

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：37114
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2018～2019
課題番号：18H06267・19K21359
研究課題名(和文) 消化器癌に対する免疫チェックポイント阻害剤を用いた革新的がん免疫複合療法の開発
研究課題名(英文) Development of innovative combined cancer immunotherapy using immune checkpoint blockade for digestive cancers
研究代表者
岡野 慎士 (Okano, Shinji)
福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授
研究者番号：10380429
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：がん免疫複合療法(CCI)において、免疫チェックポイント阻害剤(IC)と現行治療の相互作用に関する知見収集が緊急的課題。マウス大腸癌接種モデルにて、CCI抗腫瘍効果機序、併用薬剤投与時期の原理原則を検討。化学療法(C)の免疫原性腫瘍細胞死と腫瘍特異的CTL(TC)誘導、続くPD-1抗体による腫瘍内IFN- γ 産生性CD4、CD8T細胞及びTCの劇的な上昇を確認、化学療法後にPD-1抗体を投与するタイミングが重要であった(TCの生体内抗腫瘍効果発揮のためにPD-1抗体投与必須)。Cは腫瘍細胞のみならず、骨髄由来抑制性細胞やTCを減少させた。選択的細胞死を誘導する薬剤開発が有効な新規CCIとなる。

研究成果の学術的意義や社会的意義
免疫原性腫瘍細胞死から腫瘍抗原特異的T細胞誘導及び抗腫瘍効果に至る「殺細胞治療関連がん免疫サイクル」を考慮に入れた効率の良いがん複合免疫療法の投与レジメ検討の提唱と新規がん免疫複合療法の開発の一つの標的を提案することができ、がん患者の予後改善のために本研究分野の更なる推進と応用が期待されることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：It is important to obtain knowledge about interaction between immune checkpoint inhibitors (ICs) and current standard cancer treatments in combined cancer immunotherapy (CCI). We assessed mechanisms of antitumor effects in the CCI and basic principle for the administration timing of combined drugs using mouse colon adenocarcinoma models. The chemotherapy induced immunogenic cancer cell death and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (TC) responses, and dramatically increased numbers of IFN-gamma producing CD4 and CD8 T cells and TC within the tumors, suggesting that the administration order of the chemotherapy followed by the anti-PD-1 antibody was important (anti-PD-1 treatment was essential for in vivo anti-tumor effects by TC). Chemotherapy reduced not only tumor cell numbers, but also numbers of myeloid-derived suppressor cells and TC. Development of drugs to selectively induce cell death of specific target cells is a promising strategy for new CCIs.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：癌免疫療法 免疫チェックポイント阻害剤 癌集学的治療 癌抗原特異的T細胞 癌ゲノム不安定性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に対する治療は、外科治療、化学療法、放射線療法、分子標的薬などが実地の臨床で施行されており、進行癌症例における予後及びQOL改善に大きく寄与している。一方で、抗腫瘍免疫応答、中でも抗原特異的なT細胞性免疫は、腫瘍の発生抑制及び臨床的に検出不可能な病巣を含む広汎な転移巣(癌細胞)並びに局所再発を抑制することが可能で、個体の能動的治癒力による悪性腫瘍の根絶に威力を発揮する。近年、免疫チェックポイント阻害剤の登場により、患者のT細胞性腫瘍免疫応答を負に制御する分子の抑制により、頭頸部扁平上皮癌、悪性黒色腫、腎細胞癌、肺非小細胞性肺癌、卵巣癌、消化管癌、肝癌および尿路上皮癌等の一部の症例で、驚異的な持続的臨床効果を認めることが報告されている¹⁾²⁾。特にProgrammed cell death-1 (PD-1)/PD-1 ligand-1 (PD-L1)阻害剤の効果は腫瘍内にリンパ球が高度に浸潤する亜型やmicrosatellite instability(MSI)が高く、変異によってcancer neoantigenを産生しやすい癌腫において有効とされている³⁾⁴⁾。現在、標準的化学療法と免疫チェックポイント阻害剤を併用する(がん免疫複合療法と呼ぶ)臨床試験が進行中であるが、その奏効率及び副作用発生率は様々で、例えば非小細胞性肺癌ではplatinum/pemetrexed-based chemotherapyとの併用効果が米国The Food and Drug Administration (FDA)によって認可されている一方で、多発性骨髄腫に対するサリドマイド誘導体との併用では、奏効率の増強を認めず、逆に副作用の重症化により臨床試験が中止されている。このように、免疫チェックポイント阻害剤を用いるがん集学的治療において、適切な併用薬剤の選択法、投与量、時期についての原理原則並びに現行の標準的癌治療法が与える、ゲノム不安定性を獲得している腫瘍細胞と腫瘍内微小環境への作用や腫瘍特異的T細胞応答の活性化状態あるいは免疫チェックポイント阻害剤の感受性への影響等の詳細な作用機序は未解明のまま、各癌腫のがん免疫複合療法遂行の障壁となっている。

