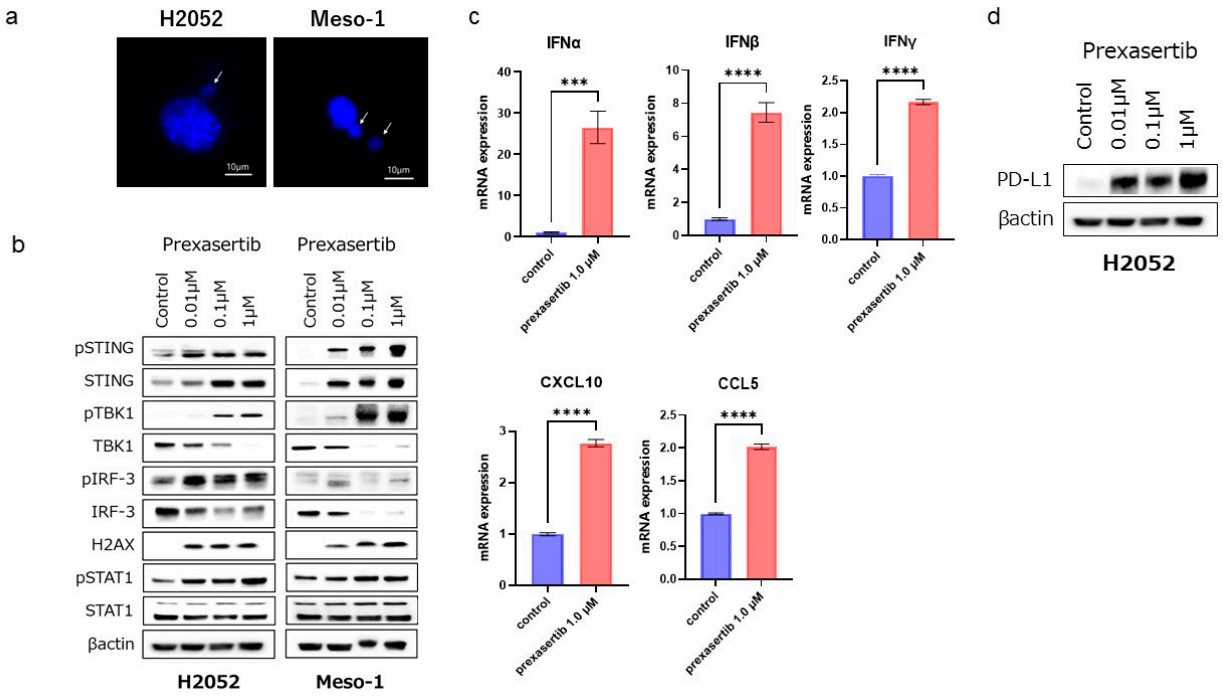
155　胸膜中皮腫に対する新規がん化学免疫療法の開発	谷口　寛和

【目的】胸膜中皮腫は、稀少ながん種の 1 つであり、薬物療法における治療選択肢が非常に少ない。その中で、PD-1 阻害剤と CTLA-4 阻害剤の併用療法や、化学療法と PD-L1 阻害剤の併用療法の一定の治療効果が報告され、がん免疫療法が他のがん種同様期待されているものの、その治療効果は限定的であり、予後延長にさらに寄与する治療法の開発が望まれる。本研究では、がん免疫療法の効果を増強する薬剤として、DNA 修復機構阻害剤に着目し研究を行った。

【方法】ヒト胸膜中皮腫細胞株である H2052、H2452、Meso-1、Meso-4 を使用した。*in vitro* の実験として、細胞増殖 assay（MTT assay）、Apoptosis assay（Annexin V、DAPI を用いた flowcytometry 法）、Western blotting 法、real time PCR 法を用いて検討を行った。

