

Title	抗腫瘍免疫ネットワークのキー操作技術開発による効果的な複合がん免疫療法の構築
Sub Title	Development of effective immunotherapy by combining interventions on key points in the anti-tumor immune network
Author	河上, 裕(Kawakami, Yutaka) 工藤, 千恵(Kudo, Chie) 藤田, 知信(Fujita, Tomonobu) 桜井, 敏晴(Sakurai, Toshiharu) 塚本, 信夫(Tsukamoto, Nobuo) 大多, 茂樹(Ota, Shigeki) 谷口, 智憲(Yaguchi, Tomonori)
Publisher	
Publication year	2014
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2013. )
JaLC DOI	
Abstract	日本で第一死因であるがんに対して有効ながん免疫療法を開発するために、がんに対する免疫応答における重要な制御ポイントに対する免疫制御法(免疫が起きやすくするがん細胞の破壊法、抗がん剤に耐性ながん幹細胞の免疫標的、リンパ球や樹状細胞などの免疫細胞に作用して免疫誘導を増強する方法、がん患者で抑制されている免疫状態を改善する方法など)の開発を行った。さらにこれらの制御法を組み合わせて、治療効果を高める複合的がん免疫療法の開発を進めた。本研究成果は、将来、臨床試験での検証を経て、効果的ながん免疫療法の開発につながる可能性がある。 In this study, we have attempted to develop effective cancer immunotherapy by combining immune-regulating interventions on multiple important points in the cancer related positive and negative immune responses. We have developed and evaluated the following interventions; 1) interventions to induce immunogenic cancer cell death, 2) cancer antigens expressed in cancer stem cells which are resistant to chemotherapy, 3) interventions to stimulate antigen presenting dendritic cells for anti-cancer T-cell activation, 4) interventions to activate anti-cancer T-cells, 5) interventions to reverse cancer-induced immunosuppression. Using mouse tumor models, we have evaluated cancer immunotherapies in which the above interventions are appropriately combined, particularly with immune-checkpoint blockade therapies. These results may lead to development of more effective cancer immunotherapies through evaluation in the future clinical trials.
Notes	研究種目 : 基盤研究(A) 研究期間 : 2011 ~ 2013 課題番号 : 23240128 研究分野 : 総合領域 科研費の分科・細目 : 腫瘍学・腫瘍免疫学
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_23240128seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_23240128seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23240128

研究課題名（和文）抗腫瘍免疫ネットワークのキー操作技術開発による効果的な複合がん免疫療法の構築

研究課題名（英文）Development of effective immunotherapy by combining interventions on key points in the anti-tumor immune network

研究代表者

河上 裕 (Kawakami, Yutaka)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：50161287

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 37,700,000 円、（間接経費） 11,310,000 円

研究成果の概要（和文）：日本で第一死因であるがんに対して有効ながん免疫療法を開発するために、がんに対する免疫応答における重要な制御ポイントに対する免疫制御法（免疫が起きやすくするがん細胞の破壊法、抗がん剤に耐性ながん幹細胞の免疫標的、リンパ球や樹状細胞などの免疫細胞に作用して免疫誘導を増強する方法、がん患者で抑制されている免疫状態を改善する方法など）の開発を行った。さらにこれらの制御法を組み合わせて、治療効果を高める複合的がん免疫療法の開発を進めた。本研究成果は、将来、臨床試験での検証を経て、効果的ながん免疫療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have attempted to develop effective cancer immunotherapy by combining immune-regulating interventions on multiple important points in the cancer related positive and negative immune responses. We have developed and evaluated the following interventions; 1) interventions to induce immunogenic cancer cell death, 2) cancer antigens expressed in cancer stem cells which are resistant to chemotherapy, 3) interventions to stimulate antigen presenting dendritic cells for anti-cancer T-cell activation, 4) interventions to activate anti-cancer T-cells, 5) interventions to reverse cancer-induced immunosuppression. Using mouse tumor models, we have evaluated cancer immunotherapies in which the above interventions are appropriately combined, particularly with immune-checkpoint blockade therapies. These results may lead to development of more effective cancer immunotherapies through evaluation in the future clinical trials.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：がん免疫療法 肿瘍抗原 樹状細胞 T細胞 免疫抑制 免疫チェックポイント阻害

