

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08653

研究課題名(和文) MET阻害とワクシニアウイルス療法を併用した肺癌に対する複合的分子標的・免疫療法

研究課題名(英文) Combined molecular targeting and immunotherapy for lung cancer with MET inhibition and vaccinia virus therapy

研究代表者

金地 伸拓 (Kanaji, Nobuhiro)

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60403789

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍溶解性ワクシニアウイルスMDRVV003およびMET阻害薬tepotinibをヒト肺癌細胞株およびマウス肺腺癌細胞株に加えると細胞死が誘導された。両者併用は単剤よりもその効果が高かった。またB6マウスでの皮下腫瘍モデルにおいても、両者併用は単剤よりも高い抗腫瘍効果を認め、さらにMDRVV003の投与部位から離れた腫瘍も縮小した。腫瘍の免疫染色では両者併用においてCD4およびCD8陽性細胞の浸潤が認められた。MDRVV003非投与腫瘍の縮小効果の機序としてMDRVV003増殖による直接的な細胞死以外に免疫原性細胞死があり、MET阻害は直接および免疫応答により細胞死を増強したと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌治療の進歩により進行肺癌患者の生存期間延長が認められているがまだ十分ではない。新たな治療法や免疫チェックポイント阻害薬の効果を高める方法の開発が望まれている。癌に対するウイルス療法は遺伝子改変により腫瘍選択性と腫瘍殺傷性を高めた腫瘍溶解性ウイルスを用いた治療法である。MET阻害薬は肺癌細胞上のMETに結合し癌細胞の増殖を抑制する。本研究では、腫瘍溶解性ウイルスMDRVV003とMET阻害薬tepotinibはそれぞれの直接作用のみではなく、免疫賦活作用をもたらし、抗腫瘍効果を発揮することが示された。これらの併用はまさに新規治療かつ免疫チェックポイント阻害薬の効果を高める方法である。

研究成果の概要(英文)：When oncolytic vaccinia virus MDRVV003 and/or a MET inhibitor tepotinib were added to human lung cancer cell lines and mouse lung adenocarcinoma cell line, cell death was induced. The combination was more effective than the single agent. In a subcutaneous tumor model in B6 mice, the combination of tepotinib and MDRVV003 had a greater antitumor effect than the single agent, and tumors distant from the site of MDRVV003 administration also shrank. Immunostaining of tumors showed infiltration of CD4- and CD8-positive cells when MDRVV003 was used in combination with MDRVV003, suggesting that immunogenic cell death, in addition to direct cell death by MDRVV003, is a mechanism for the reduction of non-MDRVV003-injected tumors, and MET inhibition appeared to enhance cell death both directly and by immune response.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 免疫療法 腫瘍溶解性ウイルス ウイルス療法 ワクシニアウイルス MET阻害薬 テポチニブ

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで研究代表者は、肺癌微小環境に着目して、肺線維芽細胞が産生する肝細胞増殖因子 (HGF) が肺癌細胞上の受容体型チロシンキナーゼ MET に結合して肺癌の進行をもたらす、MET 阻害薬がマウスモデルにおける腫瘍増大を抑制することを報告した (Kanaji N, Respir Res 2017)。興味深いことに、HGF は免疫細胞にも直接作用して、免疫抑制性好中球の腫瘍巣や所属リンパ節への遊走を促したり、免疫抑制性の樹状細胞を誘導したりすることにより、抗腫瘍免疫反応を減弱させる。そして、MET 阻害薬はこれらを阻害して抗腫瘍免疫を増強する免疫チェックポイント阻害作用をもつことが報告されている (Glodde N, Immunity 2017)。

抗 PD-1 抗体に代表される免疫チェックポイント阻害薬は、すでに免疫細胞の浸潤がみられる "hot tumor" には威力を発揮するが、免疫反応が乏しい "cold tumor" には有効ではなく、これを hot にする手法を併用する「複合的がん免疫療法」が有効と目されている。そのような手法として注目されているのが「がんウイルス療法」である。ウイルス療法は、遺伝子改変により腫瘍選択性と腫瘍殺傷性を付与した腫瘍溶解性ウイルス (oncolytic virus; OV) を主として腫瘍内に投与し、癌細胞を選択的に殺傷しようとする開発された治療であるが、その効果のかなりの部分が免疫学的機序によることが示されている。すなわち、OV が腫瘍細胞を殺すとともに腫瘍巣の免疫抑制環境を打破した後、OV によって活性化した樹状細胞が死んだ腫瘍細胞を貪食し、ネオ抗原を含む多様な腫瘍抗原を提示して抗腫瘍 T 細胞反応を誘導する。ワクシニアウイルスの複製・増殖には、感染細胞における MAPK (ERK) 経路の活性化が必須であり、研究分担者の中村貴史はこれを活かした遺伝子組換えワクシニアウイルス MDRV003 (MAPK-dependent recombinant vaccinia virus 003) を開発した (未発表)。

以上より、肺癌に対して MET 阻害薬と MDRV003 を併用することは、両者の直接的な腫瘍殺傷効果とともに、MET 阻害薬の免疫チェックポイント阻害作用と MDRV003 の免疫賦活作用の併用効果 (すなわち複合的がん免疫療法) という、複数の直接・間接の抗腫瘍効果をもたらす強力かつ合理的な治療法になると期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトおよびマウスの肺癌細胞株を用いた *in vitro*, *in vivo* の系により、MET 阻害薬と OV が併用効果をもつことを示す。さらに、OV によって惹起される免疫活性化を MET 阻害薬が増強する機序を、免疫原性細胞死の有無や腫瘍浸潤リンパ球を調べることにより明らかにする。以上により、肺癌に対する MET 阻害薬とワクシニアウイルスの併用療法に向けた基礎的知見を確立する。

