

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 8 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06991

研究課題名（和文）悪性腫瘍患者のマクロファージに着目した新規免疫モニタリング法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel immune monitoring focusing on macrophages in patients with malignancy

研究代表者

大西 紘二（Ohnishi, Koji）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特任准教授

研究者番号：40613378

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究はがん免疫療法の効果予測のために新たな免疫モニタリング法の開発を目指したものである。私達は膵臓癌、胃癌、舌癌患者においてもCD169陽性リンパ節マクロファージが多い症例であるほど、術後の生存率が高いことを明らかにした。私達は以前の研究で大腸癌や悪性黒色腫、子宮体癌などでも同様の結果を示しているため、CD169陽性リンパ節マクロファージは様々な癌種のがん患者における予後マーカーとして有用であると考えられる。CD169陽性マクロファージが特異的に産生する液性因子を網羅的に解析した結果、CCL8やCXCL10など複数の分子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん免疫療法は従来の手術治療や放射線・化学療法を凌駕する可能性がある新しい治療戦略であるが、劇的な治療効果を示す症例がある一方で、殆ど効果を示さない症例までその治療効果に大きな個人差が生じやすい点が問題である。そのため、治療前のがん免疫療法の効果予測が可能な免疫モニタリング法の開発が重要である。本研究では、新しい免疫モニタリング法の1つとして、リンパ節のCD169陽性マクロファージに着目した方法を提示したことは画期的であり、今後の研究の進展により、簡便で広く応用可能ながん免疫モニタリング法の開発につながる事が可能である。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop a new immune monitoring method for predicting the effects of cancer immunotherapy. We have shown that even in patients with pancreatic cancer, gastric cancer, and tongue cancer, the higher the number of CD169-positive lymph node macrophages, the higher the postoperative survival rate. Since we have shown similar results in colorectal cancer, malignant melanoma, endometrial cancer, etc. in previous studies, CD169-positive lymph node macrophages are useful as prognostic markers in cancer patients of various cancer types. Conceivable. As a result of comprehensive analysis of humoral factors specifically produced by CD169-positive macrophages, multiple molecules such as CCL8 and CXCL10 were identified.

研究分野：人体病理学

キーワード：がん免疫 リンパ節 マクロファージ CD169 がん免疫モニタリング

1. 研究開始当初の背景

背景 1. がん免疫療法の免疫モニタリングの重要性と問題点

がんの治療法として、手術・化学療法・放射線療法に続く新たな治療法として、がん免疫療法が急速に普及しつつある。がん免疫におけるブレーキに相当する PD1/PD-L1 を阻害する免疫チェックポイント阻害薬は一部の進行がん患者において著効を示す一方で、がん免疫療法が殆ど効果を示さない症例も少なくない。免疫チェックポイント阻害薬は副作用が少なくなく、また経済的にも負担が大きい薬であるため、事前にがん免疫療法の効果を予測できる免疫モニタリングが非常に重要となる。

この免疫モニタリングとして一般的に行われている検査がコンパニオン診断である。これは腫瘍細胞や免疫細胞に PD1/PD-L1 がどの程度発現しているのか解析することで、免疫チェックポイント阻害薬の治療効果を予測する手法である。しかし、様々ながん種でコンパニオン診断が行われるようになった一方で、このコンパニオン診断結果と実際の治療効果が一致しない症例が数多く報告されるようになった。すなわち、現状の免疫モニタリングには限界があり、別のバイオマーカーを用いた新たな免疫モニタリングの開発が望まれている現状がある。さらに、がん免疫療法は手術不能の進行がん患者においても対象になる場合が多いことから、比較的簡便に実施できる血液検査での免疫モニタリングが望ましいと考えられる。

