

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17650

研究課題名(和文) 抗PD-1抗体耐性機構に着目したNKT細胞活性化ベクターを用いた新規腹膜播種治療

研究課題名(英文) Novel peritoneal seeding therapy using NKT cell activation vector focused on anti-PD-1 antibody resistance mechanism

研究代表者

杉田 裕 (Sugita, Yutaka)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：70802346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍微小環境の形成は腫瘍細胞のみならず、様々な免疫細胞や間質細胞による。その中で骨髄由来抑制細胞(MDSC: Myeloid-derived suppressor cells)は、抑制性免疫細胞であり、腫瘍微小環境の構築に関与している。一方、腹膜播種に関する報告は少なく、検討は未だ十分とは言えない。そこで大腸癌腹膜播種マウスモデルを作成し、腹腔内MDSCの動態を解析し、腹膜播種の病勢への関与を検討した。結果、MC38の腹腔内投与後、腹腔内のMDSCは病勢の進行とともに増加した。腹腔内では特にPMN-MDSCの割合が増加した。抗Ly6G抗体によるMDSC消失試験では、腫瘍進行を抑制させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腹膜播種は胃癌の再発形式の45%を占め、死因の約60%は腹膜播種に伴う癌性腹膜炎とされているが、未だ有効な治療法がなく予後不良である。腹膜播種は抗PD-1抗体に効果が乏しいとされており、その新たな治療戦略の開発が必要である。研究提案者は腹膜播種の病態に腹腔内骨髄由来抑制細胞(MDSC)が関与することを明らかにした。腹膜播種の病態には腹腔内G-MDSCが強く関連することを見出した。MDSCを標的にした新たな治療の開発はCD8+T細胞などの抗腫瘍免疫を活性化することで、腹膜播種の治療に活路を見出すことを可能とする。

研究成果の概要(英文)：The tumor microenvironment is composed not only of tumor cells, but also of various immune cells and stromal cells. Among them, Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are suppressor immune cells and are involved in the establishment of the tumor microenvironment. On the other hand, there have been few reports on peritoneal seeding, and the studies are still insufficient. In this study, we created a mouse model of peritoneal dissemination of colorectal cancer, analyzed the dynamics of intraperitoneal MDSCs, and examined their involvement in the pathogenesis of peritoneal dissemination. The results showed that intraperitoneal MDSCs increased with disease progression after intraperitoneal administration of MC38. The proportion of PMN-MDSCs increased especially in the peritoneal cavity. Anti-Ly6G antibody-induced MDSC disappearance studies inhibited tumor progression.

Translated with www.DeepL.com/Translator (free version)

研究分野：癌免疫

キーワード：腹膜播種 抗PD-1抗体 MDSC NKT細胞

1. 研究開始当初の背景

腫瘍微小環境の形成は腫瘍細胞のみならず、様々な免疫細胞や間質細胞による。CD4+/CD8+ T細胞、NK細胞などは抗腫瘍効果に非常に重要な作用を持つが、免疫細胞の中にはそれらの細胞障害性細胞に抑制的に働く免疫細胞も数多くある。その中で骨髄由来抑制細胞(MDSC: Myeloid-derived suppressor cells)は、抑制性免疫細胞であり、腫瘍微小環境の構築に関与している。これは主に monocytic-MDSC (M-MDSC) と polymorphonuclear-MDSC(PMN-MDSC)の2つのサブタイプからなり、担癌宿主生体内で蓄積する。これまで我々は、マウスモデルにおいて生体内でのMDSCの蓄積が病勢を反映する事を示してきた。

腹膜播種は近年の化学療法剤の開発にもかかわらず、未だ有効な治療法がなく予後不良である。それらの背景がありながら、MDSCと腹膜播種に関する報告は少なく、検討は未だ十分とは言えない。従って、腹膜播種の病態を明らかにし、有用な治療法を模索することが非常に重要である。MDSCの制御に加えて腫瘍反応性CD8+T細胞の誘導と抗PD-1抗体耐性の解除が重要である。我々が開発したNKT細胞活性化ワクチンは、腫瘍反応性T細胞を誘導することを確認しており、さらにMDSCの制御と抗PD-1抗体耐性の解除にも有効である可能性がある。本ワクチンを用いて、NKT細胞を介した免疫制御基盤技術の確立と腹膜播種難治性の克服が期待される。

