

平成 25 年度 海外留学補助金による研究経過・成果報告書

肝細胞癌に対する抗VEGFR2抗体/抗PD-1抗体併用による新規治療の開発

Edwin E. Steele Laboratory, Department of Radiation Oncology,
Massachusetts General Hospital, MA, USA

羽藤 泰

1. 留学先での研究の概要

申請者は、Edwin L. Steele Laboratory, Department of Radiation Oncology, Massachusetts General Hospital, MA, USA に 2013 年 9 月より赴任し、Dan Gabriel Duda DMD, PhD.の指導のもと、下記の 4 つの研究テーマを与えられ、主導的立場で研究している。

- 1) 肝細胞癌に対する抗 VEGFR2 抗体 / 抗 PD-1 抗体の併用による新規治療の開発
- 2) 胆管癌に対する新規治療の開発
- 3) 前立腺癌骨転移における癌細胞および間葉系細胞の相互作用と転移促進・治療抵抗性機構の解明
- 4) 進行肝細胞癌に対する FOLFOX+sorafenib 治療の臨床研究

1) について研究内容の開示許可を得られたため、後述で報告する。肝臓癌の免疫治療は先駆的領域で、昨年はこの領域についての総説を公表した。(Hato T et al. *Hepatology* 2014) また肝臓癌に唯一有効な薬物は sorafenib であるが、sorafenib に加えて SDF-1/CXCR4 のシグナル遮断を行い抗腫瘍免疫に働く腫瘍細胞浸潤を抑制し、かつ抗 PD-1 抗体を追加するトリプルコンボの新規治療について共同研究者として報告した。(Chen B, Ramjiwan R and Reiberger T et al. *Hepatology* 2014)。

2) について、われわれは先行する肝内胆管癌を対象とした臨床試験の切除腫瘍検体および末梢血血漿の解析から、血管新生に関わる分子 P (特許関連のため非開示) の発現が非常に高いことに着目し、新規治療の開発を開始している。肝内胆管癌の動物モデルは非常に限られているため、動物モデル作成を最初に行った。マウスに生着可能なヒト由来肝内胆管癌細胞株として HuCCT-1, SSP25 および RBE を同定した。In vitro での P 刺激により、これらの細胞株に ERK, AKT を介したシグナル伝達が起こることを確認した。これらの細胞株で P の受容体の一つである N を shRNA を用いてノックダウンすると in vitro で細胞増殖が著名に抑制されるのみならず、in vivo でも腫瘍の生着率が著名に低下し、腫瘍の増殖も著しく抑制されることを見いだした。現在、抗 P 薬および抗 N 薬を用いた in vivo の腫瘍増殖抑制効果を検討中である。さらに C57BL/6 由来の肝内胆管細胞癌細胞株の供与を受け、これが野生型 C57BL/6 の肝臓で増殖可能であることを確認した。上記モデルを総括し、臨床検体の解析と併せて新規治療薬開発につなげたい方針である。

3) について前立腺癌の骨転移に SDF-1/CXCR4 が関与することは比較的良好に知られた事象であるが、われわれは原発巣の線維芽細胞や間葉系幹細胞が癌細胞との間に何らかの相互作用を行う、あるいは細胞同士がとともに集塊を形成して転移促進的に機能するメカニズムがあると推定し、これを解明すべくモデル作成を行っている。アンドロゲン非依存性のマウス前立腺癌細胞株 Pten/Smad 細胞を用いて骨転移好発亜株を樹立することをまず試みている。GFP 標識した前立腺癌細胞株を経皮的経心臓的に血管内注入し、注入後 1 週間で骨髄を回収し、早期に骨に到達しかつ生着する細胞を GFP の蛍光を用いて回収、これを再度別のマウスに注入することを繰り返して骨転移好発亜株の選別を行っている。この亜株が樹立後、親株との間で網羅的遺伝子解析、NGS 等を用いてプロファイルの詳細な比較を行い、間質との相互作用に用いられる一連の分子群を同定する方針である。また間葉系幹細胞と癌細胞の間の相互作用について in vitro で cell insert を用いた共培養を行って転移促進機能や生存促進作用の増強があることを確認している。また SDF-1 の受容体として CXCR4 以外に CXCR7 の存在が知られているが、この受容体は本来デコイ的で特段のシグナルを細胞内に伝達しないと考えられていたが、CXCR4 阻害下では逆説的に CXCR7 の発現が上昇する現象を見だし、詳細を検討している。

4) については臨床試験参加者の末梢血採血検体の血漿のタンパク質の解析および免疫細胞の分画をフローサイトメトリーで解析する部分を分担している。月 1 回程度、臨床腫瘍医との会議に出席し、MGH での風通しの良いトランスレーショナルリサーチの手法を学んでいる。

上記研究以外に eNOS が腫瘍免疫に果たす役割の解明や胃癌の免疫治療の開発に共同研究者として参加、技術提供等している。

2. 肝細胞癌に対する抗 VEGFR2 抗体/抗 PD-1 抗体併用による新規治療の開発

[背景]