背景 2. 抗腫瘍免疫における CD169+リンパ節マクロファージの意義

リンパ節内にはリンパ管に連続したリンパ洞という構造があり、多数のリンパ節洞マクロファージ (以下、LySM) が存在している。LySM は流入する腫瘍抗原を貪食しリンパ球へ提示することで腫瘍特異的なリンパ球活性化を誘導する。CD169 (Sialoadhesin) はシアル酸含有分子との結合能をもつ膜タンパクであり、LySM 等の特定のマクロファージに発現が見られる。Asano らは、腫瘍ワクチンモデルマウスを対象とした解析により CD169+LySM が腫瘍抗原を CD8+T 細胞へ抗原提示することで抗腫瘍免疫を誘導することを報告した (Immunity, 2011)。申請者らは、in vitro で IFNs がマクロファージに CD169 を誘導することを報告し、免疫組織学的手法を用いて様々ながん種において所属リンパ節の CD169+LySM が多い症例では CD8+T 細胞や NK 細胞の腫瘍組織内浸潤が増加し、術後生存率が有意に高いことを明らかにした {大腸癌: Ohnishi et al. Cancer Sci, 2013、悪性黒色種: Saito and Ohnishi et al. Cancer Immunol Res, 2015、乳癌: Shiota and Ohnishi et al. PLOS ONE, 2016、子宮体癌: Ohnishi et al. Cancer Sci, 2016、膀胱癌: Asano and Ohnishi et al. Cancer Sci, 2018、食道癌: Takeya and Ohnishi et al. Pathol Int, 2018、膵臓癌、舌癌: unpublished data}。すなわち、がんの手術時に転移検索のため同時切除していたリンパ節標本を用いて、CD169+LySM の評価を行うことでがん免疫モニタリングとしての予後予測が可能であることが示唆された。

2. 研究の目的

がん患者の CD169+LySM と相関する血液中の分子マーカーの組み合わせを同定することで、より簡便で高精度な新規免疫モニタリング法の開発を目指す

本研究は、コンパニオン診断や治療前検査などの従来の方法では不十分であった免疫モニタリングの改善を目指し、最終的には患者・社会双方にとって高効果・低コストの持続可能なオーダーメイドがん治療達成を目指すための有益ながん免疫モニタリング法の開発を目的とした野心的研究である。

3. 研究の方法

1. 新鮮リンパ節検体から CD169+LySM を抽出し、CD169+LySM が特異的に分泌する液性因子の同定を行う

1. 様々ながん患者 (現時点では、舌がんと大腸がんを予定) において、手術時に得られた新鮮リンパ節検体を一部供与いただき、抗 CD68 抗体を用いたソーティングを行い、マクロファージの抽出を行う。さらに抗 CD169 抗体を用いて、CD169 陽性マクロファージと CD169 陰性マクロファージを分離する。

2. 上記の 2 群のマクロファージをマイクロアレイ検査にて網羅的解析を行い、CD169 陽性マクロファージが特異的に発現している液性因子に関わる遺伝子を同定する。

3. 上記の実験 2 で同定された液性因子の遺伝子について、実際に CD169 陽性マクロファージが分泌する可能性があるのかどうか検討するため、上記の実験 1 で分離した CD169 陽性マクロファージを培養し、ELISA 法にて該当する液性因子の分泌を確認する。

II. がん患者の血液検体を用いて、IFNs とすでに同定した液性因子候補の血液中濃度を測定し、CD169+LySM との相関性を解析する

1. 研究 で対象とした様々ながん患者の術前採血検体（凍結保存検体）を用いて、研究 で同定した複数の液性因子の血液中濃度を測定する。さらに申請者らによる以前の研究でマクロファージにおける CD169 発現を増強することが知られている IFNs (IFN , IFN , IFN) の血液中濃度も測定する。

2. 実験 1 において、血液中濃度の上昇が認められた液性因子について、その血液中濃度と CD169+LySM の数との相関関係を解析し、CD169+LySM との相関性が高い液性因子を同定する。

