



Title	血管新生阻害剤先行投与がもたらす肺癌免疫療法に与える影響に関する研究
Author(s)	佐藤, 峰嘉
Description	配架番号 : 2763
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15445号
Issue Date	2023-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15445
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89987
Type	doctoral thesis
File Information	SATO_Mineyoshi.pdf



学位論文

血管新生阻害剤先行投与がもたらす肺癌免疫療法に
与える影響に関する研究

(Studies on the effects of pre-administering
an angiogenic inhibitor in immunotherapy for
lung cancer)

2023 年 3 月

北海道大学

佐藤峰嘉

学位論文

血管新生阻害剤先行投与がもたらす肺癌免疫療法に 与える影響に関する研究

(Studies on the effects of pre-administering
an angiogenic inhibitor in immunotherapy for
lung cancer)

2023 年 3 月

北海道大学

佐藤峰嘉

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
方法	10 頁
結果	17 頁
考察	31 頁
結論	35 頁
謝辞	37 頁
利益相反	38 頁
引用文献	39 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の結果の一部は以下の論文に投稿中である.

Mineyoshi Sato, Nako Maishi, Yasuhiro Hida, Aya Yanagawa-Matsuda, Mohammad Towfik Alam, Jun Sakakibara-Konishi, Jin-Min Nam, Yasuhito Onodera, Satoshi Konno, Kyoko Hida.

Angiogenic inhibitor pre-administration improves the therapeutic effects of Immunotherapy

Cancer Medicine

本研究の一部は以下の学会で発表した.

1. 佐藤峰嘉, 間石奈湖, 樋田泰浩, 今野哲, 樋田京子 : Vascular normalization window and tumor immunity of mouse lung cancer. 第 28 回日本血管生物医学会学術集会, 2021 年 3 月 13 日 (WEB 開催).
2. Mineyoshi Sato, Nako Maishi, Yasuhiro Hida, Aya Matsuda, Jun Sakakibara-Konishi, Satoshi Konno, Kyoko Hida: Angiogenic inhibitor administration prior to immunotherapy improves the therapeutic effects. 第 39 回札幌国際がんシンポジウム, 2021 年 7 月 7 日 (札幌).
3. 佐藤峰嘉, 間石奈湖, 樋田泰浩, 松田彩, 今野哲, 樋田京子 : 免疫療法に先行した AI 投与は治療効果を改善する. 第 80 回日本癌学会学術集会, 2021 年 10 月 2 日 (横浜).
4. 佐藤峰嘉, 間石奈湖, 樋田泰浩, 松田彩, 榊原純, 今野哲, 樋田京子 : AI の先行投与による免疫療法の治療効果増強. 第 55 回北海道病理談話会, 2022 年 9 月 17 日 (札幌).
5. Mineyoshi Sato, Nako Maishi, Yasuhiro Hida, Aya Matsuda, Jun Sakakibara, Kyoko Hida: Angiogenic inhibitor pre-administration improves the therapeutic effects of immunotherapy. 第 81 回日本癌学会学術総会, 2022 年 9 月 30 日 (横浜) .

要旨

【背景と目的】

本邦において肺癌は最も罹患者数が多く、予後不良の悪性腫瘍の一つである。近年、進行期術後再発肺癌に対して免疫チェックポイント阻害剤が用いられており、一部の患者では高い治療効果を示している。しかし、多くの患者においては単剤では効果が不十分で、殺細胞性抗がん剤や血管新生阻害剤等が併用されている。多剤併用による化学療法の一つ、カルボプラチン・パクリタキセル・ベバシズマブ・アテゾリズマブ療法においても、患者の予後は十分には改善されていない。

腫瘍血管は正常血管に比し、内皮細胞間接着や周皮細胞による被覆が減弱であるため漏出性が高く、組織間圧が高くなることから無秩序な走行を呈し、血流が障害されている。そのため腫瘍組織内は有効な血液循環が得られず低酸素に陥っており、また薬剤送達性や免疫細胞の浸潤も障害されている。ベバシズマブやラムシルマブをはじめとする血管新生阻害剤は、過剰な血管内皮増殖因子（VEGF）を抑制することで腫瘍血管を正常化し、腫瘍組織内への薬剤送達や免疫細胞浸潤を改善することが知られており、実際の臨床でも腫瘍血管正常化による免疫細胞動員の増加を期待して用いられている。血管新生阻害剤による血管正常化効果が表れるまでに、投与から時間を要することが前臨床モデルで指摘されているが、実臨床では、血管新生阻害剤は免疫チェックポイント阻害剤をはじめとした併用薬と同日に投与されている。そのため、併用薬が投与される時点では腫瘍血管は正常化されていない。すなわち、同日投与では血管新生阻害剤による腫瘍血管正常化効果を十分活用できていないと考えられる。そこで我々は肺癌免疫療法において、血管新生阻害剤の先行投与によって腫瘍血管が正常化したタイミングで他薬剤を投与することにより、現行の同日投与より大きな治療効果が得られるのではないかと仮説を立てた。本研究では、マウス肺癌皮下腫瘍モデルを用いて、血管新生阻害剤の先行投与が治療効果改善につながるかについて、主に免疫組織学的手法を用いて検討した。

【材料と方法】

C57BL/6J マウスにマウス由来肺癌細胞株 Lewis Lung Carcinoma (LLC) もしくは Venus-Rluc 遺伝子導入 LLC (LLC-Venus-Rluc) を皮下注射して、マウス肺癌モデルを作製した。血管新生阻害剤として抗マウス VEGFR2 モノクローナル抗体 DC101 を用いた。薬剤投与後の腫瘍血管正常化のタイミングについて、DC101 投与後、経時的に腫瘍を摘出して評価した。CD31 免疫染

色により血管新生阻害効果を解析し、血管正常化を周皮細胞の被覆率で評価した。周皮細胞は α SMA 蛍光免疫染色で可視化した。また、組織の低酸素領域については GLUT1 免疫染色で、腫瘍組織浸潤 CD8 陽性細胞を CD8 α 蛍光免疫染色で検討した。以上の解析結果で明らかになった血管正常化のタイミングを踏まえ、次に免疫チェックポイント阻害剤との併用療法の効果を検討した。免疫チェックポイント阻害剤として抗マウス PD-1 抗体 RMP1-14 を用い、DC101 の併用療法において抗腫瘍効果を評価した。周皮細胞被覆率と腫瘍組織浸潤 CD8 陽性細胞を上記同様に評価し、腫瘍組織中の PD-L1 の発現率を PD-L1 免疫染色により算出した。また、転移については発光 in vivo イメージングにより検出した。さらに実臨床の治療法に準じて、血管新生阻害剤、免疫チェックポイント阻害剤、殺細胞性抗がん剤の 3 剤併用についても検討した。DC101 と RMP1-14 とパクリタキセルの同時投与と血管新生阻害剤 DC101 先行投与について、治療効果を比較した。腫瘍サイズの計測により抗腫瘍効果、組織切片のヘマトキシリン・エオジン染色により腫瘍組織壊死を解析した。上記同様の免疫染色法により、微小血管密度や CD8 陽性細胞の浸潤率を解析した。肺転移は摘出肺組織のヘマトキシリン・エオジン染色で検討した。腫瘍組織内の CD8 陽性細胞の活性化状態は、real-time polymerase chain reaction 法により Granzyme B と IFN- γ の mRNA 発現により評価した。

【結果】

DC101 単剤単回投与のモデルでは、腫瘍組織内の微小血管密度は投与 7 日後までは低下していたが、14 日後には再度上昇した。血管正常化の指標の一つである周皮細胞による血管の被覆は、DC101 投与 3 日後に最大になった。腫瘍組織低酸素領域も投与 3 日後に最も縮小し、血管の正常化が血流を改善したことが示唆された。また、CD8 陽性 T 細胞の腫瘍組織浸潤も投与 3 日後に増加する傾向がみられた。これらの結果から、このモデルでは DC101 投与 3 日後に最も血管が正常化されると考えられた。これらの結果を踏まえ、DC101 と RMP1-14 の併用療法では、2 剤の同時投与と DC101 の 3 日先行投与を比較した。腫瘍増殖は DC101 先行投与群で抑制される傾向がみられた。CD8 陽性細胞の浸潤は先行投与群で増加する傾向がみられた。腫瘍内の PD-L1 の発現を検討したところ、同時投与群で先行投与群より有意に減少し、免疫チェックポイント阻害作用により腫瘍細胞がより除去されたことが示唆された。最後に DC101 と RMP1-14 とパクリタキセルの併用療法では、無治療群、DC101 なし群、DC101 同時投与群と先行投与群の比較を行なった。DC101 先行投与群で最も大きい腫瘍増殖抑制効果が得られ

た．組織学的な解析においても壊死領域が最も拡大しており，生存する癌組織が減少したことが示された．腫瘍組織内の微小血管密度は血管新生阻害剤投与群で少なく，血管新生阻害剤による血管新生阻害効果がみられた．腫瘍浸潤 CD8 陽性細胞数は DC101 先行投与群で多い傾向がみられた．CD8 陽性細胞の Granzyme B および IFN- γ の mRNA 発現は血管新生阻害剤投与群で高くなる傾向がみられ，血管新生阻害剤の投与ががん免疫を活性化することが示唆された．

【結論】

血管新生阻害剤先行投与によって腫瘍血管があらかじめ正常化されることで，後続して投与する免疫チェックポイント阻害剤をはじめとした併用薬の効果が増強されることが示唆された．血管正常化によって免疫細胞の浸潤が促進されたこと，免疫細胞機能障害の要因にもなる低酸素等の腫瘍微小環境が改善されたこと，また併用薬の薬剤送達が改善したことがその機序として考えられる．以上より，血管新生阻害剤の量や種類の変更ではなく，投与タイミングの変更のみで免疫療法などの治療効果が改善される可能性が示唆された．肺癌患者の免疫療法において，血管新生阻害剤を先行投与する併用療法が新たな治療戦略になり得ることが示唆された．

略語表

AI	angiogenic inhibitor
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
FBS	fetal bovine serum
FFPE	formalin-fixed paraffin-embedded
GLUT1	glucose transporter 1
HE	hematoxylin-eosin
ICI	immune checkpoint inhibitor
IFN- γ	interferon-gamma
IL-10	interleukin-10
LLC	Lewis lung carcinoma
HBSS	Hanks' balanced salt solution
mRNA	messenger ribonucleic acid
MVD	microvessel density
PD-1	programmed death-1
PD-L1	programmed death ligand-1
PTX	paclitaxel
RNA	ribonucleic acid
TGF- β	transforming growth factor- β
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR2	vascular endothelial growth receptor 2

緒言

肺癌は現在、世界で毎年約 200 万人が新たに罹患し、約 180 万人が死亡する、最も予後が悪く広く見られる癌腫の一つである (Sung et al., 2021). 近年本邦においても、年に 12 万人以上が新たに罹患し、7 万人以上が死亡している (The Editorial Board of the Cancer Statistics in Japan, 2021). 進行期非小細胞肺癌では、上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) をはじめとしたドライバー遺伝子変異が知られており、各遺伝子変異に応じたチロシンキナーゼ阻害剤が治療に用いられ、予後が大きく改善している (Hanna et al., 2021). 一方で、分子標的薬の標的となる遺伝子変異のない肺癌では、プラチナ製剤等の殺細胞性抗がん剤、血管新生阻害剤 (angiogenic inhibitor, AI), 免疫チェックポイント阻害剤 (immune checkpoint inhibitor, ICI) が複数併用されて用いられることが多い (Hanna et al., 2020). 臨床試験 (Gandhi et al., 2018; Nishio et al., 2021; Paz-Ares et al., 2018) の結果から様々な併用療法が承認され、患者の生存期間を延長しているものの、さらなる治療効果の改善が期待されている.

がん組織が増大するためには、がんに栄養や酸素を与える血管が必要である (Folkman, 1971). 腫瘍細胞から血管内皮成長因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) 等の血管新生を促進する物質が過剰に分泌されることで、腫瘍組織内には過剰な血管新生が起こる (Kondo et al., 2000; Lewin et al., 1999). 腫瘍血管の新生を阻害することで腫瘍を「兵糧攻め」にし、増大するのを抑制できると考えられた. そこで開発された AI の治療標的は腫瘍血管内皮細胞である (Folkman, 1995; Kerbel and Folkman, 2002). なお、腫瘍血管は形態学的にも機能的にも異常であることが知られているが (Baluk et al., 2005; Morikawa et al., 2002; Pasqualini et al., 2002), VEGF が関与している. VEGF は血管内皮細胞間の VE-Cadherin をエンドサイトーシスするため、内皮細胞間接着は減弱する (Gavard and Gutkind, 2006). また、成熟血管では血管を覆う周皮細胞からのアンジオポエチン-1 が内皮細胞上の Tie2 受容体をリン酸化させ壁構造を保持するように働くが、VEGF は血管内皮細胞によるアンジオポエチン-2 の産生を促進し、それがアンジオポエチン-1 と拮抗するアンタゴニストとして働くため、血管を覆う周皮細胞は脱離する (Conway et al., 2001; Hu and Cheng, 2009; Huang et al., 2010). その結果、血管透過性が亢進し、血漿成分が組織内に漏出するため (Dvorak et al., 1988;

Roberts and Palade, 1995; Weis and Cheresh, 2005), 腫瘍組織間圧は上昇する (Carmeliet, 2005; Ferrara, 2005). そのため腫瘍内の未熟な構造の血管は圧排され正常組織の血管のような階層だった構造を欠き, 歪曲していることが多い (McDonald and Choyke, 2003). また腫瘍血管の一部は閉塞し, 血流が障害されている部分も多い (Jain, 1988). これらのことから, 腫瘍組織は低酸素環境になりやすく (Dewhirst et al., 1999; Vaupel et al., 1989), 薬剤送達や免疫細胞の浸潤も減少する (Chauhan et al., 2011) (図 1) .

