とされているが、発症のメカニズムや原因遺伝子はわかっていない。15歳前後の若年者に好発し、治療は術前後化学療法と手術を組み合わせる。5年生存率は50-70%にまで改善してきているが、新規治療薬開発など課題も残っている。

【(2)抗PD-1抗体】

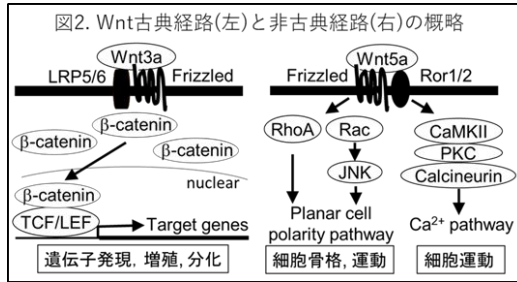
がんの微小環境では、生体が本来有する免疫が有効に働かない「免疫寛容」の状態になっている。そのメカニズムの一つとして「免疫チェックポイント機構」が知られている。PD-1およびリガンドのPD-L1もその機構を担う分子である。抗PD-1抗体の基本的な作用機序は、PD-1/PD-L1インタラクションを解除し、T細胞を正常な免疫状態に回復し腫瘍を攻撃させるというもので(図1)、周知のとおりメラノーマや肺癌に対し、顕著な治療効果が確認されている。骨肉腫にもPD-L1が発現しており、抗PD-1抗体が有効である可能性があるが、末期骨肉腫患者に対する臨床試験の結果は不良である。



【(3)Wnt経路】

Wnt経路は発生や恒常性の維持など多様な生命現象に関与し、悪性腫瘍との関係も報告されている。Wnt経路には古典経路と、非古典経路が存在する。古典経路の代表的なリガンドであるWnt3aは、受容体であるFrizzledおよび共受容体であるLRP5/6を介して細胞内にシグナルを伝達する(図2.左)。骨肉腫において、古典経路の亢進は腫瘍の浸潤、転移を促進する。一方でWnt非古典経路の代表的なリガンドであるWnt5aはFrizzledを介してシグナルを伝達し、細胞極性や細胞移動に関与する(LRP5/6は介さない。図2.右)。Wnt5aはFrizzledとの結合においてWnt3aに競合するため一般的には古典経路を抑制する。腫瘍に対しては、腫瘍促進的に作用する古典経路を抑制し、がん抑制遺伝子として働く癌腫が確認されている。一方で、Wnt5aの高発現が、骨肉腫を含む複数種類の

がんの悪性度と相関することが報告され、癌腫によってはWnt5aが腫瘍促進的に働くと考えられている。本研究室では骨芽細胞においてWnt5aがLRP5/6発現の亢進を介してWnt3aと協調的に骨形成を促進することを報告した。この発見は競合的な関係が一般的であるWnt古典経路と非古典経路においてはユニークである。そして、骨芽細胞系由来と考えられている骨肉腫においても同様の関係がみられ、病態に影響している可能性がある。



2. 研究の目的

本研究では抗PD-1抗体の骨肉腫に対する有用性の検討を行うことを第一の目標とする。また、近年悪性腫瘍との関連が明らかにされてきているWntシグナルに着目し、抗PD-1抗体による抗腫瘍効果におけるWntシグナルの相互作用を解析することを第2の目標とする。

3. 研究の方法

(1) 骨肉腫細胞株の皮下移植マウスモデルを用いてin vivoで抗PD-1抗体の抗腫瘍効果を検証する。マウスモデルはマウス骨肉腫LM8を同系列マウス(C3H/Slc)の背部皮下に1×10<sup>6</sup>個移植し作成する。マウス抗PD-1抗体(4H2、試薬提供:小野薬品工業株式会社)は20mg/kgを週3回、合計5回投与する。腫瘍径の推移、体重の推移、生存期間、肺転移の有無を評価する。

