

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16790

研究課題名（和文）膀胱癌に対するCD47-SIRPシグナル系を利用した新たな免疫がん治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel immunocancer therapy for bladder cancer using the CD47-SIRP signaling system.

研究代表者

坂本 茉莉子（Sakamoto, Mariko）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：80834564

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、転移性膀胱がんに対する新たながん免疫療法の確立を目指し、がん治療薬の有効性評価を行った。膀胱がんに対する抗PD-L1抗体の有用性は既に証明されているが、さらに抗SIRP抗体を併用することによって、マクロファージの膀胱がん細胞に対する貪食効果を高めることができ、腫瘍モデルマウスにおいても単剤に比して併用群でより強い腫瘍成長抑制効果を認めることができた。さらに、腫瘍内の免疫細胞を解析すると、2剤併用群において腫瘍排除に携わるCD8陽性T細胞の割合が増えていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗PD-L1抗体と抗SIRP抗体を併用することで、膀胱癌に対し単剤に比してより強い抗腫瘍効果を認めることができたが、併用療法による抗腫瘍効果にはマクロファージが大きく寄与しており、マクロファージのがん細胞貪食が起点となって、腫瘍内の環境が癌排除の方向へと変容し、T細胞の呼び込みに繋がっている可能性が示唆された。詳細については更なる解析が必要であるが、抗PD-L1抗体が効きにくいとされるT細胞浸潤が少ない腫瘍に対しても併用療法が有効であり、新たな併用療法の1つとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The efficacy of anti-PD-L1 antibody against bladder cancer has already been proven. In this study, we evaluated the efficacy of anti-PD-L1 and anti-SIRP antibody combination therapy as a cancer therapeutic agent, aiming to establish a new cancer immunotherapy against metastatic bladder cancer. The combination therapy of anti-PD-L1 and anti-SIRP antibody enhanced the phagocytosis of macrophages against bladder cancer cells. Furthermore, a stronger tumor growth suppression effect was observed in the combination therapy group compared to the monotherapy group in tumor bearing model mice. Furthermore, analysis of immunocompetent cells in bladder tumors showed that the proportion of CD8-positive T cells which were involved in tumor elimination was increased in the combination therapy group.

研究分野：泌尿器悪性腫瘍

キーワード：がん免疫療法 抗体療法 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

筋層浸潤性膀胱癌に対する薬物療法においては、1次治療としてMVAC療法(メトトレキサート、ビンブラスチン、ドキソルビシン、シスプラチン)、GC療法(ゲムシタピン、シスプラチン)などの化学療法が確立されているものの、これら白金製剤を中心とした抗がん剤加療に続く2次治療の開発は長らく進んでおらず、約30年近くの間停滞期にあった。そうした状況の中、2017年12月に抗PD-1抗体ペムブロリズマブが癌化学療法後に増悪した根治切除不能な尿路上皮癌に対して承認され、膀胱癌治療は1つのブレークスルーを迎えた。さらに、抗PD-L1抗体の臨床使用も始まり、免疫チェックポイントは今や第4のがん治療の柱となり、現在の癌治療においてなくてはならない存在となった。しかしながら、実際、筋層浸潤性膀胱癌に対しても一定の抗腫瘍効果を示しているものの、転移性膀胱癌に対する抗PD-L1抗体単剤でのresponse rateは15-25%前後とまだまだ十分な効果とは言い難い現状もあり、更なる新たな治療法の開発が急がれている。

上述の通り、膀胱癌のみならず、様々な癌種において、免疫療法の有用性が再注目されている。癌は、免疫抑制性の微小環境を確立することによって、免疫応答からの回避を誘発している。腫瘍微小環境は、組織に存在する線維芽細胞や血管内皮細胞などの細胞、マクロファージなどの自然免疫細胞、さらにT細胞などの獲得免疫細胞で構成されているが、中でも、T細胞が腫瘍細胞の排除に大きな役割を担っており、このT細胞からの免疫回避機構を制御する抗PD-1/PD-L1抗体や抗CTLA-4抗体が現在使用されている免疫チェックポイント阻害薬の中心となっている。しかしながら、その他の腫瘍内浸潤免疫細胞、中でも腫瘍に浸潤したマクロファージは、免疫抑制性の性質腫瘍の発生、進行、転移に強く関与していることが知られており、近年、癌治療の基礎となる腫瘍内マクロファージの機能改変にも注目が集まっている。