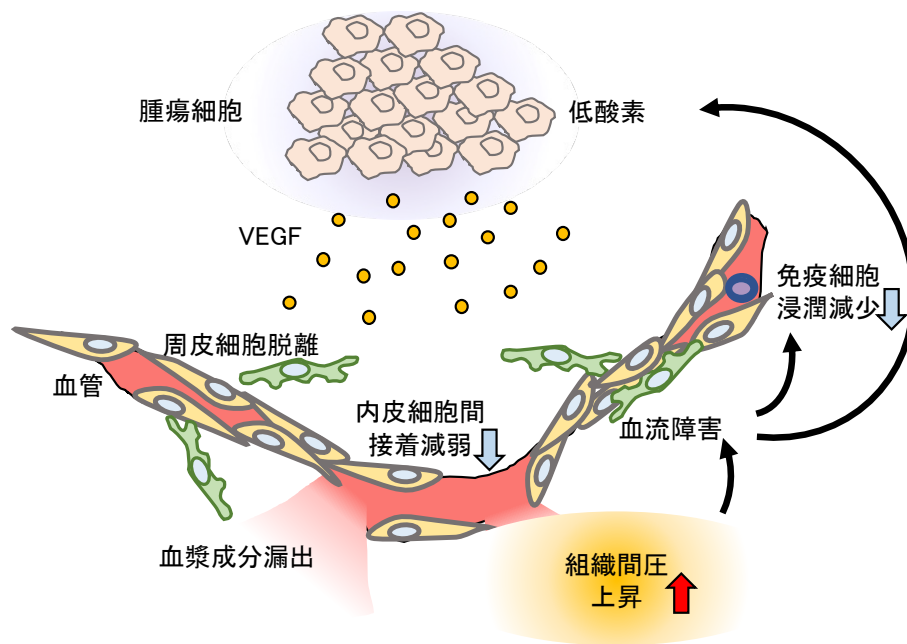


図 1 腫瘍血管の異常性

このように, 過剰な VEGF シグナルは腫瘍血管をはじめとする腫瘍微小環境の異常性をもたらすことが知られており, AI の投与により改善することができることが知られている (Jain, 2001). 現在, 臨床で用いられている AI は, VEGF-VEGFR2 のシグナルの抑制により腫瘍細胞のアンジオポエチン-1 の発現を亢進させ, 腫瘍血管への周皮細胞の遊走を促進し (Winkler et al., 2004), 腫瘍血管の壁構造を保持して腫瘍組織中への薬剤送達等を改善する (Tong et al., 2004). このように, AI は単に血管新生を阻害するだけでなく, 腫瘍血管の漏出性を低下させ, より成熟した機能する血管に変化させる. この AI の効果は血管正常化として Jain によって提唱された (Jain, 2005). VEGF シグナル阻害剤を用いた血管の正常化が微小環境を改善することは動物モデル (Kamoun et al., 2009; Peterson et al., 2016;

Yasuda et al., 2013; Zhou et al., 2008)や臨床研究 (Tada et al., 2018)で証明されている。さらに近年、我々のグループを初めとし多くの研究者によって腫瘍血管内皮細胞を標的することによって腫瘍微小環境が改善されることも報告されている (Annan et al., 2019; Bergers et al., 2003; Cong et al., 2021; Maishi et al., 2022; Zhang et al., 2009)。

がん免疫サイクルには様々な因子が関わっており、中でも重要なものは腫瘍浸潤リンパ球である (Chen and Mellman, 2013)。一方で、がん抗原を認識し、活性化した T 細胞が腫瘍組織に遊走・浸潤するためには機能的な血管が必要である (Huang et al., 2012)。そのため、AI による血管正常化効果はがん免疫に対して極めて重要であると考えられている (Lanitis et al., 2015)。担癌マウスモデルを用いた研究において、血管新生阻害療法が、腫瘍特異的 CD8 陽性リンパ球の浸潤を増加させ (Manning et al., 2007; Shrimali et al., 2010)、ICI の効果を増強することでがん免疫反応を促進させるということが報告されている (Allen et al., 2017; Lee et al., 2020; Ott et al., 2015; Zhao et al., 2019)。肺癌患者に対する ICI を用いた臨床試験に関しては、ニボルマブ単剤療法で奏効率が 2 割程度と恩恵をうける患者が限られていた (Borghaei et al., 2015; Carbone et al., 2017)。2018 年に公表された IMpower150 試験では、ICI であるアテゾリズマブを既存の標準治療の一つであったカルボプラチン＋パクリタキセル＋ベバシズマブ (AI) に併用することで、奏効率は 6 割程度になり、非併用群と比較し、進行期・術後再発非小細胞肺癌の無増悪生存期間を有意に延長したと報告された (Socinski et al., 2018)。しかしながら両群の無増悪生存期間の差はわずかに 1.5 ヶ月であり、十分に肺癌患者の予後を改善したというには未だ言い難いのが現状である。このことから ICI による抗腫瘍効果を増強することができる他の戦略が必要である。

AI によって血管が正常化されるには一定の時間を要し、さらに一過性であるため、その効果を十分に活用するためには最適なタイミングがあるということが指摘されている (Chauhan et al., 2012; Jain, 2005)。しかしながら、肺癌の実臨床では、AI は ICI を含む他の抗がん剤と同時に投与されており、AI により正常化効果が得られる前に併用薬は投与されている。このことから我々は、現状の殺細胞性抗がん剤・AI・ICI の併用療法の効果が不十分である要因のひとつには、AI と他薬剤が同時投与されているため、AI による血管正常化が有効に活用されず、腫瘍への薬剤送達や免疫細胞の浸潤が不十分であるためではないかと仮説を立てた。すなわち、AI を

先行投与したのちに併用薬剤を投与することでより治療効果が増強されるのではないかと考えた（図2）。

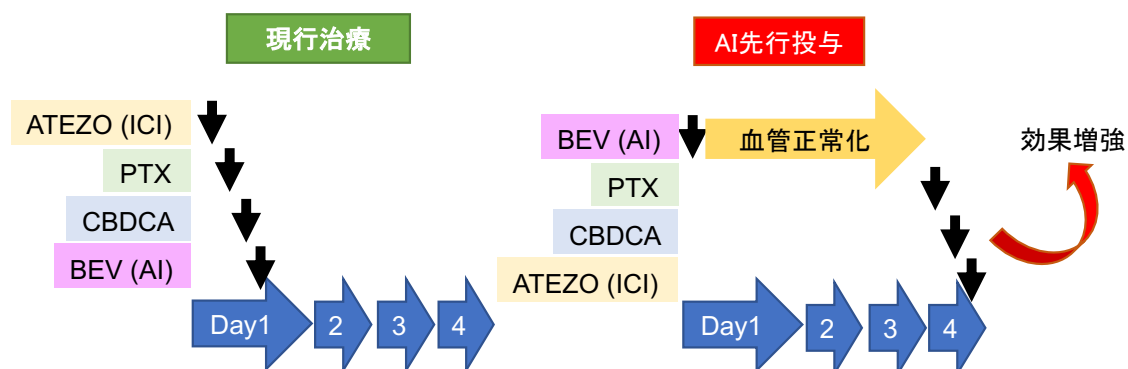


図2 現行の治療スケジュールと血管新生阻害剤（AI）先行投与の戦略
血管新生阻害剤を先行投与し，血管正常化のタイミングでICIを含む併用薬を投与することで抗腫瘍効果が増強すると着想した．ATEZO: atezolizumab (ICI), PTX: paclitaxel, CBDCA: carboplatin, BEV: bevacizumab (AI)

これまで肺癌免疫療法においてAIの投与タイミングによる治療効果の違いを検討した報告はない．本研究では，ICIを含む併用薬にAIを先行投与することで治療効果が改善されるかどうか，マウス肺癌モデルを用いて検討した．

方法

実験使用動物

6 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを日本クレア株式会社 (Tokyo, Japan) より購入し, SPF (specific-pathogen-free) 環境で飼育した. 入舎日より 1 週間飼育後, 腫瘍移植実験を開始した. 本研究に関する実験プロトコルは北海道大学動物実験委員会により承認された. 動物の取扱いは「北海道大学動物実験に関する規定」に従った.

細胞と培養条件

LLC (ルイス肺癌由来細胞株) は, RIKEN Cell Bank (Ibaraki, Japan) より購入した. また Venus-Rluc 遺伝子導入 LLC (LLC-Venus-Rluc) は既報の通り作製された (Maishi et al., 2016). 具体的には, 国立研究開発法人産業技術総合研究所近江谷克裕先生のご厚意により提供された Rluc cDNA を PCR 法で増幅し, pCR-Blunt II-TOPO プラスミドベクター (Invitrogen, USA) に挿入しクローニングした. その産物を pCAGGS-Venus プラスミドの *XhoI* と *NotI* の制限部位にサブクローニングした (Inuzuka et al., 2009). さらに Venus と Rluc をコードする DNA 断片を理化学研究所バイオリソース研究センター生体情報統合技術開発チーム三好浩之先生のご厚意によりご提供いただいた pCSII-CMV-MCS の *EcoRI* と *NotI* による制限部位に挿入しサブクローニングした. こうして作製されたレンチウイルスベクターをパッケージングベクターである pCAG-HIVpg とエンベローププラスミドである pCMV-VSV-G-RSV-REV (三好浩之先生よりご提供) を, RIKEN Cell Bank (Ibaraki, Japan) より購入した 293T 細胞に FuGENE HD Transfection Reagent (Promega, USA) を用いて遺伝子導入した. 産生されたウイルス粒子を既報の通り LLC に感染させ, 遺伝子導入した (Miyoshi, 2004). 遺伝子組み換えに関しては「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定」に従った. LLC と LLC-Venus-Rluc は 10% ウシ胎仔血清 (FBS (fetal bovine serum), Sigma, USA) ・ 1% ペニシリン/ストレプトマイシン添加 Dulbecco 改変イーグル培地 (DMEM, Sigma, USA) で継代培養した. 細胞は 37°C, 5% CO₂-95% 気相下で培養した. また, Mycoplasma 感染がないことを PCR 法で確認した (Takara PCR Mycoplasma Detection Set, Japan).

抗体と試薬

実験には以下の抗体, 試薬を使用した. 抗癌剤としてパクリタキセル (Pfizer, Japan), AI として InVivoMAb anti-mouse VEGFR2 antibody (DC101, BioXCell, USA, #BE0060), ICI として InVivoMAb anti-mouse PD-

1 antibody (RMP1-14, BioXCell, #BE0416), アイスotypeコントロールとして InVivoMab rat IgG1 isotype control (TNP6A7, BioXCell, #BE0290), InVivoMab rat IgG2a isotype control (2A3, BioXCell, #BE0089)を用いた. また組織染色および免疫染色に rabbit anti-CD31 antibody (Abcam, UK, #ab28364), purified rat anti-mouse CD31 antibody (BD Pharmingen, USA, #553370), rabbit anti-mouse/human α -SMA antibody (Abcam, #ab5694), rat purified anti-mouse CD8 α antibody (BioLegend, USA, #100702), Alexa Fluor 647 rat anti-mouse CD31 antibody (BioLegend, #102416), rabbit anti-mouse GLUT1 antibody (Abcam, #ab115730), goat anti-mouse PD-L1 antibody (R&D systems, USA, #AF1019), rabbit anti-mouse CD8 α antibody (Abcam, #ab217344), Alexa Fluor 647 goat anti-rat IgG antibody (BioLegend, #405416), Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen, USA, #A11034), Alexa Fluor 488 goat anti-rat IgG antibody (Invitrogen, #A11006), goat anti-rabbit IgG antibody/horse radish peroxidase (HRP) (DAKO, USA, #P0448), and rabbit anti-goat IgG antibody/HRP (DAKO, #P0449), DAPI solution (Dojindo, Japan, #PQ012), Matrigel (Corning, USA, #356231), カラッチ・ヘマトキシリン (Muto Pure Chemicals, Japan, #30022), マイヤーヘマトキシリン (Muto Pure Chemicals, Japan, #30002), ピュア・エオシン液 (Muto Pure Chemicals, Japan, #32042), ヤギ血清 (Sigma-Aldrich, USA, #G9023), Dako Liquid DAB+ substrate Chromogen System (Agilent Technologies, USA, #K3468), ウシ血清アルブミン溶液 (Sigma-Aldrich, USA, #A8327)を用いた. また, Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco, #14175-079), in vivo grade VivoGlo Luciferin (Promega, USA, #P1043)を用いた.

マウス肺癌皮下腫瘍モデル

予備実験として LLC の移植条件を検討した. マウスの右側背部に LLC を $1.0 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$ 1xHBSS, $0.5 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$ 1xHBSS, $0.5 \times 10^6 / 50 \mu\text{l}$ 1xHBSS + $50 \mu\text{l}$ Matrigel, $0.25 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$ 1xHBSS (各群 $n = 3$) 皮下移植し, 腫瘍が触知されてから 2-4 日後に腫瘍を摘出し, 腫瘍増殖と腫瘍血管新生について検討を行った.

血管新生阻害剤単剤投与による血管正常化タイミングの検討実験では, 40 匹のマウスに対して $1.0 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$ 1xHBSS の LLC 細胞を右側背部に皮下移植した. 腫瘍体積が 45 mm^3 を超えた時点 (0 日目) で, マウスを各

群 $n = 5$ 匹の 8 群に分けて、①無治療で 0 日目に腫瘍摘出、6 つの群に対して抗マウス VEGFR2 モノクローナル抗体 DC101 800 μg を腹腔内投与し (Benedito et al., 2012; Fischer et al., 2007; Li et al., 2020), それぞれ②1 日後, ③3 日後, ④5 日後, ⑤7 日後, ⑥14 日後に腫瘍摘出, ⑦7 日後に DC101 を同量再投与して 14 日後に腫瘍摘出した. またコントロールとして, ⑧0 日目に DC101 のアイソタイプコントロールである TNP6A7 800 μg を腹腔内投与し 14 日後に腫瘍摘出した (図 3).

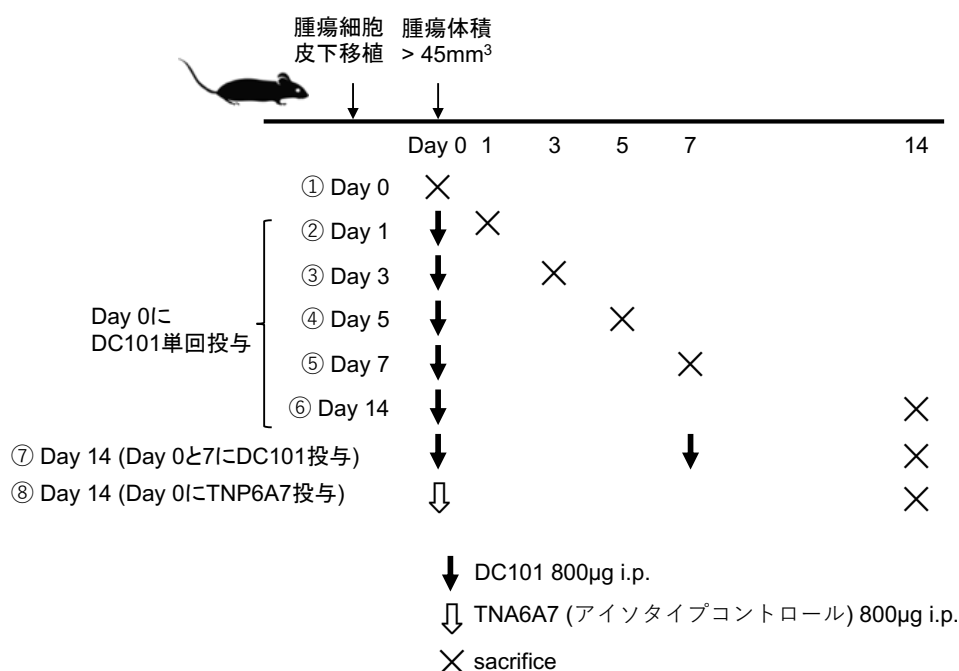


図 3 LLC 皮下腫瘍モデルにおける DC101 による血管正常化効果の検討

1.0×10^6 個の LLC を HBSS 100 μl に懸濁し, C57BL/6JJc1 マウスの右背部に皮下注射後, ①~⑧の 8 群に分けて複数のタイミングで腫瘍を摘出した. 各群 $n = 5$.