全世界で年間 75 万人もの患者が肝細胞癌と診断され、年間 60 万人以上が、肝細胞癌が原因で死亡すると報告されている [1]。肝細胞癌の治療は第一に切除であるが、切除不能症例に対しては sorafenib が唯一有効な治療として確立している [2]。Sorafenib は B-raf, c-kit, VEGFR1-3 および PDGFR の機能を阻害して抗腫瘍効果を発揮する化合物である。残念ながら sorafenib による肝細胞癌の治療効果は、97%の症例が効果判定 SD の範疇におさまる「増殖抑止」にとどまり、全生存期間の延長幅もわずか数ヶ月に過ぎない。肝細胞癌が豊富な血管網を有するという病理組織学的な特徴から、血管新生の主軸である VEGF/VEGFR シグナルを標的とした多数の分子標的治療薬(Sunitinib, Brivanib, Linifanib, Bevacizumab, Ramucirumab)が臨床試験で試されてきたが、いずれも治療効果が弱く、消化管出血をはじめとする有害事象にも悩まされ有効性を示すに至っていない。抗 VEGFR2 特異的抗体である Ramucirumab について、留学開始後 9 ヶ月にあたる 2014 年 6 月に European Society of Medical Oncology 総会で報告がされた。Sorafenib で failure となった症例のセカンドライン治療として対 placebo での第Ⅲ相試験の結果が報告された(REACH trial)。全生存期間では Ramucirumab 群 9.2 ヶ月 (95%CI: 8.1-10.6) 対 placebo 群 7.6 ヶ月(95%CI: 6.0-9.3)で、わずかに統計学的有意差に届かず有効性を示せていない。上記状況を鑑みて、抗 VEGF/VEGFR2 治療薬を用いた肝細胞癌治療には新たな改善が必要と考えられる。

われわれの研究室では抗 VEGF/VEGFR 治療薬による抗血管新生療法の問題点として、血流が遮断される事に伴って発生する逆説的な腫瘍微小環境内の低酸素領域の拡大、およびそれに付随する抗腫瘍免疫の低下を指摘してきた。[3, 4] われわれはこのような「逆説的な低酸素領域」の発生を回避する目的で、抗 VEGF/VEGFR 治療の強度調整を行い、血管を「正常化」させることで、抗腫瘍免疫がむしろ改善し、抗腫瘍ワクチン療法との併用効果が増強することを乳癌のモデルで報告した。[4] 今回、抗 VEGF/VEGFR 治療の強度調節は血管が豊富な肝細胞癌においても同等に有効な手段であるか否かを検証する。

一方、最近、皮膚癌を中心として免疫チェックポイントと呼ばれる分子群を標的とした免疫療法が勃興し、適応を拡大している。癌抗原に対する免疫応答の主役である T 細胞の活性化や抗原応答性は刺激性および抑制性の共シグナルのバランスや相互作用によって決定される。[5] 抑制性のシグナルは自己免疫の誘導や免疫反応の停止のために必要とされており、これらの分子群を免疫チェックポイント分子と呼ぶ。癌細胞は CTLA-4, PD-1, PD-L1, TIM-3, LAG-3 などの多様な免疫チェックポイント分子を駆使し、免疫応答を編集して逃避機構を樹立している。[5] 悪性黒色腫での免疫療法の成功をうけて、肝細胞癌に対しても免疫療法が非常に注目されている。肝細胞癌に免疫療法が有効であると考えられている根拠は、①肝臓は食物を介して外界からの抗原に常にさらされるため元来免疫寛容が存在している、②癌が発生する肝臓はウィルス性肝炎や肝硬変をはじめとして慢性炎症が存在しており免疫寛容状態にある、③一方で肝細胞癌症例の大多数で腫瘍特異的抗原 (AFP, GPC-3, NY-ESO-1 など) に対する特異的免疫反応の存在は確認されている、④肝細胞癌はこれらの特異的免疫応答を回避し免疫応答を編集するように働きかけている、という特徴による。[6] そこで肝細胞癌に対する抗免疫チェックポイント分子療法は、第 I 相および第 II 層試験が開始されている。[6] われわれのグループは抗 PD-1 抗体療法が肝細胞癌モデルマウスで有効な治療法であることを示したが、その効果は弱く、別の治療との併用が有効であることを報告した。[7] 今回、われわれは上述した強度調節抗 VEGFR 抗体療法と抗 PD-1 抗体療法の併用の有効性についてマウスモデルを用いて検討を行う。

[材料・方法]

マウスモデルおよび細胞

肝細胞癌のマウスモデルとして、われわれは①癌細胞の同所移植、②Mst1^{-/-}Mst2f^{-/-}マウスを用いた遺伝子改変モデル、③化学発癌モデル、の 3 つのモデルを用いる。株化細胞株として、Massachusetts General Hospital で樹立された C3H マウス由来の HCA-1 を保有しているほか、National Cancer Institute からの供与で C57BL/6 マウス由来 RILWT を使用している。マウス 1 匹につき癌細胞 2 百万個を Fetal Bovine Serum 5 μ l + Matrigel 5 μ l 混合液に懸濁し準備す