2. 研究の目的

マウス消化器癌腫瘍モデルを用いて、時空間的な腫瘍抗原特異的T細胞応答(T細胞のエピジェネティックな変化と抗PD-1抗体の感受性並びに化学療法に対する影響等)、癌細胞の治療反応性及び腫瘍内微小環境に着目し、がん免疫複合療法の抗腫瘍効果の詳細な分子機序と薬剤の交互作用を検討し、併用薬剤の選択法、投与時期の原理原則を明らかにする。更に、Immunologic synthetic lethalityによる新規がん免疫複合療法を目指す。

3. 研究の方法

マウス大腸癌モデルを利用し、化学療法と抗PD-1併用療法を施行し、両者が与える腫瘍抗原特異的T細胞、腫瘍内微小環境、癌細胞への影響を検討する。

(検討項目)

i) マウス消化器癌モデルによるがん免疫複合療法の原理原則の構築

マウス消化器癌腫瘍皮下接種モデルを用い、標準的癌治療法(化学療法)と抗PD-1抗体併用療法の奏功性と薬剤の最適な投与時期を検討する。

ii) 標準療法が与えるT細胞応答、特に腫瘍抗原特異的T細胞(テトラマー解析による腫瘍抗原特異的T細胞をモニター)への影響を検討する。

フローサイトメーターを用いて、化学療法投与前後のエフェクターT細胞{CD4 T細胞(Th1)、細胞傷害性キラーCD8T細胞(CTL)}の質的(IFN- γ などのサイトカイン産生能、PD-1、TIM-3などの免疫チェックポイント関連分子発現、CD62L、CD44などのメモリーマーカーの発現、Nr4aなどの疲弊化T細胞のエピジェネティックな変化の検出)及び量的変化(腫瘍内浸潤T細胞数、脾臓・所属リンパ節内のT細胞数、アポトーシス数)を検討する。

iii) がん免疫複合療法前後での腫瘍内微小環境(腫瘍内微小血管密度、骨髄由来抑制性細胞)の質的量的変化を明らかにする。

iv) immunologic synthetic lethalityを誘導する標的分子として、HDAC阻害剤のQuinostatを併用したがん免疫複合療法の効果を検討する。

4. 研究成果

i) マウス消化器癌モデルによるがん免疫複合療法の原理原則の構築

マウス大腸癌を用いた腫瘍皮下接種モデルにおいて、標準的化学療法と抗PD-1抗体併用療法の奏功性と最適な投与時期を検討した。本研究で利用した大腸癌細胞株CT26は抗PD-1抗体療法の効果が得られにくい非DNA mismatch repair (MMR)欠損大腸癌で、腫瘍上のPD-L1の発現も確認した。約10mmの固形癌形成後に、FOLFIRI療法{5-フルオロウラシル(5FU)、ホリナート(LV)、イリノテカン(CPT-11)}及び抗PD-1抗体を投与した。化学療法後、免疫原性細胞死時に上昇するhigh-mobility group box 1 (HMGB1)が有意に上昇し、それと同時に、*in vitro*での腫瘍特異的な細胞傷害(CTL)活性を認めた(図1)5)。

化学療法後に抗PD-1抗体を投与することによって、腫瘍内にIFN- γ 産生性のCD4及びCD8T細胞が劇的に上昇すること、化学療法がない場合、抗PD-1抗体による有意な腫瘍特異的CTL活性の誘導やIFN- γ 産生性T細胞応答の上昇が全く見られなかったことから、最適な抗腫瘍効果を発現するためには、抗PD-1抗体の投与前に化学療法を施行する必要があることが判明した。活性化抗原特異的T細胞応答による生体内の抗腫瘍効果発揮のためには抗PD-1抗体の投与が必須であった(図2)5)。

