

PHD 阻害薬によるがん微小環境と腫瘍免疫への影響

松永 慎司, 富田 修平

組織内に走行する血管は、組織内の細胞へ酸素や栄養などを供給する重要な組織構造である。一方、腫瘍組織では異常な血管形成が認められる。これらの背景には血管透過性の亢進、不規則な血管新生、未成熟な血管形成があると考えられている。また、これらは腫瘍血管構造の特徴でもある。したがって、腫瘍組織は血流が乏しく、組織内間質圧が高く、低酸素、低栄養、低pHの組織環境に曝されている。このような組織環境は、抗がん薬化学療法や放射線療法に対する治療抵抗性の一因とも考えられている。血管内皮特異的なプロリル水酸化酵素 (PHD) 欠損マウスにおいて形成された腫瘍において腫瘍血管は正常様の血管を形成し、腫瘍微小環境は改善することが報告されている。がん細胞・組織においてのPHDの下流のシグナル経路の低酸素誘導因子 (HIF) シグナルの増強は、がんの増殖と転移を促進するといわれている。一方で、免疫細胞においてHIFシグナル経路の亢進は、炎症を活性化し、抗腫瘍効果を誘導するとの報告もされており相反するものも多い。これらの背景より、最近開発されたPHD阻害薬が腫瘍組織に対してどのような影響を及ぼすのか、また、これまでの報告から予期されるような腫瘍血管の正常化を促し、腫瘍微小環境を改善するのか否か、腫瘍免疫にどのような影響を与えるかについて我々の知見を概説する。

キーワード：低酸素、がん微小環境、腫瘍免疫

1. はじめに

がん治療は近年、新規治療法の開発、発展などによりおおきく変化してきた。また、多くの悪性腫瘍において新規の抗がん薬は奏効率と治療成績は向上し、がん患者の生存率および生存期間の延長に寄与している。しかしながら、進行性のがんにおいては早期がんに比し抗がん薬の奏効率、生存率などは依然として低い状況である¹⁾。病期の進行したがん病態においては抗がん薬、放射線治療に抵抗性を示すことが多く、治療法や治療薬の選択肢が制限される。これら治療抵抗性は近年開発された免疫チェックポイント

阻害薬においても例外ではなく、治療抵抗性を示す悪性腫瘍に対する治療法の開発は依然としてがん治療、研究開発における課題となっている。

腫瘍組織を形成する細胞はがん細胞だけでなく、血管内皮細胞、線維芽細胞や免疫細胞など正常な臓器・組織同様に多様な細胞群で構成されている。しかし、その組織環境は正常組織とは異なり、腫瘍組織特異的な環境が形成されており、がん微小環境と呼ばれている²⁾。腫瘍組織内血管は正常血管形成による蛇行や、異常・不規則な分枝、血管内皮同士のタイトジャンクション形成が不足や微小血管を覆う周皮細胞が少ないとによる血管透過性の亢進が生じ

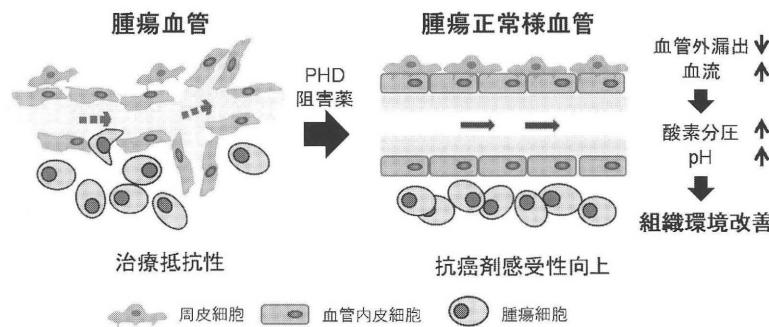


図1 肿瘍血管構造と腫瘍血管正常化の概念図



ており、血管形成が未熟な状態である。また、これらの事象により血液の血管外漏出が生じ、組織血流が低下しているとされる³⁾。そのため、組織内は低酸素、低栄養状態となっている。また、組織内間質圧が高いため薬物など、組織外からの物質送達効率も低下している⁴⁾。このような組織環境は治療抵抗性の一因にもなっている。

我々は、低酸素組織における血管の機能・役割について研究を行っており、腫瘍組織における血管という視点からプロリル水酸化酵素（PHD）阻害薬の腫瘍内血管に対する検討、解析を行った。