る。マウスを Ketamine / Xylazin 麻酔後に上腹部正中切開で 1cm ほど開腹し肝臓を体外へ導出、先の細胞懸濁液を肝被膜下に注入する。注入後に組織圧で懸濁液が逆流漏出するのを防止するために針の通過路を 3 分綿棒で圧迫する。腹腔内洗浄後、腹壁を層々に縫合閉鎖する（上記手法は現在 Nature protocols に投稿中である）。腫瘍移植後から経腹壁的に超音波検査を施行し、腫瘍径を 2 次元方向で集計、推定体積を計算する。この手法により HCA-1 の場合 1 週間、RILWT の場合 3 日で直径 2mm 大の腫瘍が確認される。HCA-1 腫瘍の場合移植後約 1 ヶ月半で致死的となり、RILWT の場合は 14 日で致死的な腫瘍を形成する。Mst1^{-/-} Mst2f^{-/-} に Cre recombinase を経静脈的にアデノウイルスで delivery すると、YAP の不活化を介して、約 15 週ほどで肝細胞癌を発癌するモデルである。[8] 化学発癌モデルには四塩化炭素の経口投与を用いている。20%四塩化炭素/オリーブ油液を 150 μ l/回/マウスで週 3 回経口投与する。C3H マウスに同四塩化炭素溶液を投与すると、投与 13 週で小葉間隔壁の線維化が著名となり、投与 26-8 週でほぼ 100%に肝細胞癌が発生する。化学発癌モデルが最もヒトの肝細胞癌に近いが、作成に時間がかかり、腫瘍径も均一でなく、発癌した腫瘍も分化度が高く増殖が遅いため、他のモデルとの併用が必要となる。

試薬

in vivo で使用する抗マウス VEGFR2 抗体は ImClone 社との MTA 契約に基づいて供与をうけた(DC101)。抗マウス PD-1 抗体は Bio X Cell 社から購入した。

フローサイトメトリー

データの取得は LSR-II (BD bioscience)、データの解析は FACS Diva software (BD bioscience)または FSC Express ver4.0 (DeNovo software)で行った。

in vivo イメージング (liver window モデル)

リアルタイムで生体内でおこる現象を観察するために、全身麻酔下にマウス腹壁上部にフレーム付きガラスを埋め込み、シアノアクリレートを用いて窓ガラスに肝臓（および腫瘍）を接着させるモデル(Liver window モデル)を使用した。ガラス窓から直視で腫瘍を観察できるほか Optical Frequency Domain Imaging (OFDI) をもちいて血流構築全体を観察可能である。さらに尾静注で蛍光付きモノクローナル抗体や Rhodamine red などの色素を投与すれば、2 光子顕微鏡を用いることで血流や特定の細胞の動態をリアルタイムで追跡することが可能である。今回われわれは CD8 Alexa fluor 488 抗体と Rhodamine red の注射により細胞傷害性 T 細胞の癌組織への浸潤をリアルタイムに観察した。

