

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20076

研究課題名(和文)肉腫の免疫モニタリングによる新規治療標的探索

研究課題名(英文)Searching for new therapeutic targets by immunomonitoring of sarcoma

研究代表者

小林 英介(Kobayashi, Eisuke)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医長

研究者番号：40365292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肉腫患者から末梢血を採取し、免疫モニタリングを行った。CD8 + T細胞上のTim-3の高発現および単球系骨髄由来免疫抑制細胞(M-MDSC)が無増悪生存期間(PFS)と有意に関連していた($p = 0.04, 0.02$)。また、CD8+T細胞上のNKG2D高発現は、良好なPFSと有意に関連していた($p = 0.04$)。多変量解析でもCD8 + T細胞上のTim-3の発現量はPFS不良と関連していた($p = 0.04$)。末梢血の免疫学的状態は、肉腫患者の予後に関連する事が示唆され、肉腫治療のためのバイオマーカーや免疫療法に基づく新規治療開発に応用できる可能性があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肉腫は非常にまれな悪性腫瘍であるため、治療法が限られている。がんに対する第4の治療法として免疫療法が、近年いくつかのがん種において承認され、他のがん種においても大規模な臨床試験で創薬として有望な結果が得られている。しかしながら、肉腫に対する有効性に関してはほとんど明らかになっていない。今回の知見は、癌に対する宿主免疫反応が、肉腫を有する患者に存在することを示唆し、肉腫患者における免疫治療のための免疫プロファイニングとなり、肉腫治療のためのバイオマーカーまたは免疫療法に基づく新規な戦略の開発につながる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Peripheral blood was collected from a patient with bone and soft tissue sarcoma and immunological monitoring was performed. High expression of Tim-3 on CD8 + T cells and monocytic bone marrow-derived immunosuppressive cells (M-MDSC) were significantly associated with progression-free survival (PFS) ($p = 0.04, 0.02$). High NKG2D expression on CD8 + T cells was significantly associated with good PFS ($p = 0.04$). Multivariate analysis also showed that Tim-3 expression on CD8 + T cells was associated with poor PFS ($p = 0.04$). It was suggested that the immunological status of peripheral blood is related to the prognosis of sarcoma patients, and it has been found that it may be applied to the development of new biomarkers and immunotherapy for the treatment of sarcoma and.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：肉腫 免疫モニタリング 免疫療法 希少がん 骨軟部腫瘍

1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍は骨肉腫やユーイング肉腫を代表とする悪性骨腫瘍、および脂肪肉腫、未分化多型肉腫、横紋筋肉腫などを代表する悪性軟部肉腫の2つに大別され、いわゆる肉腫と総称される。症例自体が極めて少なく、近年は希少がんとも称され、がん対策基本法の改訂もあり、国を挙げてその治療開発に力を入れ始めている。しかし症例数の観点および経済的観点からも新規の治療開発が困難な領域である。加えて組織型が多彩であり、個別の疾患で標準治療が存在するのは骨肉腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫と非常に限られた疾患のみである。教科書的には軟部肉腫の治療において生存率の向上に寄与するとして確立されている抗腫瘍薬はDoxorubicinとIfosfamidの2剤のみであるが、薬剤耐性肉腫も多いことから、治療に難渋することは臨床上の大きな問題点である。初診時転移のない軟部肉腫期(UICC/AJCC)の5年生存率が約50-60%、転移のない骨肉腫は65%程度であり、化学療法の導入で改善してきたものの、AYA世代を始めとする若年者に多い疾患でもあり、未だ予後不良である。また新規薬剤の開発が過去30年でほとんどないのが現状であり、治療成績改善のためにも新しい治療戦略が必須である。固形がんにおいては、手術、化学療法、放射線療法に続くがんに対する第4の治療法として免疫療法が期待され多くの研究が行われてきた。近年、前立腺がんに対する樹状細胞ワクチン療法(Sipuleucel-T)や進行メラノーマに対する抗CTLA-4抗体(ipilimumab)、進行メラノーマや非小細胞肺癌で抗PD-1抗体(Nivolumab, pembrolizumab)がFDAで承認され、他の癌種においても抗PD-L1、抗PD-1抗体の早期臨床試験においても有望な結果が得られてきており、これまで以上にがん免疫療法に注目が集まっている。また、m-MDSC(monocyte myeloid Derived Suppressor Cells:単球系骨髄由来免疫抑制細胞)が悪性黒色腫の予後との関連するという報告など、治療のみならず、腫瘍の予後マーカーとしても注目されている。多くの抗がん剤や分子標的薬剤と同様に、がん免疫療法も全ての患者に有効ではない。現在より高い有効性を求めるために、免疫療法に適した患者のバイオマーカー検索、また手術や従来抗がん剤や分子標的薬剤と免疫療法の併用療法が欧米では試みられており、本邦でも今後、同様の研究や臨床試験が計画されていくと予想される。併用療法には理論上は免疫機能に好ましい影響を与える抗がん剤と免疫療法の組み合わせが望ましく、もしくは少なくとも免疫機能を高度に抑制しない抗がん剤と免疫療法を組み合わせることが必要条件と考えるが、どの薬剤と免疫療法の組み合わせが最適に関して、肉腫領域では全くの未知であり、国内外でも報告は皆無である。さらには抗がん剤治療のレジメン毎に免疫機能への影響についての情報が必要となるが、前述のごとく肉腫においてその情報は皆無である。そこで、肉腫に対する標準治療として一般的に行われている手術や抗がん剤治療レジメンが、免疫機能に与える影響を解析することを目的とし本研究を計画した。本研究の結果、免疫機能が受ける影響に治療方法で差を認めることや、抗がん剤が免疫機能に与える影響に個体差があることが確認できれば、新たな視点に基づいた個別化された免疫療法開発や新規予後マーカーの開発にもつながることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、治療対象になる希少がんである肉腫患者に対して前向きに採血を行い、免疫モニタリングを行うことである。これは肉腫に対する標準治療として一般的に行われている手術や抗がん剤治療レジメンが、免疫機能に与える影響を解析することを目的とし、新規治療標的やバイオマーカーの開発を進める。具体的には、免疫機能が受ける影響に治療方法で差を認めることや、抗がん剤が免疫機能に与える影響に個体差があることを確認することで、新たな視点に基づく患者ごとに個別化された免疫療法の開発や、抗がん剤治療と免疫療法との併用療法の開発、また、肉腫における免疫系新規予後マーカーの開発にもつながること、得られた知見を臨床応用し、骨軟部肉腫患者の治療成績の向上に繋げることを目的としている。