2. 腫瘍血管正常化とがん治療戦略

がん組織環境という視点での治療戦略はベバシズマブなどに代表されるような血管内皮増殖因子（VEGF）を標的としたものが代表的なものとして挙げられる。これら抗VEGF薬は腫瘍組織への栄養供給源である血管を断ち、がん細胞を兵糧攻めにするという考え方から開発されたが、近年の基礎、臨床研究において抗VEGF薬の適切量の投与により腫瘍組織内の血管正常化を誘導し、腫瘍組織血流を改善、および薬物送達効率を向上させることで、がん化学療法の奏効率が向上することが報告されている⁵⁻⁸⁾。多くの腫瘍組織において血管形成・血管新生が亢進している状態であり、これらの治療において抗VEGF薬は正常様血管形成の促進、腫瘍血管の成熟を促進することで、腫瘍組織内血流を改善し、低酸素、低栄養状態を改善するとされる。腫瘍内血管の正常化はがん治療において治療戦略の一つとなることが示唆されている（図1）。

3. 腫瘍組織環境と腫瘍免疫

正常組織において異常が生じた細胞やがん化した細胞は免疫監視機構により認識され排除されているが、悪性腫瘍組織内では免疫監視機構は正常に機能しておらず、がん細胞は免疫細胞の認識、攻撃から逃れているとされている⁹⁾。さらに腫瘍組織内では種々の増殖因子やサイトカインなどが産生・分泌されており、がん細胞の生存、増殖に

有利な組織環境が形成されている¹⁰⁾。近年開発された免疫チェックポイント阻害薬はT細胞の認識・応答性を改善し、抗腫瘍効果を示すが、効果を示すがん種も限られる。また、がん種および病期によっては腫瘍組織内からT細胞が排除されるものもある¹¹⁾。そのため、T細胞を利用した治療戦略では効果を示さない、期待できない場合もある。このような治療抵抗性腫瘍に対する治療戦略として着目されるのが、腫瘍組織環境である。腫瘍内組織環境を正常組織様に変えることにより、腫瘍組織内の免疫細胞は腫瘍免疫活性を回復し、免疫治療に対して反応性が得られることも報告されている^{11,12)}。

4. PHD阻害薬による腫瘍血管正常化作用

腫瘍血管正常化は腫瘍組織環境を改善する手段として有用な治療戦略と考えられている¹³⁾。著者らのグループではこれまでにPHD阻害薬は虚血組織において血管新生促進作用により創傷治癒を促進させることを明らかにしている¹⁴⁾。また、血管内皮特異的PHD2ヘテロノックアウトマウスの腫瘍移植マウスモデルでは腫瘍組織内で正常様の血管走行が生じていることが報告されている¹⁵⁾。これらの知見からPHD阻害薬が腫瘍血管正常化を誘導し、腫瘍組織環境の改善に寄与するか否かの検討を行った。

PHD阻害薬投与により腫瘍組織内血管構造の変化が認められた（図2）。特に、血管構造を評価するために血管内皮細胞マーカーであるCD31を用いて腫瘍組織を蛍光免疫染色により評価した結果、腫瘍組織切片の単位面積当たりのCD31陽性率はPHD阻害薬投与により優位に増加していた。また、血管の長径を評価した場合においても有意な上昇が認められた。腫瘍組織の血管密度評価においては単位面積当たりの血管数の低下が認められた。これらのことからPHD阻害薬は組織内の血管は不規則な分枝は抑制され、1本の血管が延長していると考えられ、不規則な蛇行や分枝といった腫瘍血管特異的な特徴が低減されていると考えられた。また、既存の腫瘍血管正常化の報告とも一致した結果であった¹⁵⁾。

