

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18104

研究課題名(和文) 前立腺癌におけるHDAC阻害剤の免疫調節作用および免疫複合療法への応用の研究

研究課題名(英文) Immunomodulatory effects of HDAC inhibitors for combination immunotherapy in prostate cancer

研究代表者

坂野 恵里 (Banno, Eri)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：60580793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌細胞株において、他癌腫で認めるようなTp53変異の有無によるHDAC阻害剤(vorinostat, entinostat)の感受性の違いは認めなかった。前立腺癌マウスモデルにおいては、HDAC阻害剤は抗腫瘍効果を示し、腫瘍関連マクロファージや制御性T細胞、骨髄由来抑制細胞の各関連遺伝子の発現低下を認め、一方で、抗腫瘍作用を有するCD8陽性T細胞関連遺伝子の発現は低下していた。抗PD-1抗体およびHDAC阻害剤の併用投与群は、抗PD-1抗体単独投与群に比し、腫瘍組織におけるCD8細胞陽性細胞数や制御性T細胞数に差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害薬の登場により、がん免疫療法の有用性が認識されている。前立腺癌におけるHDAC阻害剤の抗腫瘍効果と免疫調節機能への作用は明らかになったが、抗PD-1抗体と併用する複合免疫療法としての効果は限局的であった。本研究をもとに、前立腺癌に対するHDAC阻害剤以外の複合免疫療法の可能性を期待する。また、前立腺癌ではTP53変異が高頻度に認められ、引き続きTP53をターゲットにした治療に繋がる研究も望まれる。

研究成果の概要(英文)：In prostate cancer cell lines, there was no significant difference in sensitivity to HDAC inhibitors (vorinostat, entinostat) depending on Tp53 mutation. In mouse models of prostate cancer, a HDAC inhibitor vorinostat showed the antitumor effect, downregulating expression of genes associated with tumor-associated macrophages, regulatory T cells, and bone marrow-derived suppressor cells, while downregulating expression of genes associated with anti-tumor cytotoxic CD8+ cells. No significant difference was observed in the number of tumor-infiltrating CD8+ T cells and regulatory T cells between the combination therapy (HDAC inhibitor and anti-PD-1 antibody) and the monotherapy of anti-PD-1 antibody.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：前立腺癌 HDAC阻害剤 複合免疫療法 腫瘍免疫微小環境 TP53変異

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん細胞特異的な遺伝子異常のみならず、エピジェネティクスもがんの発生に寄与することが明らかになってきた。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDAC 阻害剤) は、ヒストンの脱アセチル化酵素を阻害し、そのアセチル化の亢進によりクロマチン構造を弛緩させる。つまり、HDAC 阻害剤は脱アセチル化を阻害することで間接的に転写活性を高める方向に働き、癌抑制遺伝子など発現抑制されていた遺伝子の発現が増加することで抗腫瘍効果を示すとされている。また、HDAC 阻害剤は IL6, IL8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  などのサイトカイン産生の制御、制御性 T 細胞や骨髄由来抑制細胞の抑制効果も報告されている。

このような HDAC 阻害剤によるサイトカインおよび免疫細胞に作用する免疫調節能を生かして、癌免疫療法における HDAC 阻害剤併用が注目されており、米国では血液腫瘍、固形癌ともに臨床試験が進んでいるが、前立腺癌に対する HDAC 阻害剤を用いた複合免疫療法の有効性は明らかになっていない。

HDAC 阻害剤 vorinostat は、*in vitro* で TP53 野生型と比べ、TP53 変異型でより強い細胞増殖抑制効果を示すことが報告されているが、TP53 変異が比較的多い前立腺癌において、その遺伝子型ごとの HDAC 阻害剤の効果は検討されていない。

### 2. 研究の目的

前立腺癌における HDAC 阻害剤の免疫調節機能への作用が解明され、免疫チェックポイント阻害剤と併用する複合免疫療法という新たなアプローチ、また TP53 の治療ターゲットとしての可能性を期待して、本研究を計画した。

### 3. 研究の方法

#### (1) HDAC 阻害剤の抗腫瘍効果の検討

当研究室で作製した前立腺特異的 PTEN ノックアウトマウスより樹立した TP53 野生型、変異型の細胞株を用い、HDAC 阻害剤の抗腫瘍効果とアンドロゲン受容体 (AR) シグナル経路などへの影響を検討した。HDAC 阻害剤 vorinostat を添加した細胞と脾臓より得られた CD8 陽性 T 細胞を共培養し、細胞増殖抑制効果を評価した。