治療後の腫瘍細胞を回収し、PD-L1発現を検討したところ、化学療法後にPD-L1発現の上昇を認められた。このPD-L1の上昇はヌードマウスで見られなかったことより、化学療法によって惹起されたT細胞応答によって、adaptive resistanceが増強され、そのため、化学療法単独ではT細胞応答による抗腫瘍効果が発揮できないと考えられた。

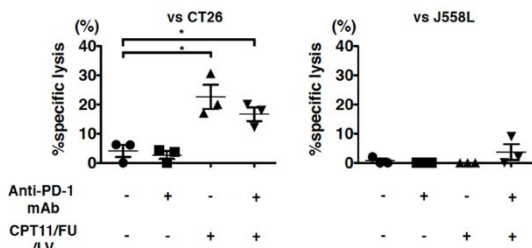


図1 大腸癌CT26に対するがん免疫複合療法後のCT26特異的細胞障害活性。Balb/cマウスにCT26を皮下接種、腫瘍を形成させ、皮下接種7日後に治療を開始した。実験群は未治療(PBS)群(●, n=3)、FOLFIRI(CPT-11/FU/LV)単独群(▲, n=3)、抗PD-1抗体単独群(■, n=3)、あるいは併用療法群(▼, n=3)とした。腫瘍接種後13日目に所属リンパ節及び脾臓を回収し、マイマイシンC処理をしたCT26と5日間共培養し、エフェクター細胞を作成後、CT26(左図)あるいはサードパーティーのJ558L(右図)に対する細胞障害活性(エフェクター細胞:腫瘍細胞=100:1)を測定した。それぞれのドットは各個体からのデータで、水平線は平均の% specific lysis、エラーバーは標準誤差を示している。統計解析はANOVA及びBonferroni's post hoc testを使用した(*P<0.05)。

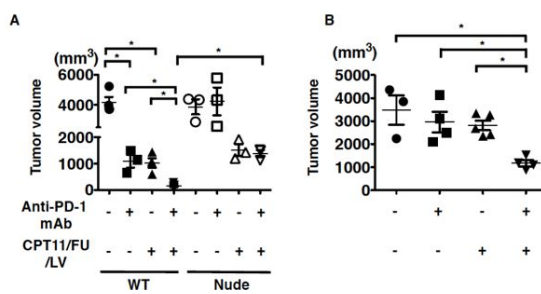


図2 大腸癌CT26に対するがん免疫複合療法の抗腫瘍効果。Balb/cマウス(黒ドット)あるいはBalb/cヌードマウス(白ドット)にCT26を皮下接種し、腫瘍を形成させ、皮下接種7日後(A)及び14日後(B)に治療を開始した。実験群は未治療(PBS)群(●), FOLFIRI(CPT-11/FU/LV)単独群(▲), 抗PD-1抗体単独群(■), あるいは併用療法群(▼)とした。図は腫瘍接種後27日目(A)あるいは30日目(B)の腫瘍体積を示している。それぞれのドットは各個体からのデータで、水平線は平均腫瘍体積、エラーバーは標準誤差を示している。統計解析はANOVA及びBonferroni's post hoc testを使用した(*P<0.05)。

ii) 標準療法が与える腫瘍抗原特異的T細胞への影響

テトラマーをもちいてCT26の抗原特異的T細胞応答を経時的に検討した。化学療法の投与によって、所属リンパ節及び脾臓、腫瘍内において、CD8中のCT26特異的CD8T細胞の割合及び総数が上昇し、抗PD-1抗体投与により増強された。

初回化学療法開始後13日目の所属リンパ節及び脾臓内のCT26抗原特異的T細胞は、TIM-3+PD-1+あるいはTIM-3-PD-1+が大多数を占めていたが、腫瘍内のCT26抗原特異的T細胞は大多数が疲弊化したTIM-3+PD-1+であった。