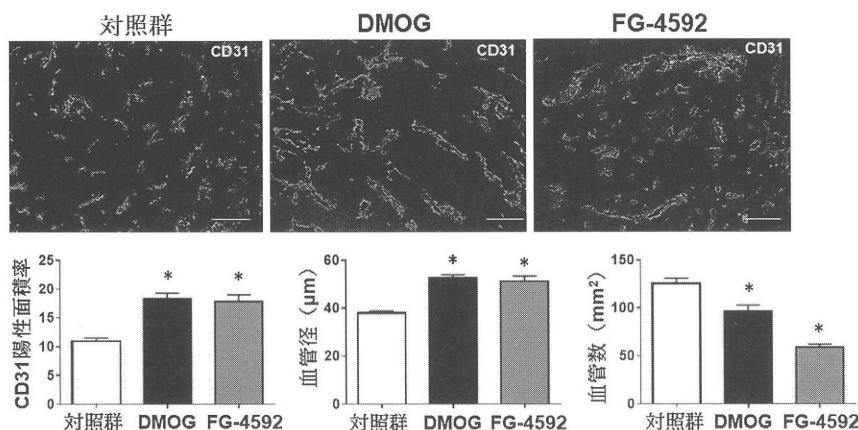


図2 PHD阻害薬の腫瘍血管構造に与える影響

腫瘍モデルマウスにPHD阻害薬投与後の腫瘍組織を血管内皮マーカーCD31により蛍光免疫染色した画像（上段）。画像解析による組織血管構造の定量解析（下段）。（文献16より改変引用）

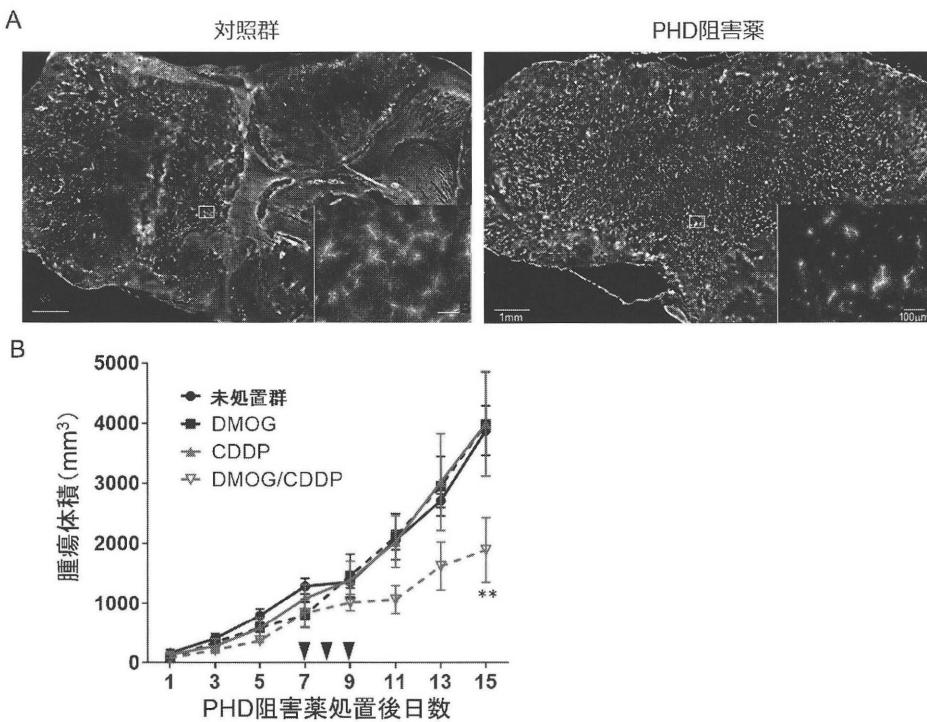


図3 腫瘍血管機能の改善による抗がん薬感受性の増強

蛍光標識高分子デキストランによる組織灌流性と血管機能評価(A). PHD阻害薬投与後7日目より3日間2.5 mg/kgシスプラチンを腹腔内投与した際の腫瘍増殖曲線(B). (文献16より改変引用)

5. 血管正常化と抗がん薬感受性の増強

PHD阻害薬による腫瘍血管構造変化が血管機能の改善をしているか検討した。対照群の腫瘍組織では組織灌流性が乏しく、血管走行も不規則であるのに対し、PHD阻害薬投与後の血管においては組織灌流性が改善し、腫瘍内の血管が規則的に走行していることが認められた(図3A)。また、PHD阻害薬投与後の組織においては血管外漏出も減少していることも確認された。これらはPHD阻害薬が血管構造変化を誘導するだけでなく機能的にも正常様の血管に改善することが示唆された。また、低分子化合物による組織内薬物動態も確認したが、PHD阻害薬投与後の組織では薬物送達効率も改善していた。これらの結果が抗がん薬による治療効果に影響を与えるか検討を行った。シスプラチニ(CDDP)単独では腫瘍増殖抑制効果が認められないが、PHD阻害薬/シスプラチニ併用群では腫瘍増殖抑制効果が認められた(図3B)。また、このことからPHD阻害薬による血管正常化は抗がん薬の薬物送達効率を改善すると共に、抗がん薬感受性を改善することが示唆された¹⁶⁾。