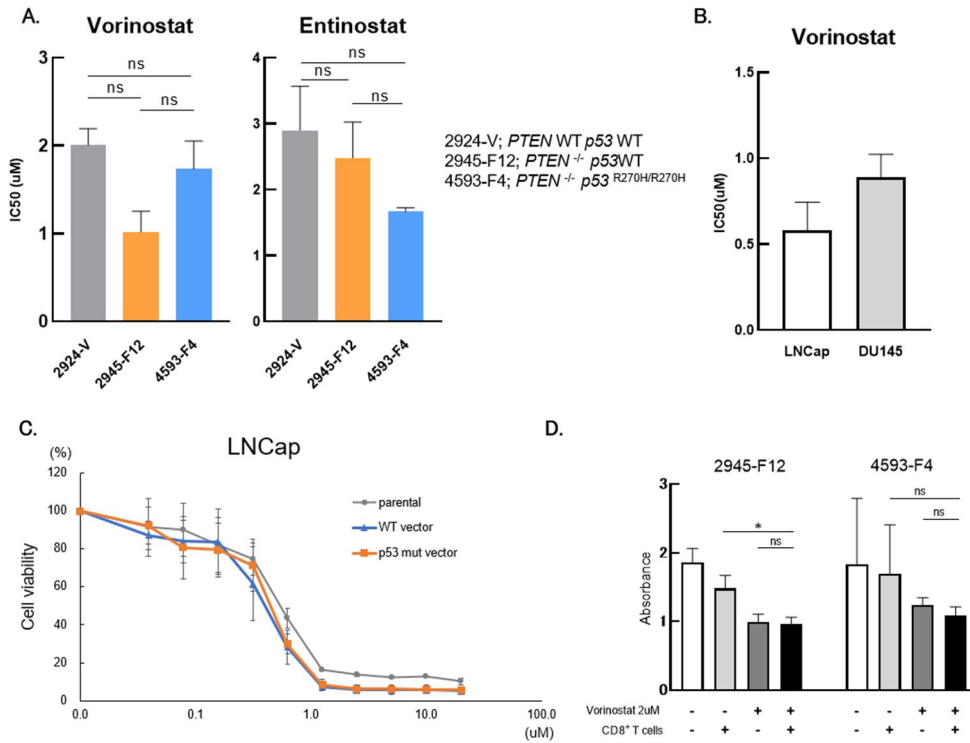
#### (2) HDAC 阻害剤の免疫調節作用の検討

前立腺特異的 PTEN ノックアウトマウスに vorinostat を投与し、マウスモデルにおける HDAC 阻害剤の至適用量と AR シグナル経路や免疫応答に与える影響を評価した。次に (1) で使用した細胞株を野生型マウスに皮下移植したマウスモデルを用い、vorinostat と抗 PD-1 抗体の併用療法の効果を検討した。

### 4. 研究成果

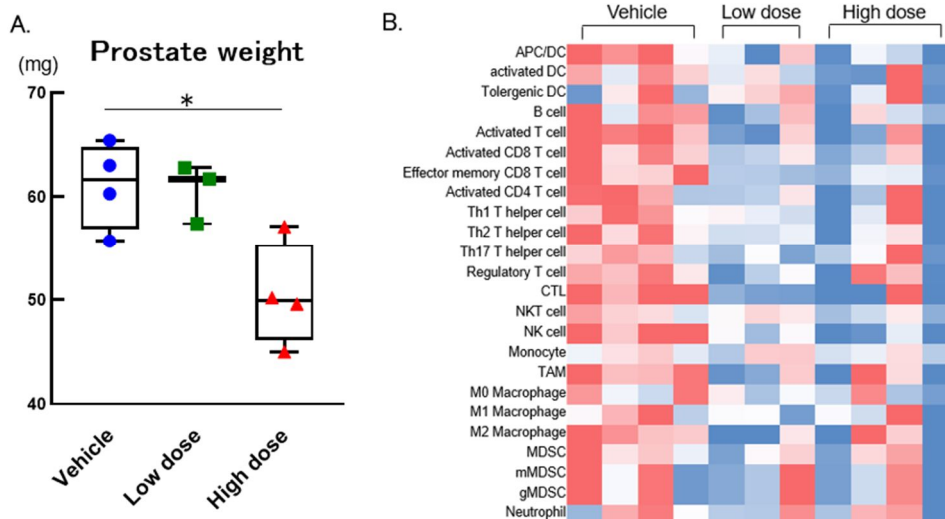
(1) 大腸癌や肺癌などにおいて、HDAC 阻害剤である vorinostat は、TP53 野生型と比べ、TP53 変異型でより強い細胞増殖抑制効果を示すことが報告されている (Sonnemann et al. BJC 2014, Li et al. Cell Death Differ 2011)。HDAC 阻害剤 vorinostat と entinostat に対する薬剤感受性を当教室で樹立した細胞株 2924-V (PTEN<sup>+/+</sup>, Tp53 WT), 2945-F12 (PTEN<sup>-/-</sup>, Tp53 WT)、4593-F12 (PTEN<sup>-/-</sup>, Tp53<sup>R270H/R270H</sup>) を用いて検証したが、TP53 異常の有無で薬剤感受性に有意な違いはなく、TP53 異常のある細胞株の方が IC50 が高かった (図 1-A)。ここでヒト前立腺癌細胞株でも検討することにして LNCap (PTEN 欠損、TP53 野生型) と DU145 (PTEN 野生型、TP53 変異型) でも HDAC 阻害剤の感受性を評価したところ同様の結果であった (図 1-B)。さらに LNCaP に p53 Dominant-negative vector set (Clontech) を用いて TP53 野生型、TP53 変異型のベクターをトランスフェクションして検討しても p53 の表現型による細胞増殖抑制効果に変化はなかった (図 1-C)。前立腺癌における TP53 異常は HDAC 阻害剤の細胞増殖抑制効果に関与しないと考えられた。次に予め vorinostat 2 $\mu$ M を添加し 72 時間培養した 2945-F12 および 4593-F4 細胞とマウス脾臓からセルソーティングした CD8 陽性細胞を抗 CD3 抗体、抗 CD28 抗体を添加して活性化させた T 細胞を 72 時間共培養、腫瘍細胞の生存率を測定した。2945-F12 においては、vorinostat にて前処理した細胞は共培養にて細胞増殖が有意に抑制されており、vorinostat による CD8 陽性 T 細胞への免疫調節能の可能性が考えられた (図 1-D)