AI 先行投与による ICI の効果増強の検討については, 30 匹のマウスに対して $1.0 \times 10^6/100 \mu\text{l}$ 1xHBSS の LLC-Venus-Rluc 細胞を右側背部に皮下移植した (各群 $n = 5$). A 群 (Iso+Iso) は腫瘍細胞移植 14 日後に TNP6A7 800 μg と抗マウス PD-1 抗体 (RMP1-14) のアイソタイプコントロールである 2A3 200 μg を腹腔内投与した. B 群 (Iso→Iso) は, 11 日後に

TNP6A7 を投与し，14 日後に 2A3 を腹腔内投与した．C 群（Iso+ICI）は，TNP6A7 800 μ g と RMP 1-14 200 μ g を 14 日後に腹腔内投与した．D 群（Sim AI）は DC101 800 μ g と RMP1-14 200 μ g を 14 日後に腹腔内投与した．E 群（Iso→ICI）は 11 日後に TNP6A7 を投与し，14 日後に RMP1-14 を腹腔内投与した．F 群（AI first）は 11 日後に DC101 を投与し，14 日後に RMP1-14 を腹腔内投与した．全てのマウスは腫瘍移植 21 日後に安楽殺し，腫瘍と肺を摘出した（図 4）．IVIS Spectrum In Vivo Imaging System (PerkinElmer, USA)を用いた ex vivo 発光イメージングで摘出肺組織のルシフェラーゼ活性を検出し，肺転移を評価した．

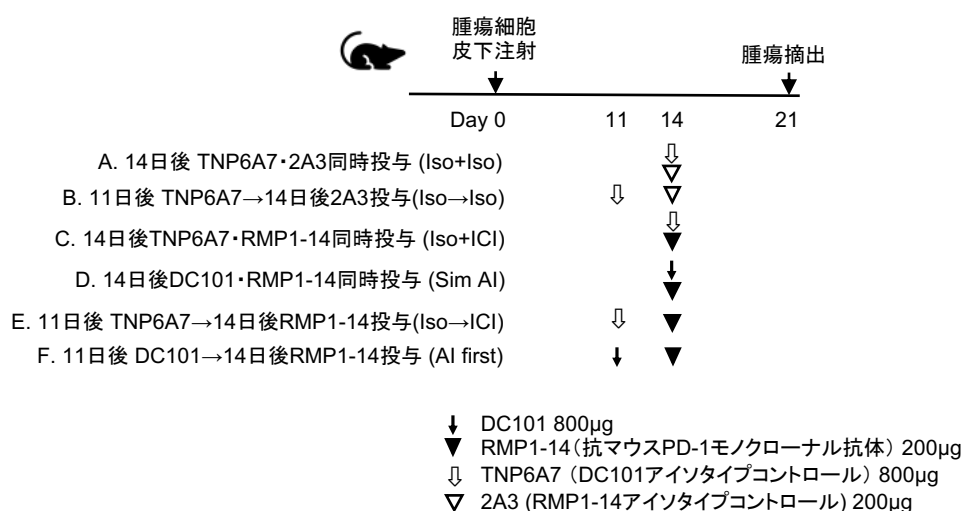


図 4 DC101 先行投与と同時投与による免疫チェックポイント阻害薬の効果検討

LLC-Venus-Rluc 1.0×10^6 個を C57BL/6JJc1 の右背部に皮下移植した 11 日後に 6 群に分け薬剤を腹腔内投与した．21 日後に腫瘍を摘出した．各群 n = 5.

AI の先行投与による ICI とパクリタキセルの抗腫瘍効果の検討については，20 匹のマウスの右側背部に $1.0 \times 10^6 / 100 \mu$ l 1xHBSS の LLC 細胞を皮下注射して，11 日後に 4 つの群に無作為に分けた（各群 n = 5）：Control 群（腫瘍移植 14 日後と 21 日後に TNP6A7 40 mg/kg + 2A3 10 mg/kg + 生理食塩水を腹腔内投与），ICI + PTX 群（腫瘍移植 14 日後と 21 日後に TNP6A7 40 mg/kg + RMP1-14 10 mg/kg + パクリタキセル 20 mg/kg を腹腔

内投与), AI + ICI + PTX 同時投与群 (sim AI; 腫瘍移植 14 日後と 21 日後に DC101 40 mg/kg + RMP1-14 10 mg/kg + パクリタキセル 20 mg/kg を腹腔内投与), AI 3 日先行投与→ICI + PTX 群 (AI first; 腫瘍移植 11 日後と 18 日後に DC101 40 mg/kg, 14 日後と 21 日後に RMP1-14 10 mg/kg + パクリタキセル 20 mg/kg を腹腔内投与) した (図 5). すべての実験において腫瘍体積は $0.5 \times \text{長径} \times \text{短径}^2$ の計算式で算出した.

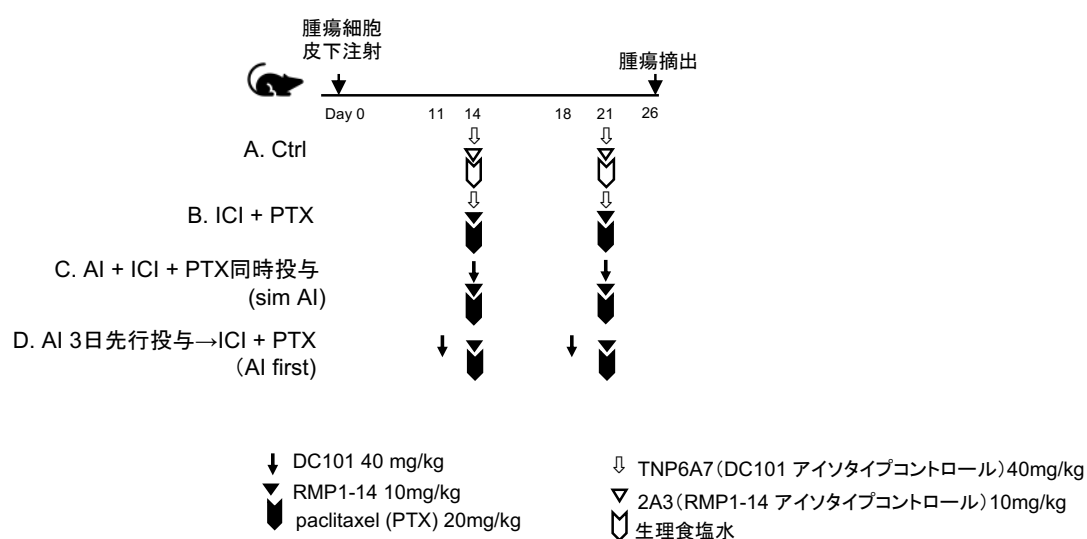


図 5 血管新生阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤とパクリタキセルの併用療法における血管新生阻害剤先行投与の有用性の検討

LLC 1.0×10^6 個を HBSS 100 μ l に懸濁し, C57BL/6JJc1 マウスの右背部に皮下注射後, 11 日後に A~D の 4 群に分けて薬剤投与を開始した. 26 日後に腫瘍組織を摘出した. 各群 n = 5.

免疫組織染色および解析方法

摘出した腫瘍組織は二分割し, 一方を 10%ホルマリン液で固定後, 脱水およびパラフィン包埋して, ホルマリン固定パラフィン包埋ブロック (FFPE) を作製した. もう一方を Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek Japan, Japan) で包埋し, 液体窒素に浸漬し, 新鮮凍結ブロックを作製した. それぞれを薄切した後, 新鮮凍結切片については免疫染色前に 4%パラホルムアルデヒドで固定した. ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色はパラフィン切片を脱パラフィン, 再水和処理後, カラッチ・ヘマトキシ

リン液で 15 分間染色後水洗し，3 倍希釈ピュア・エオシン液で 1 分間染色した．その後脱水，透徹，封入した．免疫組織染色については，FFPE 切片については脱パラフィン，再水和後，95℃ pH 9.0 Tris-EDTA バッファーで 30 分間抗原賦活処理後 30-60 分 5% ヤギ血清/PBS あるいは 1% ウシ血清アルブミン/PBS でブロッキングした．腫瘍血管については一次抗体としてウサギ抗 CD31 抗体 (Abcam, #ab28364) を 4℃ overnight で反応させたのち，二次抗体として HRP-conjugated ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (DAKO, #P0448) を 60-90 分室温で反応させた．DAKO Liquid DAB+ substrate Chromogen System で発色し可視化した．血管密度については，予備実験においては全視野の腫瘍面積における CD31 陽性面積の割合として計算した．また AI を含む治療実験においては，血管が密に分布する 5 視野を選び，血管数を計測したものを微小血管密度 (Microvessel density: MVD) とした (Weidner et al., 1991)．周皮細胞の被覆 (pericyte coverage) は凍結切片を 4% パラホルムアルデヒドで固定後，0.1% Triton-X100 で透過処理し，一次抗体としてラット抗マウス CD31 抗体 (BD Pharmingen, #553370) とウサギ抗 α -SMA 抗体 (Abcam, #ab5694) を 4℃ overnight で反応させたのち，二次抗体として Alexa Fluor 647-conjugated ヤギ抗ラット IgG 抗体 (BioLegend, #405416) と Alexa Fluor 488-conjugated ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen, USA, #A11034) を 90 分室温で反応させて可視化した． α -SMA 陽性面積と CD31 陽性面積の比を算出し，周皮細胞の被覆率とした (Eberhard et al., 2000)．

腫瘍組織中の低酸素領域については，パラフィン切片を同様に抗原賦活化処理，ブロッキング処理後，一次抗体としてウサギ抗マウス GLUT1 抗体 (Abcam, #ab115730) を 4℃, overnight で反応させ，二次抗体として HRP-conjugated ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を 60 分室温で反応させた．組織低酸素は壊死部を除いた全切片の面積に対する GLUT1 陽性領域の割合として定量化した．腫瘍浸潤リンパ球については，凍結切片上では一次抗体としてラット抗マウス CD8 α 抗体 (BioLegend, #100702) と二次抗体として Alexa Fluor 647-conjugated 抗ラット IgG 抗体を反応させ，FFPE 切片上で一次抗体としてウサギ抗マウス CD8 α 抗体 (Abcam, #ab217344) と二次抗体として HRP-conjugated ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を反応させた．PD-L1 陽性面積については一次抗体としてヤギ抗マウス PD-L1 抗体 (R&D systems, #AF1019) と二次抗体として HRP ウサギ抗ヤギ IgG 抗体 (DAKO, #P0449) を反応させた．PD-L1 陽性面積は壊死部を除いた全切片の面積に対する PD-L1 陽性領域の割合として定量化した．発色で可視化された免疫染色スライド

は Nanozoomer 2.0-HT (Hamamatsu Photonics, Japan) で画像スキャンし、デジタルデータに変換した。MVD は Adobe Photoshop (Adobe, USA) で解析し、他の免疫染色画像は NIH Image J software (NIH, USA) を用いて解析した。蛍光免疫染色画像は KEYENCE BZ-X810 オールインワン蛍光顕微鏡 (KEYENCE, Japan) を用い、ランダムに視野を選択して撮影し、BZ-X800 Analyzer (KEYENCE, Japan) を用いて解析した。

組織 RNA 抽出と定量 real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

TRIzol reagent (Life Technologies, USA, #15596018) と ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega, USA, #6012) を用いて腫瘍組織から total RNA を抽出した。抽出した 1 μ g の RNA から ReverTra Ace, 5x RT Buffer (Toyobo, Japan), Oligo dT primer, Random primer (Hokkaido System Science, Japan), dNTP mixture (Takara Bio, Japan, #4030) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。定量的 real-time PCR は KAPA SYBR FAST qPCR kit (KAPA Biosystems, USA), C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA) を用いて、初期変性 (95°C, 30 秒), 熱変性 (95°C, 1 秒), アニーリング (60°C, 5 秒), アニーリング・伸長反応 (60°C, 20 秒) で 40 サイクル行い、増幅産物の定量を行った。CD8 陽性 T 細胞中の Granzyme B と Interferon- γ (IFN- γ) の mRNA 発現レベルの解析では、CD8 α mRNA を標準として、 $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて相対比を比較検討した。使用したプライマー配列は以下の通りである。

Mouse CD8 α forward: 5' -AGCCCCAGAGACCAGAAGATTG-3'

Mouse CD8 α reverse: 5' -CATTTGCAAACACGCTTTCGGC-3'

Mouse Granzyme B forward: 5' -TACTGCTGACCTTGTCTCTGGC-3'

Mouse Granzyme B reverse: 5' -TGACTTGCTGGGTCTTCTCCTG-3'

Mouse IFN- γ forward: 5' -TGGAGGAACTGGCAAAGGATG-3'

Mouse IFN- γ reverse: 5' -CGCTTATGTTGTTGCTGATGGC-3'

統計解析

2 群間のデータの比較には unpaired Student's t-test を用い、3 群以上のデータの比較には one-way ANOVA および Tukey-Kramer test を用いた。p < 0.05 を有意差ありと判定した。統計解析は JMP version 16 (SAS Institute) を使用した。