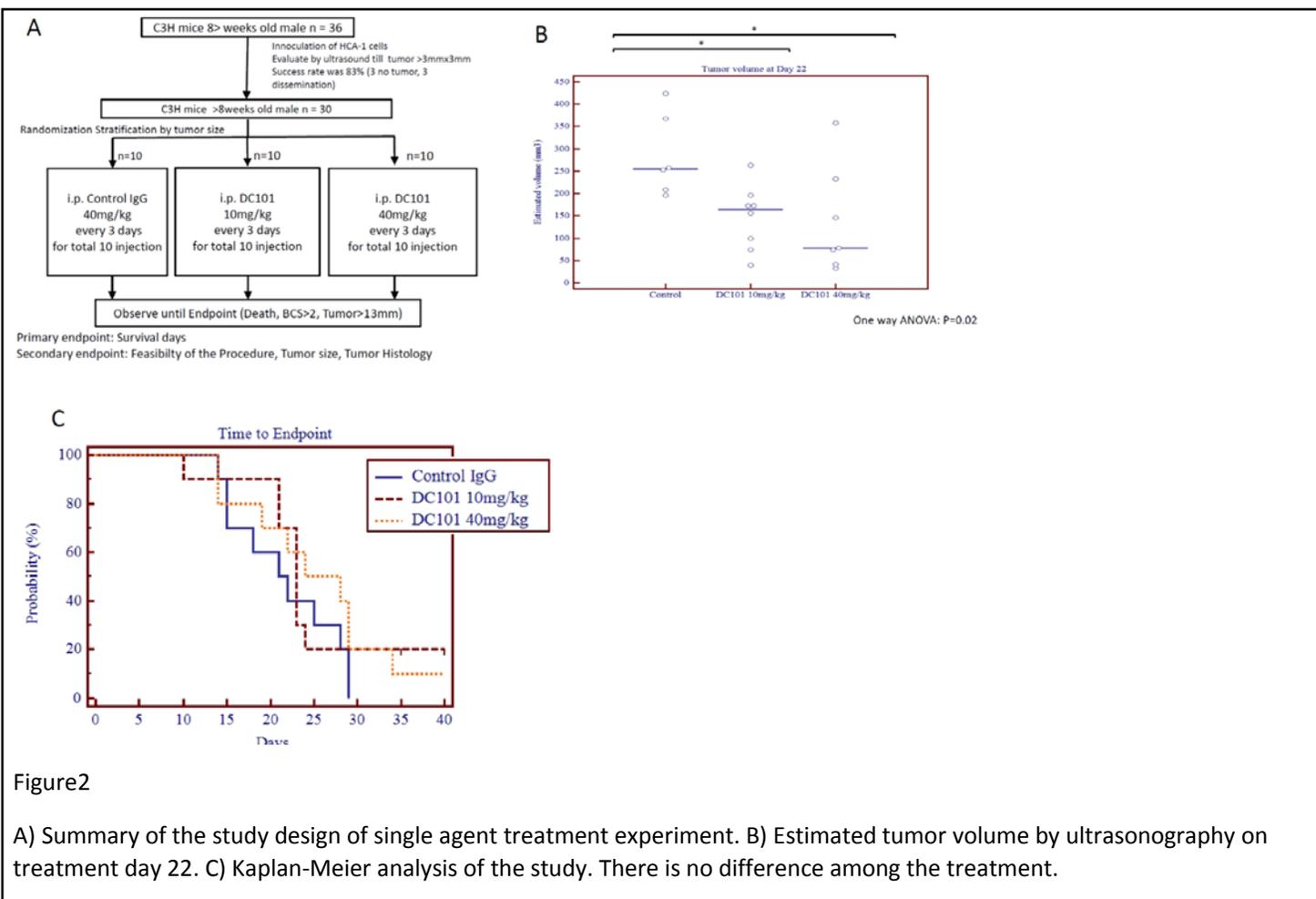
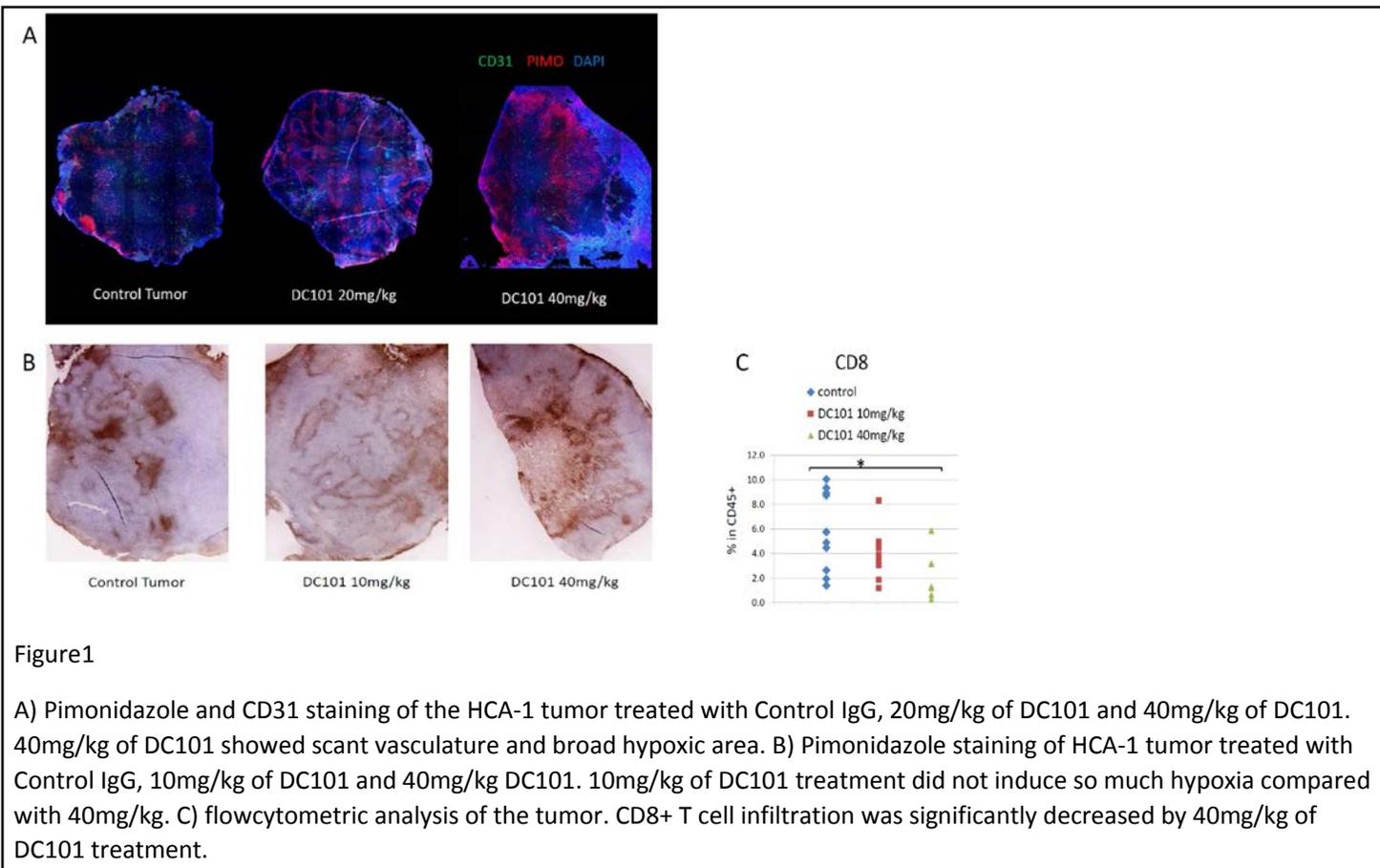
データ演算と統計

データの集積は Microsoft Excel 2013(Microsoft)で行い、統計学的検討は MedCalc ver 15.2.1 (MedCalc software)で行った。2 群間比較は主に student T test、3 群間以上の比較は one-way ANOVA を用いて行った。生存分析は Kaplan Meier 法を用いた。