図1



(2) TP53 変異に対する HDAC 阻害剤の感受性に違いがなかったため、TP53 野生型についてのみ検討することにした。前立腺特異的 PTEN ノックアウトマウスに vorinostat を 4 週間投与 (Low dose 50 mg/kg, High dose 100 mg/kg, ip, 5 days/week) すると high dose 群では前立腺の縮小効果を認めたが(図 2-A)、WB では AR シグナル経路や PI3K/Akt シグナル経路には変化を認めなかった。前立腺組織における 144 個の免疫関連遺伝子 mRNA 発現から我々の研究室で使用している Immune Score を算出、前立腺腫瘍組織における免疫表現型を検討した。Vorinostat 投与群では、制御性 T 細胞や骨髄由来抑制細胞、腫瘍関連マクロファージ関連遺伝子の発現は抑えられていたが、一方で CD8 陽性 T 細胞や細胞障害性 T 細胞、Th17 細胞関連遺伝子の発現も抑えられていた(図 2-B)。

図2

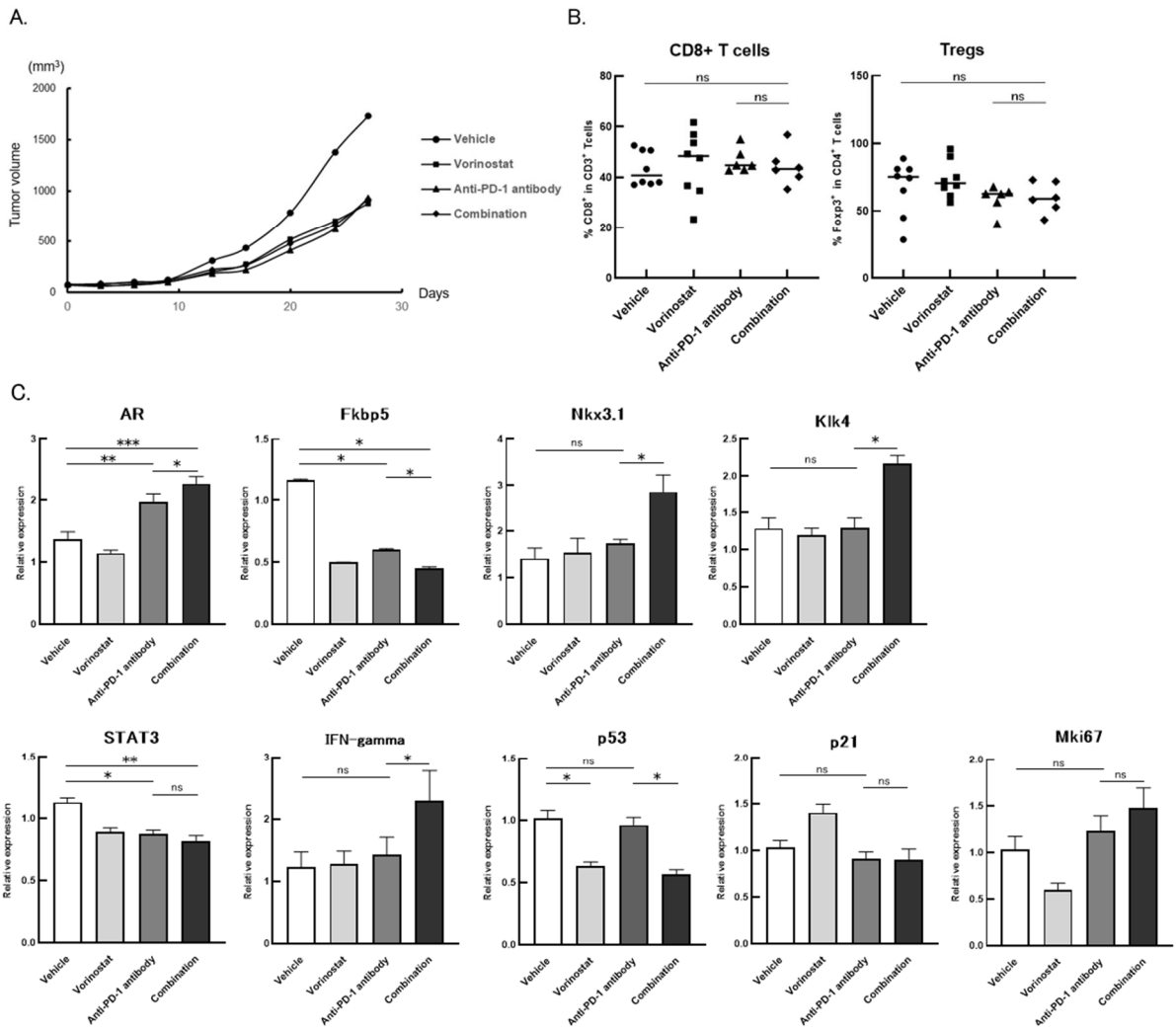


次に 2945-F12 細胞を皮下移植したマウス ( $3 \times 10^6$  個/100ul, 2ヶ所にインジェクション) を用いて、Vehicle 群 (Isotype Control IgG 10 mg/kg, ip, 2 days/week), Vorinostat 群 (100 mg/kg, ip, 5 days/week), 抗 PD-1 抗体群 (CD279 RMP1-14 10 mg/kg, ip, 2 days/week), 併用療法群 (vorinostat 100 mg/kg, ip, 5 days/week, CD279 RMP1-14 10 mg/kg, ip, 2 days/week) に分け、4 週間薬剤投与を行った。Vehicle 群以外の 3 群では腫瘍の増大は抑えられていたものの、併用療法群で有意に腫瘍増大抑制効果を認めているわけではなかった(図 3-A)。また、腫瘍組

