

令和元年5月27日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09597

研究課題名(和文) 腫瘍に浸潤する好中球による非小細胞肺癌・免疫インターフェイス制御解明と治療戦略

研究課題名(英文) Tumor associated Neutrophils control NSCLC-Immune interface

研究代表者

福原 達朗 (FUKUHARA, TATSURO)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん先進治療開発研究部・特任研究員

研究者番号：80400365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：非小細胞肺癌(NSCLC)は治療抵抗性を示すことが多く、その克服が課題となっている。本研究では、腫瘍内に浸潤する好中球に着目した解析を行った。マウス肺癌モデルにおいて、キラーT細胞が存在しない癌においても、腫瘍内に好中球が認められた。好中球除去抗体を投与したところ腫瘍増殖が低下したことから、好中球は腫瘍増殖を助けている可能性が高い。そこで好中球を遊走させる誘引因子を探索しS100Aを同定した。S100AはEGFRシグナルで誘導され、好中球遊走能を示すことから、非小細胞肺癌の新たなマーカーのみならず、治療標的となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非小細胞肺癌における腫瘍内好中球の意義を見出したことが学術的意義がある。新たな肺癌マーカー遺伝子を発見した点で社会的意義がある。肺癌の治療標的としての可能性があり発展すれば、社会貢献となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：NSCLC is one of the most common cancer worldwide and therapy-resistance awaits further improvement. We found that syngeneic lung tumor includes a Neutrophil population. To study a role of tumor associated Neutrophil (TAN), we depleted Neutrophil in vivo. Neutrophil depletion decreased tumor size, which prompted us to screen for a factor that recruits Neutrophils into NSCLC. We identified S100A proteins are abundantly expressed in NSCLC. S100A protein expressions were induced in response to EGF. Because former reports suggested their potential ability to recruit Neutrophils, S100A may be a good marker for NSCLC as well as a potential therapeutic targets.

研究分野：呼吸器腫瘍学

キーワード：非小細胞肺がん 好中球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)我が国の肺癌死亡者数は年 5 万人を超え、化学療法に抵抗性を示す固形腫瘍の代表である。上皮成長因子受容体(EGFR)チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)は EGFR 変異を有する NSCLC に著効を示す。申請者は、ゲフィチニブと標準化学療法との第 Ⅲ 相比較試験において、ゲフィチニブが有意に無増悪生存期間を延長することを見出し、EGFR 遺伝子変異が EGFR-TKI の効果予測因子であることを報告した。肺癌患者の治療法選択に大きな影響を与える画期的な成果である。しかし、EGFR 変異を有するにもかかわらず 25-30%の症例では EGFR-TKI が奏効しない(自然耐性)。また著効例においても獲得耐性を生じ再燃する(獲得耐性)。耐性の原因は、EGFR の 2 次的遺伝子変異 (T790M)、 HGF/c-Met の増幅と活性化、 ErbB2 の活性化、 アポトーシス誘導分子の遺伝子多型等であるが、機序の解析は未だ不十分とであり、分子生物学的エビデンスに基づく新規治療法の開発が急務となっている。

