

令和6年度TR事業研究奨励助成金
研究成果報告書

2025年 3月 27日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団
理事長 堀田 知 光 殿

報告者氏名：大脇 貴之

研究課題：E. がんの予防、がんの診断・治療の開発、がんとの共生を促進する
ための分野横断的な研究
(テ-マ) 免疫チェックポイント阻害剤リチャレンジ療法の開発と機序の解明

研究期間： 自 2024年 4月 1日
至 2025年 3月 31日

研究指導者：氏名 榎本 篤

公益財団法人 がん研究振興財団

(1)期間中の研究について

1)要旨

本研究は免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) 治療におけるリチャレンジ療法を開発することを目的とし、実施した。マウス膀胱がん細胞株 MB49 皮下移植モデルを用い、抗 PD-1 抗体及び抗 PD-L1 抗体による治療経過中の耐性化に伴う腫瘍微小環境中の免疫細胞の変化を解析し、それを打破するための治療法を検討した。結果として、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体に共通して、マクロファージが炎症性の M1 型が減少し腫瘍促進性の M2 型が増加することがわかった。また、抗 PD-L1 抗体の治療後には PD-L1⁺細胞の枯渇、抗 PD-1 抗体の治療後には PD-1⁺FoxP3⁺細胞の増加が起こることがそれぞれの抗体に対する治療抵抗性に関わっているものと考えられた。また、腫瘍微小環境中の CAF についても解析した結果、治療抵抗性が生じるに従い、Meflin をマーカーとして持つがん抑制性 CAF が減少し、LRRC15 をマーカーとして持つがん促進性 CAF が増加していることが明らかとなった。このことから、Meflin⁺CAF を増加させる治療として、合成レチノイド AM80 を用いた治療法の有用性について検討を行った。結果として、ICI 治療抵抗性獲得後に AM80 を投与し、リチャレンジ療法として用いる ICI 抗体を一度目に使用したものとは異なるターゲット分子を持つものに変えた場合、腫瘍縮小効果を認めることを見出した。この治療法により、一度 ICI 治療を行うも、治療経過中に治療抵抗性となった患者さんに対して再び ICI 治療を有効にする、持続可能性のある治療法として期待される。

2)序

ICI はがん治療のキードラッグだが、奏効率は未だ限定的である。有効性を増強するために抗がん剤や分子標的薬との併用療法が承認されつつある一方で、治療後に再増悪した症例に対する治療法の選択肢が狭くなるとの問題（例：一次治療に ICI を使用した症例は二次治療以降で ICI を使用できない又は有効性が乏しい）も浮上している。がん細胞は一度投与された薬剤に対しては薬剤耐性を獲得することが知られており、治療の初期段階で使用した薬剤を再び使用する「リチャレンジ療法」に効果を期待することは一般的には難しい。

がん細胞ではなく腫瘍微小環境を標的とする ICI はリチャレンジ療法への期待は持てるものの、実臨床においては有効性が乏しく、現状推奨された治療法ではないとガイドラインにも記載されている。ICI 治療の効果予測マーカーについて様々な研究が行われており、ICI が効きやすい腫瘍微小環境として、PD-L1 陽性率が高いこと、CD8 陽性細胞数が多いことなどが報告されている。最近では腫瘍微小環境中に最も豊富に存在するがん関連線維芽細胞（CAF）の重要性も着目されており、我々も CAF の研究を行ってきた。海外からの多くの研究で、CAF が多い腫瘍は免疫抑制性の環境を有し、ICI 治療抵抗性を示すことが知られている。一方、我々は、広く知られているがん促進性 CAF とは異なり、Meflin の発現によって特徴づけられる CAF 亜群ががん抑制性の機能を有し、ICI 治療感受性を増強することを独自に見出した（Owaki et al., Br J Cancer, 2024.）。また、がん促進性 CAF をがん抑制性 CAF へと初期化する薬剤として同定した AM80 を ICI と併用することで ICI の有効性が著明に増強することを報告した。興味深いことに、AM80 を事前に投与した場合にのみ、ICI の奏効率を上昇させることを見出しており、がん間質の制御が ICI の奏効に重要であるとの検証結果を得ている（Owaki et al., Br J Cancer, 2024.）。