III. 良好な臨床予後と相関する液性因子の組み合わせを同定する

研究 で同定した複数の液性因子候補について、どの組み合わせが最も CD169+LySM の数や生存率を反映するのか明らかにするため（例えば、IFN + CCL8 + CXCL10 のような組み合わせ）、多変量解析を行う。これによって、がん免疫のアクセラレーター機能（CD169+LySM に相当）を最も良く反映する血清バイオマーカーの組み合わせを同定する。

4. 研究成果

1. CD169 陽性マクロファージが特異的に発現する液性因子の解析

新鮮リンパ節検体からマクロファージを抽出したが、解析に十分な細胞数を確保することは困難であった。そのため、ヒト末梢血からマクロファージを分離し、INF 刺激により CD169 陽性マクロファージを培養し、CD169 発現を欠失させたマクロファージとの比較検討を行うことにした。マイクロアレイ法による網羅的解析にて CD169 陽性マクロファージが特異的に発現する分子を解析したところ、特に CD169 発現との相関性が高い液性因子として、CCL8, CXCL10 などの分子を同定した。これらの CCL8, CXCL10 等が実際に CD169 陽性マクロファージに特異性が高い分子であるのかどうか確認するため、RT-PCR 法および ELISA 法にて解析を行ったところ、同様の結果が得られた。

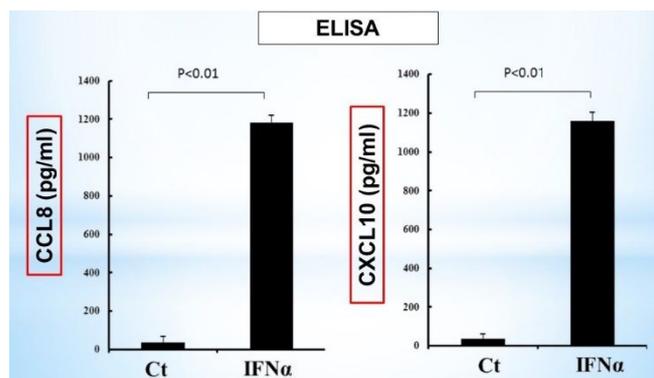
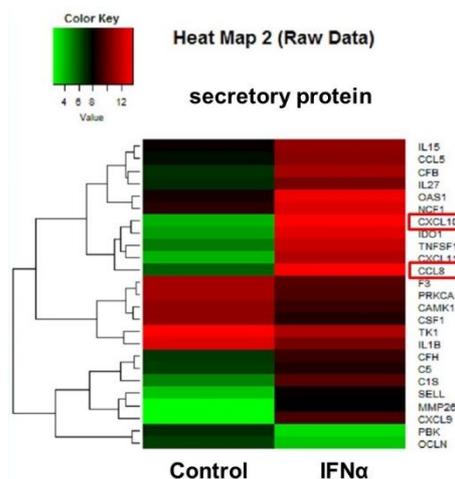


図 1 : マイクロアレイ法による網羅的解析

図 2 : ELISA 法による解析

2. 大腸がん患者の凍結血清を対象とした CD169 陽性マクロファージ関連分子の解析

熊本大学倫理委員会に研究計画の承認を得た後、大腸癌患者と舌癌患者の血清解析を行うことにした。舌癌患者については前向き研究を行うため、凍結血清の収集を開始した。一方で、大腸癌患者については、48 症例の凍結保存血清を解析することにした。

