

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08760

研究課題名(和文) プレオマイシンと免疫チェックポイント阻害薬の併用による悪性黒色腫の治療

研究課題名(英文) Therapy for melanoma with the combination of bleomycin and immune checkpoint inhibitors

研究代表者

門野 岳史 (Kadono, Takafumi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：80292910

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)：悪性黒色腫はホク口由来の皮膚がん、容易に転移し予後が悪い。本研究ではマウスの悪性黒色腫モデルを用いて、がん免疫を高める免疫チェックポイント阻害薬である抗PD-1抗体に抗がん剤の一種でDNA障害性の強いプレオマイシンを併用したところ、悪性黒色腫の成長速度が低下することが分かった。また、その機序として腫瘍局所への細胞浸潤と炎症性サイトカインの増加が考えられ、更に所属リンパ節も増大し、腫瘍局所に移行するT細胞が増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性黒色腫は容易に転移し予後が悪い皮膚がんである。近年、がん免疫を高める免疫チェックポイント阻害薬や特定の遺伝子異常を標的とする分子標的薬が登場し、従来よりも生存率が向上したが、未だ十分とは言えない。本研究では、マウスの実験ではあるが、免疫チェックポイント阻害薬による治療にDNA障害性の強い抗がん剤であるプレオマイシンを併用することで、免疫チェックポイント阻害薬単独治療の場合よりも悪性黒色腫の成長速度が低下することが分かり、人への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Malignant melanoma, a skin cancer derived from moles, generally has a poor prognosis with frequent metastasis. In this study, we used mouse model of melanoma and treat the tumor with bleomycin, an anti-cancer agent that exerts strong DNA damage, in addition to anti-PD-1 antibody, an immune checkpoint inhibitor that enhances tumor immunity. We found that the combination therapy retarded the tumor growth and the possible mechanism includes strong inflammatory cell infiltration and augmentation of inflammatory cytokines. We also found that regional lymph nodes were enlarged with the increase of T cells that have the capacity to migrate into the tumor.

研究分野：皮膚悪性腫瘍

キーワード：悪性黒色腫 PD-1 CTLA-4 プレオマイシン

## 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫による死亡数は増加の一途を辿っており、進行期に対する治療は著しく困難である。近年、抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体が免疫チェックポイント阻害薬として登場し、従来の治療を超える効果を挙げているものの、奏効率は3割程度にとどまっている。最近抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体の併用療法が登場し、3年生存率が58%にまで達したものの、副作用も強く、免疫関連有害事象と言われる様々な自己免疫疾患が生じる。ことに、抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体の併用療法では、ほぼ全例で有害事象がみられ、グレード3以上のものに限っても50%を超える。従って、より効果が高く、副作用が少ない治療法が切に求められている。

PD-1 は免疫を負に制御する分子で、主に活性化した CD8 陽性 T 細胞の抑制に重要と考えられている。抗 PD-1 抗体はこれらの CD8 陽性 T 細胞を再活性化することにより、腫瘍免疫を高めると考えられており、抗 PD-1 抗体が効果を発揮するためには、抑制のかかった腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞が存在することが重要とされている。また、PD-1 は CTLA-4 とともに新たに活性化 T 細胞が形成される際に重要である共刺激分子の CD28 を抑制することによっても免疫を制御する。さらに、CTLA-4 は制御性 T 細胞の免疫抑制機能に不可欠と考えられている。従って、抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体といった免疫チェックポイント阻害薬を用いることで、抑制された腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞を再活性化すること、新たな腫瘍特異的 CD8 陽性 T 細胞を生み出すこと、そして制御性 T 細胞の機能を阻害することによって効果を発揮すると考えられている。これら免疫チェックポイント薬の欠点としては、PD-1 および CTLA-4 は免疫全般に働き、腫瘍特異的に働くとは言いがたいことである。そのため、副作用として様々な免疫関連有害事象をきたし、副作用で命を落とすことも稀ではない。