2. 研究の目的

腹膜播種マウスモデルを作成し、腹腔内MDSCの動態を解析し、腹膜播種の病勢への関与を明らかにすることを目的とした。また腹膜播種の病態に関与するメカニズムを解明し、新たな治療法を開発、模索することを目的とした。

3. 研究の方法

C57BL/6マウスに大腸癌細胞株MC38を腹腔内投与し、腹膜播種モデルを作成した。腹膜播種の進行とともに、経時的にマウスを犠牲し、脾臓・末梢血・腹腔内のMDSCの変化をフローサイトメトリーにより解析した。さらにPMN-MDSCを含むLy6G陽性細胞を減少させる、抗Ly6G抗体の投与により、抗腫瘍効果を解析した。腫瘍量の解析にはルシフェラーゼ付加MC38細胞株を用いて経時的にIVIS (*In vivo imaging system*)で測定する事で定量化を行い、Ly6G陽性細胞の病態進行との関連を検討した。

腹膜播種治療に使用する方法として、PD-1阻害剤を投与後に我々が開発したNKT細胞活性化ワクチンを用いて治療を行うことを想定する(図1)。

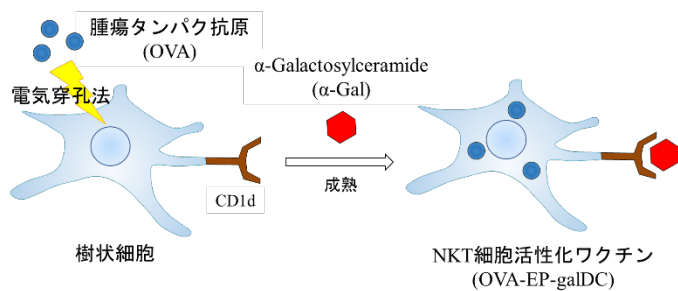


図1. NKT細胞活性化ワクチンの開発

4. 研究成果

我々は腹膜播種マウスモデルを確立した。まず腹膜播種モデルに抗PD-1抗体の治療効果を再検討した。皮下摂取モデルと違い、腹膜播種モデルでは抗PD-1抗体は有効な治療効果をしめさなかった。そこで腹膜播種モデルにおける抗PD-1抗体耐性のメカニズムを解析することとした(図2)。

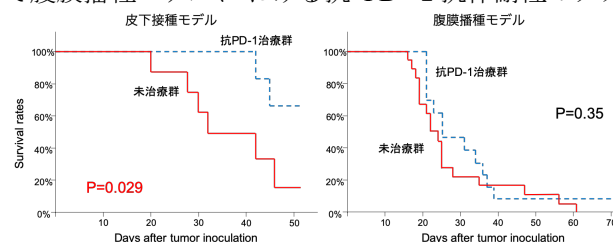


図2. 腹膜播種モデルにおけるPD-1阻害剤抵抗性

腹膜播種結節には免疫細胞がほとんど存在しないため、腫瘍微小環境を評価するために、腹膜播種結節ではなく腹腔に注目した。腹膜播種の進行に伴いマウスの腹水量が増加しており、腹水を解析の対象とすることとした。その結果、腹腔内の PMN-MDSCs は腹膜播種の進行に伴い、大幅に増加していた。これらの結果から、腹腔内の PMN-MDSCs が腹膜播種の進行と治療抵抗性に強く関与している事が示唆された (図 3)。