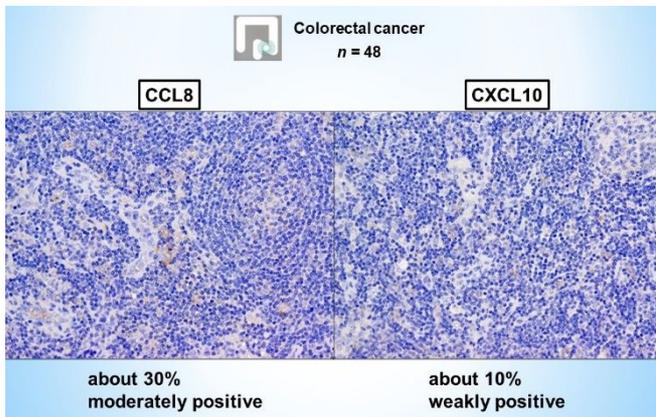


図3：大腸がん患者のリンパ節マクロファージにおけるケモカイン発現

まずは、in vitro 実験によって明らかにした CD169 陽性マクロファージが特異的に発現するケモカイン（CCL8, CXCL10 など）が、生体でのリンパ節マクロファージにおいても産生がみられるかどうか検討するため、大腸癌患者の摘出リンパ節検体のパラフィン包埋（FFPE）検体を用いて、免疫組織化学的検討を行った。CCL8, CXCL10 の免疫組織化学的検討を行った結果、CXCL10 の発現は比較的低く、リンパ節マクロファージの 10%程度にとどまっていたのに対し、CCL8 はリンパ節マクロファージにより強い発現が認められ、症例により発現が高い症例と低い症例が認められ、全体として約 30%のリンパ節マクロファージに CCL8 発現が認められた（図 3）。次に凍結保存血清を用いて、血清中の CCL8, CXCL10 濃度を ELISA 法にて測定し、リンパ節の CD169 発現との相関性を解析した。リンパ節マクロファージの CD169 発現については、FFPE 検体を用いた免疫組織化学検討により CD169 陽性細胞数をカウントし、中央値を基準として陽性細胞数が多い CD169 高発現群と陽性細胞数が少ない CD169 低発現群の 2 群に分けて、それぞれの群の血清中ケモカイン濃度を比較検討した。CXCL10 については、CD169 高発現群と低発現群で類似の分布を示し、統計学的な有意差を認めなかった。CCL8 については、CD169 高発現において若干血清濃度が高い傾向がみられたが、統計学的な有意差は認めなかった（図 4）。