本研究においては、ICI 治療経過中の耐性化に伴う腫瘍微小環境中の免疫細胞の変化を解析し、それを打破するための治療法を検討する。特に、我々がこれまでに研究を重ねてきた CAF に着目し、CAF の初期化が ICI リチャレンジ療法へ応用可能であるのかを検討した。さらに、有効であった場合、如何なる機序が重要であるのかを解明し、ICI リチャレンジ療法の臨床開発への応用を目指す。そのために、①ICI 治療抵抗性の腫瘍微小環境の解明、②ICI リチャレンジ療法の開発、③AM80 により ICI 治療感受性が復活した腫瘍微小環境の解明を行った。

3)実験方法

①ICI 治療抵抗性の腫瘍微小環境の解明

ICI 治療後に増悪し ICI 治療抵抗性を獲得した腫瘍と、ICI 治療感受性の腫瘍の間における腫瘍微小環境の相違点を解明する。このためにまず、ICI 治療後に ICI を再投与した際に効果が減弱し治療抵抗性を獲得したものと考えられるタイミングについて、腫瘍モデルマウスを用いて同定することから始める。具体的には、ICI を 1 回投与した腫瘍に、異なる日数において 2 回目の ICI を投与し、腫瘍が 2 回目の ICI 投与に反応しないタイミング、すなわち腫瘍が ICI 治療抵抗性を獲得するタイミングを探索する。続いて、上記実験の ICI 治療抵抗性を獲得するタイミングにおける腫瘍微小環境の構成細胞の変化を調べ、ICI 治療抵抗性において重要な機能を有する細胞を同定する。

②ICI リチャレンジ療法の開発

①で得られた結果に基づき、ICI 治療抵抗性となった腫瘍に対して、いかなる薬剤の投与が ICI 治療抵抗性の打破を生み出すのかを検討する。特に我々が研究を重ねてきた CAF に着目して、CAF の初期化薬として AM80 の併用によるリチャレンジ療法の有用性を検討する。

具体的には、ICI 投与後に治療抵抗性となったタイミングで AM80 または DMSO を投与し、続いて ICI の再投与を行い、腫瘍サイズの推移を測定する。

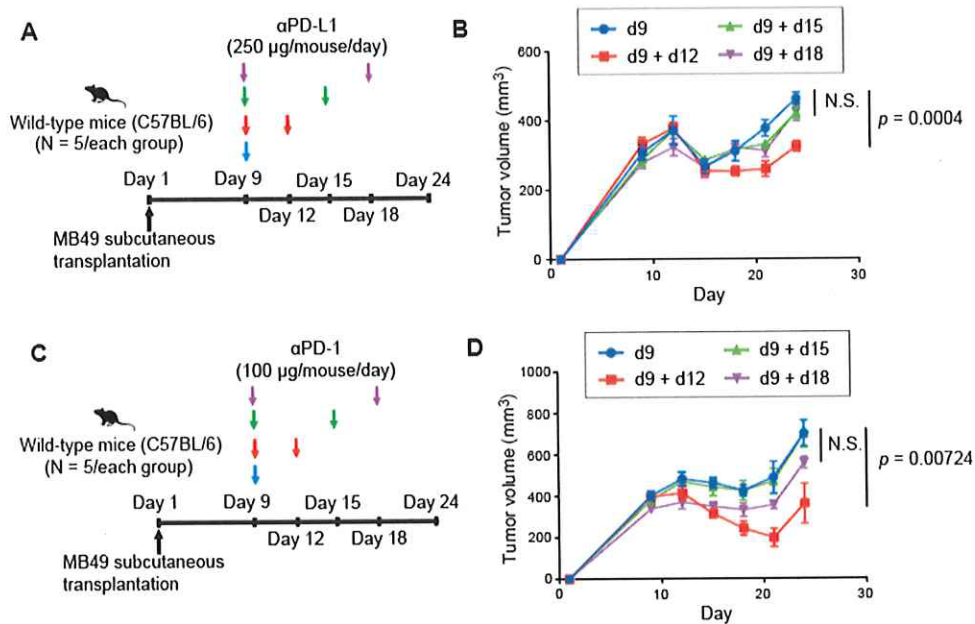
③AM80 により ICI 治療感受性が復活した腫瘍微小環境の解明

②で施行する ICI リチャレンジ実験において、AM80 投与により再度 ICI 治療感受性が確認された腫瘍の検体を用いて、腫瘍微小環境にみられる変化の検証を行う。具体的には、AM80 投与における time course 毎の腫瘍を収集し、Single cell RNA-seq 及び Xenium in situ による解析を行い、腫瘍微小環境の違いが如何に ICI 治療の効果に重要であるのかを解析する。特に、②で得られた一度目に投与した ICI とは異なる ICI のみが有効であった理由の探索を行う。