【結果】DNA 修復機構阻害剤である、ATR 阻害剤、ATM 阻害剤、WEE1 阻害剤、CHK1 阻害剤を用いて、MTT assay にて各薬剤の胸膜中皮腫細胞株に対する効果を検討した。その中で、WEE1 阻害剤、CHK1 阻害剤が低濃度で有効性を示すことを発見した。このうち CHK1 阻害剤である Prexasertib は、胸膜中皮腫細胞株に対して、Cisplatin よりも低濃度で強い細胞増殖抑制効果を示し、濃度依存性に Apoptosis を誘導することが確認された。加えて、Prexasertib の投与により STING 経路が活性化され、Type 1 インターフェロンの発現が上昇し、PD-L1 の発現も増加することが示唆された。これらの結果から、Prexasertib ががん免疫賦活を促進し、直接的な抗腫瘍効果だけでなく、がん免疫微小環境にも影響を与えることを示唆された。今後は、*in vivo* の検討や PD-1 阻害剤との併用効果について検討を進めることとした。

CHK1 阻害剤が胸膜中皮腫細胞のがん免疫微小環境に与える影響



155. 胸膜中皮腫に対する新規がん化学免疫療法の開発

谷口　寛和

長崎大学病院 呼吸器内科 がん診療センター

Key words：胸膜中皮腫，DNA 修復，免疫チェックポイント，CHK1

緒　言

胸膜中皮腫は、アスベスト曝露が原因となり、数十年後に発症する予後が不良な胸部悪性疾患である。稀少疾患であるため、臨床試験が実施しにくく、新規治療法の開発が他のがんより進みにくい。近年では、PD-1（Programmed death-1）/PD- Ligand 1（PD-L1）や、cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4（CTLA-4）らの免疫チェックポイント阻害剤が、多くのがんにおいて一定の治療効果を示すことが明らかとなってきた。予後不良の胸膜中皮腫においても臨床試験で、PD-1 阻害剤と CTLA-4 阻害剤の併用療法や、化学療法と PD-L1 阻害剤の併用療法の一定の治療効果が報告された［1, 2］。がん免疫療法が期待される一方でその効果は限定的であり、更なる予後改善に寄与する治療法の開発が課題の 1 つである。

近年、多くのがん種における新規治療標的の 1 つとして DNA 修復機構が注目されている。がん細胞は正常細胞と比較して、DNA に多くの異常を有しており、細胞の DNA 修復機構が重要な役割を担っている。DNA 修復機構は、DNA が損傷を持ったまま細胞分裂を行わないように、損傷した DNA を修復し、DNA の修復が完了するまで細胞周期を停止させる。具体的には WEE1、ATR、ATM、CHK1、CHK2 などの細胞周期チェックポイント分子が活性化することで、細胞周期は停止し、DNA の修復が行われている。この機構を阻害することで、DNA に損傷を有した状態でがん細胞の分裂を進行させ、細胞死が誘導される。近年、これらの分子を標的とした開発が進んでいる［3］。

本研究では、胸膜中皮腫に対する新規治療法として DNA 修復機構阻害剤の可能性について探索した。先に挙げた細胞周期チェックポイント分子のうち、特に CHK1 阻害剤に着目し、胸膜中皮腫にもたらす直接的な抗腫瘍効果、他の殺細胞性抗がん剤との併用効果、がん免疫微小環境に与える影響、免疫チェックポイント阻害剤との併用効果について広く探索した。

方　法

1. 細胞培養と細胞増殖 assay

ヒト胸膜中皮腫細胞株である H2052、H2452、Meso-1、Meso-4 を使用した。細胞は RPMI＋10%FBS＋抗生剤入りの培地で培養をした。

細胞増殖 assay として 3-（4,5-Dimethylthial-2-yl）-2,5-Diphenyltetrazalium Bromide（MTT）assay を行った。概要としては、96 well plate に細胞を 2,000～3,000 cells/well となるように分割し、翌日から濃度を振って薬剤の投与を行った。薬剤曝露から 72 時間の時点で培養液を破棄し、50 μg の MTT 溶液を well に入れ、2 時間後に dimethyl sulfoxide（DMSO）を加え、吸光度を測定した。

2. Apoptosis assay

アポトーシスアッセイは Annexin V を用いた。薬剤投与から 72 時間後に Annexin V、DAPI で染色し、Flowcytometry 法にて検討した。