(2) 最近になって、抗腫瘍免疫による癌治療が注目を浴びている。肺癌をはじめとする腫瘍細胞上には、抑制性レセプター(PD-L1, B7-1 等)が発現誘導される。これらの抑制性分子は CD8+ 細胞傷害性 T 細胞に対して強力な抑制性シグナルを送ることで、抗腫瘍免疫による攻撃を回避していると考えられる。実際に PD-L1 と PD-1(PD-L1)に対する T 細胞上の共刺激受容体間、および B7-1 と CTLA-4(B7-1)に対する T 細胞上の共刺激受容体間の相互作用を阻害するモノクローナル抗体投与を行うことで、NSCLC に劇的な効果を生むことが報告された。興味深いことに腫瘍内には CTL 以外にも多くの骨髄由来細胞が浸潤している。この事実は、EGFR-TKI 効果が不十分な肺癌症例に対して、抗腫瘍免疫の増強による免疫制御の打破が極めて有効なアプローチであることを示唆している。EGFR-TKI と PD-(L)1 の併用による治療効果(前述)は、この療法が薬剤耐性肺癌の有効な克服法であることを示している。しかし、実際の個体における免疫学的な事象、特に腫瘍細胞の傷害に関わる細胞傷害性リンパ球と腫瘍細胞の相互作用など、重要な基本事項で依然不明な点は多い。抗腫瘍免疫に関する理解をさらに発展させ、治療法に至るレベルにまで開発を進めるためには、生体における「肺癌と免疫系の相互効果」に関する具体的な実験的エビデンスが必要である。実際に、腫瘍内に細胞傷害性 T 細胞 (CTL) が存在しない肺癌も多く、肺癌細胞を攻撃する際の生物学的応答、特に腫瘍内における好中球の役割はほとんど不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、「NSCLC が好中球を利用して抗腫瘍免疫を回避することから、有望な治療標的である」という作業仮説を立て、主な具体的目標として NSCLC 内に浸潤する好中球の役割、腫瘍による好中球遊走および好中球分化に関する制御機構、腫瘍内の炎症性因子の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Syngeneic 担癌マウスを用いた in vivo 腫瘍モデルによる NSCLC 腫瘍内好中球の解析：

発癌と悪性化における好中球の意義を明らかにするため、マウス担癌モデルを用いる。C57/BL6 系統由来の肺癌細胞 Lewis Lung Carcinoma(LLC)を皮下に移植し腫瘍を形成させる、腫瘍形成を観察するとともに、腫瘍に含まれるリンパ球分画と骨髄系細胞を調整し、CD8 陽性 T 細胞、浸潤する好中球について FACS によって解析する。マクロファージと好中球、単球を染めるマーカーである CD11b, Ly6C, Ly6G を用いた。

(2) 肺癌組織に好中球をリクルートする因子同定の試み：マイクロアレイを用いた好中球誘導因子の同定：

肺腫瘍が好中球をリクルートする因子の同定を目指す。腫瘍形成時に発現する遺伝子を同定する。サイトカインや炎症関連分子が分泌される可能性がある。同定された遺伝子は CRISPR/Cas9 法を用いて癌細胞において欠損させる。この細胞を再度マウスに移植して、腫瘍の形成が低下する等の影響を解析した。

4 . 研究成果

(1) LLC が形成する Syngeneic 腫瘍内に含有される骨髄球系細胞を解析したところ、CD45+CD11b+Ly6ChiLy6G^{hi} で染色される好中球集団が存在し、これらは CD45+CD11b+Ly6C^{low}Ly6G^{low} で規定される TAM とは明らかに異なる集団であった。一方、CD8⁺T 細胞の浸潤はほぼ皆無であった。したがって、肺癌組織には好中球が一定数存在することが明らかになった。

(2) Syngeneic 腫瘍モデルを用いて腫瘍内好中球の役割を解析した。抗 Ly6G 抗体をマウス腹腔に連続投与して好中球除去を継続的に行い、腫瘍形成を比較した。その結果、好中球除去抗体を投与したマウスでは、コントロール抗体投与群に比し腫瘍増殖能が低下した。したがって、好中球は腫瘍増殖を促進する能力を有することが示唆された。

(3) 肺癌細胞が分泌する好中球遊走と活性化因子を探索した。肺癌細胞に高い発現を示す S100A 蛋白群を同定した。次いで、EGFR シグナルによる S100A の発現を調べたところ、同シグナルによって顕著な発現誘導が確認された。S100A には約 20 種のサブタイプがあるため、個々のサブタイプの発現を解析した。その結果、好中球の遊走を促進する S100A8 および S100A9 (ヘテロダイマー)に加えて、S100A4 および S100A11 を同定した。

(4) S100A8 および S100A9 は骨髄球および好中球に対する遊走を促すことから、今回同定した S100A4 および S100A11 が肺癌から分泌されて好中球を腫瘍へとリクルートする可能性が高いものと考えられる。以上の結果より、S100A 分子群は肺癌のマーカーのみならず治療標的となる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Watanabe K, Fukuhara T, Tsukita Y, Morita M, Suzuki A, Tanaka N, Terasaki H, Nukiwa T, Maemondo M. EGFR Mutation Analysis of Circulating Tumor DNA Using an Improved PNA-LNA

PCR Clamp Method. Can Respir J. 査読有 2016, 5297329. doi: 10.1155/2016/5297329.