3. 研究の方法

(1) ヒト・マウス肺癌細胞株に対する MDRV003 の殺細胞効果

多数のヒトおよびマウス肺癌細胞株を用い、ERK 発現および MDRV003 の殺傷作用を評価する。

(2) ヒトおよびマウス肺癌細胞株に対する MET 阻害薬の殺細胞効果

上記の実験で用いたヒトおよびマウス肺癌細胞株が MET 阻害薬 (PHA-665752, tepotinib) で死滅するかどうかを調べる。MDRV003 と MET 阻害薬のいずれでも死滅する細胞株を以下の実験に用いる。

(3) MDRV003 と MET 阻害薬の併用効果

MDRV003 と MET 阻害薬の併用によりヒト肺癌細胞株に対する直接的な殺細胞効果が高まるかどうかを、*in vitro* の系および免疫不全マウスを用いた *in vivo* の系で調べる。

マウス肺癌細胞株を用い、同系マウスに2個の皮下腫瘍を形成させ、一方にのみ MDRV003 を腫瘍内投与する。また MET 阻害薬を腹腔内投与する。これらの単独および併用療法を行い、MDRV003 が非投与部位の腫瘍にも (免疫学的に) 抗腫瘍効果をもたらすか、MDRV003 と MET 阻害薬の併用により抗腫瘍効果が増強するかどうかを調べる。

(4) MDRV003, MET 阻害薬の併用効果の免疫学的機序

MDRV003 の腫瘍内投与は、ウイルス増殖による直接的な抗腫瘍効果をもたらすと同時に、投与部位および非投与部位に抗腫瘍免疫反応を惹起すると想定される。そこで腫瘍内のウイルスの存在を PCR で、また、腫瘍内のリンパ球浸潤の状態を免疫染色で調べる。また *in vitro* の系で、免疫原性細胞死の指標である ATP と HMGB1 の発現を調べる。

4. 研究成果

(1) 7つのヒト肺癌細胞株および1つのマウス肺癌細胞株における ERK 発現をウエスタンブロットで評価し、すべての細胞での ERK 発現を認めた。また MDRV003 により多くの肺癌細胞株は死滅したが、その感受性 (死滅するウイルス量 (MOI)) は様々であった。

(2) 多くの肺癌細胞株は tepotinib 10 μ M に感受性があり、細胞死を認めた。ヒト肺腺癌細胞株 A549、ヒト肺扁平上皮癌細胞株 EBC-1、およびマウス肺腺癌細胞株 3LL は MDRV003 および

tepotinib とともに感受性があり死滅したため、これらの細胞株を以下の実験に用いた。
(3)MDRVV003 と tepotinib の併用により A549、EBC-1、3LL は濃度依存性に死滅し、併用効果が示された。また、C57BL/6 マウスの皮下の 2 か所に 3LL を接種し、腫瘍を形成させた。その後、MDRVV003 を片方の腫瘍に接種し、tepotinib を腹腔内投与した。その結果、コントロール (MDRVV003 も tepotinib もなし) と比較して MDRVV003 あるいは tepotinib のみでも腫瘍増大は抑制されたが、両者の併用により抑制効果は最も強かった。また MDRVV003 を投与した腫瘍の増大抑制が強かったが、非投与腫瘍も tepotinib がなくても増大抑制が認められた。
(4)ワクシニアウイルスの PCR では、MDRVV003 投与腫瘍 8 のうち 7 に、非投与腫瘍 8 のうち 5 にワクシニアウイルスが検出された。これらはワクシニアウイルスが投与部位から離れた病巣にも移行し、抗腫瘍効果を発揮することを示す。また腫瘍の CD4 と CD8 陽性細胞の免疫染色では、MDRVV003 投与および非投与腫瘍内ともに MDRVV003 と tepotinib との併用時に最も多く浸潤していることが判明した。さらに A549 の培養上清では MDRVV003 添加後に ATP が増加し、細胞内 HMGB1 も増加していた。これらは免疫原性細胞死を示唆する所見である。これらの結果から、MDRVV003 は、ウイルスによる直接的な癌細胞殺傷作用のみではなく免疫原性細胞死を惹起し間接的な抗腫瘍効果を発揮すること、tepotinib は直接作用に加え、免疫反応を介した抗腫瘍効果をもたらすことが示唆された。

引用文献

Kanaji N, Yokohira M, Nakano-Narusawa Y, Watanabe N, Imaida K, Kadowaki N, Bandoh S. Hepatocyte growth factor produced in lung fibroblasts enhances non-small cell lung cancer cell survival and tumor progression. *Respir Res.* 2017 Jun 15;18(1):118.

Glodde N, Bald T, van den Boorn-Konijnenberg D, Nakamura K, O'Donnell JS, Szczepanski S, Brandes M, Eickhoff S, Das I, Shridhar N, Hinze D, Rogava M, van der Sluis TC, Ruotsalainen JJ, Gaffal E, Landsberg J, Ludwig KU, Wilhelm C, Riek-Burchardt M, Müller AJ, Gebhardt C, Scolyer RA, Long GV, Janzen V, Teng MWL, Kastenmüller W, Mazzone M, Smyth MJ, Tüting T, Hölzel M. Reactive Neutrophil Responses Dependent on the Receptor Tyrosine Kinase c-MET Limit Cancer Immunotherapy. *Immunity.* 2017 Oct 17;47(4):789-802.e9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井上 卓哉、大原 靖弘、坂井 健一郎、渡邊 直樹、坂東 修二、金地 伸拓
2. 発表標題 肺癌に対する腫瘍溶解性ワクシニアウイルスとテボチニブ併用による抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 日本呼吸器学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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	中村 貴史 (Nakamura Takafumi) (70432911)	鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授 (15101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------