

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19591

研究課題名（和文）PD-1経路阻害薬耐性メカニズムの解明と新規治療開発～がん性腹水再利用への挑戦

研究課題名（英文）Investigation of acquired resistance of PD-1 inhibitor with recycle of CART system

研究代表者

濱西 潤三（Hamanishi, Junzo）

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：80378736

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：再発卵巣癌患者のがん性腹水を用いてがん性腹水濾過濃縮再静注療法（CART）法にて、大量のがん性腹水からの最適ながん細胞と免疫細胞抽出を検討し、高い細胞回収効率を得られ、同細胞の遺伝子発現解析にて、化学療法耐性に関わる遺伝子を複数個同定した。この遺伝子について同種同系マウス卵巣癌細胞株で発現抑制した細胞株を用いたマウス卵巣癌性腹水モデルを作成し、阻害薬を併用治療した結果、有意にがん性腹水が減少し、生存期間が延長した。同様にCART法で採取したがん性腹水細胞を投与した免疫不全PDXモデルでも同様の結果を得たことから、CART法を用いた免疫解析のモニタリングや再利用の有用性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では卵巣癌だけでなく、がん性腹水を生じる他臓器がんにも応用可能であると考えられるため、CART法による、腫瘍局所の多角的な免疫状態のモニタリングや、新たな免疫抑制因子の発現メカニズムの解明、さらには同因子を標的とした新たな治療選択のシーズ開発の基盤として、様々な再利用（リサイクル）が複数のがん種に対して期待でき、限られた医療材料や資源を有効に活用することが示され、今後の腫瘍免疫研究の新たなツールとして期待できる。

研究成果の概要（英文）：A large amount of cancer ascitic fluid could be filtrated and be concentrated by CART system in the patients with recurrent ovarian cancer. The optimal extraction of cancer cells and immune cells from the cancer ascites and next, we identified the several genes associated with chemotherapy-resistance. Mouse ovarian cancer cell lines whose expression was suppressed in syngeneic mouse ovarian cancer cell lines for these genes. Cancer ascites model and combined treatment with an inhibitor of these genes significantly reduced cancer ascites and prolonged survival. Similar results were obtained in an immunodeficient PDX model administered with cancer ascites cells collected by CART. The results show the usefulness of monitoring and reuse of the CART method for immune analysis.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 がん性腹水 CART

## 1. 研究開始当初の背景

進行卵巢癌は大量のがん性腹水(約1~5L)や腹膜播種を伴うことが多く、症状緩和(腹水除去、血中アルブミン維持)目的で腹水濾過濃縮再静注療法 CART 法を汎用する。しかしながら、そのほとんどは、膜ろ過、濃縮後に排液として破棄されているが、その排液には大量のがん細胞と免疫細胞が混在していると考えた。そこで当科で予備検討を行った結果、CART 処理後の排液中にはがん細胞だけでなく T 細胞、骨髄系細胞などの生細胞を数多く確認できたため、これらの細胞を有効利用(リサイクル)して多角的な解析や治療検討を行うことを着想した。

## 2. 研究の目的

本研究では、卵巢癌に対する PD-1 経路阻害薬および抗がん薬治療の治療効果(治療耐性)に関連する免疫関連因子(遺伝子)を、(1) 卵巢癌の臨床検体から得られる腫瘍や免疫細胞を用いて探索し、(2) マウス卵巢癌腹膜播種に対する治療耐性モデルを作成して比較検討し、(3) 共通する免疫関連因子(遺伝子)を標的とするマウス卵巢癌腹膜播種モデルを用いて新規治療法開発(併用療法)の基礎的検討を行う

## 3. 研究の方法

化学療法薬に抵抗性を示した再発卵巢癌患者のがん性腹水や末梢血検体の免疫学的解析のために、がん性腹水濾過濃縮再静注療法(CART)法を用いて腫瘍および免疫細胞の回収率の測定と効率的な回収法を決定するとともに、*in vitro*での免疫機能解析を行い、治療抵抗性に関わる因子を調べた。次に、マウス卵巢癌細胞株を用いて化学療法や PD-1 経路阻害薬耐性に伴い、腫瘍細胞や免疫細胞に発現する免疫関連因子(遺伝子)の探索を行ない、さらにマウス卵巢癌腹膜播種モデルにおけるがん性腹水細胞を用いて、化学療法や抗 PD-1 (PD-L1) 抗体を用いた免疫学変化を解析し、抵抗性に関わる因子の検証を行った。さらに免疫不全マウスを用いたヒト卵巢癌治療モデル PDX モデルにより、CART で大量に回収したがん細胞と免疫細胞を腹腔内に投与し、PD-1 経路阻害薬と検証された因子の阻害による併用療法の有効性について、腹水量の減少や生存期間の延長などを指標にして検証した。