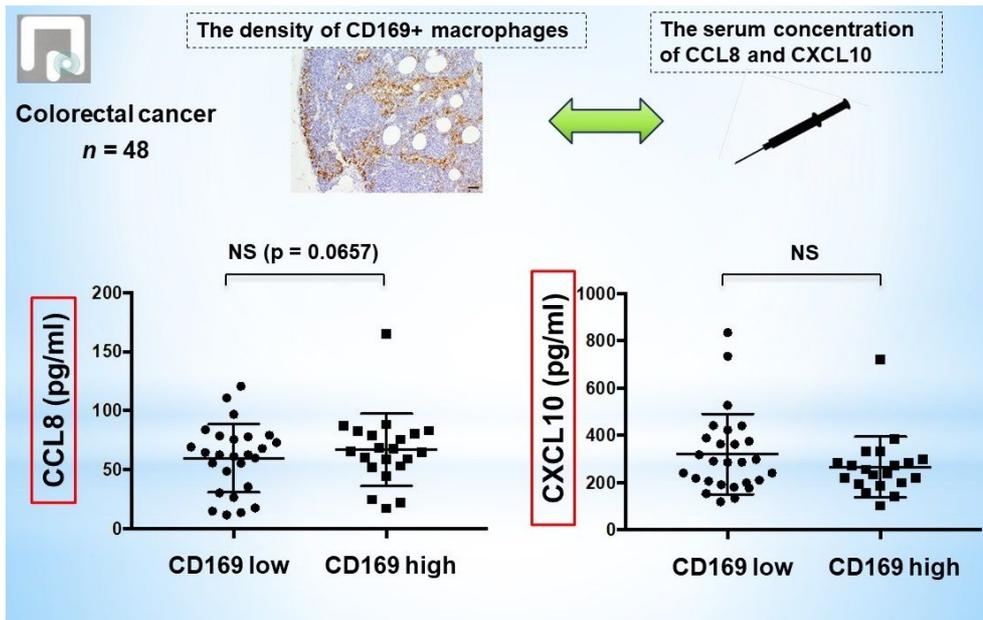


図4：大腸がん患者の血清中ケモカイン濃度と CD169 陽性リンパ節マクロファージとの相関性解析

現時点での解析結果では、CD169 発現と相関性がある統計学的に有意な血清中ケモカインを同定するまでには至っていないが、CCL8 については相関の傾向がみられたので、今後の追加検討を行う意義が十分にあると考えられる。また、その他の候補となるケモカインについても同様の解析を追加する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Shinchi Y, Komohara Y, Yonemitsu K, Sato K, Ohnishi K, Saito Y, Fujiwara, Y, Mori T, Shiraishi K, Ikeda K, Suzuki M.	4. 巻 110
2. 論文標題 Accurate expression of PD-L1/L2 in lung adenocarcinoma cells: a retrospective study by double immunohistochemistry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer sci	6. 最初と最後の頁 2711-2721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamashita T, Ohnishi K, Ueda M, Masuda T, Inoue Y, Misumi Y, Ueda A, Obayashi K, Takeya M, Ando Y.	4. 巻 26
2. 論文標題 Transthyretin amyloid-related cerebral angiitis after liver transplantation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Amyloid	6. 最初と最後の頁 11-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takeya H, Ohnishi K, Shiota T, Saito Y, Fujiwara Y, Yagi T, Kiyozumi Y, Baba Y, Yoshida N, Asano K, Tanaka M, Baba H, Komohara Y.	4. 巻 59
2. 論文標題 Maf expression in human macrophages and lymph node sinus macrophages in patients with esophageal cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Clin Exp Hematop	6. 最初と最後の頁 112-118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nouno T, Okamoto M, Ohnishi K, Kaieda S, Tominaga M, Zaizen Y, Ichiki M, Momosaki S, Nakamura M, Fujimoto K, Fukuoka J, Shimizu S, Komohara Y, Hoshino T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Elevation of pulmonary CD163+ and CD204+ macrophages is associated with the clinical course of idiopathic pulmonary fibrosis patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Thorac Dis	6. 最初と最後の頁 4005-4017
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takeya H, Shiota T, Yagi T, Ohnishi K, Baba Y, Miyasato Y, Kiyozumi Y, Yoshida N, Takeya M, Baba H, Komohara Y.	4. 巻 68
2. 論文標題 High CD169 expression in lymph node macrophages predicts a favorable clinical course in patients with esophageal cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathology international	6. 最初と最後の頁 685-693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12736	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yukio Fujiwara, Koji Ohnishi, Yoshihiro Komohara, Cheng Pan.
2. 発表標題 Orosomucoid is indirectly involved in tumor development via macrophages.
3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西紘二
2. 発表標題 業務改善を目指した新しい病理診断システムの開発
3. 学会等名 IoMT (Internet of Medical Things) FORUM in Kyushu
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原章雄、大西紘二、菰原義弘
2. 発表標題 環状硫黄化合物による腫瘍関連マクロファージをターゲットとしたがん治療への応用.
3. 学会等名 日本薬学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西紘二、浅野桐子、菰原義弘
2. 発表標題 新規バイオマーカーの探索 CD169陽性リンパ節マクロファージは膀胱癌患者の腫瘍免疫能と予後を予測する.
3. 学会等名 第108回 日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西紘二、浅野桐子、菰原義弘.
2. 発表標題 新規バイオマーカーの探索 CD169陽性リンパ節マクロファージは膀胱癌患者の腫瘍免疫能と予後を予測する.
3. 学会等名 第108回 日本病理学会総会
4. 発表年 2019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
研究 分 担 者	菰原 義弘 (Komohara Yoshihiro) (40449921)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------