初回化学療法後6日目に再度、5FU/LV単独、CPT-11単独、CDDP単独、5FU/LV+CPT11投与し、1週後のCT26抗原特異的T細胞を検討した。化学療法単独によって、CT26抗原特異的T細胞は全群において低下した。5FU/LV+CPT11併用群では相加的に数的減少が観察された。しかし、腫瘍が残存している場合はその後増加した。腫瘍がない場合、追加で2度の化学療法を行った場合、CT26抗原特異的T細胞は更に減少した。

iii) がん免疫複合療法前後での腫瘍内微小環境の質的量的変化

がん免疫複合療法前後で、腫瘍内微小血管密度及び骨髄由来抑制性細胞の減少が観察された。しかし、骨髄由来抑制性細胞は4日目に低下した後、7日目には再増殖した。

がん免疫複合療法での抗PD-1抗体投与によって、腫瘍内血管周囲のリンパ球浸潤が増強し、腫瘍の壊死巣の拡大がみられた。

iv) HDAC阻害剤・Quinostatのimmunologic synthetic lethality誘導の検討

Quinostatの投与により、抗腫瘍効果は増強されたが、この効果はヌードマウスでも観察された。野性型マウスにおいて、Quinostatの併用しない化学療法+PD-1抗体投与による抗腫瘍効果と比較し、薬剤投与後の腫瘍の迅速な再増殖を観察し、腫瘍特異的T細胞応答に対して抑制作用がある可能性が示唆された。

(まとめ)

化学療法による免疫原性腫瘍細胞死の誘導と腫瘍特異的CTLの誘導、その後の抗PD-1抗体による腫瘍内IFN- γ 産生性CD4及びCD8T細胞の劇的な上昇と抗腫瘍効果増大が確認されたことにより、化学療法後にPD-1抗体を投与するタイミングが重要であることが判明した。テトラマーを用いた腫瘍抗原特異的T細胞応答のシングルセル解析により、化学療法による腫瘍細胞の免疫原性細胞死から惹起された腫瘍抗原特異的T細胞応答が抗PD-1抗体により量的・質的に増強されることが判明した。その後の化学療法では、検討した全ての薬剤により腫瘍抗原特異的T細胞数が一過性に減少するが、腫瘍の残存によりその数は漸増した。従って、化学療法自体は活

性化された腫瘍抗原特異的T細胞に細胞死を誘導するが、再度の腫瘍抗原の免疫システムへの暴露により再活性化されると考えられた。しかし、腫瘍がない場合は、化学療法により漸減したことから、投与中止のタイミングも重要であることが示唆された。今回検討した化学療法は骨髄由来抑制性細胞も含めて全ての細胞の減少を誘導する。しかし、骨髄由来抑制性細胞の減少は一過性でそのリバウンドによる増加は著しく、腫瘍抗原特異的T細胞減少と相まって、抗腫瘍効果に負の影響を与えている可能性がある。従って、骨髄由来抑制性細胞と腫瘍細胞のみを標的とするなどの選択的な細胞死誘導薬剤の開発が有効な新規がん免疫複合療法の一つとなる可能性が示唆された。

immunologic synthetic lethalityを誘導する標的分子として、活性化されたT細胞の疲弊化を防ぐ可能性も期待して、エピゲノム調節剤であり、抗腫瘍効果を惹起するHDAC阻害剤のQuinostatを併用したが、結果的にはT細胞依存性の抗腫瘍効果の有意な上昇が見られなかった。T細胞のエピゲノム調整剤の開発は発展途上であり、更なる研究の進展が望まれる。