免疫チェックポイント阻害薬が効果を発揮する前提条件として、適切な腫瘍抗原を認識して腫瘍細胞を攻撃する T 細胞が不可欠である。我が国における悪性黒色腫は、非露光部の末端黒子型が多く、露光部で紫外線の影響下にある悪性黒色腫と比べると遺伝子異常の数が少ない。その結果腫瘍抗原の多様性が乏しく、それが欧米人の悪性黒色腫と比較して免疫チェックポイント阻害薬が効きにくい要因と考えられている。腫瘍抗原には色々の種類があるが、重要なのは腫瘍細胞の遺伝子変異に伴い産生される異常タンパクからの neoantigen である。Neoantigen は正常細胞にはみられないことより、腫瘍選択性が高く、腫瘍免疫の鍵と考えられている。Neoantigen を増やす手法としては、放射線照射が知られており、免疫チェックポイント阻害薬との併用によって治療効果が増強することが近年種々の癌腫で報告されている。また、抗腫瘍薬投与によっても neoantigen が増えることが知られ、特に DNA 障害性のものが有用とされている。

これまで、免疫チェックポイント阻害薬と種々の薬剤とを組み合わせることにより、より効果が高く、副作用の少ない治療法が模索されている。抗腫瘍薬投与はリンパ球を殺傷することで免疫チェックポイント阻害薬の作用を損ねると考えられがちである。しかしながら前述の通り、“抗腫瘍薬投与は腫瘍を障害する際に neoantigen を放出させることで、免疫チェックポイント阻害薬と相乗効果をもたらすことを狙い、本研究の立案に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、免疫チェックポイント阻害薬に抗腫瘍薬を加えることで、より効果的な悪性黒色腫に対する治療を目指すことである。しかしながら、抗腫瘍薬には様々な種類があり、どの薬剤を選択するかというのが大きな問題であるが、免疫チェックポイント阻害薬と抗腫瘍薬の併用に関する臨床試験は乏しい。また、実臨床ではダカルバジンとの併用が行われているが、有効性についてははっきりしないのが現状である。本研究は DNA 障害性で neoantigen の放出が期待できる抗腫瘍薬で、しかも造血器障害や免疫抑制といった副作用が少ないプレオマイシンを併用してマウスの腫瘍の大きさを比較することにより検討を行う。また、その際にどのような現象が起こっているのかについて、免疫組織学的検討、局所のサイトカイン産生などを検討し、具体的な機序についての検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) マウスの悪性黒色腫モデル

本研究に必要なマウスは野生型マウスである C57BL/6 マウスであり、日本エスエルシーより随時購入し、聖マリアンナ医科大学動物実験施設にて飼育を行う。悪性黒色腫細胞としては B16 を用いる。B16 は C57BL/6 マウスに生着し、一般的には免疫原性は高くないとされる。腫瘍の発育速度を考えて B16F1 で行うが、可能であればより増殖速度の速い B16F10 も用いる。実験には 7~12 週齢のマウスを用いる。5x10<sup>5</sup> 個の腫瘍細胞を PBS に懸濁し、マウスの背部に皮内注射す

る。治療の開始時期としては、腫瘍を注射して1週間後（予防モデル）および腫瘍が大凡確認できる段階である2週間後（治療モデル）の2通りで行う。抗 PD-1 抗体(RMP1-14)もしくは抗 CTLA-4 抗体(9H10)各々5mg/kgの量を5日間間隔で腹腔内に2回投与する。また、腫瘍局所には300 $\mu$ gのプレオマイシンを2日間間隔で腫瘍部に3回局注する。予備実験として治療モデルで行った抗 PD-1 抗体を用いた群(右2匹)と抗 PD-1 抗体とプレオマイシン局所注射とを併用した群(左2匹)の腫瘍の写真を示す。この結果をもとに治療モデルと予防モデルで実験を行い、腫瘍の大きさにどのような変化が出るかについて検討する。各解析について各々最低10匹のマウスを用いる。

