

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07217

研究課題名(和文) 加齢に伴う免疫能の変化に立脚した化学療法との複合がん免疫療法の確立

研究課題名(英文) Combined anti-cancer immunotherapy based on the ability of immune responses in aged hosts

研究代表者

原田 守 (Harada, Mamoru)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：50260716

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)：CT26大腸がん細胞を皮下接種した場合、若年マウスと比べて加齢マウスで促進されていた。また、加齢マウスでは血中IL-6が増加し、がんワクチンによる抗がん効果の誘導も不十分であった。一方、マウス由来のRENCA腎がん細胞に非自己抗原としてヒトCA9由来遺伝子を発現させた RENCA/hCA9細胞を用いた研究も実施した。その結果、RENCA/hCA9を拒絶する若年マウスでは、ヒトCA9を認識するCD8陽性T細胞とともにCD4陽性T細胞も誘導されていた。一方、RENCA/hCA9を皮下接種した加齢マウスにおいては、抗がん剤と免疫チェックポイント阻害抗体の併用でがんの退縮を誘導できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、加齢がん生体での有効な複合免疫療法の確立を目指した。加齢に伴い炎症性サイトカインが上昇し、担がん状態の場合さらに炎症状態が悪化する。また、加齢がん生体では強力な化学療法を受けた後では骨髄抑制が生じ、抗がんT細胞を再賦活させる免疫チェックポイント抗体療法も効果を示さないかもしれない。研究の成果は、実臨床において、がん患者の大部分を占める中高年のがん患者に対して複合免疫療法を実施する場合の貴重な基盤的情報になり、高齢化が進む本邦における複合抗がん免疫療法の適応拡大に大いに貢献できると予想される。

研究成果の概要(英文)：The in vivo growth of murine colon carcinoma CT26 was more rapid in aged mice compared to young mice, and the serum levels of IL-6 were elevated in aged mice. In addition, aged mice showed lower response to anti-cancer vaccine by inactivated cancer cells compared to young mice. On the other hand, we examined the immune responses to murine renal carcinoma RENCA expressing human CA9 (hCA9) as a non-self antigen. As a result, young mice rejected RENCA/hCA9 and human CA9-recognizing CD8+ T cells and CD4+ T cells were induced in such mice. In addition, aged mice allowed RENCA/hCA9 to grow in vivo but combined immunotherapy with immune checkpoint blockade therapy with chemotherapy exerted significant antitumor effects even in aged mice.

研究分野：がん免疫療法

キーワード：免疫療法 加齢 化学療法 集学的がん治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

CTLA-4 や PD-1/PD-L1 などの免疫チェックポイント分子に対する阻害抗体療法が特定のがん腫で有効であることが広く認知され、免疫療法への期待が高まっている。しかし、単独療法での治療効果は 2-3 割であり治療効果が十分とは言えない。今後の方向性の一つは、免疫チェックポイント阻害抗体療法で効果を示すレスポonder患者をスクリーニングできる方法を開発することであり、世界中の研究者が競い合っている。もう一つの方向性は、化学療法剤など他のがん治療薬と免疫チェックポイント抗体療法を併用して治療効果を高めることである。

免疫力は加齢とともに低下する。さらに、加齢のがん患者では担がんに伴う免疫抑制も生じ、より重篤な免疫力の低下が生じる。また、加齢により血中に IL-6・TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインが増加する。そして、加齢担がん生体に免疫療法を実施した場合、これらのサイトカインが治療に伴う有害事象をより悪化させる可能性がある。一方、担がん状態とは慢性炎症と見なすことができ、悪液質の原因とされる IL-6・TNF- $\alpha$  の増加とともに、炎症により MDSC も増える。加齢と担がん状態に伴う持続的炎症状態は免疫療法だけでなく、全てのがん治療にとっての障害である。しかし、このような加齢担がん生体の免疫学的特徴 (T 細胞機能の低下、炎症性サイトカインや免疫抑制性細胞の増加、有害事象の生じやすさ) を考慮した複合免疫療法の研究は無い。さらに、ほぼ全ての前臨床研究は、6-7 週齢の若年動物(マウス)(ヒトの 6-7 歳に相当)を用いて実施されており、実臨床を反映している実験系とは言えない。