4)結果

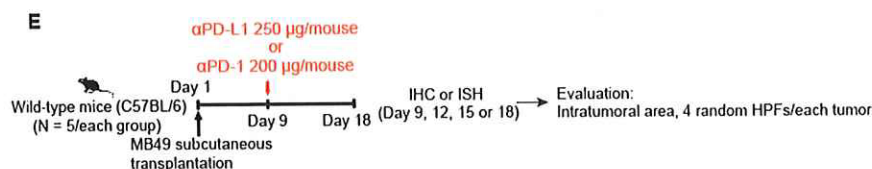
①ICI 治療抵抗性の腫瘍微小環境の解明

抗 PD-L1 抗体、抗 PD-1 抗体双方において、治療後に再投与した際に効果が減弱し治療抵抗性を獲得したものと考えられるタイミングについて、マウス膀胱がん皮下移植モデルマウスを用いて同定することを試みた(A-D)。

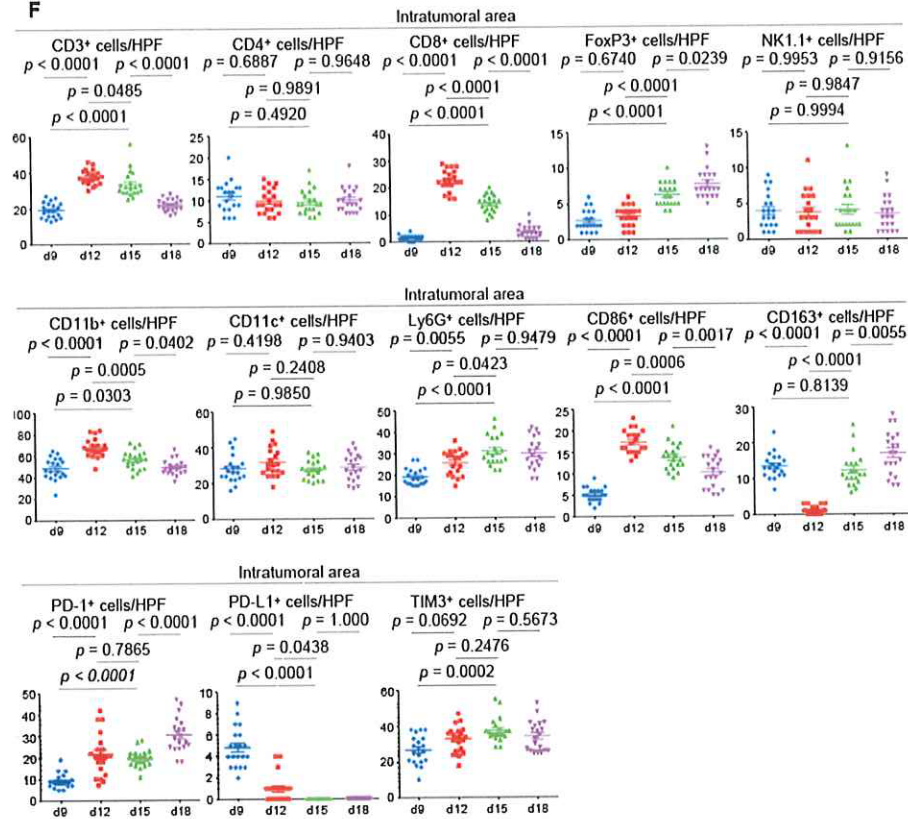


3日の間隔での再投与は単回投与と比較して有意な腫瘍縮小効果を認めていたものの、抗 PD-L1 抗体、抗 PD-1 抗体のいずれにおいても6日以降の再投与では有意差が認められなかった。このことから、6日間の間に ICI 治療抵抗性が獲得されたものと考えられた。