実際マクロファージは腫瘍に対する抗体依存性殺細胞活性のエフェクターとしても機能することが実証されており、マクロファージの免疫チェックポイント阻害薬では、T細胞の免疫チェックポイントを阻害する治療法のように腫瘍の遺伝的不安定性は重要ではなく、新たに出現するネオアンチゲンを認識する必要はないとされている。

マクロファージの免疫チェックポイントとしては、CD47-SIRP系が知られており、SIRPはマクロファージ上に存在する7回膜貫通型タンパク質であり、マクロファージの貪食作用の調節因子として機能している。膜型分子であるSIRPは膜型分子のCD47と細胞間シグナル伝達システムCD47-SIRP系を構成しており、がん細胞上のCD47とマクロファージ上のSIRPが結合すると、マクロファージによるがん細胞の貪食が負=抑制的に制御されることが過去の研究で明らかになっている。また、逆にこのCD47-SIRP結合を阻害する抗SIRP抗体が、貪食細胞によるがん細胞の貪食排除を増強し、前臨床試験においても抗腫瘍効果をもたらすことも明らかとなっており、抗SIRP抗体に関しては進行性固形がんに対し、第1相臨床試験が行われている。

以上のように、マクロファージというT細胞とは異なる抗腫瘍効果を司る自然免疫細胞に焦点を当てた治療と、抗PD-1/PD-L1抗体というT細胞による殺腫瘍活性を増強する治療法を組み合わせることで、自然免疫系、獲得免疫系、双方からのアプローチが可能であり、更なる抗腫瘍効果を得ることが期待できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、新たながん免疫治療のアプローチとして、マクロファージによるがん抗原を認識する分子標的薬を介した抗体依存性細胞貪食活性(ADCP)に注目し、膀胱癌に対するCD47-SIRPシグナル系を利用した新たな免疫がん治療法の開発を主たる目的とした。

3. 研究の方法

がん抗原を認識する分子標的薬として抗PD-L1抗体を使用し、これと抗SIRP抗体を併用することによって、より強い抗腫瘍効果を発揮することができるかどうかを評価した。

In vitroでの貪食実験:

蛍光標識したマウス(MB49およびMBT2)及びヒト膀胱癌細胞(HT1197およびT24)と、マウス(C57BL/6およびC3H/HeN)骨髄由来マクロファージ及びヒト臍帯血由来マクロファージを抗体存在下に共培養した後に、細胞を回収し、フローサイトメーターを用いてマクロファージによるがん細胞の貪食率を以下の式の形で評価した。

(貪食率= 蛍光ラベルされた癌細胞を取り込むことによって、蛍光標識をまとったマクロファージの数/マクロファージ全体の数*100)

In vivo での抗体薬効評価：

マウス (C57BL/6 および C3H/HeN) 皮下に膀胱癌細胞 (MB49 および MBT2) を移植した腫瘍モデルマウスを作成し、これらに抗体薬を腹腔内投与した後に腫瘍サイズを経時的に測定し、腫瘍増殖抑制効果について評価した。

また、腫瘍移植モデルマウスに抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CSF-1R 抗体を投与し、T 細胞およびマクロファージが枯渇したモデルマウスを作成し、これらのマウスにおいても上述の抗体治療を施した後、腫瘍サイズがどう変化するかを評価した。(薬効に主にもどの細胞が強く関与しているのかを評価する為)