6. PHD阻害薬の腫瘍免疫に対する影響

腫瘍特異的組織環境を改善することにより腫瘍内の免疫細胞の免疫応答性を回復し、免疫細胞を介した治療効果が得られることが報告されている¹⁷⁻¹⁹⁾。このことからPHD阻害薬投与による腫瘍組織環境の改善が腫瘍免疫に影響するか、また、腫瘍増大に影響するか評価・検討を行った。PHD阻害薬投与により腫瘍血管正常化だけでは

なく、腫瘍増大抑制作用もあることが観察された(図4A)。また、腫瘍血管正常化は投与後6日前後かかるのに対し、腫瘍増殖抑制は投与直後より生じていると考えられた。しかしながら、PHD阻害薬のがん細胞への直接的な作用は観察されず、免疫細胞活性化による抗腫瘍効果の可能性が考えられた。また、この実験で用いたルイス肺がん細胞株による腫瘍組織中にはT細胞がほとんど確認されなかったことから、腫瘍増大抑制作用がマクロファージ(Mφ)を介するものと予想された。そのためPHD阻害薬の作用点を確認するためにPHD阻害薬と同様の作用機序となるMφ特異的VHLノックアウト(KO)マウスを用いて、腫瘍増殖への影響を検討した。VHL KOマウスでは腫瘍の増大が抑制されていることから、PHD阻害薬の効果はMφを介した作用と考えられた。次にPHD阻害薬の効果がMφを介した作用であることを確認するために図4Cに示すようにPHD阻害薬投与後のマウス腫瘍組織内よりMφを単離し、担がんマウスの腫瘍へ移入し、腫瘍に対する影響を検討した。PHD阻害薬投与した腫瘍より単離したMφを移入した群では腫瘍増大抑制が認められた。これらの結果からPHD阻害薬は腫瘍に対して血管再構築による腫瘍血管正常化を促し、それにより腫瘍組織環境の改善が生じる。また同時に、腫瘍内Mφに直接作用し、腫瘍増殖抑制作用を示すと考えられた²⁰⁾。

7. おわりに

進行期がんに対する治療手段は少なく生存率は向上してはいるが、依然として生命予後は悪い状況である。本研

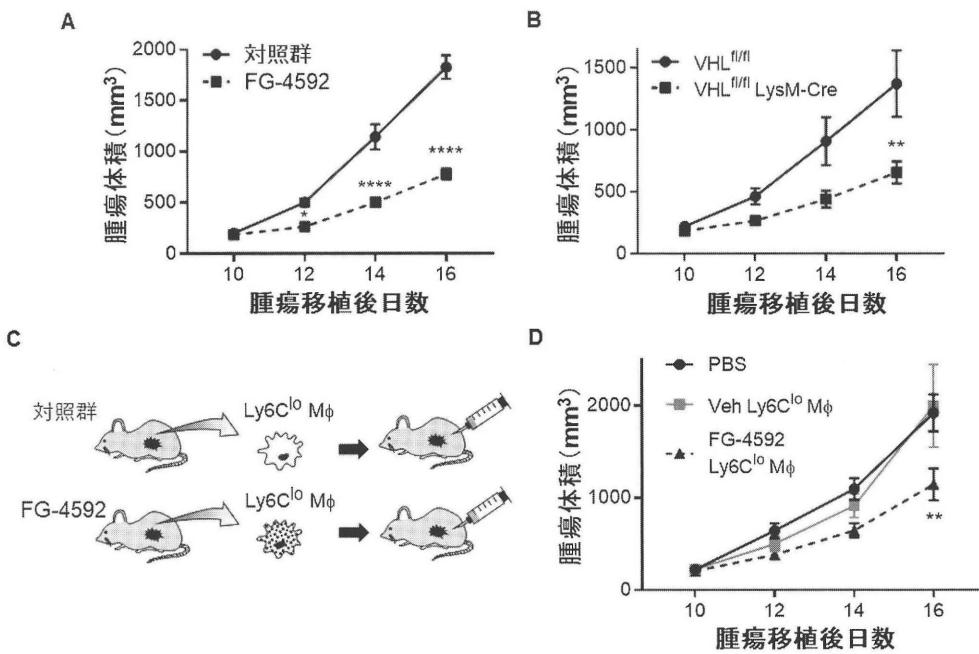


図4 PHD 阻害薬投与による腫瘍増殖抑制作用と作用機構

(A) PHD 阻害薬である FG-4592 投与腫瘍増殖曲線. (B) マクロファージ特異的 VHL ノックアウトマウスにおける腫瘍増殖曲線. (C) 肿瘍内マクロファージ移植実験概要図と (D) 肿瘍増殖曲線. A, D における処置は腫瘍移植後 10 日目に実施. (文献 20 より改変引用)