3. Real time PCR

インターフェロン、ケモカインの mRNA レベルでの発現を real time PCR 法で測定した。Total RNA は、NucleoSpin® RNA Plus キット（TaKaRa Bio Inc.）を使用し抽出した。cDNA 合成には、SuperScript VILO cDNA 合成キットおよびマスターミックス（Invitrogen）を使用した。TaqMan 遺伝子発現アッセイ（Thermo Fisher Scientific）を使用した。qPCR 解析は、ViiA7 リアルタイム PCR システム（Applied Biosystems）を用いた。相対 mRNA レベルは、$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法を使用して計算した。

4. Western blotting

20～50 μg ずつのタンパク質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動（Bio-Rad、Hercules、CA）によって分離した。免疫反応性のバンドは、Super Signal West Dura Extended Duration Substrate Enhanced Chemiluminescent Substrate（Pierce Biotechnology）を使用し検出した。

結　果

1. 胸膜中皮腫に対する DNA 修復機構阻害剤の効果

ヒト胸膜中皮腫に対する DNA 修復機構阻害剤の効果を検討するため、MTT assay にて各薬剤の単剤での細胞増殖効果を確認した。その結果、WEE1 阻害剤である Adavosertib、CHK1 阻害剤である Prexasertib は、胸膜中皮腫に対する Key drug である Cisplatin よりも低濃度で強い細胞増殖抑制効果を発揮していることを発見した(図 1)。これらの薬剤のうち、CHK1 阻害剤に着目して更に実験を進めた。アポトーシス assay では、Prexasertib は濃度依存性に Apoptosis を誘導しており、直接的な抗腫瘍効果を有することが *in vitro* で証明された（図 2a、b)。また、DNA 損傷を誘導する抗悪性腫瘍薬の 1 つである Cisplatin と併用することで、相乗効果をもたらすことが判明した（図 2c)。

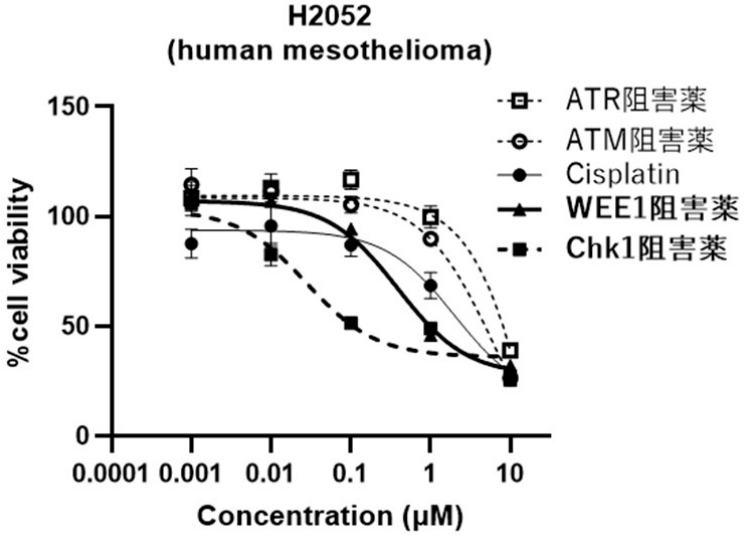


図 1. DNA 修復機構阻害剤の細胞増殖抑制効果
H2052 細胞に対して ATR 阻害剤、ATM 阻害剤、Cisplatin、WEE1 阻害剤、Chk1 阻害剤を各濃度で投与し、72 時間後に MTT assay 法にて細胞増殖を評価。