#### (2) 悪性黒色腫病変の組織学的検討

腫瘍の増大の様子に依存するが、悪性黒色腫細胞を背部に接種して3週間の時点で、背部の腫瘍を全層性に採取する。組織を半割し、H&E染色を行う。好中球、リンパ球、組織球に関しては浸潤細胞数を計測する。また、トルイジンブルー染色によって肥満細胞数を測定する。腫瘍組織を半割した残りは凍結し、免疫組織学的解析を行う。マクロファージ特異的な抗体であるF4/80、抗 CD4 抗体 (RM4-5)、抗 CD8 抗体 (53-6.7)、抗 CD11c 抗体 (HL3) および皮膚 DETC に特異的に発現する T 細胞レセプターである抗 TCR V $\beta$  3 鎖抗体 (536) で染色する。また、抗 PD-1 抗体を用いた場合、PD-1 のリガンド発現が予後因子として知られているため抗 PD-L1 抗体(10F.9G2) および抗 PD-L2 抗体(TY25)による染色も行う。

#### (3) 悪性黒色腫腫瘍病変に浸潤する炎症細胞もしくは末梢血のフローサイトメトリーによる検討

悪性黒色腫細胞を背部に接種して21日後に、腫瘍組織を採取する。組織を細かく裁断し、0.27% collagenaseD、3000IU/ml dispase、0.125% hyaluronidase、0.01% DNase を10%FBC入りRPMI1640に加え、37 $^{\circ}$ C、2時間 incubate し、血球細胞を分離する。また、末梢血からも血球細胞を分離する。細胞は蛍光色素で標識した前述の抗体を用い、フローサイトメトリーにて解析する。

#### (4) Real-time PCR によるサイトカイン、細胞成長分子の mRNA 発現の定量的解析

悪性黒色腫細胞を背部に接種して21日後の腫瘍組織におけるサイトカイン、細胞成長分子の mRNA 発現を real-time PCR 法にて定量的に測定する。具体的には、Th1 サイトカインであるインターフェロン $\gamma$ 、IL-12 など、Th2 サイトカインである IL-4、腫瘍の線維化に関連する IL-13、IL-10、transforming growth factor- $\beta$ 、IL-17などを測定する。

上記の実験を一通り行い、腫瘍局所や末梢血で具体的にどのような違いが免疫チェックポイント薬単剤と併用療法の間にもみられるかを調べる。それ以降の実験はそれまでに得られた結果によるが、マイクロアレイを用いて単剤群と併用療法とを比較したり、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 Fc $\gamma$  抗体を用いて CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、Fcレセプターを阻害し、どれが腫瘍免疫に最も効いているかなどを検討したりする。全体を通じて本研究で明らかにしたいのは、免疫チェックポイント阻害薬とプレオマイシン局所投与の併用療法が有効であるかどうかである。それに加えて、その際の生体内でのパラメーターがどのように変化しているか評価し、その機序まで解析を進めた。