(2) 抗PD-1抗体投与による腫瘍浸潤免疫細胞の変化を検証するために腫瘍と脾臓における免疫細胞の種類と割合をフローサイトメトリーで検証する。

(3) 他の癌腫で知られているIFN刺激によるPD-L1発現が、骨肉腫においてもみられるかどうかin vitroで検証する。

4. 研究成果

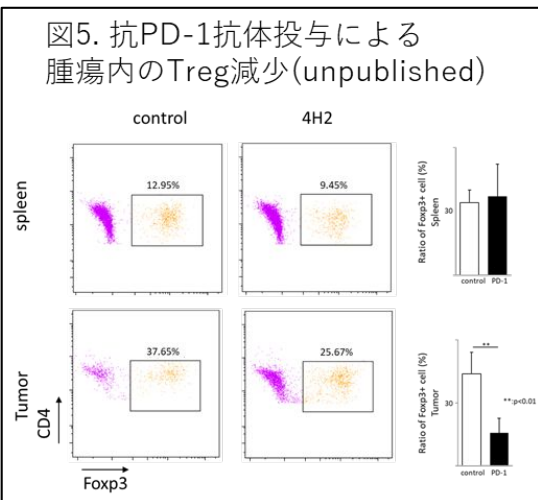
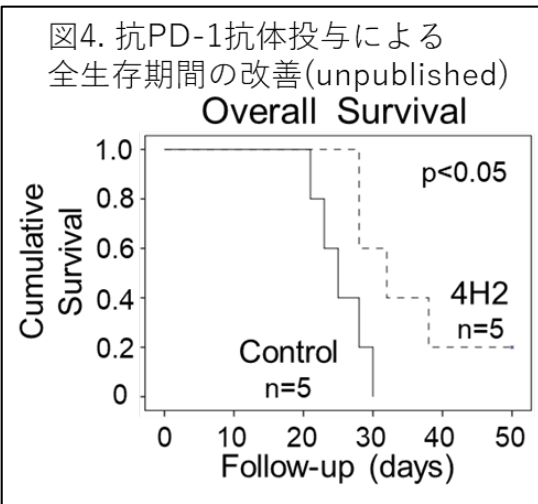
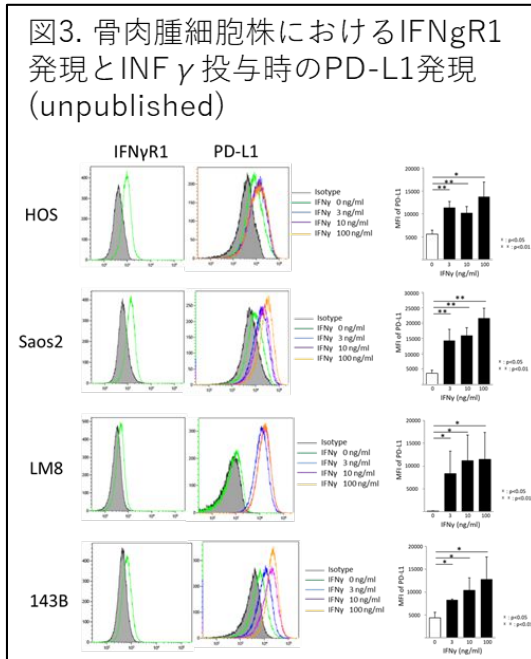
(1) IFN刺激とPD-L1発現  
in vitroでIFN刺激により骨肉腫のPD-L1発現が増強した(次頁図3)。ヒト骨肉腫細胞株(HOS, Saos2, 143B)ではIFN刺激がなくてもPD-L1分子の発現を認めた。