## 2. 研究の目的

本研究では、加齢担がん生体の免疫的特徴と免疫チェックポイント阻害抗体療法と化学療法との複合がん免疫療法に焦点を当て、加齢担がん生体での抗がん免疫応答の特徴をさらに解明し、また、モデルネオ抗原としてヒト CA9 という非自己抗原を発現させたマウスががん細胞を用いて、ネオ抗原に対する免疫応答を通して、加齢担がんマウスにおいても有効な複合的がん治療モデルの基盤を確立することを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) BALB/c マウス由来の CT26 大腸がん細胞を若年マウスと加齢マウスに皮下接種し、その増殖、血中 IL-6、また、不活化したがん細胞を用いたがんワクチンによる抗がん効果の誘導を比較検証する。

(2) BALB/c マウス由来の RENCA 腎がん細胞に非自己抗原としてヒト CA9 由来遺伝子を発現させた RENCA/hCA9 細胞を若年マウスと加齢マウスに皮下接種し、生体内でのがんの増殖を比較する。また、RENCA/hCA9 が拒絶されれば、それを担う免疫細胞を同定する。さらに、複合がん免疫療法の治療モデルと考えられる RENCA/hCA9 を皮下接種した加齢マウスを用いて、抗がん剤と免疫チェックポイント阻害抗体の併用でがんの退縮を誘導できるかを検討する。

## 4. 研究成果

(1) BALB/c マウス由来の CT26 大腸がん細胞を皮下接種した場合の生体内での増殖は、若年マウスと比べて加齢マウスで促進されていた。また、加齢マウスでは、血中 IL-6 が増加し、不活化したがん細胞を用いたがんワクチンによる抗がん効果の誘導も不十分で、がん特異的キラーT 細胞の誘導も低下していた。

(2) BALB/c マウスとその同系腫瘍でがん抗原ペプチドが判明している CT26 大腸がん細胞、CT26 細胞由来だが皮下接種後に自然肺転移する LuM1 がん細胞を用いて、無治療での抗がん免疫応答の違い、さらに、複合免疫療法を実施した場合の治療効果を若年 (7W) マウスと加齢 (60W) マウスで比較した。その結果、CT26 のモデルで申請者は、若年担がんマウスでは抗がん剤 cyclophosphamide (CP) と免疫チェックポイント阻害抗体療法 (抗 CTLA-4 抗体) の併用で顕著な抗がん効果が誘導されたが、同じ治療プロトコールは加齢担がんマウスには治療効果を誘導できなかった。一方、皮下接種後に自然肺転移モデルを生じる LuM1 がん細胞の肺転移モデルでは、加齢マウスでは 45 日以内にすべてのマウスが死亡したが、若年マウスでは大部分のマウスが生存し顕著な違いを認めた。また、LuM1 がん細胞を脾臓内に投与する肝転移モデルでも、加齢マウスは 20 日以内にマウスが死亡したが、若年マウスでは肝転移が観察されず、対照的な結果となった。

(3) マウス腎がん RENCA/hCA9 を用いたマウスモデルでは、RENCA/hCA9 は若年 (6-7 週齢) BALB/c マウスにはマトリゲルを併用しても生着しなかったが、加齢マウスにはマトリゲルを併用しなくても生着した。若年 BALB/c マウスでの RENCA/hCA9 の拒絶は抗 CD4 抗体の投与ではほとんど影響なかったが、抗 CD8 抗体を投与したマウスでは認められなくなったことから、RENCA/hCA9 腎がんに対するエフェクター細胞は CD8 陽性 T 細胞であることが判明した。さらに、H-2K<sup>d</sup> または H-2L<sup>d</sup> に結合してヒト由来アミノ酸配列を含む 9-mer ペプチドをアルゴリズムに基づいて 21 種類準備し、RENCA/hCA9 を皮下接種した若年 BALB/c マウスの局所リンパ節細胞を反応細胞として IFN- $\gamma$  ELISA で評価したところ、1 つの候補ペプチド hCA9<sub>288-296</sub> (AYEQLLSRL) を同定した。このペプチドに相当する mouse CA9<sub>267-275</sub> (AYEQLLSHL) を用いても、RENCA/hCA9 を拒絶した若年マウスの脾細胞から RENCA/hCA9 に対するキラー T 細胞を誘導できた。