Morita M, Sato T, Nomura M, Sakamoto Y, Inoue Y, Tanaka R, Ito S, Kurosawa K, Yamaguchi K, Sugiura Y, Takizaki H, Yamasita Y, Katakura R, Sato I, Kawai M, Okada Y, Watanabe H, Kondoh G, Matsumoto S, Kishimoto A, Obata M, Matsumoto M, Fukuhara T, Motohashi H, Suematsu M, Komatsu M, Nakayama KI, Watanabe T, Soga T, Shima H, Maemondo M, Tanuma N :PKM1 Confers Metabolic Advantages and Promotes Cell-Autonomous Tumor Cell Growth. 査読有 Cancer Cell. 2018, 33(3): 355-367. e7.doi:10.1016/j.ccell.2018.02.004.

Mitsune A, Yanagisawa S, Fukuhara T, Miyauchi E, Morita M, Ono M, Tojo Y, Ichinose M :Relapsed Myasthenia Gravis after Nivolumab Treatment. Intern Med.査読有 2018 Feb 9. Doi:10.2169/internalmedicine.9153-17.

Saito H, Fukuhara T, Furuya N, Watanabe K, Sugawara S, Iwasawa S, Tsunozuka Y, Yamaguchi O, Okada M, Yoshimori K, Nakachi I, Gemma A, Azuma K, Kurimoto F, Tsubata Y, Fujita Y, Nagashima H, Asai G, Watanabe S, Miyazaki M, Hagiwara K, Nukiwa T, Morita S, Kobayashi K, Maemondo M. Erlotinib plus bevacizumab versus erlotinib alone in patients with EGFR-positive advanced non-squamous non-small-cell lung cancer (NEJ026): interim analysis of an open-label, randomised, multicentre, phase 3 trial.査読有 Lancet Oncol. 2019 May;20(5):625-635. Doi: 10.1016/S1470-2045(19)30035-X. Epub 2019 Apr 8.

〔学会発表〕(計1件)

Tatsuro Fukuhara, Satoshi Oizumi, Shunichi Sugawara, Koichi Minato, Toshiyuki Harada, Akira Inoue, Yuka Fujita, Satoshi Watanabe, Kazuhiko Ito, Akihiko Gemma, Yoshiki Demura, Maso Harada, Hiroshi Isobe, Ichiro Kinoshita, Satoshi Morita, Kuniko Kobayashi, Koichi Hagiwara, Minoru Kurihara, Toshihiro Nukiwa :Updated survival outcomes of NEJ005/TCOG0902, a randomized PII of gefitinid and chemotherapy in EGFR-mutant NSCLC, 18th World Conference on Lung Cancer : WCLC2017, Yokohama, 2017/10/15

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：前門戸 任

ローマ字氏名：(MAEMONDO, Makoto)

所属研究機関名：地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）

部局名：がん先進治療開発研究部

職名：特任研究員

研究者番号（8桁）：40344676

研究分担者氏名：田中 伸幸

ローマ字氏名：(TANAKA, Nobuyuki)

所属研究機関名：地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）

部局名：がん先進治療開発研究部

職名：部長

研究者番号（8桁）：60280872

研究分担者氏名：長島 隆一

ローマ字氏名：(NAGASHIMA, Ryuichi)

所属研究機関名：地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）

部局名：がん先進治療開発研究部

職名：研究技師

研究者番号（8桁）：20783707

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：