## 4. 研究成果

再発卵巢癌患者のがん性腹水を用いて CART 法を用いて、大量のがん性腹水からのがん細胞と免疫細胞抽出を試みたが腹水量とは関係なく、症例によって腫瘍細胞も免疫細胞との比率も大きく異なっており、まったく免疫細胞が採取できない症例や、ごく少量の腹水でも多量の T 細胞が抽出できる症例も認められた。そこで、CART 法では採取直前後を外した最適なタイミングを検討した結果、細胞回収効率が大幅に上がったことで良好な PBMC 分画から細胞分画解析も可能となった。その結果、卵巢癌のがん性腹水の遺伝子発現解析にて、化学療法耐性(抵抗性例でのみ高発現あるいは低発現)に関わる遺伝子を複数個同定することができた。特に同因子のうち化学療法治療前後の臨床検体を用いて、発現が大きく変化することがわかった。

そこで化学療法抵抗性にかかわる遺伝子について2種類の同種同系マウス卵巢癌細胞株および同遺伝子(複数個)をノックアウトした細胞株を用いたマウス卵巢癌腹膜播種から癌性腹水モデル

を作成し、シスプラチン、パクリタキセル、抗 PD-L1 抗体を単独、併用それぞれ投与した結果、化学療法単剤では有意にがん性腹水が減少し、マウス体重および生存期間の延長傾向が示され、さらに併用ではそれらの改善が確認できた。以上、腹水濾過濃縮再静注療法（CART）を用いて化学療法および抗 PD-L1 抗体療法の抵抗性を示す因子を同定するとともに新たな治療に寄与する遺伝子を同定できた。一方、PDX モデルについては、CART によりがん性腹水細胞中の腫瘍細胞と T 細胞を分離し、in vitro で免疫抑制活性を解析したが、同系マウスモデルと同様に化学療法と免疫療法を併用投与をおこなった結果、腫瘍増殖は抑制できた。以上から、CART 法を用いた免疫解析のモニタリングや再利用（リサイクル）の有用性を示すことができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Mulati Kumuluzi, Hamanishi Junzo, Matsumura Noriomi, Chamoto Kenji, Mise Nathan, Abiko Kaoru, Baba Tsukasa, Yamaguchi Ken, Horikawa Naoki, Murakami Ryusuke, Taki Mana, Budiman Kharma, Zeng Xiang, Hosoe Yuko, Azuma Miyuki, Konishi Ikuo, Mandai Masaki	4. 巻 120
2. 論文標題 VISTA expressed in tumour cells regulates T cell function	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 115 ~ 127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-018-0313-5	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 Oda Katsutoshi, Hamanishi Junzo, Matsuo Koji, Hasegawa Kosei	4. 巻 151
2. 論文標題 Genomics to immunotherapy of ovarian clear cell carcinoma: Unique opportunities for management	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Gynecologic Oncology	6. 最初と最後の頁 381 ~ 389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygyno.2018.09.001	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 Inayama Yoshihide, Hamanishi Junzo, Matsumura Noriomi, Murakami Ryusuke, Abiko Kaoru, Yamaguchi Ken, Baba Tsukasa, Horie Katsuyuki, Konishi Ikuo, Mandai Masaki	4. 巻 23
2. 論文標題 Antitumor Effect of Nivolumab on Subsequent Chemotherapy for Platinum Resistant Ovarian Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Oncologist	6. 最初と最後の頁 1382 ~ 1384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1634/theoncologist.2018-0167	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 -