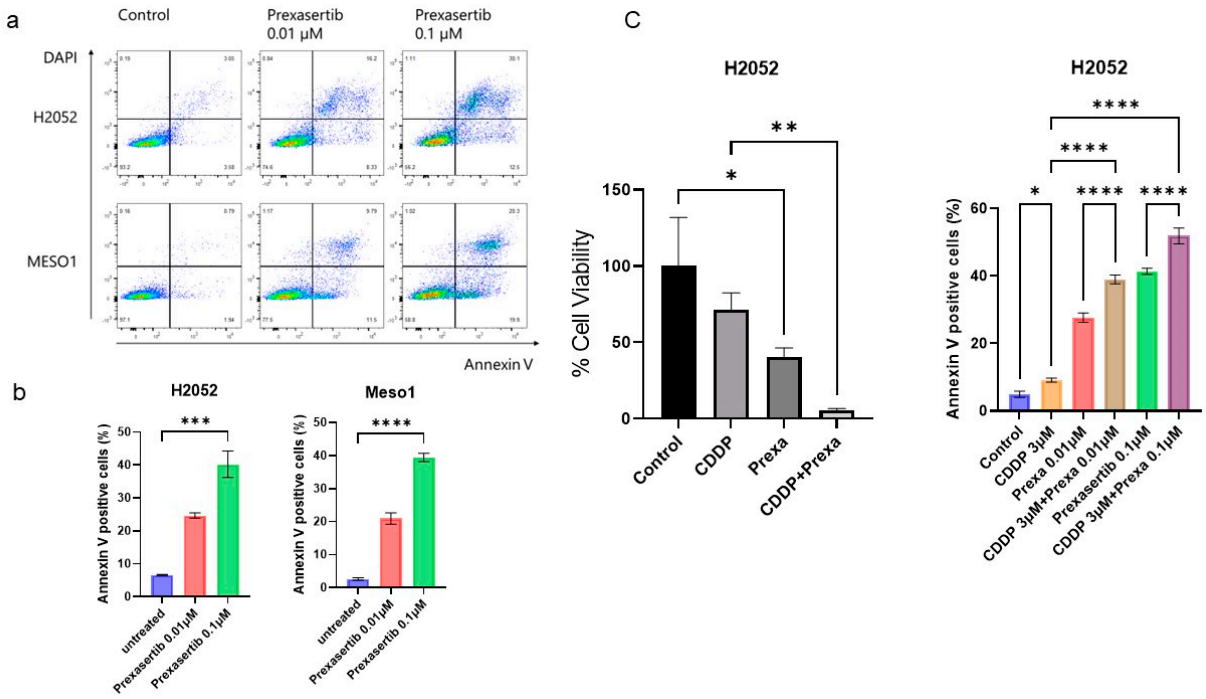


図 2. Prexasertib がもたらす直接的な抗腫瘍効果

a) Vehicle、Prexasertib 投与 72 時間後の H2052、MESO1 における Annexin V assay における Flowcytometry の Gating。

b) Annexin V 陽性細胞の割合。***P＜0.001、****P＜0.0001（Student T test）。

c) 左）Cisplatin（CDDP）3μM、Prexasertib（prexa）0.01μM の単剤および併用療法の細胞増殖 assay。72 時間投与後 MTT assay で評価。右）各濃度で CDDP、Prexa の単剤および併用療法のアポトーシスアッセイ。72 時間後、Annexin V assay で評価。*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.001、****P＜0.0001（One way ANOVA test）。

2. CHK1 阻害剤ががん免疫微小環境にもたらす影響

これまでの報告で Prexasertib は小細胞肺癌に対して、直接的な抗腫瘍効果に加え、STING 経路の活性化、Interferon β を介した、がん免疫賦活化作用を示すことや、PD-L1 の発現を誘導することが報告されている。そこで、胸膜中皮腫に対して Prexasertib ががん免疫賦活を発揮するかを検討した。Prexasertib はその作用機序から、細胞の DNA に損傷を有する状態のまま細胞周期を進めるため、不適当な細胞分裂が生じ、これに引き続いて Type1 インターフェロンの発現に寄与する STING 経路の活性化が起こることが報告されている。胸膜中皮腫細胞株においても、Prexasertib 曝露後に DAPI を用いて細胞染色を行ったところ、Micronuclei と呼ばれる小型の核が分裂しており、不均一な細胞分裂が誘導されていることが確認された（図 3a）。

Western blotting 法を用いたシグナル解析では、STING、TBK1、IRF3 のタンパクのリン酸化が亢進しており、STING 経路の活性化が惹起されていた（図 3b）。リアルタイム PCR 法を用いた Type 1 インターフェロン、CXCL10、CCL5 の mRNA 発現は Prexasertib によって上昇していることが検出された（図 3c）。また、Western blotting によるタンパク解析では、PD-L1 の発現も Prexasertib の投与によって上昇しており、Prexasertib は直接的な抗腫瘍効果のみならずがん免疫微小環境にも影響を与えることが示唆された（図 3d）。