【結果】

抗 VEGFR2 抗体濃度の適正化

ヒトの Ramucirumab 推奨投与量と血行動態的に同等な抗マウス VEGFR2 抗体(DC101)の濃度は 40mg/kg である。これを基準に Control IgG 投与群、低用量 (10mg/kg or 20mg/kg) DC101 投与群、通常治療量(40mg/kg)DC101 投与群の 3 群比較を行い、組織学的変化および免疫細胞浸潤について評価を行った。まず通常治療量群とコントロール群を比較すると、コントロール群では組織内に pimonidazole 陽性の低酸素領域は殆ど存在しない一方で、通常治療量群では腫瘍に著名な低酸素領域の出現が確認された。(Fig 1A and B) そこで DC101 投与量を半分の 20mg/kg にして比較すると、低酸素領域は帯状の領域の幅が細くなるものの、依然として低酸素領域が顕在であることが判明した。そこで投与量を通常の 1/4 量である 10mg/kg とすると、低酸素領域の出現はほぼ見られなくなった。この投与条件で、腫瘍に浸潤する CD8 陽性リンパ球の割合を調べると、通常治療量群では CD8 陽性 T リンパ球は著名に減少していることが確認されたが、10mg/kg 投与群ではその減少は見られなかった。これらの結果から、DC101 の低用量治療濃度を 10mg/kg に設定して実験を進めることにした。



低用量 DC101 による抗腫瘍効果の確認

コントロール群、低用量、通常投与量の 3 群を作成し、無作為割付け試験を行って抗腫瘍効果を確認した。(Fig2A) のように治療割り付けを行い、10 回投与後にマウスの生存分析と腫瘍径の解析を行った。投与 3 週時点での推定腫瘍径を比較すると、低用量群は通常投与量群と遜色ない腫瘍増殖抑制効果を持つことが示された。(Fig 2B) 一方で生存の比較では 3 群間に有意差はなく、抗 VEGFR2 抗体単剤治療は効果が弱い事が確認された。(Fig 2C)

抗 VEGFR2 抗体と抗 PD-1 抗体によるコンビネーション治療の検討

抗 PD-1 抗体による治療を前述の抗 VEGFR2 抗体と併用することで相乗効果が期待されると推察した。そこで抗 PD-1 抗体単剤治療に低用量もしくは通常投与量の DC101 を併用し、4 群比較を行った。(Fig 3A) 腫瘍の増殖は抗 PD-1 抗体単剤治療に比較して、コンビネーション治療でより強力に抑えられることがしめされた。(Fig 3B & C) 生存を比較すると、コンビネーション治療群ではコントロールに比して有意に生存が延長する事が示され、とくに低用量 DC101 併用群で生存が長い傾向にあったが、低用量併用群と通常投与量併用群では統計学的有意差は得られなかった。

