

論文内容要旨

Stromal reaction inhibitor and immune-checkpoint inhibitor combination therapy attenuates excluded-type colorectal cancer in a mouse model

(大腸癌に対する間質反応抑制剤と免疫チェックポイント阻害剤併用療法における抗腫瘍効果の検討)

Cancer Letters, 2020, in press.

主指導教員：茶山 一彰 教授

(医系科学研究科 消化器・代謝内科学)

副指導教員：田中 信治 教授

(広島大学病院 内視鏡医学)

副指導教員：伊藤 公訓 教授

(広島大学病院 総合内科・総合診療医学)

頼田 尚樹

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

近年、免疫チェックポイント阻害剤の出現により癌免疫療法は劇的な進歩を遂げてきたが、大腸癌においては未だ一部の腫瘍でしか癌免疫療法の効果が得られていない。大腸癌では癌胞巣周囲に線維性間質が増生する間質反応が知られており、我々は以前、間質反応が強い大腸癌は悪性度が高いこと、大腸癌外科切除標本における病理組織学的検討において、間質反応が強い腫瘍組織ではリンパ球の腫瘍内への浸潤が少ない傾向があることを見出している。また、間質反応が強い癌は悪性度が高く、また PDGFR 阻害剤により移植腫瘍の間質反応が強力に抑制されることも報告した。今回、大腸癌の免疫細胞浸潤と間質反応の関連に着目し、大腸癌治療において免疫チェックポイント阻害剤との併用に間質反応抑制剤を活用することにより、癌微小環境への T 細胞浸潤を容易にし、免疫チェックポイント阻害剤の抗腫瘍効果を増強できると考えた。そして、抗 PD-1 抗体と PDGFR 阻害剤の併用療法による抗腫瘍効果を検討した。実験方法としてまず、ヒト大腸癌外科切除標本 196 検体を用いて抗 CD8 抗体を用いて腫瘍免疫組織学的評価を行い、phenotype 分類で 3 群（免疫細胞が癌胞巣に浸潤している Inflamed-type、免疫細胞の間質への集積はあるが癌胞巣に浸潤しない Excluded-type、癌微小環境内に免疫細胞を殆ど認めない Desert-type)に分類し臨床病理学組織学的因子との関連を解析した。また、同検体を用いて免疫組織学的評価または PCR にて Microsatellite status も評価し、phenotype 分類との関連を検討した。次に抗 PD-1 抗体薬と PDGFR 阻害剤が癌細胞 (BALB/c mouse 由来大腸癌細胞株 CT26) および間質細胞 (JLS-V9) の細胞増殖能に与える影響をタイムラプスシステムで評価した。更に、Phenotype 別の免疫同系応答同所移植マウスモデルを作成した。Inflamed-type モデルは CT26 を BALB/c マウスの盲腸壁に移植し、Excluded-type モデルは同様に CT26 と JLS-V9 を共移植し作成した。Desert-type は nude マウスに CT26 を移植し作成した。作成した各モデルを対象に、抗 PD-1 抗体及び PDGFR 阻害剤による治療実験を行った。抗腫瘍効果は治療開始 25 日後の腫瘍重量で評価した。作成した組織を用いて次世代シーケンサーで RNA 解析を行い、免疫組織化学的に評価した。実験結果として、ヒト大腸癌では Excluded type 症例の割合が 55.1%と最多であった一方、Inflamed-type 症例の割合は 9.7%と最低であった。Excluded-type 症例は他 phenotype と比較し Overall survival rate が低く予後不良の傾向を認めた。また、Inflamed-type 症例では有意に MSI-high 症例が高率であった。細胞増殖能の評価では、抗 PD-1 抗体薬及び PDGFR 阻害剤は CT26 の増殖能に影響を与えなかったが、JLS-V9 との共培養下では、PDGFR 阻害剤により CT26 の増殖能の低下を認めた。また、作成した Phenotype 別の免疫同系応答同所移植マウスモデルの腫瘍組織を α SMA, CD 8 で免疫組織学的に評価し、各モデルが矛盾なく再現されていることを確認した。治療実験の結果では、Excluded-type の腫瘍では抗 PD-1 抗体単剤では抗腫瘍効果は乏しかったが、抗 PD-1 抗体と PDGFR 阻害剤併用では腫瘍重量は有意に減少した。また、免疫組織学的に CD8, type I collagen, p-PDGFR, and Ki67 を用いて評価すると、腫瘍内において免疫細胞数は増加し、間質量や細胞増殖能は減少しており抗腫瘍効果の増強が確認された。Inflamed-type モデルでは、抗 PD-1 抗体単剤で良好な抗腫瘍効果が得られたが、PDGFR 阻害剤併用による上乗せ効果は認めなかった。RNA 解析による免疫組織化学的検討では、Excluded-type 腫瘍における

併用治療群のシグナル伝達は、PD-1 抗体単独治療群と比較して免疫系細胞や免疫関連サイトカインが増加し、間質系細胞系が抑制されていた。以上の治療実験の結果から、**Excluded type** の大腸癌に **PDGFR** 阻害剤を投与すると間質反応が抑制されることで腫瘍免疫組織学的 **phenotype** が腫瘍胞巣内に免疫細胞が十分に存在する **Inflamed-type** に変化し、免疫抑制が解除されることで治療効果の増強に繋がったと考えた。この併用療法により、これまで抗 PD-1 抗体単剤での治療効果が得られなかった症例においても新たな治療選択肢となる可能性があると考ええる。