1. 著者名 Taki Mana, Abiko Kaoru, Baba Tsukasa, Hamanishi Junzo, Yamaguchi Ken, Murakami Ryusuke, Yamanoi Koji, Horikawa Naoki, Hosoe Yuko, Nakamura Eijiro, Sugiyama Aiko, Mandai Masaki, Konishi Ikuo, Matsumura Noriomi	4. 巻 9
2. 論文標題 Snail promotes ovarian cancer progression by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCR2 ligand upregulation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-03966-7	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 Lin Heng, Wei Shuang, Hurt Elaine M., Green Michael D., Zhao Lili, Vatan Linda, Szeliga Wojciech, Herbst Ronald, Harms Paul W., Fecher Leslie A., Vats Pankaj, Chinnaiyan Arul M., Lao Christopher D., Lawrence Theodore S., Wicha Max, Hamanishi Junzo, Mandai Masaki, Kryczek Ilona, Zou Weiping	4. 巻 128
2. 論文標題 Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade?mediated tumor regression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 1708 ~ 1708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI120803	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 Iwai Yoshiko, Hamanishi Junzo, Chamoto Kenji, Honjo Tasuku	4. 巻 24
2. 論文標題 Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Biomed Sci.	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12929-017-0329-9	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 Murakami Ryusuke, Matsumura Noriomi, Brown J.B., Higasa Koichiro, Tsutsumi Takanobu, Kamada Mayumi, Abou-Taleb Hisham, Hosoe Yuko, Kitamura Sachiko, Yamaguchi Ken, Abiko Kaoru, Hamanishi Junzo, Baba Tsukasa, Koshiyama Masafumi, Okuno Yasushi, Yamada Ryo, Matsuda Fumihiko, Konishi Ikuo, Mandai Masaki	4. 巻 187
2. 論文標題 Exome Sequencing Landscape Analysis in Ovarian Clear Cell Carcinoma Shed Light on Key Chromosomal Regions and Mutation Gene Networks	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 2246 ~ 2258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2017.06.012	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 濱西 潤三*, 万代 昌紀	4. 巻 73
2. 論文標題 免疫チェックポイント阻害薬 メカニズムと治療効果, 有害事象	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 最新医学	6. 最初と最後の頁 182-194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 濱西 潤三*, 万代 昌紀	4. 巻 21
2. 論文標題 婦人科がん 婦人科がんに対するチェックポイント阻害薬の開発動向	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 腫瘍内科	6. 最初と最後の頁 32-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 濱西 潤三*, 万代 昌紀	4. 巻 27
2. 論文標題 免疫チェックポイントPD-1経路阻害薬の展望	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cytometry Research	6. 最初と最後の頁 39-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 濱西 潤三*, 万代 昌紀	4. 巻 263
2. 論文標題 がん免疫療法の臨床 がん種別治療 婦人科がんに対するがん免疫療法の新展開 PD-1経路阻害薬への期待	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 97-103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Lin Heng, Wei Shuang, Hurt Elaine M., Green Michael D., Zhao Lili, Vatan Linda, Szeliga Wojciech, Herbst Ronald, Harms Paul W., Fecher Leslie A., Vats Pankaj, Chinnaiyan Arul M., Lao Christopher D., Lawrence Theodore S., Wicha Max, Hamanishi Junzo, Mandai Masaki, Kryczek Ilona, Zou Weiping	4. 巻 128
2. 論文標題 Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 805 ~ 815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1172/JCI96113	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15件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 濱西 潤三
2. 発表標題 婦人科がんの診断・治療 婦人科がんにおける新たな診断・治療に向けて がん遺伝子パネル検査からがん免疫療法へ
3. 学会等名 日本婦人科腫瘍学会 学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 濱西 潤三
2. 発表標題 婦人科がんの新たな治療薬
3. 学会等名 日本産科婦人科学会 学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hamanishi J.
2. 発表標題 Immune Checkpoint PD-1 Inhibitors for Ovarian Cancers
3. 学会等名 The 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS 2018) 14-16 Sep 2018. Kyoto Symposium. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hamanishi J.
2. 発表標題 New perspectives of PD-1 inhibition for Gynecologic Cancer
3. 学会等名 The 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS 2018) 14-16 Sep 2018. Kyoto Symposium. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hamanishi J.
2 . 発表標題 Efficacy of Immuno-checkpoint Inhibitors in Ovarian Cancer
3 . 学会等名 The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO 2018) 14-19, Oct. 2018. Rio de Janeiro, Brazil. Symposium. (招待講演)(国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hamanishi J
2 . 発表標題 PD-1 signal inhibitors for gynecologic cancers: Future perspectives
3 . 学会等名 The 5th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology (ASGO 2017)
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Hamanishi J
2 . 発表標題 D-1 signal blockade for ovarian cancer: Perspectives and issues
3 . 学会等名 The 56th Annual Congress of Taiwan Association of Obstetrics and Gynecology The 1st J-K-T Joint Conference of Obstetrics and Gynecology. The 1st J-K-T Joint Conference of Obstetrics and Gynecology.
4 . 発表年 2017年