(4) 加齢マウスに RENCA または RENCA/CA9 を皮下接種して、切除したがん組織に浸潤している免疫細胞を免疫組織染色で調べた。その結果、RENCA 組織には CD4<sup>+</sup> T 細胞、CD8<sup>+</sup> T 細胞、マクロファージが浸潤していたが、RENCA/hCA9 組織には CD4<sup>+</sup> T 細胞、CD8<sup>+</sup> T 細胞、マクロファージの浸潤は明らかに少なく、いわゆる 'cold' 腫瘍であった。

(5) 臨床において治療難治性と考えられる 'cold' RENCA/CA9 を皮下接種した担がん加齢マウスを用いて、複合がん免疫療法の有効性を検証した。その結果、抗がん剤 cyclophosphamide (CP) と免疫チェックポイント阻害抗体療法 (抗 CTLA-4 抗体 + 抗 PD-1 抗体) の複合免疫療法の効果を検証したところ、半数のマウスでがんが完全退縮した。また、TKI 阻害剤である axitinib と免疫チェックポイント阻害抗体療法 (抗 CTLA-4 抗体 + 抗 PD-1 抗体) との複合免疫療法も実施したが、この実験系においても半数のマウスでがんが完全退縮した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Monma H, Iida Y, Moritani T, Okimoto T, Tanino R, Tajima Y, Harada M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Chloroquine augments TRAIL-induced apoptosis and induces G2/M phase arrest in human pancreatic cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0193990
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0193990.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tanino R, Tsubata Y, Harashima N, Harada M, Isobe T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Novel drug-resistance mechanisms of pemetrexed-treated non-small cell lung cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 16807-16821
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.24704.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Inao T, Iida Y, Moritani T, Okimoto T, Tanino R, Kotani H, Harada M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Bcl-2 inhibition sensitizes triple-negative human breast cancer cells to doxorubicin.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 25545-25556
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25370.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Minami T, Matsumoto N, Sugimoto K, Shimizu N, De Velasco M, Nozawa M, Yoshimura K, Harashima N, Harada M, Uemura H.	4. 巻 44
2. 論文標題 Hypoxia-inducing factor (HIF)-1 $\alpha$ -derived peptide capable of inducing cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes from HLA-A24+ patients with renal cell carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 197 - 202
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.intimp.2017.01.014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Harashima N, Takenaga K, Akimoto M, Harada M.	4. 巻 8
2. 論文標題 HIF-2a dictates the susceptibility of pancreatic cancer cells to TRAIL by regulating survivin expression.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget,	6. 最初と最後の頁 42887-42900
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.17157.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Iida Y, Harashima N, Motoshima T, Komohara Y, Eto M, Harada M.	4. 巻 108
2. 論文標題 Contrasting effects of cyclophosphamide on anti-CTLA-4 blockade therapy in two tumor mouse models.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science,	6. 最初と最後の頁 1974-1984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13337.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Komohara Y, Harada M.	4. 巻 59
2. 論文標題 Potential mechanisms of spontaneous regression in patients with B-cell lymphoma: the significance of co-stimulatory molecules in lymphoma cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	6. 最初と最後の頁 207-210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0.3960/jslrt.19026.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanino R, Amano Y, Tong X, Sun R, Tsubata Y, Harada M, Fujita Y, and Isobe T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Anticancer Activity of ZnO Nanoparticles Against Human Small-Cell Lung Cancer in an Orthotopic Mouse Model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 502-512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-19-0018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 稲尾瞳子、原田守
2. 発表標題 p53遺伝子変異を有するトリプルネガティブ乳癌細胞株に対するdoxorubicinとBcl-2 阻害剤（ABT-199）の併用効果