## 4. 研究成果

免疫チェックポイント阻害薬に DNA 障害性の抗腫瘍薬であるプレオマイシンを併用し、抗腫瘍効果に加えて neoantigen を誘導することで免疫チェックポイント阻害薬と相乗的に作用し、悪性黒色腫に対する治療効果を高める検討を行った。16F1 悪性黒色腫細胞を C57BL/6 マウス背部に20万個打ち、腫瘍が形成された段階で、抗 PD-1 抗体もしくは抗 CTLA-4 抗体を10mg/kg 腹腔内に2回投与し、加えて腫瘍局所に300 $\mu$ gのプレオマイシンを局所注射し、その後の腫瘍の成長速度を計測した。免疫チェックポイント阻害薬単剤で使用した場合は、抗 PD-1 抗体の方が抗 CTLA-4 抗体よりも良好な結果が得られたため、以降は抗 PD-1 抗体を主に用いた。抗 PD-1 抗体単剤投与と群と比較するとプレオマイシンの局所注射をした群の方が腫瘍の成長速度が予防モデル及び治療モデルの両方で低下した。また、マウスによっては寛解を得られた例もあったが、極めて少数例であった。これらのマウスより接種して3週間の時点で腫瘍組織を取り出し、H&E染色を行ったところ、腫瘍の成長速度が低下したマウスではマクロファージやリンパ球の浸潤細胞の増加が見られた。次いで、CD4 や CD8、さらには Gr-1 及び F4/80 を用いた免疫染色を行い、浸潤細胞のプロファイルについて検討を行った。浸潤細胞数は腫瘍の大きさに影響を受けるため、腫瘍の大きさを揃えて数値化したところ、抗 PD-1 抗体腹腔内投与にプレオマイシンの局所注射を加えることで、腫瘍周囲の CD4 や CD8 及び F4/80 陽性細胞が増加していた。Gr-1 陽性の好中球については明確な差はみられなかった。抗 PD-L1 抗体および抗 PD-L2 抗体を用いた免疫染色も行ったが明確な差は見られなかった。

次に、腫瘍組織においてどのようなサイトカインの産生が見られるかに関して、接種して3週間の時点で腫瘍組織からの mRNA を用いて、Real time PCR を行なったところ、抗 PD-1 抗体とプレオマイシンとを併用した群で、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の増加がみられた。但し、IL-10 も増加がみられ、これに関しては全般的に浸潤細胞の増加に伴うことによる可能性が考えられた。この結果より、抗 PD-1 抗体に加えてプレオマイシン局所注射を加えることで、全般的な炎症性サイトカインの増加により腫瘍抑制効果が増強したことが考えられた。更に、接種して3週間の時

点での皮膚所属リンパ節を用いてフローサイトメトリーを行った。抗 PD-1 抗体とブレオマイシンとを併用した群では細胞数の増加がみられ、CD44<sup>high</sup> の CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の両者が増加していた。また、皮膚にホーミングしやすいと考えられる CD44<sup>high</sup> CD4CCR7 陽性 T 細胞の数も増加していた。以上より、ブレオマイシンと免疫チェックポイント阻害薬の併用により、腫瘍の成長速度が抑制され、機序としては浸潤細胞と炎症性サイトカインの増加によることが考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeuchi S, Kawakami T, Okano T, Shida H, Nakazawa D, Tomaru U, Ishizu A, Kadono T	4. 巻 89(1)
2. 論文標題 Elevated Myeloperoxidase-DNA Complex Levels in Sera of Patients with IgA Vasculitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 23-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000519869	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 Ohashi H, Takeuchi S, Miyagaki T, Kadono T	4. 巻 14(3)
2. 論文標題 Increase of lymphocytes and eosinophils, and decrease of neutrophils at an early stage of anti-PD-1 antibody treatment is a favorable sign for advanced malignant melanoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Drug Discov Ther	6. 最初と最後の頁 117-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5582/ddt.2020.03043	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 Mochizuki T, Miyagaki T, Tamaki M, Takeuchi S, Kadono T	4. 巻 11
2. 論文標題 -Hydroxybutyrate Reduces Psoriasiform Dermatitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of St Marianna University	6. 最初と最後の頁 153-159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.17264/stmarieng.11.153	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 門野 岳史	4. 巻 79
2. 論文標題 メラノーマの治療戦略 概論	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本臨牀	6. 最初と最後の頁 243-249
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 門野岳史
2. 発表標題 メラノサイト系病変のダーモスコピー所見
3. 学会等名 第84回日本皮膚科学会東京支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大橋 洋之, 竹内 そら, 宮垣 朝光, 門野 岳史, 伊澤 直樹
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬により出現した皮疹の検討
3. 学会等名 第37回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------