究で用いた腫瘍モデルは、T 細胞が少なく M ϕ が多量に存在する腫瘍であるため、臨的には治療抵抗性の悪性腫瘍とされる²¹⁾. 今回の我々の PHD 阻害薬を利用した検討が、このような治療抵抗性腫瘍に対する新たな治療戦略の開発に繋がることが期待される.

現在、PHD 阻害薬は慢性腎不全における貧血に対する新規薬剤として承認され、数種の薬剤も第Ⅲ相試験が行われている. PHD-HIF 経路は生体において様々な影響を及ぼすと考えられているため、今後これらの PHD 阻害薬が臨床使用され、様々な臨床的有用性や副作用などの情報が蓄積されることにより、PHD 阻害薬の有用性およびその他の疾患への応用に繋がっていくことが期待される.

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない.

文 献

- 1) 全がん協生存率調査 <http://www.zengankyo.ncc.go.jp/etc/seizouritsu/seizouritsu2010.html>
- 2) Quail DF, et al. Nat Med. 2013;19:1423-1437.
- 3) Hashizume H, et al. Am J Pathol. 2000;156:1363-1380.
- 4) Goel S, et al. Physiol Rev. 2011;91:1071-1121.
- 5) Huang Y, et al. Cancer Res. 2013;73:2943-2948.
- 6) Jain RK. Cancer Cell. 2014;26:605-622.
- 7) Huang Y, et al. Cancer Res. 2013;73:7144-7146.
- 8) Tolaney SM, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112:14325-14330.
- 9) DuPage M, et al. Nature. 2012;482:405-409.
- 10) Zou W. Nat Rev Cancer. 2005;5:263-274.
- 11) Binnewies M, et al. Nat Med. 2018;24:541-550.
- 12) Huang Y, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:17561-17566.
- 13) Jain RK. Science (New York, N.Y.). 2005;307:58-62.
- 14) Takaku M, et al. PLoS One. 2012;7:e42964.
- 15) Mazzone M, et al. Cell. 2009;136:839-851.
- 16) Koyama S, et al. Sci Rep. 2017;7:45621.
- 17) Pallasch CP, et al. Cell. 2014;156:590-602.
- 18) Tian L, et al. Nature. 2017;544:250-254.
- 19) Wu X, et al. Cancer Immunol Res. 2016;4:858-868.
- 20) Nishide S, et al. iScience. in press.
- 21) Thommen DS, et al. Cancer Cell. 2018;33:547-562.

The effect of PHD inhibitor on tumor microenvironment and tumor immune response

Shinji Matsunaga, Shuhei Tomita

Department of Pharmacology, Osaka City University Graduate School of Medicine

Abstract. Tumor tissue environment is generally exposed to low oxygen, nutrition depletion and high interstitial pressure condition. These circumstances are caused by vascular hyper-permeability, irregular vascularization and immature vessels. The blood vessel is important tissue structures to deliver oxygen, nutrition and so on. An abnormal blood vessel formation is a common feature of tumor tissue that were characterized by hyper-permeability, irregular vascularization, immature vessels and intravasation. Therefore, tumor tissue is exposed to low oxygen nutrition depletion and low pH due to hypoperfusion and elevated interstitial pressure. These environments are one of the reasons for chemo- and radio-resistance. Previously, we reported that prolyl hydroxylase (PHD) inhibitor induced tumor blood vessel normalization and improved tumor microenvironment in tumor mouse model. However, effects of PHD inhibitor on tumor progression is controversial. Enhanced hypoxia inducible factors (HIFs) signaling in cancer cells act to promote cancer proliferation and metastases. On the other hand, increasing of HIFs signaling in immune cells may lead to activate inflammation and elicit anti-tumor effect. We describe our study how PHD inhibitor improved tumor microenvironment and focused on tumor infiltrate immune cells were phenotypic alteration after PHD inhibitor treatment in mouse model. Our results implied that PHD inhibitor was possibly beneficial for anti-cancer therapy.