(2) 抗PD-1抗体の骨肉腫に対する治療効果  
骨肉腫細胞株皮下移植マウスにおいて抗PD-1抗体は腫瘍体積を抑制し、全生存期間を改善した(次頁図4)。

(3) 抗PD-1抗体投与による腫瘍微小環境の

変化

抗 PD-1 抗体投与により、腫瘍に浸潤している抑制性 T 細胞(Treg)の割合が有意に減少した(図 5)。



(4) 抗 PD-1 抗体による Wnt 経路活性の変化

本研究において抗 PD-1 抗体投与による腫瘍の Wnt 経路に関する影響は確認されなかった。

本研究では、まず抗 PD-1 抗体の効果予測への使用が期待されている PD-L1 分子発現のメカニズムを検証した。

結果としてほかの癌腫で報告されているように、IFN  $\gamma$  の添加により惹起されることが分かった。これは今までほかの癌腫において示されていた関係が骨肉腫においても成立することを示したものであり、骨肉腫に対する抗 PD-1 抗体の有効性を検証するうえでほかの癌腫と同様の免疫応答が起こっているという前提に矛盾しないものである。

次にマウス骨肉腫皮下移植モデルにおける抗 PD-1 抗体の有効性の評価を行い、腫瘍体積増加の抑制と、生存期間の延長において、その有効性を証明した。

現在米国にて実施されている複数種類のがんに対する抗 PD-1 抗体の臨床試験において、骨肉腫に対する顕著な治療効果は確認されていない。もともと肉腫に対する抗 PD-1 抗体は有効性が低い可能性が示唆されていたが、当該研究でも同様の結果が示されたようにも見える。しかし、当該臨床試験においてのアウトカムが RECISTv1.1 に準拠した腫瘍径の変化により有効性を評価しており、化学療法が奏功しても細胞外基質が豊富なため腫瘍体積が縮小しにくい骨肉腫においては正確な評価となっていない可能性がある。そのため、当該臨床試験の結果のみからは骨肉腫に対する抗 PD-1 抗体の有効性は判断が難しいのが現状である。

現時点で動物実験レベルであっても骨肉腫に対する抗 PD-1 抗体の有効性を評価し、生存を延長させるという結果を得た報告はなく、本研究の結果は単一のモデルではあるものの、骨肉腫に対し抗 PD-1 抗体の有効性を裏付けるものとなりうる。

さらに、抗 PD-1 抗体投与による腫瘍内の Treg の減少が確認された。

詳細なメカニズムについては現在検証を進めているが、同じ免疫チェックポイント阻害剤である抗 CTLA4 抗体では腫瘍中の Treg の減少が確認され、抗体特異的細胞障害が機序であることが分かっている。抗 PD-1 抗体においても、Treg 上に発現している PD-1 分子と抗体が結合し、抗体特異的細胞障害により Treg が除去されている可能性があると考えている。

抗 PD-1 抗体は腫瘍と T 細胞の PD-1 /PD-L1 インタクションを解除し、疲弊した T 細胞を再活性化することが基本的な作用機序と考えられているが、腫瘍に対する免疫応答を抑制する Treg を除去することにより、相乗的な抗腫瘍効果を得ている可能性が考えられる。

また、臨床的に抗 PD-1 抗体のほうが抗 PD-L1 抗体より有効であることが報告されているが、抗 PD-1 抗体による Treg の除去がその差異を説明するポイントになる可能性がある。

今後は本研究で得られた知見をさらに追及し、抗 PD-1 抗体の作用を強める併用療法の検証や、抗 PD-1 抗体投与後の Treg 減少のメカニズムを検証していくことで、骨肉腫に対する抗 PD-1 抗体の適応拡大の可能性を模索していきたい。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

吉田和薫、岡本正則、青木薫、鎌仲貴之、傍島淳、滝沢崇、田中学、羽二生久夫、薄井雄企、高沢彰、吉村康夫、齋藤直人、加藤博之、骨肉腫に対する抗 PD-1 抗体の有用性の検討、日本整形外科学会基礎学術集会、那覇、2017

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

吉田 和薫 (Yoshida, Kazushige)  
信州大学附属病院・整形外科・医員  
研究者番号：60770774

### (4)研究協力者

岡本 正則 (Okamoto, Masanori)  
佐々木 純 (Sasaki, Jun)  
椋野 みどり (Mukuno, Midori)  
齋藤 直人 (Saito, Naoto)  
加藤 博之 (Kato, Hiroyuki)