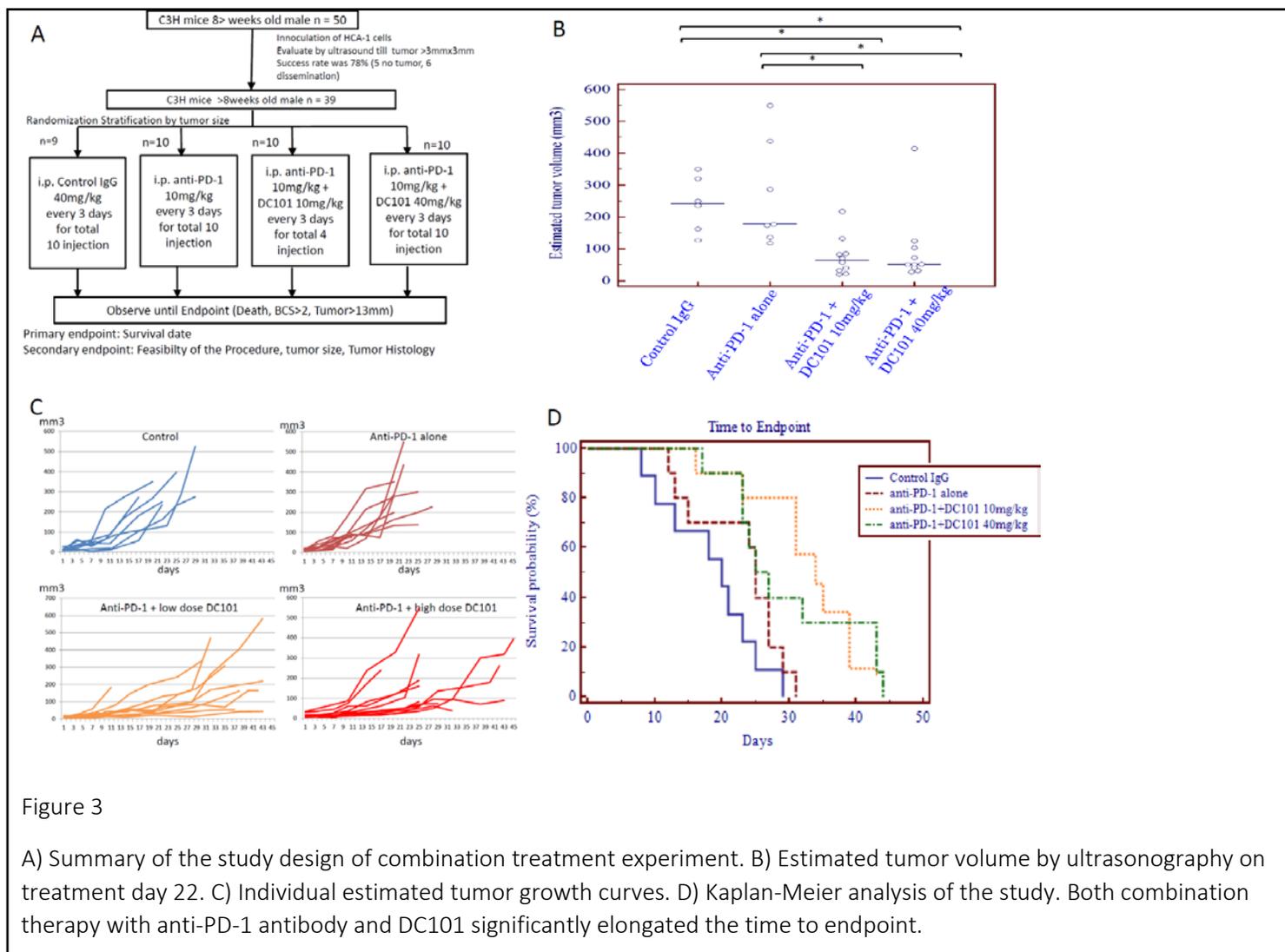


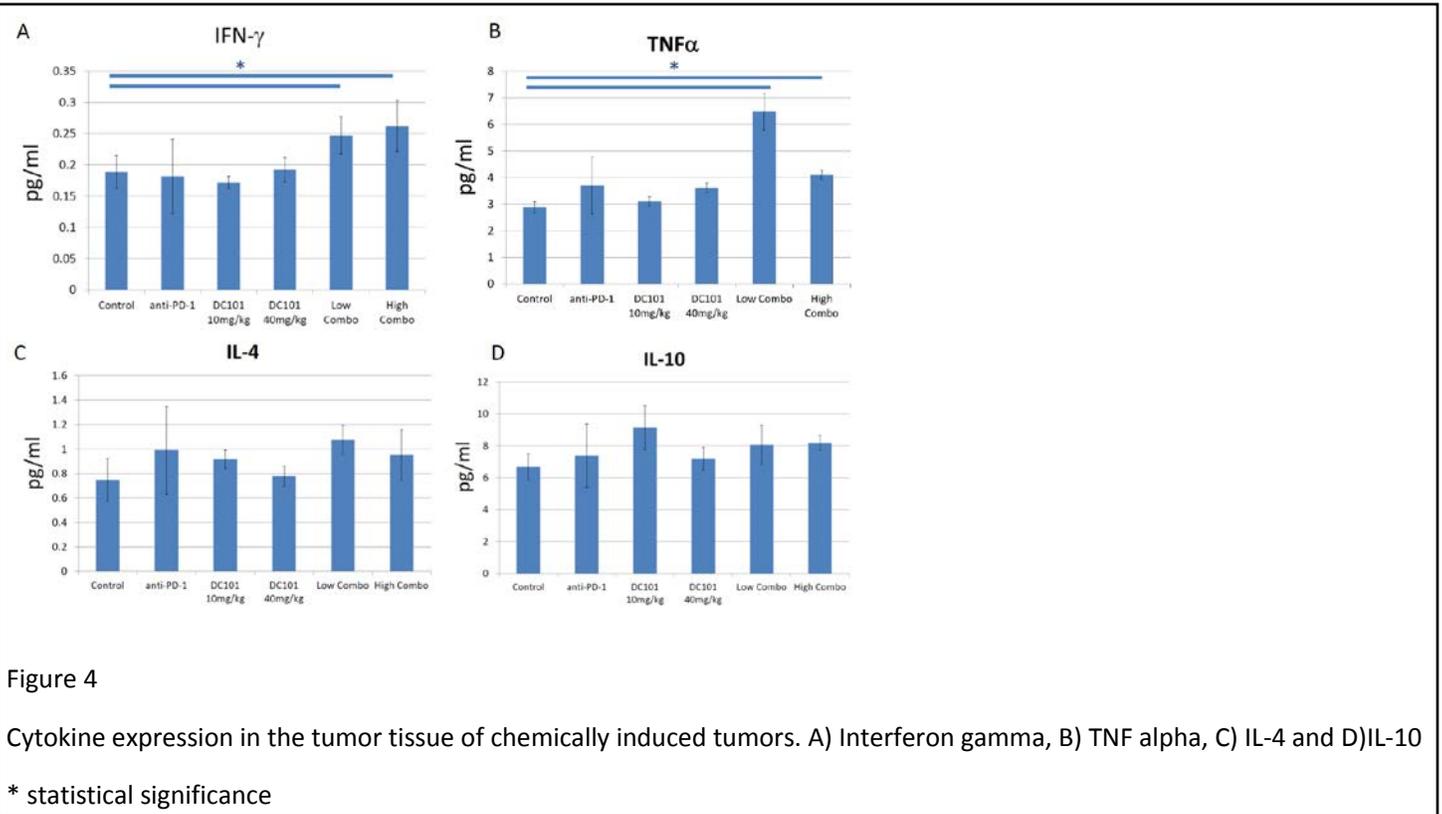
Figure 3

A) Summary of the study design of combination treatment experiment. B) Estimated tumor volume by ultrasonography on treatment day 22. C) Individual estimated tumor growth curves. D) Kaplan-Meier analysis of the study. Both combination therapy with anti-PD-1 antibody and DC101 significantly elongated the time to endpoint.