さらに、BALB/c ノードマウスに膀胱癌細胞を皮下移植したモデルマウスを作成し、こちらについても抗体薬投与の後の、腫瘍サイズについて評価を行った。

ヒト由来膀胱がん細胞株 (HT1197 および T24) に関しては、NOG マウス皮下に腫瘍細胞を打ち込み、腫瘍を定着させた腫瘍モデルマウスを作成し、上述のマウス由来膀胱癌細胞株の場合と同様に、抗体治療を行い、腫瘍サイズを測定して抗腫瘍効果の評価を行う。

in vivo 腫瘍内微小環境の評価：

上述の腫瘍モデルマウス (C57BL/6 および C3H/HeN) を安楽死させた後に抗体治療後の腫瘍を回収し、細胞を抽出した後に、フローサイトメーターにて、腫瘍浸潤免疫細胞の構成についても評価を行った。

4. 研究成果

in vitro でのマクロファージを用いた膀胱がん細胞の貪食実験では、抗 PD-L1 抗体、抗 SIRP 抗体単独投与群では有意な貪食率の増強効果は認められなかったのに比して、抗 PD-L1、抗 SIRP 抗体併用群においては、マクロファージによるがん細胞の貪食活性が有意に上がっていた。この結果は、マウス骨髄由来マクロファージ 対 マウス膀胱がん細胞 (MB49 および MBT2 共に) でも、ヒト臍帯血由来マクロファージ 対 ヒト膀胱がん細胞でも確認することができた (HT1197 および T24 とともに)。

さらに、膀胱がん細胞を皮下移植した腫瘍モデルマウスを作成し、これらのモデルマウスに抗体治療を施すことで、in vivo での抗体治療の抗腫瘍効果について評価を行った結果、単剤治療に比して 2 剤併用でより強い腫瘍抑制効果を認めた。この結果は、免疫不全 model BALB/c ノードマウスを用いた腫瘍モデルマウスでも効果は弱まったものの、同様に認められたことから、2 剤併用療法の抗腫瘍効果には、T 細胞の関与を除いた自然免疫系 (主にマクロファージ) に寄与する効果であると考えられた。また、実際、抗 CSF-1R 抗体投与によってマクロファージを枯渇させたモデルマウスを作成し抗体治療を行うと、2 剤併用による抗腫瘍効果が打ち消される結果となった。

次に腫瘍内浸潤免疫細胞についてフローサイトメーターを用いて解析した結果、2 剤抗体併用療法群において、T 細胞全体の浸潤比率があがり、中でも CD4 陽性 T 細胞の割合は減り、逆に CD8 陽性 T 細胞の比率が上がっていることが確認できた。

最後に NOG マウスを用い、ヒト膀胱癌由来細胞でも同様に in vivo での抗体薬併用の効果評価を試みたが、安定した腫瘍定着のモデルマウス作成が困難であり、こちらの評価については見送る形となった。

以上の結果から、抗 PD-L1 抗体と抗 SIRP 抗体を併用することで、膀胱癌に対し単剤に比してより強い抗腫瘍効果を認めることができたが、併用療法による抗腫瘍効果にはマクロファージが大きく寄与しており、マクロファージのがん細胞貪食が起点となって、腫瘍内の環境が癌排除の方向へと変容し、T 細胞の呼び込みに繋がっている可能性が示唆された。

詳細については更なる解析が必要であるが、この 2 剤の併用療法が、単なる相加効果だけでは留まらず、マクロファージおよび T 細胞という異なる免疫細胞をターゲットにしなが、互いに影響を及ぼし合い、相乗効果となって、一般的に免疫チェックポイント阻害剤が効きにくいとされる、T 細胞浸潤が少ない腫瘍に対しても有効となる新たな併用療法の 1 つとなる可能性が示唆された。

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 Mariko Saeki
2. 発表標題 膜型分子SIRP /SIRP 1特異抗体による腫瘍関連マクロファージを介した腫瘍制御
3. 学会等名 第111回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2024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
---------	---------