3. 学会等名 第118回日本外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲尾瞳子、原田守
2. 発表標題 Doxorubicinはヒト乳がん細胞にsenescenceを誘導し細胞傷害性免疫細胞に対する感受性を増強させる
3. 学会等名 第26回日本乳がん学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Inao T, Iida Y, Kotani H, Harada M.
2. 発表標題 Doxorubicin induces cellular senescence in human breast cancer cells and sensitizes them to cytotoxic T-lymphocytes.
3. 学会等名 San Antonio Breast Cancer Symposium. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原田守、沖本民生、谷野良輔、飯田雄一、磯部威
2. 発表標題 抗がん剤pemetrexedでsenescence に陥ったヒト肺がん細胞は細胞傷害性T細胞に傷害されやすい
3. 学会等名 第22回がん免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯田雄一、吉川倫太郎、松崎有未、原田守
2. 発表標題 間葉系幹細胞の腫瘍局所残存性を利用した新規抗がん免疫療法のマウスモデルの確立
3. 学会等名 第22回がん免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Harada M, Okimoto T, Inao T, Tanino R, iida Y, Isobe T.
2. 発表標題 Anti-cancer drugs induce senescence in cancer cells and increase their sensitivity to CAR-T cells
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Harada M, Kotani H, Iida Y.
2. 発表標題 Chemotherapy-induced senescent cancer cells are good targets for T cell-based anti-cancer immunotherapy
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iida Y, Yoshikawa R, Murata A, Matsuzaki Y, Harada M
2. 発表標題 Local delivery of CCL19-expressing mesenchymal stromal cells suppresses the tumor growth via promoting infiltration of immune cells.
3. 学会等名 第47回日本免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯田雄一、原嶋奈々江、元島崇信、菰原義弘、江藤正俊、原田守
2. 発表標題 Pros and cons of cyclophosphamide in anti-CTLA-4 antibody-treated different tumor mouse models
3. 学会等名 第21回日本がん免疫学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 原田守、飯田雄一、原嶋奈々江、元島崇信、菰原義弘、江藤正俊
2. 発表標題 Contrasting interaction between cyclophosphamide and anti-CTLA-4 therapy in different mouse tumor models.
3. 学会等名 第76回日本癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 稲尾瞳子、原嶋奈々江、原田守
2. 発表標題 トリプルネガティブ乳癌細胞株に対するdoxorubicinとBcl-2 阻害剤の併用効果
3. 学会等名 第25回日本乳癌学
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tanino R, Tsubata Y, Harashima N, Harada M, Isobe T.
2. 発表標題 Pemetrexed-resistant non-small cell lung cancer cell lines have novel drug-resistance mechanisms.
3. 学会等名 世界肺癌学会(WCLC2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Iida Y, Yoshikawa R, Murata A, Kotani H, Matsuzaki Y, Harada M
2. 発表標題 Local injection of CCL19-expressing mesenchymal stem cells augments the therapeutic efficacy of anti-PD-L1 antibody by promoting infiltration of immune cells.
3. 学会等名 第23回がん免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田守, 小谷仁司、飯田雄一、稲尾瞳
2. 発表標題 Different sensitivities of senescent breast cancer cells to immune cell-mediated cytotoxicity
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤悠介, 小谷仁司、飯田雄一、谷浦隆仁、原田守
2. 発表標題 Supplementation of L-arginine augments antitumor effects induced by chemotherapy and immune checkpoint blockade therapy.
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Harada M, Kotani H, Iida Y.
2. 発表標題 Senescent breast cancer cells induced by doxorubicin or the CDK4/6 inhibitor abemaciclib show different sensitivities to immune cell-mediated cytotoxicity.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kotani H, Iida Y, Harada M.
2. 発表標題 Identification of a candidate that suppresses the differentiation of naive helper T cells to regulatory T cells via screening of herbal crude drugs.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Iida Y, Yoshikawa R, Murata A, Kotani H, Matsuzaki Y, Harada M.
2. 発表標題 Local deliver of CCL19-expressing mesenchymal stromal cells augments the therapeutic efficacy by anti-PD-L1 blockade antibody via promoting infiltration of immune cells.
3. 学会等名 第48回日本免疫学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

島根大学医学部免疫学講座 <a href="https://www.med.shimane-u.ac.jp/immunology/">https://www.med.shimane-u.ac.jp/immunology/</a>
---

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