抗 VEGFR2 抗体と抗 PD-1 抗体併用により腫瘍内インターフェロン γ (IFN- γ) および TNF α 発現が高まる

コンビネーション治療の有効性は示されたが、なぜ抗腫瘍効果が高まるかを解明する必要がある。化学発癌モデルで肝細胞癌を作成し、これをコントロール群、低用量 DC101 単剤群、通常投与量 DC101 単剤群、抗 PD-1 抗体単

剤群、低用量併用群、通常投与量併用群の6群に分けて割り振り、2週間治療した時点でマウスを犠牲死させ、腫瘍のサイトカイン発現パターンを比較した。(Fig4A-D) 併用治療群では他の群にくらべて統計学的有意に IFN- γ 発現が上昇しており、抗腫瘍免疫効果が高くなっていることが推察された。またとくに低用量 DC101 併用群では組織内の TNF 発現が高まることも確認された。一方で腫瘍免疫抑制的に働くサイトカインである IL-4 や IL-10 については各群間で有意差を認めなかった。



コンビネーション治療により細胞傷害性 T 細胞の血管から腫瘍内への浸潤が促される

化学発癌モデルに liver window を設置し in vivo イメージングを用いて腫瘍内に浸潤する CD8 陽性 T リンパ球の動態を観察した。(Fig5) コントロール群や抗 PD-1 療法単剤治療群では CD8 陽性のリンパ球は血管沿いに主に分布しているのみなのに対して、コンビネーション治療群では CD8 陽性リンパ球は血管壁を離れて主要組織に浸潤していく様子が観察された。以上から、コンビネーション治療群では、抗腫瘍に働くサイトカイン産生が腫瘍内で高まり、細胞傷害性 T 細胞が活性化していると推察された。

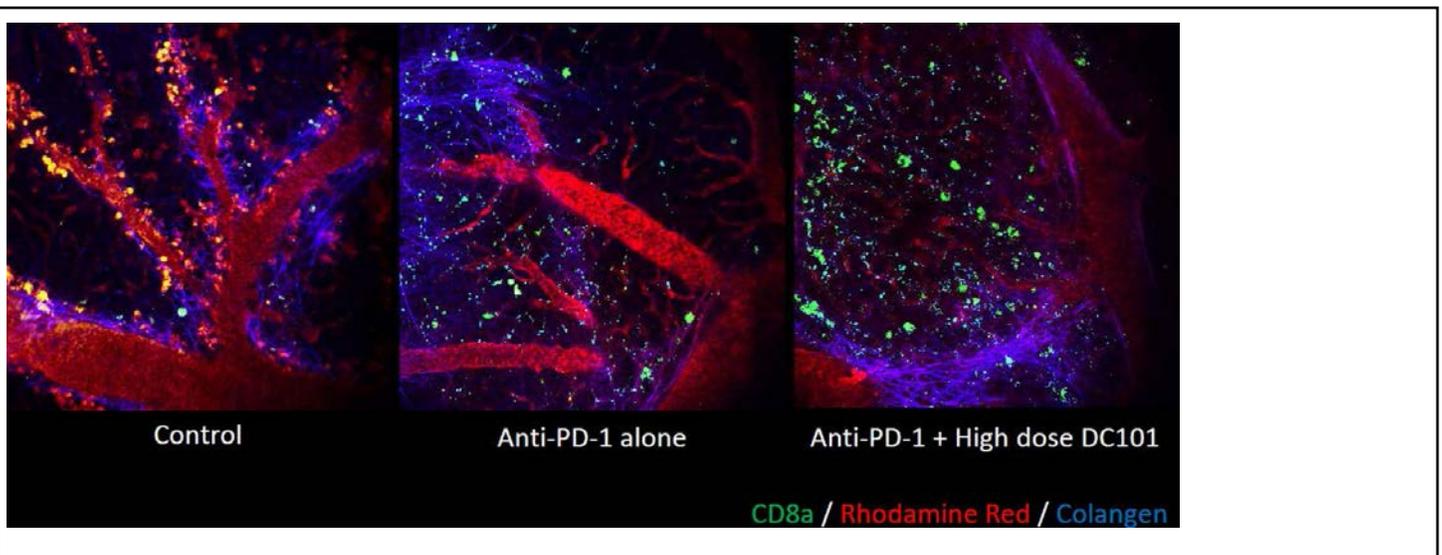


Figure 5

Intravital imaging of the tumor. CD8+ cells were labeled with Alexa fluor 488 antibody and blood flow were stained by Rhodamine red. CD8+ T cells were detached from vascular walls and infiltrated into tumor in anti-PD-1+DC101 treatment group while anti-PD-1 treatment alone group did not.