3. 研究の方法

以下の方法で研究を進めた。

1) 免疫モニタリング採血

肉腫に対して標準的な治療(手術や化学療法)を受ける患者の末梢血(成人:20ml、10歳~19歳:10ml)を試料とする。手術単独例25例/年、新規術前化学療法導入例(骨肉腫:5例、ESFT:3例、横紋筋肉腫:2例、高悪性度非円形細胞肉腫:5例の計15例/年)、進行例に対する化学療法導入例(高悪性度非円形細胞肉腫:10例/年)の上記合計50例/年(計150例)を予定とし患者登録を行う。各患者において治療前1回、治療後2回の計3回の採血を実施する。

2) T細胞のフェノタイプ・活性化マーカー、MDSCを中心とした免疫抑制細胞の解析

骨軟部腫瘍患者の血液より末梢血単核球細胞を抽出し、フローサイトメトリーを用いた免疫応

答解析を行い、肉腫患者における治療前後の免疫担当細胞のプロファイリングを作成する。

最終的に肉腫対して標準的な治療(手術や化学療法)を受ける患者の末梢血 105 例を採取した。各患者において治療前 1 回、治療後 2 回の計 3 回の採血を採取した。それら末梢血検体にリンパ球分離液を用いて、遠心分離機にて PBMC(Peripheral blood mononuclear cells: 末梢血単核球)を分離し、多重染色法を用いたマルチカラー解析法のための Flow cytometry(BD 社 LSR Fortes X-20)を用いて解析を行った。MDSC (Myeloid-derived suppressor cell: 骨髄由来免疫抑制細胞) サブセットである単球系 MDSC と顆粒球系 MDSC 及び樹状細胞(Dendritic Cell:DC) のサブセットである Myeloid DC と Plasmacytoid DC 及び免疫抑制細胞と T・B・NK 細胞などの免疫関連担当発現と各症例の臨床情報との関連を解析し、治療効果や予後関連する解析を行った。単球系 MDSC は、Lineage(CD3/CD16/CD19/CD20/CD56)-/ CD11b+/ CD33+/ HLA-DRlow/ CD14+/CD15low と、顆粒球系 MDSC は Lineage-/ CD11b+/ CD33+/ HLA-DRlow/ CD14-/ CD15+ と定義し、Myeloid DC に関しては lineage-/ HLA-DR high/ CD11c+、Plasmacytic DC は、lineage-/HLA-DR high/CD123+と定義し解析を行った。105 例のうち、高悪性度でかつ転移のない M0 症例で PFS(Progression-Free survival)に関して、M1 症例である転移群で OS との解析を行った。

4 . 研究成果

多重染色フローサイトメトリーにより、53 の免疫細胞サブセット (T 細胞、B 細胞、NK 細胞および免疫抑制サブセットを含む) を解析した。CD8 + T 細胞上の Tim-3 の高発現および単球系骨髄由来免疫抑制細胞 (M-MDSC) が無増悪生存期間 (PFS) と有意に関連していると同定した ($p = 0.04, 0.02$) また、CD8+T 細胞上の NKG2D 高発現は、良好な PFS と有意に関連していた ($p = 0.04$)。さらに、M-MDSC と Tim-3+ CD8 + T 細胞との間に弱い正の相関が観察された ($r = -0.44, p^* = 0.003$)。多変量 Cox 回帰分析においては、CD8 + T 細胞上の Tim-3 の発現量はより短い PFS と関連していた ($p = 0.04$)。他がん種でも報告されているように、末梢血の免疫学的状態は、肉腫患者の予後にも関連する事が示唆された。本研究結果により、肉腫治療のためのバイオマーカーまたは免疫療法に基づく新規な戦略の開発に応用できる可能性があることが分かった。この結果をふまえて論文化し現在論文投稿を行っている。

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 金栄智、小林英介、末原義之、窪田大介、伊藤歩、金子和夫、川井章、中馬広一、北野滋久
2. 発表標題 肉腫(悪性骨軟部腫瘍)患者における免疫モニタリング
3. 学会等名 日本整形外科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金 栄智、小林 英介、北野 滋久
2. 発表標題 Immune monitoring in patients with bone and soft tissue sarcoma
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2016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
--	---------------------------	-----------------------	----