結果

LLC 皮下腫瘍モデルにおける移植腫瘍細胞数と腫瘍増殖および血管の検討

はじめに予備実験として，LLC の皮下移植条件を検討した．具体的には，腫瘍細胞数と細胞外基質の有無により腫瘍組織の増大速度や血管新生に差があるか検討し，後に行う AI による抗腫瘍効果検証実験において，皮下腫瘍モデルの作成や血管新生阻害の解析に適した条件を検討した．腫瘍触知から 2-4 日後に腫瘍摘出を行った．腫瘍細胞移植 20 日後までに腫瘍触知がされなかった 0.25×10^6 個の群の 1 匹は著しく腫瘍増殖が遅く，移植後 24 日で腫瘍が触知されたため，腫瘍移植 26 日後に腫瘍摘出を行った．腫瘍増大速度は移植細胞数が多い群で速く，また，同じ細胞数間での細胞外基質の有無に関する比較では Matrigel がある群の腫瘍増大速度が速かった (図 6A)．HE 染色標本の観察において，Matrigel のある群で一部に壊死や出血が目立った (図 6B)．

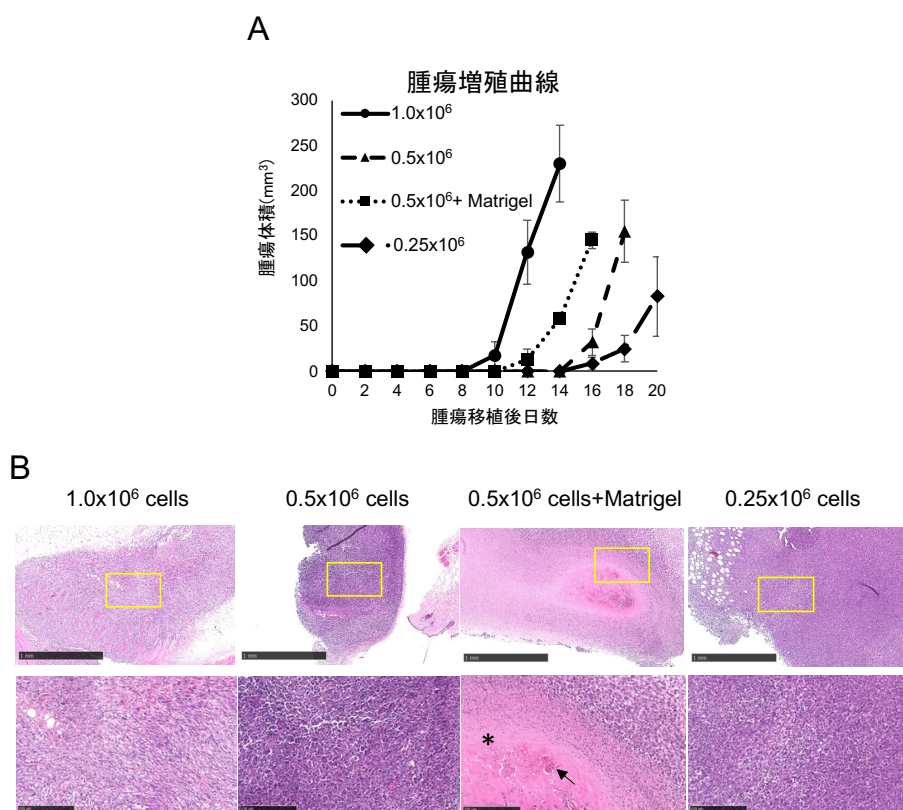


図 6 Lewis Lung Carcinoma (LLC) 皮下腫瘍の増殖曲線と組織像

(A) 腫瘍増殖曲線．MEAN $\pm$ SEM. (B) 摘出腫瘍 HE 染色像．*：壊死，黒矢印：出血部．Scale bar = 上段 1 mm，下段 250 μ m.

次に腫瘍血管について CD31 免疫染色で評価した (図 7A). 血管密度として切片全体に占める CD31 陽性面積を計算した. 各群で有意な差は認められなかった (図 7B).

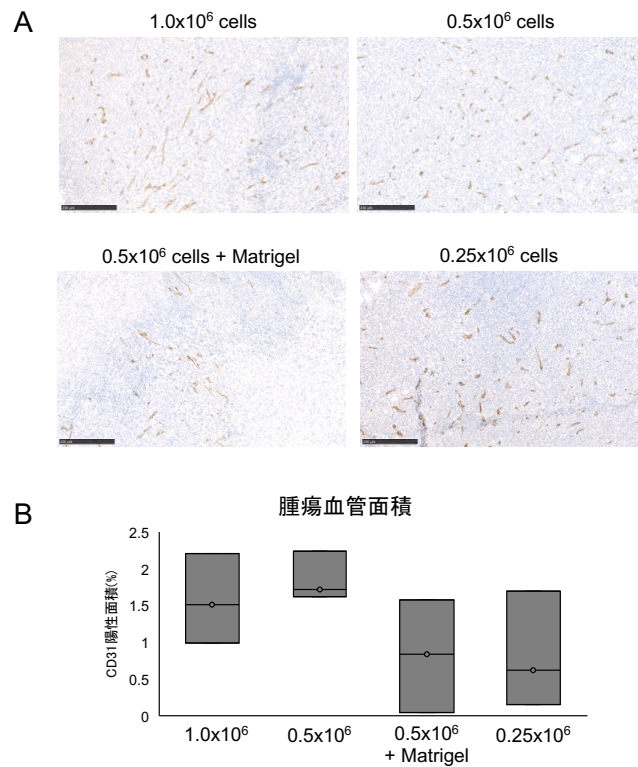


図 7 LLC 腫瘍における腫瘍血管面積の評価

(A) CD31 免疫染色により腫瘍血管を可視化した, (B) 1 切片の全腫瘍面積に占める CD31 陽性面積を計算した. Scale bar = 250 μ m. $p = 0.195$ (one-way ANOVA).

これらの結果から, 検討した範囲では移植細胞数が多くなるほど実験に適した皮下腫瘍の作成までの日数が短かった. 一方で, 腫瘍血管新生には著明な違いはみられず, 皮下腫瘍作成後に行う血管新生阻害治療効果はいずれの細胞数でも検証できることが示唆された. また, Matrigel と共に腫瘍移植した群では壊死や出血が目立ち, Matrigel による腫瘍間質への影響が示唆された. そこで以降の実験においては皮下注射腫瘍細胞数を 1 匹あたり 1.0×10^6 個とし, Matrigel を用いず HBSS で懸濁する群のみとした.

DC101 単剤投与による血管正常化タイミングの検討

LLC 皮下腫瘍モデルにおいて、DC101 単剤投与による腫瘍血管の正常化タイミングを検討するため、DC101 投与後に複数のタイミングで腫瘍を摘出し、組織学的に解析した。DC101 単回投与では腫瘍増殖に大きな違いは見られなかったが、DC101 を 2 回投与した群では治療開始 14 日目に単回投与群、アイソタイプコントロール群と比較して腫瘍増殖抑制傾向がみられた (図 8)。

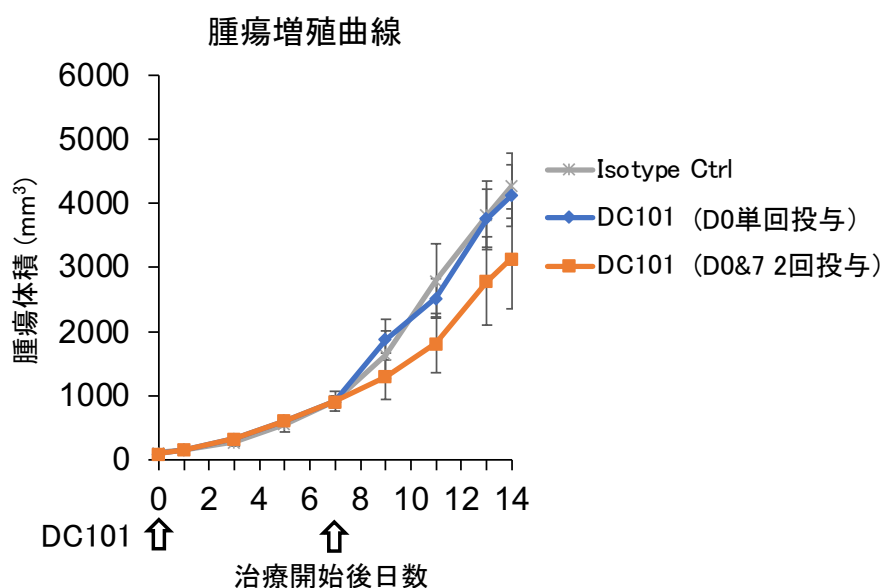


図 8 DC101 による腫瘍増殖抑制効果の検討

腫瘍増殖曲線. $p = 0.459$ (one-way ANOVA), $\text{MEAN} \pm \text{SEM}$.

血管新生阻害効果について CD31 免疫染色により評価すると (図 9A), 治療開始後経時的に投与 7 日後まで血管数が減少し, また, 治療開始 14 日後には血管は再び密に分布するようになった (図 9B)。

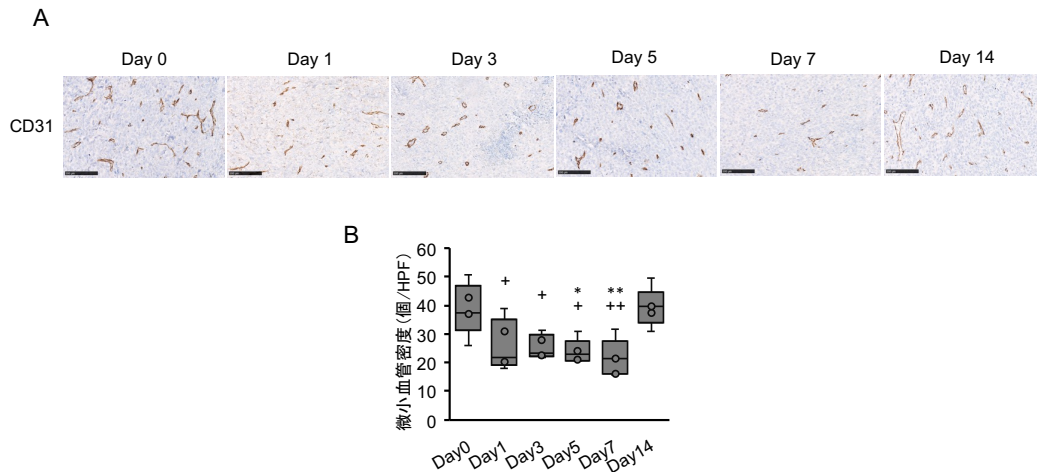


図 9 DC101 による血管新生抑制効果の経時的変化

(A) 腫瘍組織の CD31 免疫染色. Scale bar = 100 μ m. (B) 血管が密に分布している 5 視野を定量解析した. 各群 n = 5. * p < 0.05, ** p < 0.01 (対 day 0), + p < 0.05, ++ p < 0.01 (対 day 14) (Tukey-Kramer test) .

また, 治療開始 14 日後における微小血管密度を DC101 単回投与群と 2 回投与群とアイソタイプコントロール群の 3 群で比較すると (図 10A), 2 回投与群では他の群, 特にアイソタイプコントロール群と比較して微小血管密度が低かった (図 10B).

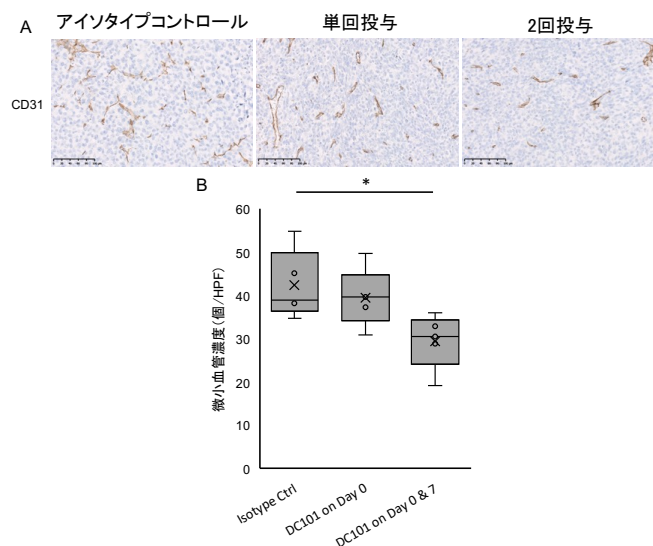


図 10 治療開始 14 日後の DC101 による血管新生抑制効果の比較検討

(A) CD31 免疫染色. Scale bar = 100 μ m. (B) * p = 0.0339 (Tukey-Kramer test). 各群 n = 5.

次に血管の成熟度を評価するため、その指標の一つである Pericyte coverage を解析した．周皮細胞を α SMA 蛍光免疫染色で可視化し、CD31 と共染色した（図 11A）． α SMA 陽性細胞は主に血管周囲に見られた．ランダムに選択された 5 視野における CD31 陽性面積と α SMA 陽性面積比で pericyte coverage（周皮細胞の被覆率）を計算したところ、DC101 投与 3 日後に有意に高くなった（図 11B）

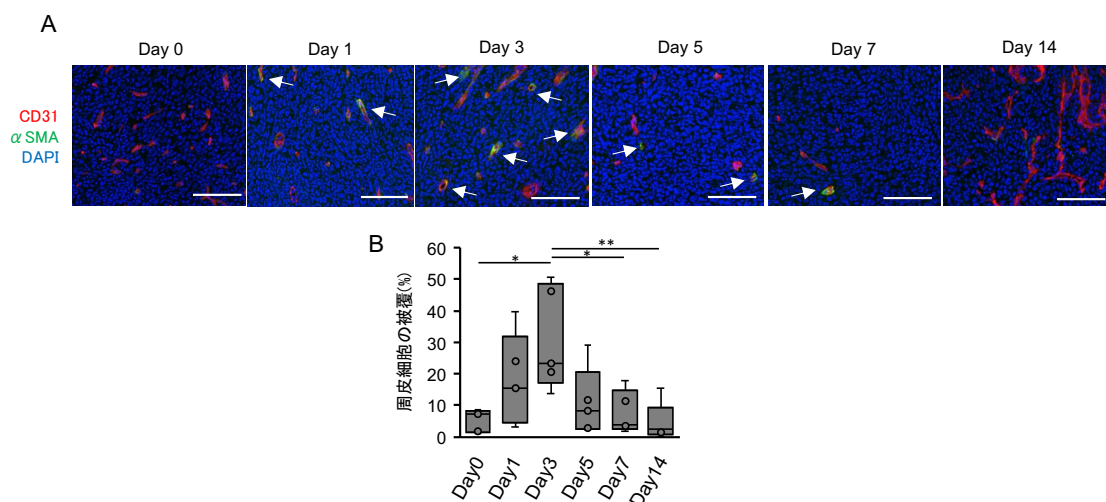


図 11 DC101 単回投与による周皮細胞の被覆の経時的変化

(A) 血管内皮細胞を CD31 蛍光免疫染色，周皮細胞を α SMA 蛍光免疫染色で可視化した． α SMA 陽性細胞が血管周囲にみられた．周皮細胞で被覆された血管を白矢印で示す．Scale bar = 100 μ m. (B) ランダムに選択した 5 視野における CD31 陽性面積と α SMA 陽性面積比で周皮細胞被覆率を計算した．各群 n = 5. * p < 0.05, ** p < 0.01 (Tukey-Kramer test).