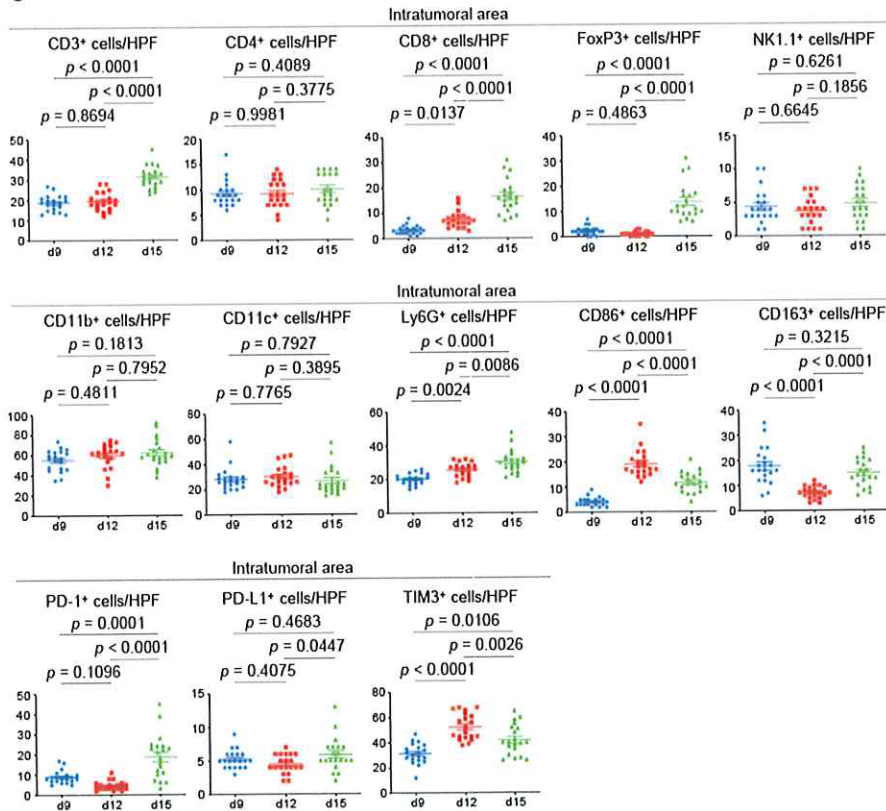
続いて、ICI 治療抵抗性を獲得するタイミングにおける腫瘍微小環境の同定を試みるため、一度 ICI を投与した後の腫瘍について時間経過による腫瘍微小環境の変化を IHC および ISH によって解析した(E-G)。