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会により、日本では、がんが第一死因となっているが、標準治療(手術、化学療法、放射線療法)では約半数の患者を治癒できないので、新しい機序によるがん治療法の開発が期待されている。免疫療法はその一つとして長年期待されてきた。近年、腫瘍抗原特異的T細胞を投与する養子免疫療法では、進行がんに対しても治療効果が示されたが、能動免疫法(がんワクチン)では期待されたほどの治療効果は得られておらず、世界的に免疫療法の大幅な改良が期待されている。研究代表者は、生体内での腫瘍の免疫的拒絶には、内在性腫瘍抗原に対する免疫応答の誘導が重要であり、そのためには抗腫瘍免疫ネットワークにおける複数のキーポイントに対する免疫制御法の開発・改良と、それらを適切に組み合わせた複合的がん免疫療法の開発が必要であることを提言してきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、抗腫瘍免疫ネットワークの複数のキーポイントに対する免疫制御法を開発・改良し、標的の異なる制御法を適切に組み合わせることにより、効果的な複合的がん免疫療法を開発することを目指した。

### 3. 研究の方法

本研究では、以下の方法により、抗腫瘍免疫ネットワークにおける異なる標的を制御する技術を開発・評価し、それらの併用による効果的ながん免疫療法の開発を進めた。

(1)内在性腫瘍抗原を免疫誘導が起こりやすい形で放出させる生体内腫瘍破壊法を見つけるために、凍結融解療法などの物理的方法、化学療法や分子標的薬などの各種抗がん剤の抗腫瘍免疫誘導効果を、マウス腫瘍モデルを用いて評価した。

(2)再発の原因となるがん幹細胞に発現し、がん細胞の増殖生存にも関与する腫瘍抗原を同定するために、side population法やスフェアーフォーム法で分画したヒトがん幹細胞様細胞を用いて、*in vitro*実験で腫瘍抗原の候補を同定し、さらにヒトがん細胞移植マウスモデルやマウス腫瘍モデルを用いて、腫瘍抗原の性質を解析した。

(3)樹状細胞が効果的に腫瘍抗原を取り込んでT細胞に抗原提示・活性化させる方法を開発するために、新規Toll様受容体(TLR)刺激化合物や転写因子阻害法などを*in vitro*実験、およびマウス腫瘍モデルで評価した。

(4)抗腫瘍T細胞を生体内で増殖活性化させる方法として、生体内でのT細胞活性化作用をもつ抗CTLA-4抗体や抗PD-L1抗体、あるいは*ex vivo*培養活性化抗腫瘍T細胞を用いた

方法を、マウス腫瘍モデルで評価した。

(5)担がん生体の免疫抑制病態を改善する方法を開発するために、各種シグナル伝達分子阻害剤や転写因子阻害剤、サイトカインやケモカインに対する抗体、各種免疫抑制性細胞に発現する分子に対する抗体等を、*in vitro*実験、およびヒトがん細胞移植マウスやマウス腫瘍モデルを用いて評価した。

(6)治療効果の高い複合的がん免疫療法を開発するために、上記で同定した免疫制御技術を組み合わせて、マウス腫瘍モデルで、治療効果の高い複合的がん免疫療法を評価した。

### 4. 研究成果

(1)抗腫瘍免疫を誘導できる生体内腫瘍破壊法の評価

マウス腫瘍モデルでの実験により、凍結融解療法(cryoablation)やアントラサイクリンアナログ化学療法剤であるMitoxantroneは、他の免疫増強剤との併用により、抗腫瘍T細胞誘導を介した治療効果を増強することを明らかにした。さらにチロシンキナーゼ阻害剤(TKI)などの分子標的薬は、マウス腫瘍モデルやヒトがん細胞移植マウスモデルでの実験により、直接的ながん細胞増殖抑制効果に加えて、がん細胞からの免疫抑制性サイトカインの産生低下や各種免疫細胞の免疫誘導作用を高めることにより、抗腫瘍T細胞の誘導増強を介した治療効果増強作用をもつことを明らかにした。

(2)樹状細胞のT細胞活性化能増強法の開発

樹状細胞活性化作用やI型インターフェロン(IFN-I)産生作用をもつTLR刺激性低分子化合物の投与は、抗腫瘍T細胞の誘導やNK細胞の活性化の促進により抗腫瘍効果を増強するアジュバント活性をもつことを、マウス腫瘍モデルの実験で明らかにした。さらにシグナル伝達分子阻害剤の中には、ヒト*in vitro*実験、およびマウス腫瘍モデルでの実験により、直接的に樹状細胞に作用して、抗腫瘍T細胞活性化作用を増強する化合物があることを明らかにした。特にSTAT3をshRNAで阻害した樹状細胞はがん細胞が分泌する免疫抑制性分子に対する抵抗性をもち、STAT3低下樹状細胞の腫瘍内投与は、免疫抑制環境にある腫瘍内でも、抗腫瘍T細胞誘導を介した抗腫瘍効果増強作用をもつことが判明し、がんの細胞免疫療法へ応用できる可能性が明らかになった。