周皮細胞被覆の改善は血管の正常化を示唆するため、それに伴う腫瘍組織の低酸素の度合いを GLUT1 免疫染色で検討した（図 12A）．壊死組織を除いた全領域を対象に GLUT1 陽性面積率を算出すると、DC101 投与 3 日後に低酸素領域が有意に減少することが示された（図 12B）．血管の正常化により、血液灌流が改善されたことが示唆された．

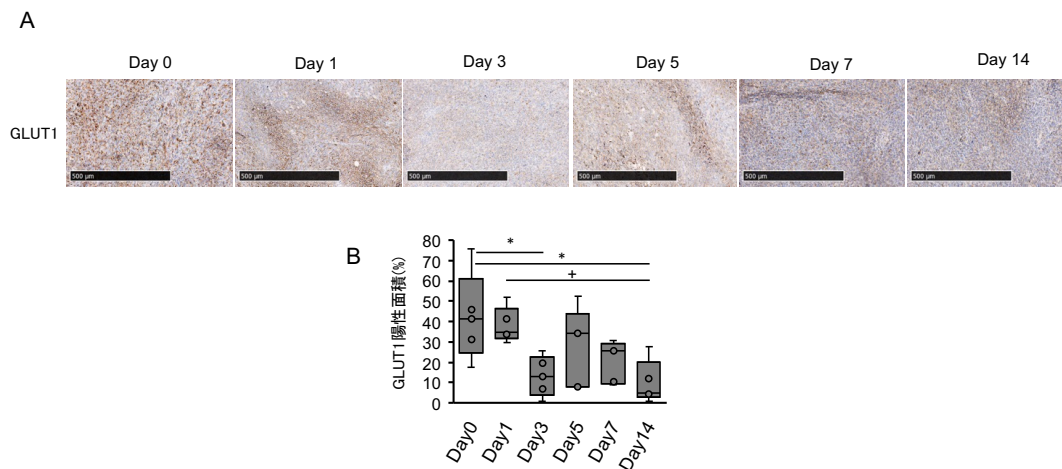


図 12 DC101 単回投与による腫瘍組織低酸素領域の経時的変化

(A) GLUT1 免疫染色で組織低酸素領域を検討した. Scale bar = 500 μ m. (B) 組織壊死部分を除く全領域を対象に GLUT1 陽性面積率を検討した. 各群 $n = 5$. * $p < 0.05$ (対 Day 0), + $p < 0.05$ (対 Day 1) (Tukey-Kramer test).

次に腫瘍血管の正常化による腫瘍組織内への CD8 陽性リンパ球浸潤への影響を CD8 α 蛍光免疫染色で解析した (図 13A). ランダム 5 視野における CD8 陽性細胞面積を算出すると, DC101 投与 3 日後に増加する傾向がみられた (図 13B). これらの結果から LLC 皮下腫瘍 DC101 単回投与モデルにおいて, 投与 3 日後に血管が最も正常化し, 免疫細胞浸潤も改善することが示唆された.

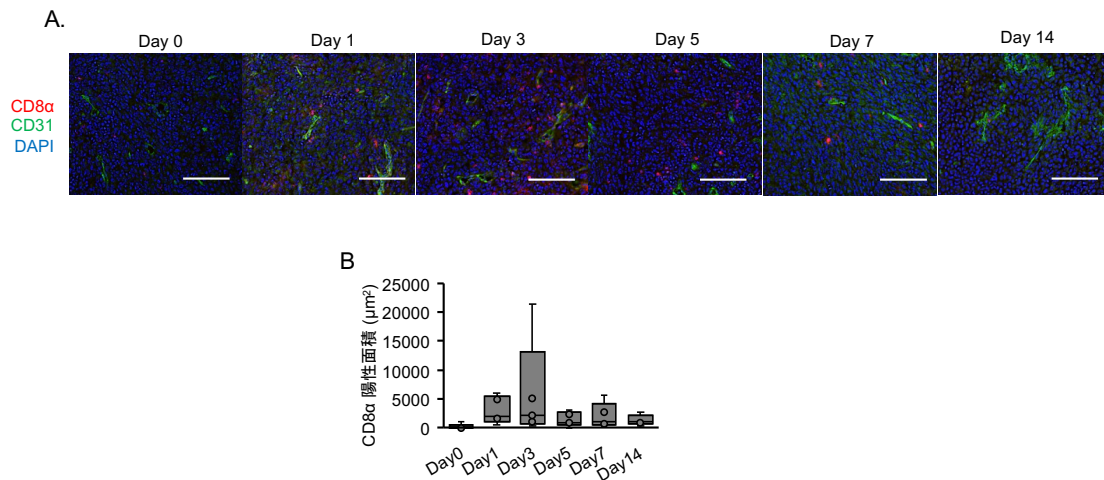


図 13 DC101 単回投与による CD8 陽性細胞浸潤の経時的変化

(A) CD8 α ・CD31 蛍光免疫染色像. Scale bar = 100 μ m. (B) CD8 陽性面積を算出し, CD8 陽性細胞の腫瘍組織内浸潤を評価した. $p = 0.287$ (one-way ANOVA).

AI 先行投与による ICI の効果増強の検討

次に LLC-Venus-Rluc 皮下腫瘍モデルにおいて, DC101 と抗マウス PD-1 抗体である RMP1-14 の併用治療を行い, DC101 先行投与による ICI の治療効果が増強されるかどうか検討した. DC101 同時投与群 (sim AI) と, DC101 3 日先行投与群 (AI first) を比較した. 腫瘍移植 21 日後の体積を比較したところ, DC101 先行投与群で, 腫瘍増殖が抑制される傾向が見られた (図 14A, B).

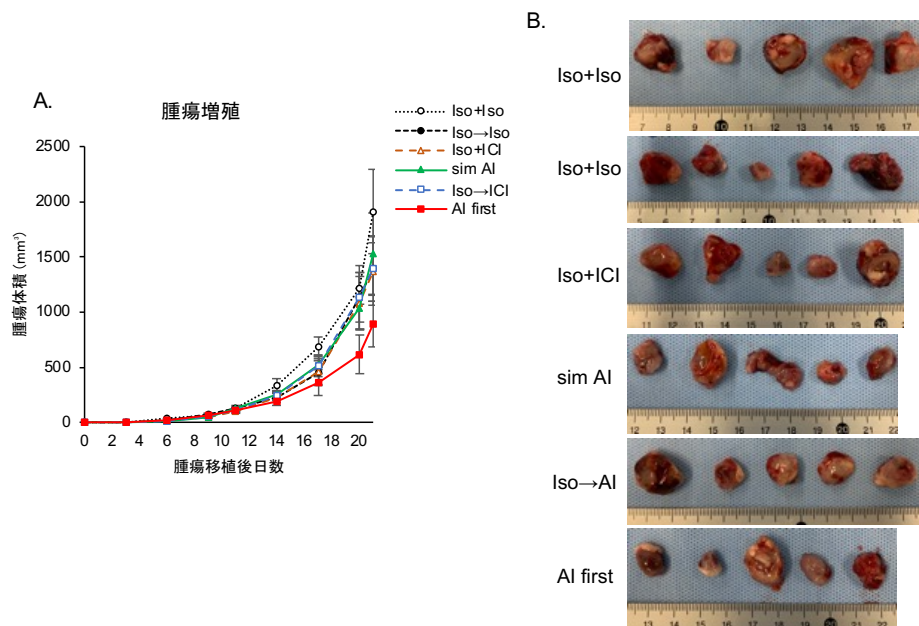


図 14 DC101 先行投与と同時投与による免疫チェックポイント阻害薬の腫瘍増殖抑制効果の検討

(A) 腫瘍増殖曲線. $p = 0.5725$ (one-way ANOVA). MEAN $\pm$ SEM. (B) 摘出腫瘍の肉眼像.

DC101 先行投与群と同時投与群の腫瘍組織を用いて, CD31 と α SMA 共染色により周皮細胞の被覆を比較すると (図 15A), DC101 先行投与群では周皮細胞の被覆が増える傾向が見られた (図 15B).

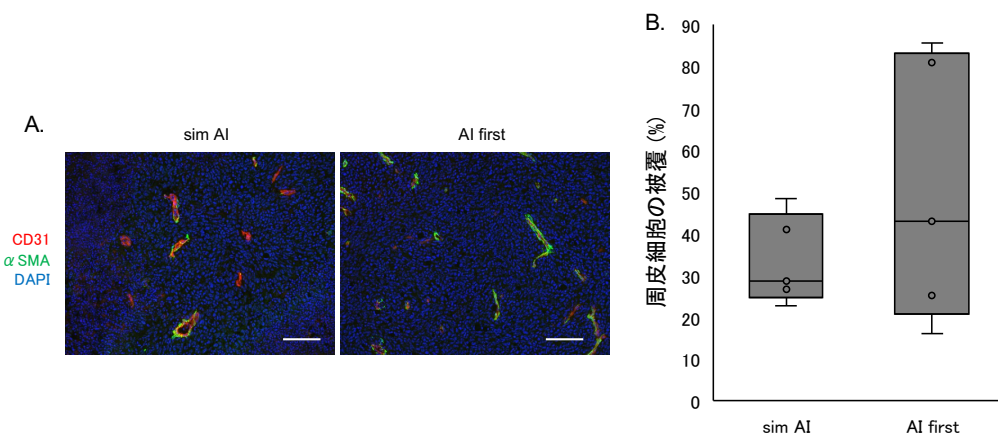


図 15 DC101 先行投与と同時投与群における周皮細胞による血管被覆の検討

(A) 周皮細胞を α SMA 蛍光免疫染色で可視化した, Scale bar = 100 μ m

m. (B) ランダム 5 視野で周皮細胞の血管被覆率を検討した. $p = 0.297$ (t-test).

また, CD8 α 蛍光免疫染色による検討で (図 16A), DC101 先行投与群では同時投与群と比較して CD8 陽性細胞の腫瘍組織内浸潤が増加する傾向が見られた (図 16B).

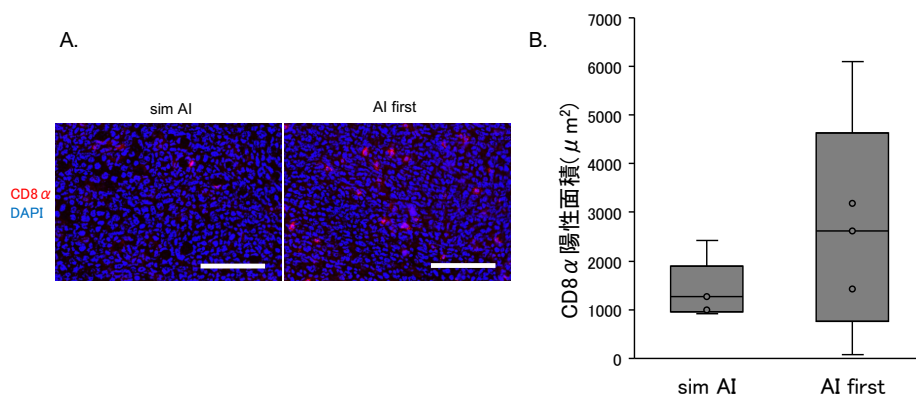


図 16 DC101 先行投与と同時投与群における腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞の検討

(A) CD8 α 蛍光免疫染色. Scale bar = 100 μm . (B) ランダム 5 視野の解析において, CD8 陽性細胞の腫瘍内浸潤を検討した. $p = 0.25$ (t-test).

次に ICI による抗腫瘍効果であるかどうか検討するため, 腫瘍組織内の PD-L1 発現を免疫染色で検討した (図 17A). 壊死部を除く全視野で PD-L1 陽性面積を比較すると, 先行投与群で有意に陽性面積が減少していた (図 17B). ICI により PD-L1 陽性細胞が除去されたことが示唆された.

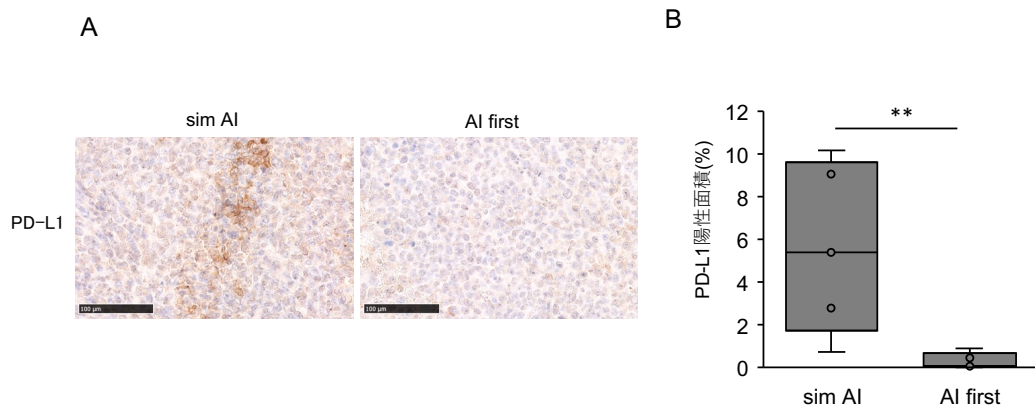


図 17 DC101 先行投与群と同時投与群における腫瘍組織中の PD-L1 発現の検討

(A) PD-L1 免疫染色. Scale bar = 100 μ m. (B) 壊死部を除く全切片の解析で DC101 先行投与群と同時投与群で PD-L1 陽性面積を比較した. ** p < 0.01 (t-test).

マウス摘出肺を用いた発光イメージングにより肺転移腫瘍細胞を検出した. 同時投与群, 先行投与群ともに肺転移シグナルは検出されなかったが, アイソタイプコントロール群や ICI 投与群で肺転移を認め, AI と ICI の併用効果の有用性が示唆された (図 18).