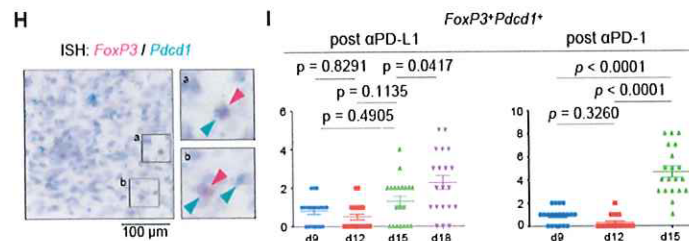
F



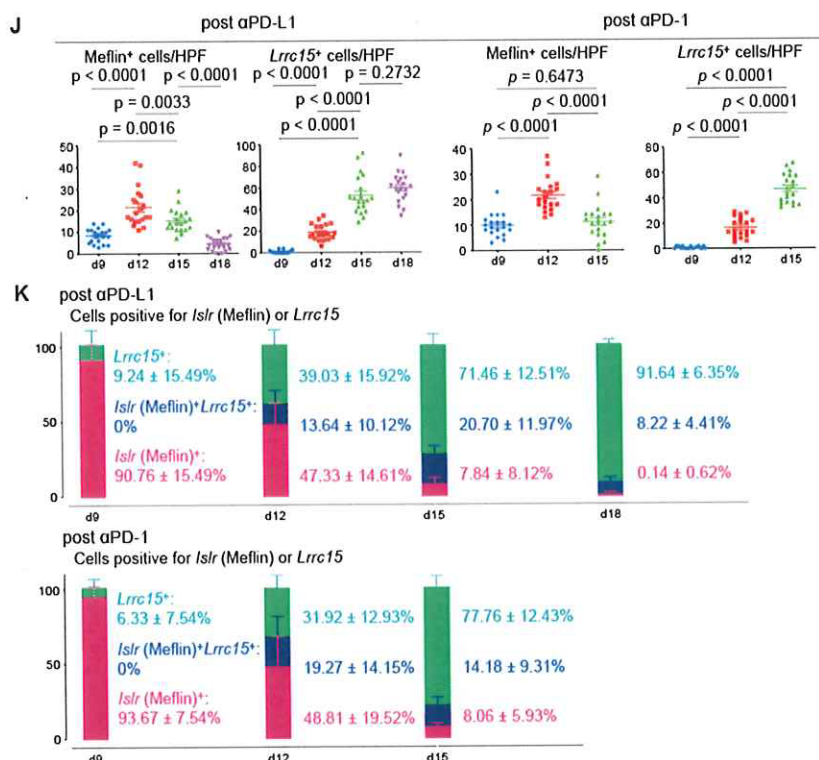
G



結果として、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体に共通して、マクロファージが炎症性の M1 型が減少し腫瘍促進性の M2 型が増加することがわかった。また、抗 PD-L1 抗体の治療後には PD-L1⁺細胞の枯渇が認められた一方、抗 PD-1 抗体の治療後には PD-1⁺細胞の枯渇は認められないことがわかった。そこで、PD-1⁺細胞についてさらに免疫細胞マーカーについての解析をするため、ISH による解析を進めたところ、抗 PD-1 抗体の治療後には PD-1⁺FoxP3⁺細胞の増加が起こることがわかった(H,I)。



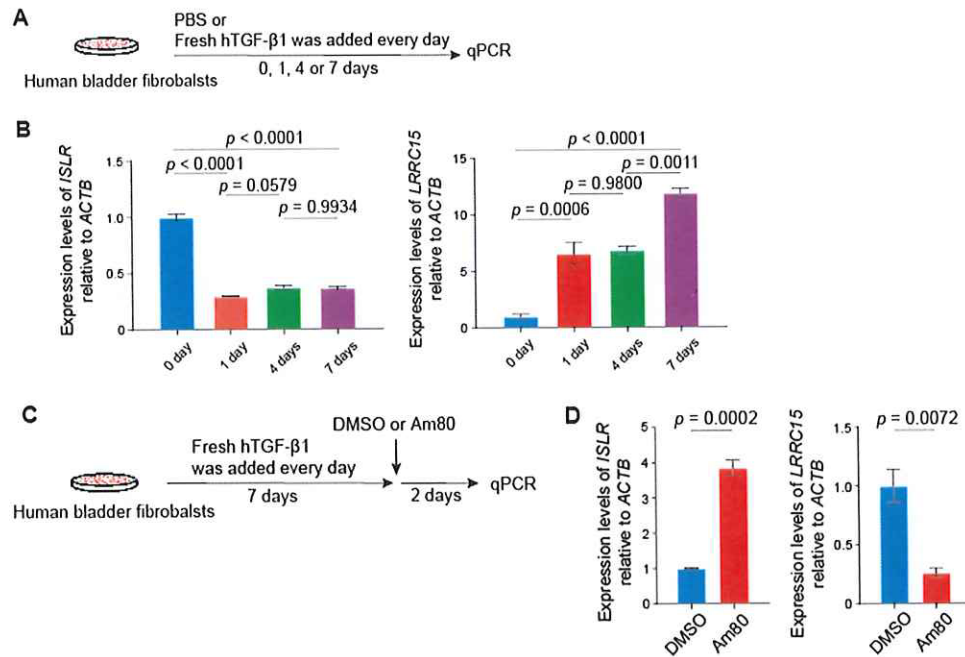
一方、我々はこれまで CAF について Meflin 陽性のがん抑制性 CAF と LRRC15 陽性のがん促進性 CAF が存在し、それぞれ ICI の治療効果を増強及び減弱させることを見出している。このメカニズムとして、マクロファージに対してがん抑制性 CAF は M1 型マクロファージに、がん促進性 CAF は M2 型マクロファージに極性変化をさせることを見出している。そこで、ICI 治療後の CAF についても検討を行った結果、ICI 治療抵抗性の獲得に伴い、CAF が LRRC15 陽性のがん促進性 CAF へと分化することを見出した(J,K)。