<引用文献>

- 1) Barber D. L., Wherry E. J., Masopust D., Zhu B., Allison J. P., Sharpe A. H., Freeman G. J. and Ahmed R.: Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006; 439:682-687.
- 2) Topalian S. L., Hodi F. S., Brahmer J. R., Gettinger S. N., Smith D. C., McDermott D. F., Powderly J. D., Carvajal R. D., Sosman J. A., Atkins M. B., Leming P. D., Spigel D. R., Antonia S. J., Horn L., Drake C. G., Pardoll D. M., Chen L., Sharfman W. H., Anders R. A., Taube J. M., McMiller T. L., Xu H., Korman A. J., Jure-Kunkel M., Agrawal S., McDonald D., Kollia G. D., Gupta A., Wigginton J. M. and Sznol M.: Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366:2443-2454.
- 3) Bijlsma M. F., Sadanandam A., Tan P. and Vermeulen L.: Molecular subtypes in cancers of the gastrointestinal tract. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14:333-342.
- 4) Le D. T., Durham J. N., Smith K. N., Wang H., Bartlett B. R., Aulakh L. K., Lu S., Kemberling H., Wilt C., Luber B. S., Wong F., Azad N. S., Rucki A. A., Laheru D., Donehower R., Zaheer A., Fisher G. A., Crocenzi T. S., Lee J. J., Greten T. F., Duffy A. G., Ciombor K. K., Eyring A. D., Lam B. H., Joe A., Kang S. P., Holdhoff M., Danilova L., Cope L., Meyer C., Zhou S., Goldberg R. M., Armstrong D. K., Bever K. M., Fader A. N., Taube J., Housseau F., Spetzler D., Xiao N., Pardoll D. M., Papadopoulos N., Kinzler K. W., Eshleman J. R., Vogelstein B., Anders R. A. and Diaz L. A., Jr.: Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* 2017; 357:409-413.
- 5) 岡野慎士: 消化器がんにおける免疫チェックポイント阻害剤を用いたがん免疫複合療法の開発. *Medical Science Digest* 2019; 45:720-723.

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 2件）

1. 著者名 Hiramoto T, Tahara M, Liao J, Soda Y, Miura Y, Kurita R, Hamana H, Inoue K, Kohara H, Miyamoto S, Hijikata Y, Okano S, Yamaguchi Y, Oda Y, Ichiyangi K, Toh H, Sasaki H, Kishi H, Ryo A, Muraguchi A, Takeda M, Tani K.	4. 巻 28
2. 論文標題 Non-transmissible MV Vector with Segmented RNA Genome Establishes Different Types of iPSCs from Hematopoietic Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Ther.	6. 最初と最後の頁 129-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ymthe.2019.09.007	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 Sudo S, Kajiya H, Okano S, Sasaki M, Katsumata Y, Ohno J, Ikebe T, Hiraki A, Okabe K.	4. 巻 111
2. 論文標題 Cisplatin-induced programmed cell death ligand-2 expression is associated with metastasis ability in oral squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 113-1123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14336.	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 Imai Daisuke, Yoshizumi Tomoharu, Okano Shinji, Itoh Shinji, Ikegami Toru, Harada Noboru, Aishima Shinichi, Oda Yoshinao, Maehara Yoshihiko	4. 巻 240
2. 論文標題 IFN- Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and the Expression of PD-L1 in Pancreatic Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Research	6. 最初と最後の頁 115 ~ 123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jss.2019.02.038	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 岡野 慎士	4. 巻 45
2. 論文標題 消化器がんにおける免疫チェックポイント阻害剤を用いたがん免疫複合療法の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 720-723
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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岡野慎士、沖英次、佐伯浩司、吉本尚平、工藤健介、木村光一、小田義直、森 正樹、前原喜彦、池田哲夫
2. 発表標題 Anti-PD1 treatment is essential for T-cell-dependent anti-tumor effects of FOLFIRI to a MMR-proficient mouse colon cancer
3. 学会等名 第108回日本病理学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡野慎士、沖英次、佐伯浩司、吉本尚平、工藤健介、木村光一、小田義直、森 正樹、前原喜彦、池田哲夫
2. 発表標題 非MMR欠損大腸癌モデルにおいてFOLFIRI療法によるT細胞依存性抗腫瘍効果発揮に抗PD-1抗体療法は必須である
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡野慎士、沖英次、小田義直、森 正樹、前原喜彦、池田哲夫
2. 発表標題 非MMR欠損大腸癌モデルにおいてFOLFIRI療法によるT細胞依存性抗腫瘍効果発揮に抗PD-1抗体療法は必須である
3. 学会等名 第24回日本外科病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡野慎士、沖英次、中司 悠、佐伯浩司、安藤幸滋、中島雄一郎、小田義直、吉本尚平、工藤健介、木村光一、前原喜彦、池田哲夫
2. 発表標題 Anti-programmed cell death 1 antibody enhances anti-tumor effect of chemotherapy with folinic acid, fluorouracil and irinotecan in a preclinical murine model of colon cancer
3. 学会等名 第29回日本消化器癌発生学会学術総会
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----