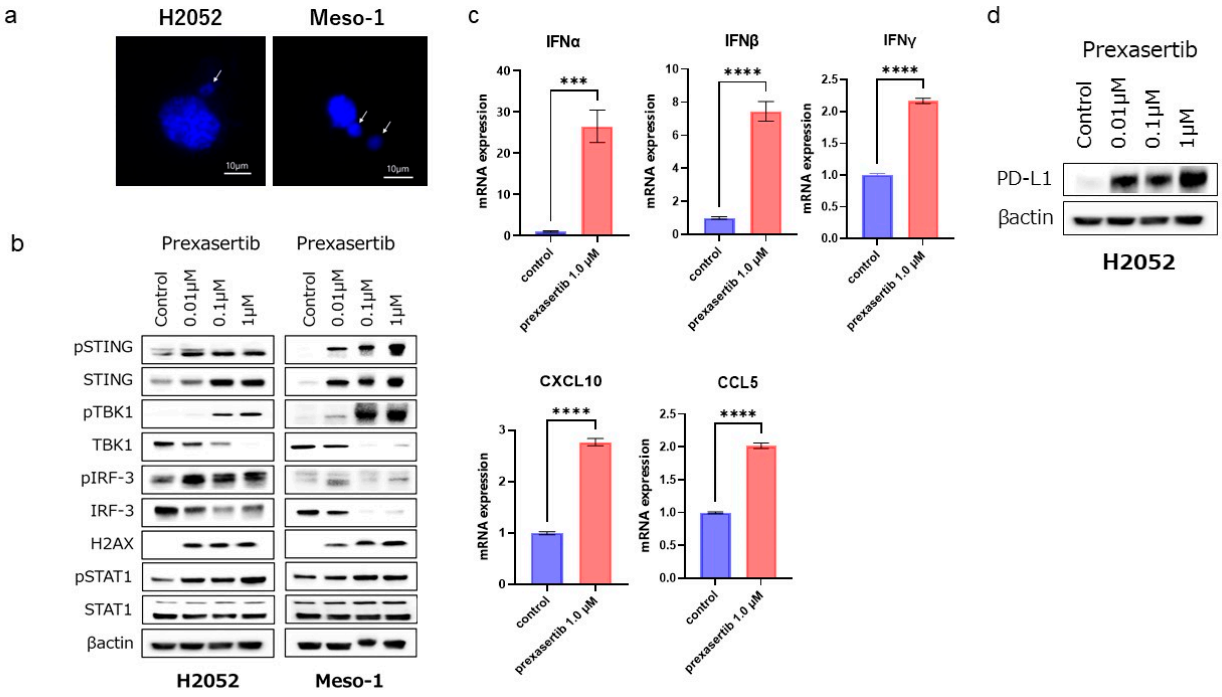


図 3. Prexasertib が腫瘍免疫与える影響について

a) H2052、Meso-1 において Prexasertib 投与 24 時間後、DAPI にて細胞を染色し、micronuclei の出現を確認。スケールバー：10μm。

b) H2052、Meso-1 において STING 経路の活性化を Western blotting 法にて検討。

c) H2052 における IFNα、β、γ、CXCL10、CCL5 の mRNA 発現を Prexasertib 投与 72 時間後、RNA を回収し real time PCR 法にて測定。***P＜0.001、****P＜0.0001（Student T test）。

d) Prexasertib 72 時間投与後の PD-L1 タンパク発現。

考　察

胸膜中皮腫細胞株に対して、DNA 修復機構阻害剤の治療効果を検討するスクリーニングを行い、CHK 阻害剤である Prexasertib による直接的な抗腫瘍効果、がん免疫賦活化効果に関する検討を実施した。現時点では、Prexasertib 単剤または Cisplatin との併用による治療効果を有すること、STING 経路の活性化による免疫賦活化作用、PD-L1 の発現を誘導することを証明した。