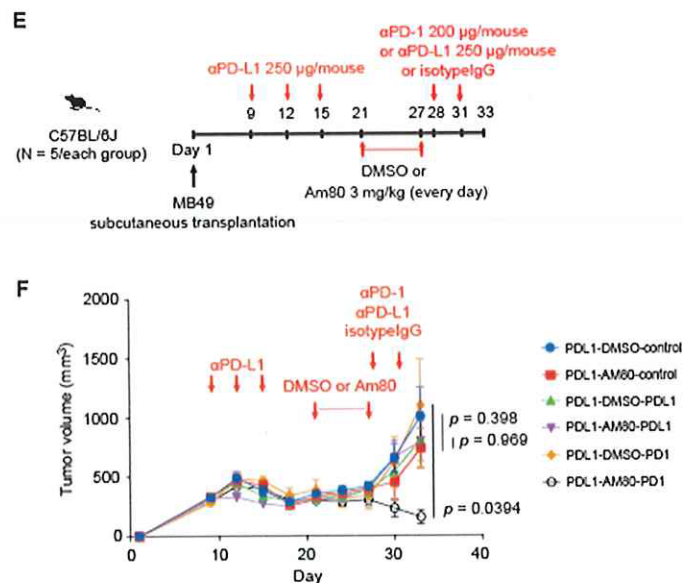
これらのマーカーを持つ細胞をターゲットに、治療法の開発を進めることとした。

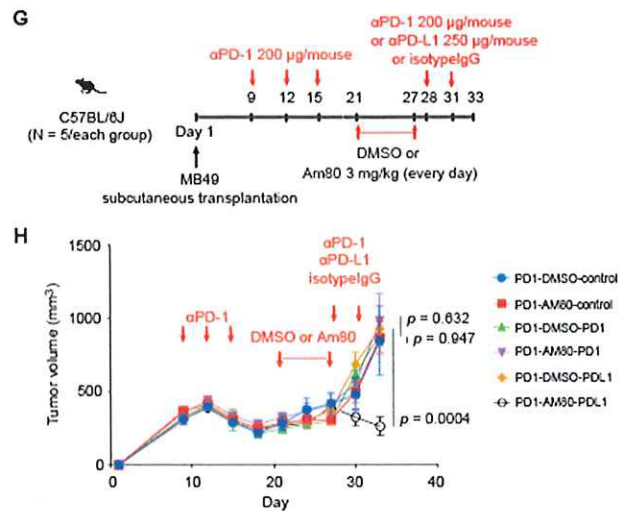
②ICI リチャレンジ療法の開発

CAF の初期化薬として AM80 を見出している。これまで、AM80 の投与は α SMA 陽性の CAF を Meflin 陽性の CAF へと初期化することを見出しているが、LRRC15 陽性の CAF に対しても効果はわからなかったため、まず、TGF β 刺激により LRRC15 陽性の CAF へと変化した細胞に対しても影響を検討した(A-D)。



このように、AM80 は LRRC15 陽性細胞についても、LRRC15 の発現を低下させ、Meflin の発現を上昇させるように、がん促進性 CAF からがん抑制性 CAF への初期化に有用であることを発見した。この戦略を用い、マクロファージの極性変化が ICI リチャレンジ療法として有用であるかを検証するため、ICI 投与後に治療抵抗性となったタイミングで AM80 または DMSO を投与し、続いて ICI の再投与を行い、腫瘍サイズの推移を測定した(E-H)。





結果として、AM80 を投与後に一度目に投与した抗体とは異なる免疫チェックポイント分子をターゲットとする抗体を投与した場合に、二度目の抗体投与後に腫瘍の増大を抑制できることが明らかとなった。

③AM80 により ICI 治療感受性が復活した腫瘍微小環境の解明

②で示した結果から、一度目に投与した抗体とは異なる免疫チェックポイント分子をターゲットとする抗体を投与した場合でも、AM80 ではなく DMSO を投与した場合には腫瘍の増大は抑制できないことが明らかとなった(E-H)。この結果を基に、AM80 投与における time course 毎の腫瘍を収集し、Single cell RNA-seq 及び Xenium in situ による解析を行うこととした。

現在結果については解析中である。この解析結果を基に、腫瘍微小環境の如何なる違い ICI 治療の効果に重要であるのかを明らかとすることを目指している。

5)考察

我々は Meflin+CAF がサイトカインによって M2 マクロファージを M1 マクロファージに極性変化させることを報告しており、LRRC15+CAF を Meflin+CAF に初期化する治療法についてリチャレンジ療法でも有用であるのかを検討した。結果として、二度目に投与する抗体のターゲット分子は変更する必要があったが、腫瘍の増大を抑制することが明らかとなった。メカニズムの解明を目指し、解析をすすめているところである。

(2)今回の結果成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

免疫チェックポイント阻害剤リチャレンジ療法は治療選択肢がなくなった患者さんに対して新たな治療選択肢を提供する、有望な治療法であると考えている。場合によって、リチャレンジ療法が何度も可能となるのであれば、がんの克服にも期待が持たれる。

ヒトにおいて ICI 治療後に獲得された ICI 抵抗性との一致について検討し、臨床応用を目指したいと考えている。

今回の貴重な研究助成に深く感謝申し上げるとともに、引き続きがん治療のためのトランスレーショナルリサーチに尽力して参る所存である。