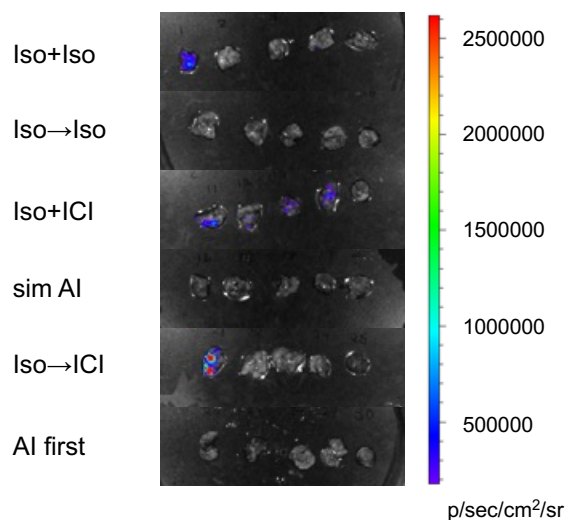


図 18 IVIS を用いた発光イメージングによる肺転移の検討

マウス摘出肺で, 発光イメージングにより肺転移腫瘍細胞を検出した.

AI の先行投与が ICI と抗がん剤併用療法の治療効果に与える影響の検討

実際の臨床では AI が殺細胞性抗がん剤と併用されていることを踏まえて、DC101, RMP1-14 に加えてパクリタキセルを投与し、治療効果を評価した。LLC 皮下腫瘍モデルに DC101, RMP1-14, パクリタキセルを腹腔内投与した。DC101 3 日先行投与した AI first 群のみで、対照群と比較して有意に腫瘍増殖が抑制された (図 19A, B)。

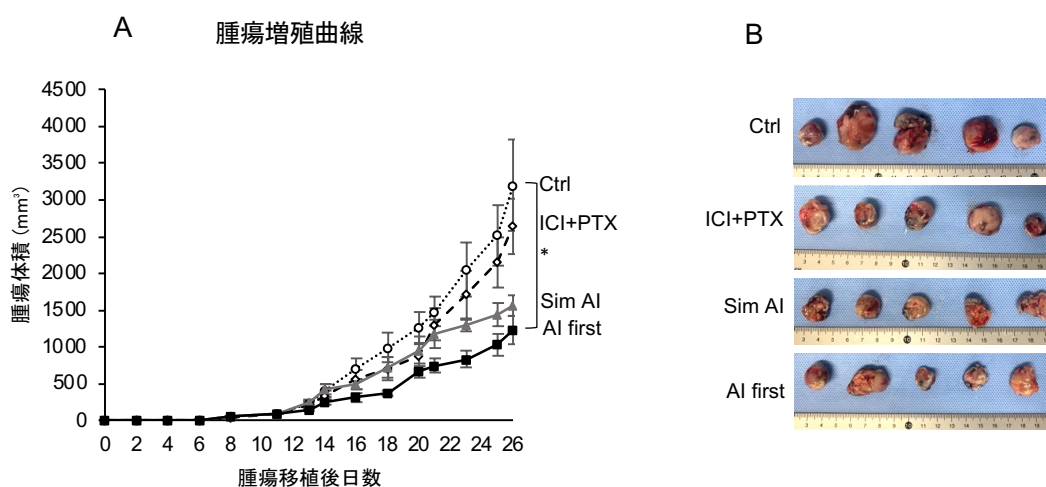


図 19 DC101 先行投与と同時投与による免疫チェックポイント阻害薬とパクリタキセルの腫瘍増殖抑制効果の検討

(A) 腫瘍体積変化. * $p < 0.05$ (Tukey-Kramer test). MEAN $\pm$ SEM.

(B) 摘出腫瘍の肉眼像.

HE 染色で腫瘍の壊死領域を評価した (図 20A). 先行投与群 AI first のみで対照群と比較して壊死領域が有意に拡大し (図 20B), AI を先行投与することで, ICI とパクリタキセルによる抗腫瘍効果がより大きくなること が示唆された.

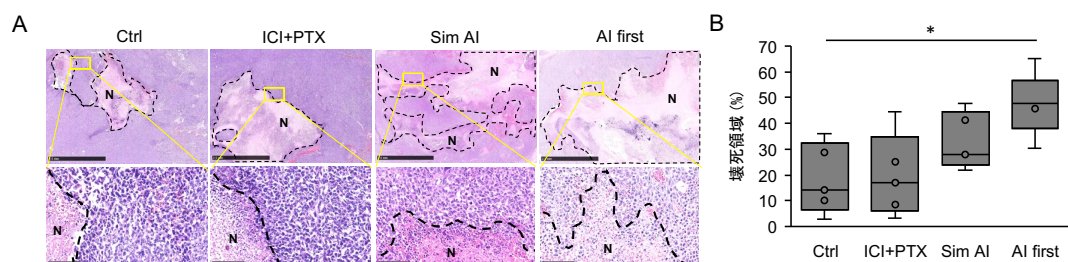


図 20 腫瘍壊死領域の検討

(A) HE 染色を用いて，腫瘍壊死を検討した．N:壊死領域．Scale bar = 上段 2.5 mm，下段 100 μ m. (B) 全切片面積に占める壊死領域の割合を算出した． $p < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

肺転移は，摘出した肺を HE 染色し (図 21A)，切片中に占める肺転移巣の面積で検討した．対照群と比べると全ての治療群において，肺転移が抑制される傾向が認められた (図 21B)．

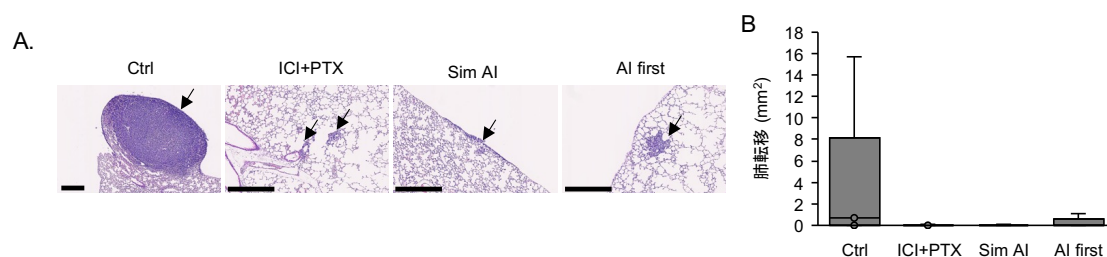


図 21 肺転移

(A) 摘出された肺標本の HE 染色で転移巣を検討した．Scale bar = 500 μ m. (B) 切片中に占める肺転移病変面積について検討した． $p = 0.348$ (one-way ANOVA).

血管新生阻害効果について CD31 免疫染色で微小血管密度により比較したところ (図 22A)，AI を投与した 2 群において，非投与群と比較して血管密度が減少した．AI 同時投与群と先行投与群の間には差は認められなかった (図 22B)．

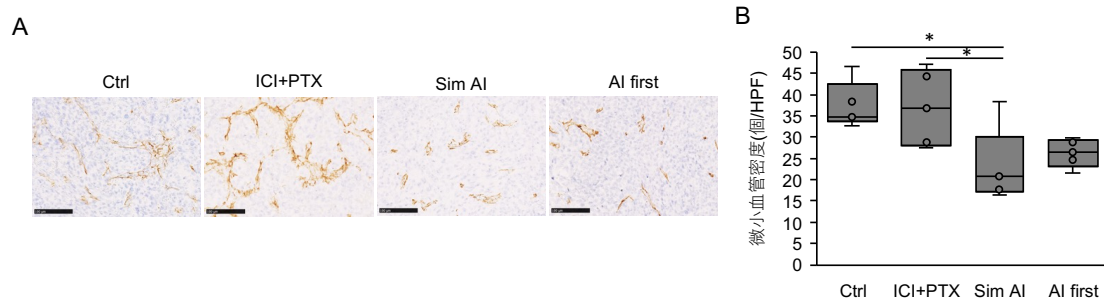


図 22 微小血管密度

(A) CD31 免疫染色. Scale bar = 100 μ m. (B) 血管が密に分布する 5 領域について CD31 陽性血管数を算出した. * $p < 0.05$ (Tukey-Kramer test).

腫瘍浸潤 CD8 陽性細胞については(図 23A), 壊死部を除いた全切片の解析で同時投与群と比較すると先行投与群でより高い傾向がみられた (図 23B).

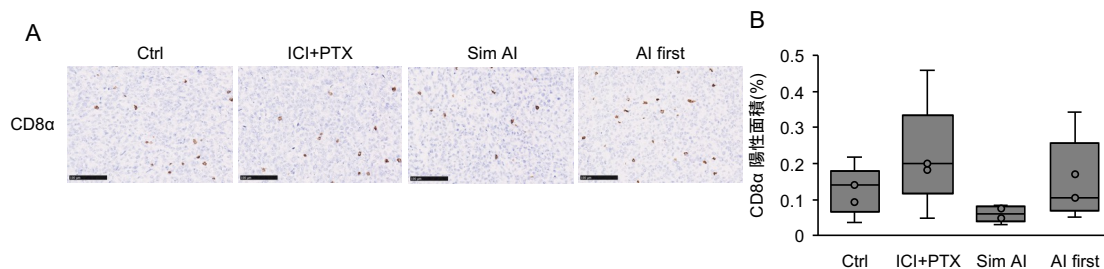


図 23 腫瘍浸潤 CD8 陽性細胞の検討

(A) CD8 α 免疫染色により CD8 陽性細胞を可視化した. Scale bar = 100 μ m. (B) 壊死部を除いた全切片における CD8 陽性面積割合を算出した. $p = 0.133$ (one-way ANOVA).

CD8 陽性細胞の機能を評価するため, 腫瘍組織における Granzyme B と IFN- γ の mRNA 発現を RT-PCR 法で検討した. DC101 で治療を行った 2 群で Granzyme B と IFN- γ の発現が高い傾向があった (図 24A, B). AI による腫瘍微小環境の改善が ICI による CD8 陽性細胞の活性維持を促進したことが示唆された.

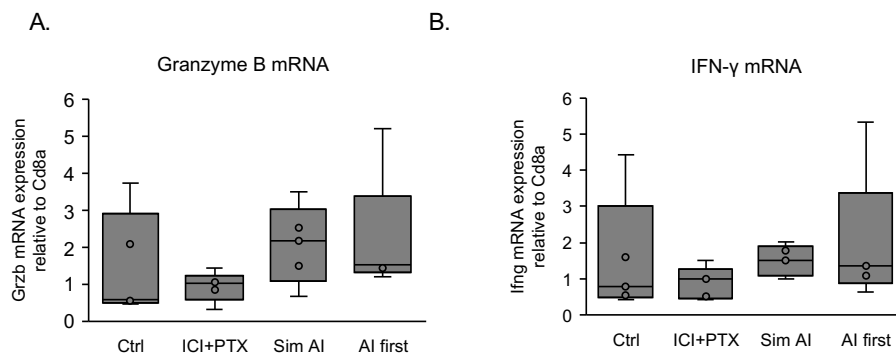


図 24 腫瘍組織中 Granzyme B, IFN γ mRNA 発現解析

摘出腫瘍の新鮮凍結検体から抽出した RNA を用いて対 CD8a mRNA で解析した。

(A) Granzyme B mRNA. $p = 0.133$ (one-way ANOVA). (B) IFN- γ mRNA. $p = 0.632$ (one-way ANOVA).

考察

本研究では、肺癌免疫療法モデルを用いて、AI の先行投与により免疫療法に先立ち腫瘍血管が正常化されることが、AI 同時投与よりも抗腫瘍効果を増強させることを示した（図 25）。その機序として、腫瘍血管の正常化による腫瘍組織内への免疫細胞浸潤の促進、免疫細胞による抗腫瘍効果を妨げる組織低酸素の改善、薬剤送達性の改善などが考えられる。

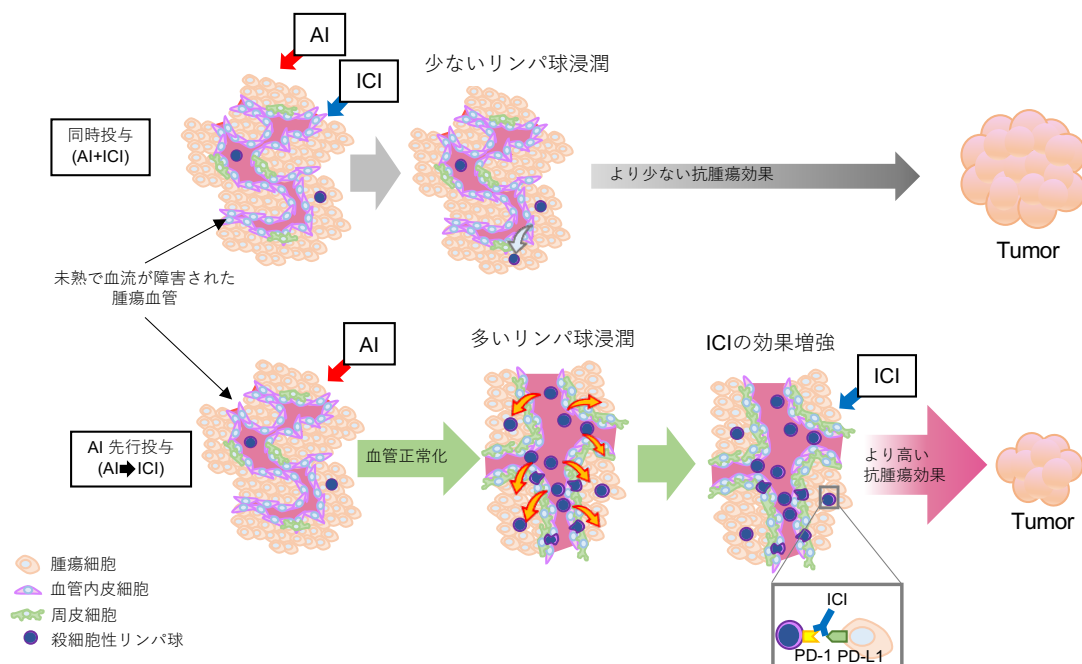


図 25 AI 先行投与による治療効果増強

AI + ICI では、腫瘍血管正常化が不十分であり、リンパ球浸潤や薬剤送達障害がされており ICI の効果が小さい。一方で AI→ICI では、腫瘍血管正常化が先行するため、リンパ球浸潤や薬剤送達が改善し、免疫療法の効果が増強される可能性がある。

ICI は多くのがんに対する治療法を劇的に変えた。しかしながら、単剤で用いた際の奏効率は約 2 割程度で (Brahmer et al., 2015; Fehrenbacher et al., 2016), 治療効果の恩恵を受けられない患者も多数存在する。免疫療法には腫瘍浸潤リンパ球が重要である (Bonaventura et

al., 2019; Pardoll, 2012). 抗 PD-1/PD-L1 抗体の治療効果は腫瘍組織内の CD8 陽性細胞障害性 T 細胞の浸潤と相関することが報告されている (Hui-Lieskovan et al., 2019; Tumei et al., 2014). CD8 陽性細胞が疲弊化するのも腫瘍組織内であり (van der Leun et al., 2020), ICI は CD8 陽性細胞の活性を維持することで抗腫瘍効果を示す. しかしながら, 腫瘍組織内に免疫細胞を運搬する経路である腫瘍血管は, 形態が異常で機能も低下しているため, 腫瘍組織内に十分に免疫細胞が浸潤できていない. また, 腫瘍組織内は低酸素および酸性環境であり (Al Tameemi et al., 2019; Annan et al., 2019; El-Kenawi et al., 2019; Vaupel et al., 1989; Vaupel and Multhoff, 2021), 腫瘍組織中の VEGF 産生がさらに誘導され, VEGFR2 を発現する制御性 T 細胞を増殖・活性化させ (Suzuki et al., 2010; Terme et al., 2013), 制御性 T 細胞は IL-10 や TGF- β 等を分泌して CD8 陽性細胞による腫瘍免疫を抑制する (Chen et al., 2005; Jarnicki et al., 2006; Vignali et al., 2008; Zou, 2006). このような腫瘍微小環境の特徴は, T 細胞の殺細胞効果を抑制する方向に働くため, 有効ながん免疫反応を得るためには腫瘍血管の正常化が重要である (Huang et al., 2018).