CHK1 は、主に細胞周期の G2/M 期に関与する細胞周期チェックポイントであり、ATR と共同して細胞周期を調整する。正常細胞の DNA 損傷として、特に Double strand DNA break が起こった際には大幅な DNA 修復が必要となるため細胞周期を止め、DNA 修復を図る［4］。ATR や CHK1 は、このような時に活性化することで DNA が修復されるまで細胞周期を止めることで細胞に保護的に働く。腫瘍細胞は一般に DNA の損傷が多く、細胞周期チェックポイントをはじめとする DNA 修復機構が活性化しており、抗悪性腫瘍薬として開発が行われている。Prexasertib は、小細胞肺癌における Preclinical study にてその直接的な抗腫瘍効果に加え、Interferon β を介した免疫賦活化作用、PD-1 阻害剤との併用効果が報告されており、腫瘍免疫に関与するとされる［5］。近年では小細胞肺癌、BRCA 野生型の卵巣癌に対する臨床試験も実施され、安全性の担保もされてきた［6，7］。しかしながら、これらの臨床研究では Prexasertib 単剤での有効性は限定的であり、他の薬剤の併用した更なる治療戦略の開発が必要と考えられる。

本研究では、我々は Prexasertib の治療により腫瘍細胞の PD-L1 発現が上昇することを発見した。PD-L1 は細胞傷害性 T 細胞の疲弊に関与し、がん免疫に抑制的に働く因子であることは広く知られている。抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体は本邦でも承認されており、実地臨床でも多くのがん種で用いられている。今後、Prexasertib と PD-1 阻害剤の併用効果を検証する動物実験を施行する予定である。また、Prexasertib がもたらす遺伝子発現の変化について広く検討するため、RNA sequence に提出し解析を追加する。

本研究は、稀少疾患である胸膜中皮腫に対する新規治療法の確立に向けた Preclinical study として更に検証を進め、エビデンスの構築を目指す。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、長崎大学先端創薬イノベーションセンターの田中義正先生である。

文　献

1) Baas P, Scherpereel A, Nowak AK, Fujimoto N, Peters S, Tsao AS, Mansfield AS, et. al., First-line nivolumab plus ipilimumab in unresectable malignant pleural mesothelioma (CheckMate 743): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet. 2021 Jan 30;397(10272):375-386. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32714-8. Epub 2021 Jan 21. Erratum in: Lancet. 2021 Feb 20;397(10275):670. PMID: 33485464.

2) Forde PM, Anagnostou V, Sun Z, Dahlberg SE, Kindler HL, Niknafs N, et. al., Durvalumab with platinum-pemetrexed for unresectable pleural mesothelioma: survival, genomic and immunologic analyses from the phase 2 PrE0505 trial. Nat Med. 2021 Nov;27(11):1910-1920. doi: 10.1038/s41591-021-01541-0. Epub 2021 Nov 8. PMID: 34750557; PMCID: PMC8604731.

3) Sen T, Gay CM, Byers LA. Targeting DNA damage repair in small cell lung cancer and the biomarker landscape. Transl Lung Cancer Res. 2018 Feb;7(1):50-68. doi: 10.21037/tlcr.2018.02.03. PMID: 29535912; PMCID: PMC5835589.

4) Groelly FJ, Fawkes M, Dagg RA, Blackford AN, Tarsounas M. Targeting DNA damage response pathways in cancer. Nat Rev Cancer. 2023 Feb;23(2):78-94. doi: 10.1038/s41568-022-00535-5. Epub 2022 Dec 5. PMID: 36471053.

5) Sen T, Rodriguez BL, Chen L, Corte CMD, Morikawa N, Fujimoto J, et. al., Targeting DNA Damage Response Promotes Antitumor Immunity through STING-Mediated T-cell Activation in Small Cell Lung Cancer. Cancer Discov. 2019 May;9(5):646-661. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1020. Epub 2019 Feb 18. PMID: 30777870; PMCID: PMC6563834.

6) Konstantinopoulos PA, Lee JM, Gao B, Miller R, Lee JY, Colombo N, et, al., A Phase 2 study of prexasertib (LY2606368) in platinum resistant or refractory recurrent ovarian cancer. Gynecol Oncol. 2022 Nov;167(2):213-225. doi: 10.1016/j.ygyno.2022.09.019. Epub 2022 Sep 30. PMID: 36192237; PMCID: PMC10673677.

7) Byers LA, Navarro A, Schaefer E, Johnson M, Özgüroğlu M, Han JY, et. al., A Phase II Trial of Prexasertib (LY2606368) in Patients With Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. Clin Lung Cancer. 2021 Nov;22(6):531-540. doi: 10.1016/j.cllc.2021.04.005. Epub 2021 Apr 24. PMID: 34034991.