1 . 発表者名 Hamanishi J, Murakami R, Mandai M, Matsumura M, Abiko K, Baba T, Hosoe Y, Yamaguchi K, Konishi I.
2 . 発表標題 Specific gene signatures and oligoclonal expansion of B cell repertoire with the responders of anti-PD-1 antibody (Nivolumab) for ovarian cancer; Novel predictive biomarkers.
3 . 学会等名 International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe 2017. Hyogo, Japan.
4 . 発表年 2017年



1. 発表者名 濱西潤三
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬～今後の展望とピットフォール～
3. 学会等名 第272回 がん研有明病院 学術研究講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 濱西潤三
2. 発表標題 Multi-omics analysis of anti-PD-1 antibody (Nivolumb) treated patients with ovarian cancer
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 濱西潤三
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬（抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体）の展望と課題
3. 学会等名 第55回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 濱西潤三
2. 発表標題 PD-1経路阻害薬の現況と展望
3. 学会等名 第15回 日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 濱西潤三
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬（抗PD-1,PD-L1抗体）～卵巣癌における展望と課題
3. 学会等名 第59回 日本婦人科腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 濱西潤三
2. 発表標題 免疫チェックポイント療法の展望と課題：卵巣がんに対する戦略
3. 学会等名 第5回 先端治療薬研究会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 濱西潤三
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬への期待
3. 学会等名 第14回 日本婦人科がん会議2017
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計8件

1. 著者名 濱西 潤三, 万代 昌紀	4. 発行年 2019年
2. 出版社 BIO Clinica	5. 総ページ数 15-19
3. 書名 【がん免疫の最前線】 免疫チェックポイント阻害薬	

1. 著者名 濱西 潤三	4. 発行年 2019年
2. 出版社 BIO Clinica	5. 総ページ数 6-7
3. 書名 本庶佑教授(BIO Clinica編集顧問)ノーベル生理学・医学賞受賞によせて 本庶佑教授のノーベル医学・生理学賞に際して	

1. 著者名 濱西 潤三, 万代 昌紀	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Pharma Medica	5. 総ページ数 25-31
3. 書名 【婦人科腫瘍の新たな治療戦略】 卵巣がんの新たな治療戦略 免疫チェックポイント阻害薬	

1. 著者名 濱西 潤三, 万代 昌紀	4. 発行年 2018年
2. 出版社 がん分子標的治療	5. 総ページ数 297-303
3. 書名 免疫チェックポイント阻害薬の治療効果予測のためのバイオマーカー	

1. 著者名 濱西潤三, 万代昌紀	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 578-585
3. 書名 実践 臨床生殖免疫学 PD-1/PD-L1経路阻害薬	

1. 著者名 濱西潤三, 万代昌紀	4. 発行年 2018年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 70-73
3. 書名 婦人科腫瘍遺伝カウンセリングマニュアル 卵巣がんの治療（外科的治療・内科的治療） 免疫チェックポイント阻害薬	

1. 著者名 濱西潤三	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本産科婦人科学会	5. 総ページ数 49-55
3. 書名 日本産科婦人科学会 研修ノート 免疫治療の現在と未来 がん免疫療法	

1. 著者名 影山 慎一、池田 裕明、珠玖 洋、西川 博嘉	4. 発行年 2017年
2. 出版社 メディカルドゥ	5. 総ページ数 286
3. 書名 がん免疫療法 : what's now and what's next?	

〔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
研究分担者	安彦 郁  (Abiko Kaoru)  (20508246)	独立行政法人国立病院機構（京都医療センター臨床研究センター）・内分泌代謝高血圧研究部・研究員   (84305)	
研究分担者	村上 隆介  (Murakami Ryusuke)  (40782363)	京都大学・医学研究科・特定病院助教   (14301)	