(3)がん幹細胞に発現し、がん細胞の増殖生存に関与するヒト腫瘍抗原の同定

Side population法で分画したヒトがん幹細胞様細胞に高発現する分子に対して、*in vitro*で誘導したT細胞は、ヒトがん細胞を認識傷害することを明らかにした。スフェアーフォーム

能で分画したヒトがん幹細胞様細胞に発現する腫瘍抗原は、siRNA実験により、がん幹細胞様細胞の増殖にも関与することが判明し、がん幹細胞の排除に有用なだけでなく、腫瘍抗原の消失による免疫逃避が起こりにくい可能性を明らかにした。

#### (4) 抗腫瘍T細胞活性化法の評価

抗腫瘍T細胞を生体内で増殖活性化させる方法として、最近、マウス腫瘍モデルと臨床試験でその効果が証明された免疫チェックポイント阻害療法の中から、抗CTLA-4抗体と抗PD-L1抗体の投与の効果、および *in vitro* 培養活性化抗腫瘍T細胞の投与の効果を、他の免疫制御剤を併用する複合的がん免疫療法の基盤技術として、マウス腫瘍モデルを用いて評価した。

#### (5) 担がん生体免疫抑制機構の解明と克服法の開発

担がん生体においては、がん細胞の各種がん遺伝子活性化・シグナル伝達亢進を起点として、IL6, IL10, VEGFなどの複数の免疫抑制性サイトカインやケモカインの産生、また制御性T細胞(Treg)、骨髓由来免疫抑制細胞(MDSC: Myeloid derived suppressor cell)、寛容性樹状細胞、間葉系幹細胞などの各種免疫抑制性細胞群の誘導・動員により、がん組織や所属リンパ節などのがん微小環境では抗腫瘍免疫抑制的な環境が形成されることを明らかにした。

さらに、ヒト細胞を用いた *in vitro* 実験、およびマウス腫瘍モデルでの実験により、がん細胞で活性化した異常シグナルを阻害するシグナル伝達分子阻害剤や転写因子阻害剤ががん細胞への直接的作用による免疫抑制性サイトカインの産生抑制に加えて、各種免疫細胞にも作用して、その免疫抑制性の減弱効果や抗腫瘍免疫誘導の増強効果をもつことを明らかにした。また免疫抑制力スケードの作動に関与するケモカインや免疫抑制性細胞群が発現する分子に対する抗体などの投与により、抗腫瘍T細胞誘導増強を介した治療効果の増強が可能であることを明らかにした。

#### (6) 上記で同定した標的の異なる免疫制御法を併用した複合的がん免疫療法の開発と臨床試験の可能性の検討

上記で異なるキー制御ポイントに対する作用を評価した各種免疫制御技術を組み合わせた複合的がん免疫療法を、マウス腫瘍モデルを用いて検討した。特に、最近、臨床試験で進行がんに対しても持続的ながん退縮効果を示し、その生体内での抗腫瘍T細胞活性化作用が示されているPD-1/PD-L1経路やCTLA-4経

路の阻害抗体との併用により、その治療効果を増強する免疫制御技術という観点から、複合的がん免疫療法の検討を行った。

ヒトがん細胞移植マウスやマウス腫瘍モデルを用いた実験により、複数のシグナル伝達分子阻害剤や転写因子阻害剤は、がん細胞による免疫抑制を直接的、あるいは間接的に改善して、樹状細胞やMDSCなどの自然免疫系細胞、および制御性T細胞や抗腫瘍エフェクターT細胞などの獲得免疫系細胞を制御することにより、抗腫瘍T細胞応答の増強を介して、抗PD-L1抗体や抗腫瘍T細胞の投与などの免疫療法の治療効果を増強できることが明らかになった。また、新規TLR刺激化合物は、Mitoxantroneや抗CTLA-4抗体や抗PD-L1抗体との併用により、抗腫瘍T細胞誘導を介した治療効果を増強できることが明らかになった。