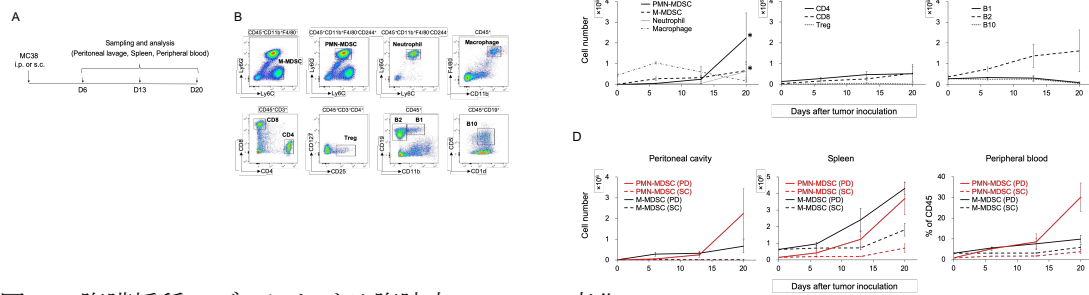


図 3. 腹膜播種モデルにおける腹腔内 MDSC の変化

次に CD244 が PMN-MDSCs の同定に有用であることを表現型、機能的に検証した。CD244 は T 細胞に対する増殖抑制機能を高度に有し、免疫抑制関連分子を発現していることを明らかにした (図 4)。

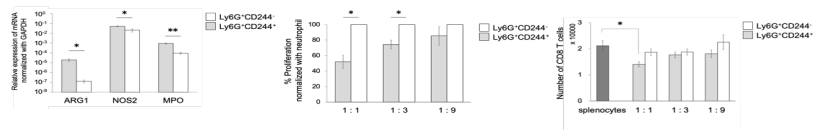


図 4. CD244⁺細胞の免疫抑制分子の発現と T 細胞増殖抑制能

腹腔内ではインターロイキン (IL) -6 と顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) の濃度が有意に上昇しており、これらはいずれも腫瘍から産生されて PMN-MDSCs の増加に寄与しているものと考えられた (図 5)。SC は通常の腫瘍モデルを示す。

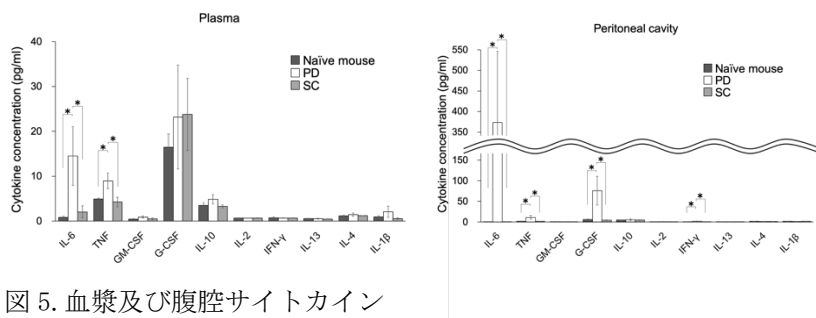


図 5. 血漿及び腹腔サイトカイン

PMN-MDSCs を抑制することで腹膜播種の進行を抑制できるのではないかと考え、その PMN-MDSCs を枯渇させる抗 Ly6G モノクローナル抗体 (mAb) を投与するモデルを作成した。結果として抗 Ly6G モノクローナル抗体 (mAb) による *in vivo* での PMN-MDSCs の枯渇は、腹膜播種の進行を著しく抑制した (図 6)。

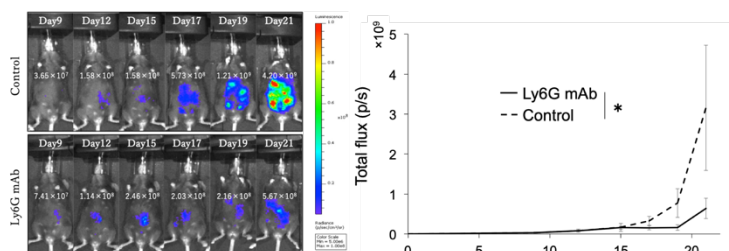


図 6. PMN-MDSC 欠失試験による腹膜播種の病勢の制御

驚くべきことに、腹腔内および末梢血中の CD4⁺/CD8⁺ T 細胞を回復させた (図 7)。PMN-MDSCs の枯渇によって腫瘍免疫微小環境における抑制性免疫が阻害され、抗腫瘍効果に重要な CD4⁺/CD8⁺ T 細胞の再活性化をもたらしたと考えられた。