近年, 多くのがんにおいて, AI は血管正常化効果が期待され, 他の抗がん剤との併用により治療成績を改善している. 非小細胞肺癌の一次治療においては抗ヒト VEGF モノクローナル抗体であるベバシズマブが, カルボプラチンとペメトレキセドとの併用で生存期間や奏効率を改善させ, その後さらに ICI であるアテゾリズマブとの併用で生存期間を延長させた (Socinski et al., 2021). 既治療肺癌患者に対しては, 抗ヒト VEGFR2 モノクローナル抗体であるラムシルマブがドセタキセルとの併用で, 無増悪生存期間を延長させた (Garon et al., 2014). ICI は殺細胞性抗がん剤や AI との併用で用いられており, 治療効果の改善が期待されているが, ICI の併用効果は十分であるとはいえない (Socinski et al., 2018). ICI による治療効果を得るためには, さらなる治療法の改善が必要である.

過去の研究で, AI による血管正常化効果があらわれるには薬剤投与から数日を要し, またその効果は一過性であると報告されており (Dings et al., 2007; Liu et al., 2020; Zhang et al., 2016), 本研究の実験結果とも矛盾しない. そのため, AI が抗がん剤や ICI と同日に投与されている実際の臨床においても, AI との併用薬が投与されたタイミングでは, AI による腫瘍血管の正常化が充分には起きていないと考えられる. 実際に AI と殺細胞性抗がん剤の併用療法については, マウス *in vivo* モデルで VEGFR2

チロシンキナーゼ阻害剤であるアパチニブの先行投与が併用薬であるペメトレキセドとの同時投与よりもより高い抗腫瘍効果を示したことや (Liu et al., 2020), 膠芽腫モデルにおいてベバシズマブの3日先行投与がトボテカンの抗腫瘍効果を増強させたことが報告されている (Dickson et al., 2007). また, 数理モデルを使った解析においてはシスプラチンとペメトレキセドより先行してベバシズマブを投与することがより大きな抗腫瘍効果をもたらすことが示唆されている (Imbs et al., 2018; Schneider et al., 2019). これらは, 血管新生阻害剤による血管正常化が, 続いて投与された薬剤の腫瘍組織内への送達を改善したことを示唆している. しかし, これまでICIに対して血管正常化を先行させることへの効果は検討されてこなかった. 本研究では, AIによる血管正常化効果に着目して, AIを殺細胞性抗がん剤やICIに先行して投与することが有効であることを肺癌マウスモデルにおいて初めて示した. 実際の肺癌患者では, AI投与後の反復生検は患者の負担が大きく倫理的にも行うことができない. 本研究ではマウスモデルを用いることにより, 薬剤投与後, 腫瘍組織中の血管性状や免疫細胞浸潤の経時的な変化を組織学的に解析することを可能にした. 本研究の結果から, AI先行投与によりCD8陽性細胞の浸潤が増加したことが, 抗腫瘍効果を改善したことが示唆される. しかしながら, T細胞上の免疫チェックポイント分子等の発現や, 制御性T細胞などのがん免疫を抑制する免疫細胞の浸潤等についてはさらなる検討が必要である. また, 本研究で用いられたLLC細胞は広く用いられるマウス由来肺癌細胞株ではあるが, 免疫原性が低いことが知られており, 本研究においてもAIとICIの2剤併用モデルでは, 腫瘍抑制効果はわずかであった. また, 本研究は皮下腫瘍モデルを用いたが, 腫瘍血管や免疫細胞浸潤の様式が同所移植ないしは自然発生モデルとは異なる可能性もあることに留意が必要である. さらに, 本研究で用いた抗体は抗マウスVEGFR2モノクローナル抗体であり, 実際にヒトの肺癌治療で用いられる抗VEGFまたは抗VEGFR2モノクローナル抗体とは薬物動態学, 薬力学的に異なる可能性がある. ヒトでの臨床に本研究の結果を適用するためには, それらを考慮に入れる必要がある.

今後, 血管正常化を先行させる戦略を臨床応用するためには, ヒトの実際の癌において, AI投与後いつ血管正常化が十分に起きているのかをモニターする必要がある. しかしながら, AIには出血や創傷治癒遅延の副作用があり, 投与後に反復生検して病理組織学的解析を行うことは不可能である. そのため, 血管正常化を反映する血清マーカーや画像検査の有用性が検討されてきたが (Zhang et al., 2016; Zhou et al., 2019), 実際に臨

床応用されているものは現在なく，今後の研究の発展が期待される．本研究成果は，実際の癌患者を対象にした AI 先行投与を検討する臨床研究の基礎となるものであり，薬剤の種類や量を変更することなく，治療スケジュール変更のみでより高い治療効果を得ることができる可能性を示した．今後臨床研究により，先行する血管正常化の戦略が肺癌免疫療法の効果増強に有用であることがさらに研究されることが必要である．

結論

① 本研究から得られた知見

- ・ LLC 皮下腫瘍モデルにおいて，抗 VEGFR2 抗体を用いた AI 投与 3 日後に腫瘍血管の周皮細胞の被覆が増加する．
- ・ 同モデルにおいて AI 投与 3 日後に低酸素領域が減少する．
- ・ 同様に AI 投与 3 日後に CD8 陽性 T 細胞が増加する．
- ・ LLC 皮下腫瘍モデルにおいて抗 VEGFR2 抗体は投与 3 日後に血管正常化効果が最大となる．
- ・ AI と ICI の 2 剤併用療法では，AI 同時投与より AI 3 日先行投与がより腫瘍増殖を抑制する．
- ・ AI と ICI とパクリタキセルとの 3 剤併用療法では，AI 3 日先行投与が有意に腫瘍増殖を抑制する．

② 新知見の意義

本研究において，AI 先行投与により血管正常化効果を最も得られるタイミングで肺癌免疫療法を行うと，治療効果が増強するということを明らかにした．進行期・術後再発肺癌治療においては，殺細胞性抗がん剤，ICI，AI など複数の薬剤が治療に用いられているにもかかわらず，十分な治療効果が得られないことが多い．血管正常化を先行させ，腫瘍浸潤免疫細胞を増やし，薬剤送達性をあらかじめ改善してから ICI や殺細胞性抗がん剤を投与することで，薬剤の種類や投与量を変えることなく，治療効果の増強が期待できる．

③ 本研究で得られた新知見から今後展開される研究

本研究は，AI による血管正常化を先行させることで免疫チェックポイントや殺細胞性抗がん剤の効果が増大する可能性があることが明らかにした．本研究結果に基づいて，実際に肺癌患者の免疫療法において，AI 先行投与により治療効果が改善されるかどうか，臨床試験で明らかになるものと考ええる．

④ 今後の課題

本実験においては免疫細胞の疲弊や活性化の詳細な検討はできておらず，今後，組織免疫染色やフローサイトメトリーを用いた解析などを検討したい．また，CD8 陽性細胞以外の抗がん作用のある免疫細胞や，逆に腫

瘍免疫を抑制する制御性 T 細胞などの免疫細胞についても検討を加える必要がある。またこの血管正常化先行による効果が一般化できるかどうか、他の腫瘍でも検討が必要である。肺癌患者の治療で用いられる VEGF/VEGF 受容体モノクローナル抗体によるヒト肺癌組織の血管正常化のタイミングについても検討が必要である。また、血管正常化をモニターすることが可能な血清マーカー等の開発が必要である。

謝辞

本研究の機会を与えていただきました北海道大学大学院医学研究院呼吸器内科学教室今野哲教授，榊原純講師，教室員の皆様に謝意を表します．また，直接の研究指導を賜りました，北海道大学歯学研究院血管生物分子病理学教室樋田京子教授，間石奈湖助教に深く感謝申し上げます．また，今回の研究にあたり多大なるご協力を頂戴しました，旧北海道大学医学研究院循環器・呼吸器外科准教授，現藤田医科大学先端ロボット・内視鏡手術学講座樋田泰浩教授，ならびに北海道大学歯学研究院血管生物分子病理学教室の皆様に感謝申し上げます．

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Al Tameemi, W., Dale, T.P., Al-Jumaily, R.M.K., and Forsyth, N.R. (2019). Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism. *Front Cell Dev Biol* 7, 4.
- Allen, E., Jabouille, A., Rivera, L.B., Lodewijckx, I., Missiaen, R., Steri, V., Feyen, K., Tawney, J., Hanahan, D., Michael, I.P., et al. (2017). Combined antiangiogenic and anti-PD-L1 therapy stimulates tumor immunity through HEV formation. *Sci Transl Med* 9, eaak9679.
- Annan, D.A., Maishi, N., Soga, T., Dawood, R., Li, C., Kikuchi, H., Hojo, T., Morimoto, M., Kitamura, T., Alam, M.T., et al. (2019). Carbonic anhydrase 2 (CAII) supports tumor blood endothelial cell survival under lactic acidosis in the tumor microenvironment. *Cell Commun Signal* 17, 169.
- Baluk, P., Hashizume, H., and McDonald, D.M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 15, 102-111.
- Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., Bergsland, E., and Hanahan, D. (2003). Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest* 111, 1287-1295.
- Bonaventura, P., Shekarian, T., Alcazer, V., Valladeau-Guilemond, J., Valsesia-Wittmann, S., Amigorena, S., Caux, C., and Depil, S. (2019). Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy. *Front Immunol* 10, 168.
- Borghaei, H., Paz-Ares, L., Horn, L., Spigel, D.R., Steins, M., Ready, N.E., Chow, L.Q., Vokes, E.E., Felip, E., Holgado, E., et al. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 373, 1627-1639.

Brahmer, J., Reckamp, K.L., Baas, P., Crino, L., Eberhardt, W.E., Poddubskaya, E., Antonia, S., Pluzanski, A., Vokes, E.E., Holgado, E., et al. (2015). Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* *373*, 123-135.

Carbone, D.P., Reck, M., Paz-Ares, L., Creelan, B., Horn, L., Steins, M., Felip, E., van den Heuvel, M.M., Ciuleanu, T.E., Badin, F., et al. (2017). First-Line Nivolumab in Stage IV or Recurrent Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* *376*, 2415-2426.

Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* *69 Suppl 3*, 4-10.

Chauhan, V.P., Stylianopoulos, T., Boucher, Y., and Jain, R.K. (2011). Delivery of molecular and nanoscale medicine to tumors: transport barriers and strategies. *Annu Rev Chem Biomol Eng* *2*, 281-298.

Chauhan, V.P., Stylianopoulos, T., Martin, J.D., Popovic, Z., Chen, O., Kamoun, W.S., Bawendi, M.G., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2012). Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner. *Nat Nanotechnol* *7*, 383-388.

Chen, D.S., and Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* *39*, 1-10.

Chen, M.L., Pittet, M.J., Gorelik, L., Flavell, R.A., Weissleder, R., von Boehmer, H., and Khazaie, K. (2005). Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 419-424.

Cong, L., Maishi, N., Annan, D.A., Young, M.F., Morimoto, H., Morimoto, M., Nam, J.M., Hida, Y., and Hida, K. (2021). Inhibition of stromal biglycan promotes normalization of the tumor microenvironment and enhances chemotherapeutic efficacy. *Breast Cancer Res* *23*, 51.

- Conway, E.M., Collen, D., and Carmeliet, P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* *49*, 507-521.
- Dewhirst, M.W., Ong, E.T., Braun, R.D., Smith, B., Klitzman, B., Evans, S.M., and Wilson, D. (1999). Quantification of longitudinal tissue pO_2 gradient in window chamber tumours: impact on tumour hypoxia. *Br J Cancer* *79*, 1717-1722.
- Dickson, P.V., Hamner, J.B., Sims, T.L., Fraga, C.H., Ng, C.Y., Rajasekeran, S., Hagedorn, N.L., McCarville, M.B., Stewart, C.F., and Davidoff, A.M. (2007). Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy. *Clin Cancer Res* *13*, 3942-3950.
- Dings, R.P.M., Loren, M., Heun, H., McNiel, E., Griffioen, A.W., Mayo, K.H., and Griffin, R.J. (2007). Scheduling of radiation with angiogenesis inhibitors anginex and Avastin improves therapeutic outcome via vessel normalization. *Clin Cancer Res* *13*, 3395-3402.
- Dvorak, H.F., Nagy, J.A., Dvorak, J.T., and Dvorak, A.M. (1988). Identification and characterization of the blood vessels of solid tumors that are leaky to circulating macromolecules. *Am J Pathol* *133*, 95-109.
- Eberhard, A., Kahlert, S., Goede, V., Hemmerlein, B., Plate, K.H., and Augustin, H.G. (2000). Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. *Cancer Res* *60*, 1388-1393.
- El-Kenawi, A., Gatenbee, C., Robertson-Tessi, M., Bravo, R., Dhillon, J., Balagurunathan, Y., Berglund, A., Vishvakarma, N., Ibrahim-Hashim, A., Choi, J., et al. (2019). Acidity promotes tumour progression by altering macrophage phenotype in prostate cancer. *Br J Cancer* *121*, 556-566.
- Fehrenbacher, L., Spira, A., Ballinger, M., Kowanetz, M.,

Vansteenkiste, J., Mazieres, J., Park, K., Smith, D., Artal-Cortes, A., Lewanski, C., et al. (2016). Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet* *387*, 1837-1846.