#### (6) 本研究の意義

本研究により、抗腫瘍免疫応答において重要なキーポイントを制御する複数の技術を評価し、その有用性を示すことができた。最近、培養抗腫瘍T細胞を用いた養子免疫療法、および抗CTLA-4抗体や抗PD-1抗体/抗PD-L1抗体を用いて生体内で抗腫瘍T細胞を作動させる免疫チェックポイント阻害療法では、複数のがん種に対して、多発転移巣をもつ大きな進行がんに対しても、長期に持続する治療効果が得られることが臨床試験で示され、Science誌では、がん細胞ではなく免疫細胞を標的にした治療で進行がんを退縮させるという「がん治療のパラダイムシフト」を示した点で、Cancer immunotherapyは2013年度Breakthrough of the Yearに選ばれている。

しかし、まだ効果が認められない症例やがん種が存在するので、現在、効果が期待できる症例を選択できるバイオマーカーの探索と、効果が期待できない症例やがん種を効果が得られるように変える方法の開発とそれを併用した複合的がん免疫療法の開発が世界的に注目されている。またヒトではがん種や症例ごとに免疫病態が異なることが判明し、個々の免疫病態に応じた免疫制御技術を適切に組み合わせる複合的がん免疫療法の開発が期待されている。本研究で開発・評価した各種免疫制御技術は、今後の個別化複合的免疫療法の開発において、免疫チェックポイント阻害療法に加えて、その基盤技術候補となると考えられ、今後、臨床試験実施による検証が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計21件)

1. Nishio H, Yaguchi T, Sugiyama J, Sumimoto H, Umezawa K, Iwata T, Susumu

- N, Fujii T, Kawamura N, Kobayashi A, Park JH, Aoki D, Kawakami Y, Immunosuppression through constitutively activated NF-κB signaling in human ovarian cancer and its reversal by a NF-κB inhibitor, *British Journal of Cancer* in press 査読有
2. Kudo-Saito C, Yura M, Yamamoto R, Kawakami Y. Induction of immunoregulatory CD271+ cells by metastatic tumor cells that express human endogenous retrovirus H *Cancer Res.* 74(5): 1361-70, 2014 (DOI:10.1158/0008-5472.CAN-13-1349) 査読有
  3. Nakamura S, Yaguchi T, Kawamura N, Kobayashi A, Sakurai T, Higuchi H, Takaishi H, Hibi T, Kawakami Y. TGF-β1 in tumor microenvironments induces immunosuppression in the tumors and sentinel lymph nodes and promotes tumor progression. *J Immunother.* 37(2): 63-72, 2014 (DOI:10.1097/CJI.0000000000000011) 査読有
  4. Kudo-Saito C, Fuwa T, Murakami K, Kawakami Y. Targeting FSTL1 prevents tumor bone metastasis and consequent immune dysfunction. *Cancer Res.* 73(20):6185-6193,2013(DOI:10.1158/0008-5472.CAN-13-1364) 査読有
  5. Tano T, Okamoto M, Kan S, Bando T, Goda H, Nakashiro K, Shimodaira S, Koido S, Homma S, Fujita T, Sato M, Yamashita N, Hamakawa H, Kawakami Y. Immunochemoradiotherapy for Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma: Augmentation of OK-432-Induced Helper T Cell 1 Response by 5-FU and X-ray Irradiation Neoplasia. 15(7): 805-814, 2013 (DOI:10.1593/neo.13488) 査読有
  6. Kawakami Y, Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Iwata-Kajihara T, Nakamura S, Miyazaki J, Kawamura N, Hoon Park J, Popivanova B, Tsujikawa T. Improvement of cancer immunotherapy by combining molecular targeted therapy. *Frontiers in Oncology.* 36:1-7, 2013 (DOI: 10.3389/fonc.2013.00136) 査読有
  7. Tsujikawa T, Yaguchi T, Ohmura G, Ohta S, Kobayashi A, Kawamura N, Fujita T, Nakano H, Shimada T, Takahashi T, Nakao R, Yanagisawa A, Hisa Y, Kawakami Y. Autocrine and paracrine loops between cancer cells and macrophages promote lymph node metastasis via CCR4/CCL22 in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 132(12):2755-2766, 2013 (DOI: 10.1002/ijc.27966) 査読有
  8. Tano T, Okamoto M, Kan S, Nakashiro K, Shimodaira S, Yamashita N, Kawakami Y, Hamakawa H. Growth inhibition and apoptosis by an active component of OK-432, a streptococcal agent, via Toll-like receptor 4 in human head and neck cancer cell lines. *Oral Oncol.* 48(8): 678-685, 2012 (DOI:10.1016/j.oraloncology) 査読有
  9. Kudo-Saito C, Shirako H, Ohike M, Tsukamoto N, Kawakami Y. CCL2 is critical for immunosuppression to promote cancer metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 30(4):393-405,2012(DOI:10.1007/s10585-012-9545-6) 査読有
  10. Okabayashi K, Fujita T, Miyazaki J, Okada T, Iwata T, Hirao N, Noji S, Tsukamoto N, Goshima N, Hasegawa H, Takeuchi H, Ueda M, Kitagawa Y, Kawakami Y. Cancer-testis antigen BORIS is a novel prognostic marker for patients with esophageal cancer. *Cancer Sci.* 103(9): 1617-1624, 2012 (DOI:10.1111/j.1349-7006.2012.02355.x) 査読有
  11. Yaguchi T, Goto Y, Kido K, Mochimaru H, Sakurai T, Tsukamoto N, Kudo-Saito C, Fujita T, Sumimoto H, Kawakami Y. Immune suppression and resistance mediated by constitutive activation of Wnt/β-catenin signaling in human melanoma cells. *J Immunol.* 189(5):2110-2117, 2012 (DOI:10.4049/jimmunol.1102282) 査読有
  12. Iwata-Kajihara T, Sumimoto H, Kawamura N, Ueda R, Takahashi T, Mizuguchi H, Miyagishi M, Takeda K, Kawakami Y. Enhanced Cancer Immunotherapy Using STAT3-Depleted Dendritic cells with High Th1-Inducing Ability and Resistance to Cancer Cell-Derived Inhibitory Factors. *J Immunol.* 187(1):27-36,2011(DOI:10.4049/jimmunol.1002067) 査読有
- 〔学会発表〕(計 65 件)
1. Kawakami Y, Xu M, Nagumo H, Fujita T, Okamoto M, Sakurai T, Noji S, Sugiyama J, Hayakawa T, Nishio H, Yaguchi T. Different immunoenvironments among cancer patients-Possible Biomarkers and modification for effective cancer treatments., Cold Spring Harbor Conferences Asia, Tumor Immunolgy & Immunotherapy, Suzhou Dushu Lake Conference Center Suzhou, China, 2013/10/29
  2. Kawakami Y, Mechanisms for cancer induced immunosuppression in tumor associated microenvironment and their reversal by targeting altered signaling pathways in cancer cells and immune cells, CSH Asia/ICMS Joint Conference on Tumor Microenvironment, Suzhou Dushu Lake Conference Center, Suzhou, China, 2012/11/16
  3. Kawakami Y, Reversal of Multiple Cancer