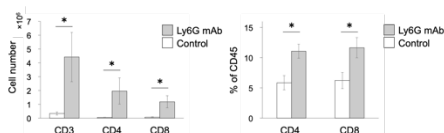


図 7. PMN-MDSC の欠失による T 細胞の回復 (末梢血、腹腔を示す)

これらの結果は、PMN-MDSCs の標的治療が、新たな治療価値をもたらすだけでなく、腹膜播種に対する T 細胞ベースの免疫療法と相乗効果をもたらす新しい戦略であることを示唆している。ただ、T 細胞の抑制機能と PD-1 経路の関係は未だ明らかでなく、このメカニズムを検討することが重要であると考えられた。

次に NKT 細胞活性化ワクチンの有用性について検討した。まず、腫瘍予防モデルにての検証を行なった。我々の独自開発した NKT 細胞活性化ワクチン (OVA-EP-galDC) の *in vivo* での腫瘍予防効果の検証を行った。OVA-EP-galDC を接種後に腫瘍皮下接種(EG7: ova8 導入した EL4)を行い、腫瘍が完全に拒絶されることを示した (図 8)。

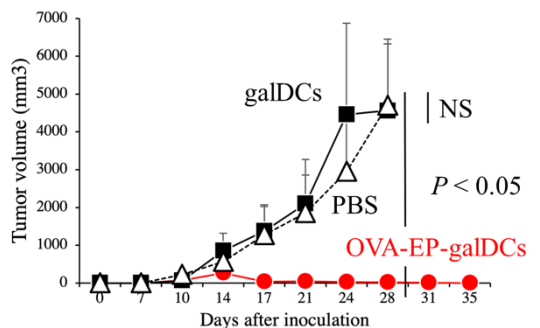


図 8. 腫瘍予防モデルにおける抗腫瘍効果 皮下摂取予防モデルを示す。

NKT 活性化ワクチン(OVA-EP-galDC)は皮膚における抗原特異的な CD8⁺T 細胞の誘導を確認し、さらに抗原特異的なレジデントメモリーT 細胞(T_{RM})の誘導も確認した (図 9)。

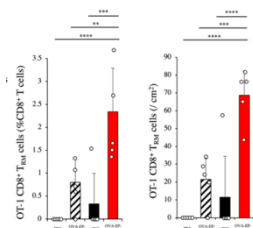


図 9. 皮下腫瘍摂取時の皮膚での T_{RM} の誘導

腹膜播種モデルでは MDSC を標的とした場合、腹腔を含む全身性 T 細胞の数の回復が期待できる。その上で、NKT 活性化ワクチンを投与すれば、強力な抗腫瘍効果が望めると考えられる。引き続き、研究を行い、腹膜播種モデルにおける MDSC 欠失と NKT 細胞活性化ワクチン療法の相乗効果を検証していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sugita Yutaka, Yamashita Kimihiro, Fujita Mitsugu, Saito Masafumi, Yamada Kota, Agawa Kyosuke, Watanabe Akihiro, Fukuoka Eiji, Hasegawa Hiroshi, Kanaji Shingo, Oshikiri Taro, Matsuda Takeru, Nakamura Tetsu, Suzuki Satoshi, Kakeji Yoshihiro	4. 巻 45
2. 論文標題 CD244+ polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells reflect the status of peritoneal dissemination in a colon cancer mouse model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2021.8057	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田 康太、山下 公大、杉田 裕、渡部 晃大、瀧口 豪介、裏川 直樹、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、松田 武、押切 太郎、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 腹膜播種の病勢に腹腔内骨髄由来抑制細胞が及ぼす影響と、治療標的としての可能性
3. 学会等名 第41回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田 康太、山下 公大、杉田 裕、阿河 杏介、渡部 晃大、瀧口 豪介、裏川 直樹、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、松田 武、押切 太郎、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 大腸癌腹膜播種の病勢に骨髄由来免疫抑制細胞が及ぼす影響とその治療応用
3. 学会等名 第31回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下 公大、杉田 裕、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、押切 太郎、松田 武、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 腹膜播種における骨髄由来免疫抑制性細胞の働きとその治療応用
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------