Ferrara, N. (2005). VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology* *69 Suppl 3*, 11-16.

Folkman, J. (1971). Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine* *285*, 1182-1186.

Folkman, J. (1995). Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* *333*, 1757-1763.

Gandhi, L., Rodriguez-Abreu, D., Gadgeel, S., Esteban, E., Felip, E., De Angelis, F., Domine, M., Clingan, P., Hochmair, M.J., Powell, S.F., et al. (2018). Pembrolizumab plus Chemotherapy in Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* *378*, 2078-2092.

Garon, E.B., Ciuleanu, T.-E., Arrieta, O., Prabhash, K., Syrigos, K.N., Goksel, T., Park, K., Gorbunova, V., Kowalyszyn, R.D., Pikiel, J., et al. (2014). Ramucirumab plus docetaxel versus placebo plus docetaxel for second-line treatment of stage IV non-small-cell lung cancer after disease progression on platinum-based therapy (REVEL): a multicentre, double-blind, randomised phase 3 trial. *Lancet* *384*, 665-673.

Gavard, J., and Gutkind, J.S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol* *8*, 1223-1234.

Hanna, N.H., Robinson, A.G., Temin, S., Baker, S., Jr., Brahmer, J.R., Ellis, P.M., Gaspar, L.E., Haddad, R.Y., Hesketh, P.J., Jain, D., et al. (2021). Therapy for stage IV non-small-cell lung cancer with driver alterations: ASCO and OH (CCO) joint guideline update.

J Clin Oncol 39, 1040–1091.

Hanna, N.H., Schneider, B.J., Temin, S., Baker, S., Jr., Brahmer, J., Ellis, P.M., Gaspar, L.E., Haddad, R.Y., Hesketh, P.J., Jain, D., et al. (2020). Therapy for stage IV non-small-cell lung cancer without driver alterations: ASCO and OH (CCO) joint guideline update. J Clin Oncol 38, 1608–1632.

Hu, B., and Cheng, S.-Y. (2009). Angiopoietin-2: Development of inhibitors for cancer therapy. Curr Oncol Rep 11, 111–116.

Hu-Lieskovan, S., Lisberg, A., Zaretsky, J.M., Grogan, T.R., Rizvi, H., Wells, D.K., Carroll, J., Cummings, A., Madrigal, J., Jones, B., et al. (2019). Tumor characteristics associated with benefit from pembrolizumab in advanced non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 25, 5061–5068.

Huang, H., Bhat, A., Woodnutt, G., and Lappe, R. (2010). Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. Nat Rev Cancer 10, 575–585.

Huang, Y., Kim, B.Y.S., Chan, C.K., Hahn, S.M., Weissman, I.L., and Jiang, W. (2018). Improving immune-vascular crosstalk for cancer immunotherapy. Nat Rev Immunol 18, 195–203.

Huang, Y., Yuan, J., Righi, E., Kamoun, W.S., Ancukiewicz, M., Nezivar, J., Santosuosso, M., Martin, J.D., Martin, M.R., Vianello, F., et al. (2012). Vascular normalizing doses of antiangiogenic treatment reprogram the immunosuppressive tumor microenvironment and enhance immunotherapy. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 17561–17566.

Imbs, D.C., El Cheikh, R., Boyer, A., Ciccolini, J., Mascaux, C., Lacarelle, B., Barlesi, F., Barbolosi, D., and Benzekry, S. (2018). Revisiting bevacizumab + cytotoxics scheduling using mathematical modeling: proof of concept study in experimental non-small cell lung carcinoma. CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol 7, 42–50.

Inuzuka, T., Tsuda, M., Kawaguchi, H., and Ohba, Y. (2009).

Transcription factor 8 activates R-Ras to regulate angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 379, 510-513.

Jain, R.K. (1988). Determinants of tumor blood flow: a review. *Cancer Res* 48, 2641-2658.

Jain, R.K. (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: A new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 7, 987 - 989.

Jain, R.K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307, 58-62.

Jarnicki, A.G., Lysaght, J., Todryk, S., and Mills, K.H. (2006). Suppression of antitumor immunity by IL-10 and TGF-beta-producing T cells infiltrating the growing tumor: influence of tumor environment on the induction of CD4+ and CD8+ regulatory T cells. *J Immunol* 177, 896-904.

Kamoun, W.S., Ley, C.D., Farrar, C.T., Duyverman, A.M., Lahdenranta, J., Lacorre, D.A., Batchelor, T.T., di Tomaso, E., Duda, D.G., Munn, L.L., et al. (2009). Edema control by cediranib, a vascular endothelial growth factor receptor-targeted kinase inhibitor, prolongs survival despite persistent brain tumor growth in mice. *J Clin Oncol* 27, 2542-2552.

Kerbel, R., and Folkman, J. (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2, 727-739.

Kondo, Y., Aii, S., Morii, A., Furutani, M., Chiba, T., and Imamura, M. (2000). Enhancement of angiogenesis, tumor growth, and metastasis by transfection of vascular endothelial growth factor into LoVo human colon cancer cell line. *Clin Cancer Res* 6, 622-630.

Lanitis, E., Irving, M., and Coukos, G. (2015). Targeting the tumor vasculature to enhance T cell activity. *Curr Opin Immunol* 33, 55-63.

Lee, W.S., Yang, H., Chon, H.J., and Kim, C. (2020). Combination of anti-angiogenic therapy and immune checkpoint blockade normalizes vascular-immune crosstalk to potentiate cancer immunity. *Exp Mol Med* *52*, 1475-1485.

Lewin, M., Bredow, S., Sergeyev, N., Marecos, E., Bogdanov, A., Jr., and Weissleder, R. (1999). In vivo assessment of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. *Int J Cancer* *83*, 798-802.

Liu, M., Li, H., Wang, X., Jing, L., Jiang, P., and Li, Y. (2020). Experimental study of the vascular normalization window for tumors treated with apatinib and the efficacy of sequential chemotherapy with apatinib in lung cancer-bearing mice and patients. *Cancer Med* *9*, 2660-2673.

Maishi, N., Ohba, Y., Akiyama, K., Ohga, N., Hamada, J., Nagao-Kitamoto, H., Alam, M.T., Yamamoto, K., Kawamoto, T., Inoue, N., et al. (2016). Tumour endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan. *Sci Rep* *6*, 28039.

Maishi, N., Sakurai, Y., Hatakeyama, H., Umeyama, Y., Nakamura, T., Endo, R., Alam, M.T., Li, C., Annan, D.A., Kikuchi, H., et al. (2022). Novel antiangiogenic therapy targeting biglycan using tumor endothelial cell-specific liposomal siRNA delivery system. *Cancer Sci* *113*, 1855-1867.

Manning, E.A., Ullman, J.G., Leatherman, J.M., Asquith, J.M., Hansen, T.R., Armstrong, T.D., Hicklin, D.J., Jaffee, E.M., and Emens, L.A. (2007). A vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitor enhances antitumor immunity through an immune-based mechanism. *Clin Cancer Res* *13*, 3951-3959.

McDonald, D.M., and Choyke, P.L. (2003). Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med* *9*, 713-725.

- Miyoshi, H. (2004). Gene delivery to hematopoietic stem cells using lentiviral vectors. In *Gene Delivery to Mammalian Cells.*, W.C. Heiser, ed. (Humana Press), pp. 429-438.
- Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R.K., and McDonald, D.M. (2002). Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol* *160*, 985-1000.
- Nishio, M., Barlesi, F., West, H., Ball, S., Bordoni, R., Cobo, M., Longeras, P.D., Goldschmidt, J., Jr., Novello, S., Orlandi, F., et al. (2021). Atezolizumab Plus Chemotherapy for First-Line Treatment of Nonsquamous NSCLC: Results From the Randomized Phase 3 IMpower132 Trial. *J Thorac Oncol* *16*, 653-664.
- Ott, P.A., Hodi, F.S., and Buchbinder, E.I. (2015). Inhibition of Immune Checkpoints and Vascular Endothelial Growth Factor as Combination Therapy for Metastatic Melanoma: An Overview of Rationale, Preclinical Evidence, and Initial Clinical Data. *Front Oncol* *5*, 202.
- Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* *12*, 252-264.
- Pasqualini, R., Arap, W., and McDonald, D.M. (2002). Probing the structural and molecular diversity of tumor vasculature. *Trends Mol Med* *8*, 563-571.
- Paz-Ares, L., Luft, A., Vicente, D., Tafreshi, A., Gumus, M., Mazieres, J., Hermes, B., Cay Senler, F., Csoszi, T., Fulop, A., et al. (2018). Pembrolizumab plus Chemotherapy for Squamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* *379*, 2040-2051.
- Peterson, T.E., Kirkpatrick, N.D., Huang, Y., Farrar, C.T., Marijt, K.A., Kloepper, J., Datta, M., Amoozgar, Z., Seano, G., Jung, K., et al. (2016). Dual inhibition of Ang-2 and VEGF receptors normalizes tumor vasculature and prolongs survival in glioblastoma by altering macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 4470-4475.

Roberts, W.G., and Palade, G.E. (1995). Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* *108*, 2369–2379.

Schneider, B.K., Boyer, A., Ciccolini, J., Barlesi, F., Wang, K., Benzekry, S., and Mochel, J.P. (2019). Optimal scheduling of bevacizumab and pemetrexed/cisplatin dosing in non-small cell lung cancer. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* *8*, 577–586.

Shrimali, R.K., Yu, Z., Theoret, M.R., Chinnasamy, D., Restifo, N.P., and Rosenberg, S.A. (2010). Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer. *Cancer Res* *70*, 6171–6180.

Socinski, M.A., Jotte, R.M., Cappuzzo, F., Orlandi, F., Stroyakovskiy, D., Nogami, N., Rodriguez-Abreu, D., Moro-Sibilot, D., Thomas, C.A., Barlesi, F., et al. (2018). Atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med* *378*, 2288–2301.

Socinski, M.A., Nishio, M., Jotte, R.M., Cappuzzo, F., Orlandi, F., Stroyakovskiy, D., Nogami, N., Rodriguez-Abreu, D., Moro-Sibilot, D., Thomas, C.A., et al. (2021). IMpower150 final overall survival analyses for atezolizumab plus bevacizumab and chemotherapy in first-line metastatic nonsquamous NSCLC. *J Thorac Oncol* *16*, 1909–1924.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., and Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* *71*, 209–249.

Suzuki, H., Onishi, H., Wada, J., Yamasaki, A., Tanaka, H., Nakano, K., Morisaki, T., and Katano, M. (2010). VEGFR2 is selectively expressed by FOXP3high CD4+ Treg. *Eur J Immunol* *40*, 197–203.

Tada, Y., Togashi, Y., Kotani, D., Kuwata, T., Sato, E., Kawazoe, A., Doi, T., Wada, H., Nishikawa, H., and Shitara, K. (2018). Targeting VEGFR2 with Ramucirumab strongly impacts effector/activated regulatory T cells and CD8(+) T cells in the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer* *6*, 106.

Terme, M., Pernot, S., Marcheteau, E., Sandoval, F., Benhamouda, N., Colussi, O., Dubreuil, O., Carpentier, A.F., Tartour, E., and Taieb, J. (2013). VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. *Cancer Res* *73*, 539-549.

The Editorial Board of the Cancer Statistics in Japan (2021). Cancer statistics in Japan 2021. (Tokyo, Japan: Foundation for Promotion of Cancer Research)

Tong, R.T., Boucher, Y., Kozin, S.V., Winkler, F., Hicklin, D.J., and Jain, R.K. (2004). Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. *Cancer Res* *64*, 3731-3736.

Tumeh, P.C., Harview, C.L., Yearley, J.H., Shintaku, I.P., Taylor, E.J., Robert, L., Chmielowski, B., Spasic, M., Henry, G., Ciobanu, V., et al. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* *515*, 568-571.

van der Leun, A.M., Thommen, D.S., and Schumacher, T.N. (2020). CD8(+) T cell states in human cancer: insights from single-cell analysis. *Nat Rev Cancer* *20*, 218-232.

Vaupel, P., Kallinowski, F., and Okunieff, P. (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res* *49*, 6449-6465.

Vaupel, P., and Multhoff, G. (2021). Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding. *J Physiol* *599*, 1745-

1757.

Vignali, D.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, 523-532.

Weidner, N., Semple, J.P., Welch, W.R., and Folkman, J. (1991). Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324, 1-8.

Weis, S.M., and Cheresh, D.A. (2005). Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 437, 497-504.

Winkler, F., Kozin, S.V., Tong, R.T., Chae, S.S., Booth, M.F., Garkavtsev, I., Xu, L., Hicklin, D.J., Fukumura, D., di Tomaso, E., et al. (2004). Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. *Cancer Cell* 6, 553-563.

Yasuda, S., Sho, M., Yamato, I., Yoshiji, H., Wakatsuki, K., Nishiwada, S., Yagita, H., and Nakajima, Y. (2013). Simultaneous blockade of programmed death 1 and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) induces synergistic anti-tumour effect in vivo. *Clin Exp Immunol* 172, 500-506.

Zhang, L., Takara, K., Yamakawa, D., Kidoya, H., and Takakura, N. (2016). Apelin as a marker for monitoring the tumor vessel normalization window during antiangiogenic therapy. *Cancer Sci* 107, 36-44.

Zhang, W., Liu, J.N., and Tan, X.Y. (2009). Vaccination with xenogeneic tumor endothelial proteins isolated in situ inhibits tumor angiogenesis and spontaneous metastasis. *Int J Cancer* 125, 124-132.

Zhao, S., Ren, S., Jiang, T., Zhu, B., Li, X., Zhao, C., Jia, Y., Shi, J., Zhang, L., Liu, X., et al. (2019). Low-dose apatinib

optimizes tumor microenvironment and potentiates antitumor effect of PD-1/PD-L1 blockade in lung cancer. *Cancer Immunol Res* 7, 630-643.

Zhou, H.C., Chen, N., Zhao, H., Yin, T., Zhang, J., Zheng, W., Song, L., Liu, C., and Zheng, R. (2019). Optical-resolution photoacoustic microscopy for monitoring vascular normalization during anti-angiogenic therapy. *Photoacoustics* 15, 100143.

Zhou, Q., Guo, P., and Gallo, J.M. (2008). Impact of angiogenesis inhibition by sunitinib on tumor distribution of temozolomide. *Clin Cancer Res* 14, 1540-1549.

Zou, W. (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* 6, 295-307.