- Induced Immunosuppressive Cascades by Molecular Targeted Therapy for Effective Immunotherapy, The 7<sup>th</sup> International Cancer Vaccine Symposium, Convitto Dlla Calza, Florence, Italy, 2012/9/12
4. Kawakami Y, Nishio H, Yaguchi T, Kawase Y, Ohizumi A, Noji S, Sakurai T, Umezawa K, Fujita T, Role of IL6/IL8-NF-KB AXIS in the Immunosuppression and resistance to immunotherapy, 26<sup>th</sup> Annual Meeting Society for Immunotherapy of Cancer, North Bethesda, MD, USA 2011/11/4

〔図書〕(計4件)

1. Kawakami Y, Yaguchi T, Sumimoto H, Kudo-Saito C, Tsukamoto N, Iwata-Kajihara T, Nakamura S, Nishio H, Satomi R, Kobayashi A, Tanaka M, Kamijuku H, Tsujikawa T, Kawamura N. Roles of signaling pathways in cancer cells and immune cells in generation of immunosuppressive tumor associated microenvironments. in "The Tumor Immunoenvironment" Eds, Shurin M, Malyguine A, Umansky V, Springer Science. 307-323, 2013
2. Ueda R, Yaguchi T, Kawakami Y. Human tumor antigens recognized by T cells and their implications for cancer immunotherapy in "Innate immune regulation and Cancer immunotherapy", Wang RF ed, Springer Science. Business Media, New York USA .335-345, 2011

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

- 取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ: <http://keiocancer.com/>

(1)研究代表者  
河上 裕 (Kawakami Yutaka)  
慶應義塾大学・医学部・教授  
研究者番号：50161287

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
工藤 千恵 (Kudo Chie)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：90424126

藤田 知信 (Fujita Tomonobu)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：20199334

桜井 敏晴 (Sakurai Toshiharu)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：20101933

塚本 信夫 (Tsukamoto Nobuo)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：20407117

大多 茂樹 (Ohta Shigeki)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：20365406

谷口 智憲 (Yaguchi Tomonori)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：40424163