織における CD8 陽性細胞の浸潤は Vehicle 以外の薬剤投与群で増加していたが、併用療法群と抗 PD-1 抗体群での差は認めなかった (図 3-B)。制御性 T 細胞の浸潤も薬剤投与群では減少傾向ではあったが、併用療法群と抗 PD-1 抗体群での差は認めなかった (図 3-B)。抗 PD-1 抗体群と併用療法群で有意に違いを認めたものは p53 と IFN であったが (図 3-C)、p53 については Vorinostat で有意に発現が低下しており、vorinostat による影響と考えられた。興味深いことに IFN については併用療法群でむしろ発現が増加しており、腫瘍浸潤 T 細胞数と相関していると考えられた。一方、腫瘍組織における AR や AR 標的遺伝子の発現については、Fkbp5 以外は併用療法群で有意に増加していた (図 3-C)。

以上より、前立腺癌において vorinostat は免疫抑制方向に働き、抗 PD-1 抗体との複合免疫療法としては期待できないと考えられる。

図3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂野恵里、橋本土、安富正悟、西本光寿、倉由吏恵、藤田和利、野澤昌弘、吉村一宏、デベラスコ・マルコ、植村天受
2. 発表標題 異種間遺伝子発現解析から免疫療法のための免疫表現型解析への応用
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂野 恵里、デベラスコ・マルコ、倉 由吏恵、藤田 和利、坂井 和子、橋本 土、西本 光寿、吉村 一宏、野澤 昌弘、西尾 和人
2. 発表標題 マウス前立腺癌モデルを用いた抗アンドロゲン受容体治療による分子および免疫学的反応の検討(Use of a mouse model of prostate cancer to assess molecular and immune responses to anti-androgen receptor therapy)
3. 学会等名 第81回日本癌学会総会
4. 発表年 2021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
---------	---------