[考察]

Bevacizumab が臨床で使われるようになって 10 年以上がすでに経過している。抗血管新生療法は当初の期待に反して非常にマイルドな治療効果を示すにとどまり、Folkman の提唱した結構の遮断による抗腫瘍効果は実現困難であることが広く認識されている。われわれの期間の長である Jain はこのマイルドな抗血管新生療法の効能を「血管の正常化」という仮説で説明可能であると提唱してきた。[9] 昨今の免疫療法の勃興を機に、われわれは血管の正常化にともない免疫機能をも微小環境を介して「正常化」させ、抗腫瘍免疫の活性化が図れるか否かという課題に挑んでいる。先述のように乳癌モデルにおいて抗血管新生療法を適正に投与することで組織間の低酸素出現を軽減し、腫瘍ワクチン療法の効率を高められることがすでに報告されている。一方で肝細胞癌のような血管密度に富む腫瘍で同等の効果が期待できるかについては明らかでなかった。肝細胞癌の腫瘍血管は潤沢にあるものの、典型的な固形腫瘍に比して、血管がより正常に近い。このような腫瘍に対しても血管正常化が有効かどうかという点は未知であった。われわれのデータはまだ研究途上であるものの、血管正常化が免疫活性につながり抗腫瘍効果を高めていく事を示している。

興味深い事の一つは、通常治療量では低酸素が腫瘍内に広く出現するにもかかわらず、抗 PD-1 療法と組み合わせると免疫機能そのものは改善してしまう点である。図 5 にしめしているのは通常量 DC101 に抗 PD-1 抗体を併用した場合の CD8 陽性 T 細胞の分布であるが、これをみても明らかに免疫細胞の活動性は改善している。同様の現象は、最近われわれが報告した sorafenib を用いた治療でも確認されている。[7] Sorafenib 単剤もしくは Sorafenib + CXCR4 阻害剤(AMD3100)の併用療法は、肝細胞癌に低酸素領域を広く出現させ、抗腫瘍免疫抑制的に働く細胞浸潤を促進するが、ここに抗 PD-1 抗体を併用すると、細胞傷害性 T リンパ球活性が改善し、腫瘍内に分布するリンパ球が増加していく。これらの事象は抗 PD-1 抗体療法が低酸素に打ち勝つ可能性を示唆している。

本研究はまだ途上である。コンビネーション治療が細胞傷害性リンパ球活性を高める事は判明したが、抗 VEGFR2 療法の何がこのアドバンテージをもたらしているか、不明である。一つのメカニズムは exhaust したリンパ球に発現している VEGFR2 抗体を中和することで機能改善している可能性である。[10] それ以外の機構として、肝臓特異的に存在する Kuppfer 細胞などの抗原提示細胞が活性化する可能性について今後研究をすすめる計画である。現時点でわれわれは各実験に対して 1 モデルのみでの検討にとどまっている点が限界になっているので、第 2 モデルを用いて結果を強固にする必要がある。

[小括]

抗 VEGFR2 抗体/抗 PD-1 抗体併用療法は肝細胞癌の治療として期待できる。そのメカニズムはいまだ不明な点が多いが、インターフェロン γ などのサイトカイン発現が高まるのをうけ、細胞傷害性リンパ球活性が高まる事が寄与している事が示唆された。詳細なメカニズムの解明が必須である。

Reference

- [1] American Cancer Society website. <http://www.cancer.org/cancer/livercancer/detailedguide/liver-cancer-what-is-key-statistics>
- [2] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J; SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008; 359(4):378-90.
- [3] Huang Y, Goel S, Duda DG, Fukumura D, Jain RK. Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy. *Cancer Res*. 2013;73(10):2943-8.
- [4] Huang Y, Yuan J, Righi E, Kamoun WS, Ancukiewicz M, Nezivar J, Santosuosso M, Martin JD, Martin MR, Vianello F, Leblanc P, Munn LL, Huang P, Duda DG, Fukumura D, Jain RK, Poznansky MC. Vascular normalizing doses of antiangiogenic treatment reprogram the immunosuppressive tumor microenvironment and enhance immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(43):17561-6.
- [5] Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-70.
- [6] Hato T, Goyal L, Greten TF, Duda DG, Zhu AX. Immune checkpoint blockade in hepatocellular carcinoma: current progress and future directions. *Hepatology*. 2014;60(5):1776-82.
- [7] Chen Y, Ramjiawan RR, Reiberger T, Ng MR, Hato T, Huang Y, Ochiai H, Kitahara S, Unan EC, Reddy TP, Fan C, Huang P, Bardeesy N, Zhu AX, Jain RK, Duda DG. CXCR4 inhibition in tumor microenvironment facilitates anti-programmed death receptor-1 immunotherapy in sorafenib-treated hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*. 2014 doi:10.1002/hep.27665. [Epub ahead of print]
- [8] Zhou D, Conrad C, Xia F, Park JS, Payer B, Yin Y, Lauwers GY, Thasler W, Lee JT, Avruch J, Bardeesy N. Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. *Cancer Cell*. 2009;16(5):425-38.
- [9] Jain RK. Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. *Cancer Cell*. 2014;26(5):605-22.
- [10] Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Pernot S, Nizard M, Pointet AL, Latreche S, Bergaya S, Benhamouda N, Tanchot C, Stockmann C, Combe P, Berger A, Zinzindohoue F, Yagita H, Tartour E, Taieb J, Terme M. VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J Exp Med*. 2015;212(2):139-48.