

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08787

研究課題名(和文) 免疫抑制性酵素IDOに着目した悪性胸膜中皮腫に対する新規免疫療法の開発

研究課題名(英文) Novel immunotherapy targetting immunosuppressive effector IDO1 for malignant pleural mesothelioma

研究代表者

田川 哲三 (TAGAWA, Tetsuzo)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：90419557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫抑制性酵素であるIDO1は肺腺癌、悪性胸膜中皮腫の腫瘍細胞で発現が認められ、高悪性因子と関連し、術後の生存率も不良であった。免疫チェックポイント分子PD-L1と同時に発現するとより予後不良であり、両者を標的とした複合免疫療法が有効となる可能性が示唆された。制御性T細胞などの抑制性腫瘍浸潤リンパ球とIDO1発現との関連が認められた。また、マウス中皮腫モデルでも腫瘍細胞にIDO1の発現が認められ、腫瘍の増殖とともに免疫抑制性細胞の増加が認められた。これらのことからIDO1は腫瘍微小環境での免疫抑制状態に関与していることが示唆され、免疫チェックポイント分子とともに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

肺癌や悪性胸膜中皮腫などの胸部悪性腫瘍は、近年の手術法の進歩、免疫療法を始めとした薬物療法の進化に関わらず、いまだに難治癌であり、新たな治療標的の同定が重要である。免疫抑制性酵素のIDO1は新たな治療標的因子として期待されており、今回の我々の研究は、肺腺癌、悪性胸膜中皮腫においてIDO1発現腫瘍の特徴、免疫チェックポイント分子および免疫抑制性腫瘍浸潤リンパ球との関連を明らかとし、新たな複合免疫療法を開発する基礎的なデータになるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) is an immunosuppressive effector. IDO1 was expressed in the specimen of lung adenocarcinoma as well as malignant pleural mesothelioma (MPM). IDO1 positivity was associated with malignant traits of these tumors and poor prognosis. IDO1 and PD-L1 proteins were co-expressed in both tumors, and co-expressing tumors exhibited significantly more malignant traits and were associated with poor prognosis. In a mouse model of MPM, IDO1 and PD-L1 were also co-expressed and these expressions were associated with the increase of regulatory immune cells in the tumor microenvironment. These results suggest that IDO1 and PD-L1 co-expression may define an aggressive form of thoracic malignancies and indicate that IDO1 and PD-L1 co-expression could be a predictive maker and both are therapeutic targets.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：悪性胸膜中皮腫 肺癌 免疫療法

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫(MPM)は標準療法が確立されていない難治性疾患であり、最新の集学的治療をもってしても平均生存期間は2年未満と不良であり、新たな治療法の開発が急務であった。MPMは比較的免疫原性の高い腫瘍であるとされ、免疫療法が有効な治療法となる可能性が以前より示唆されていた。programmed cell death 1(PD-1)、programmed cell death ligand 1(PD-L1)などの免疫チェックポイント分子を標的とした免疫チェックポイント阻害療法が肺癌を含む多くの悪性腫瘍で有効性が示され、標準治療となった。MPMについても、免疫チェックポイント阻害療法による臨床試験が複数進行中であった。既治療のMPMに対して、抗CTLA4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4)抗体を用いた免疫療法の第II相試験の結果(Calabro L et al. *Lancet Oncol.* 2013)は、奏効率7%、中間生存期間10.7ヶ月であり、抗PD-1抗体療法の第IB相試験は、奏効率が20%(Alley EW, et al. *Lancet Oncol.* 2017;18:623-30)と、免疫チェックポイント阻害剤単独療法では満足のいく成績が得られなかった。その後、フランスで施行された抗PD-1抗体と抗CTLA4抗体を用いた既治療のMPMに対する第II相試験(MAPS2 trial)の初期報告では、併用療法の病勢制御率が50%と、免疫チェックポイント阻害剤の併用療法が従来の治療法よりも効果のある可能性が示唆された。しかしながら、免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせることのできる、より強力な免疫療法の開発が望まれていた。

Indoleamine 2,3-dioxygenase(IDO)はヒト8番染色体に位置する *INDO* 遺伝子にコードされるトリプトファン代謝酵素であり、腫瘍細胞はIDOによってトリプトファンの局所的な枯渇をもたらし、その結果、T細胞の増殖抑制を引き起こすため、悪性腫瘍に対する免疫療法の新たな治療標的分子として注目されていた。非小細胞肺癌、悪性黒色腫などを対象としたIDO阻害剤の治験が進行中であり、免疫チェックポイント阻害剤との併用による治療効果が認められ、次世代免疫療法の中心となることが期待されていた。

我々は、肺腺癌患者の切除検体におけるIDO、特にIDO1発現を、免疫組織化学染色法を用いて解析し、肺癌細胞においてIDO1の高発現が認められることを確認した。

肺癌およびMPMなどの胸部悪性腫瘍においてIDOを標的とした治療の可能性を探るべく、IDO1発現の意義、腫瘍微小環境との関連に焦点をあて、研究を行うこととした。

### 2. 研究の目的

肺癌、MPMなどの胸部悪性腫瘍の腫瘍微小環境におけるIDO発現の意義、腫瘍浸潤リンパ球(TILs)、免疫チェックポイント分子などの免疫学的因子との関連を解析し、IDOを標的とした治療法および既存の免疫療法との併用による複合免疫療法を展開するための基礎となる研究を行うことである。

### 3. 研究の方法

1. ヒト肺癌切除検体を用いて腫瘍細胞におけるIDO1発現を明らかにし、患者の臨床病理学的因子、予後との関連を明らかにする。
2. 複数施設での悪性胸膜中皮腫(MPM)患者のデータベースを構築し、予後因子を明らかにする。
3. ヒトMPM切除検体を用いて腫瘍細胞におけるIDO1発現を明らかにし、患者の臨床病理学的因子、予後との関連を明らかにする。

4. マウス同所性MPMモデルを用いて、腫瘍細胞、胸水内腫瘍細胞におけるIDO1の発現を経時的に解析する。
5. 肺腺癌切除例におけるIDO1発現と腫瘍浸潤リンパ球(TILs)および三次リンパ様構造(TLS)との関連を検討し、抗腫瘍免疫応答におけるIDOの意義を検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 九州大学病院で2003年1月から2012年12月に手術を行った肺腺癌患者427例について、IDO1発現(抗体: clone UMAB126)とPD-L1発現(抗体: clone SP142)を免疫組織化学染色にて解析した。IDO1は陽性基準を1%以上(1% cut off)とすると260名(60.9%)、50%以上とすると63名(14.8%)に発現を認めた。PD-L1は1% cut offにて145名(34.0%)が陽性であった。IDO1発現(1% cut off)に関する多変量解析を行うと、腫瘍の分化度(高分化)、脈管浸潤(陽性)、PD-L1発現(陽性)と相関を認めた。IDO1とPD-L1の共発現を123名(28.8%)に認め、共発現患者はその他の患者に比べて、腫瘍の悪性度が高いことが明らかとなった。IDO1とPD-L1共発現は全生存、無再発生存に関して独立した予後不良因子であった。

次に肺腺癌細胞株(HCC4006, HCC827, H2228, H3122, A549, H358)を用いて、IDO1およびPD-L1発現を解析することとした。IDO1のタンパク発現が認められたが、発現程度とEGFRなどのドライバー遺伝子およびPD-L1タンパク発現との関連は認められなかった。これらの細胞株をIFN- $\gamma$  (15ng/ml)またはTGF- $\beta$  (20ng/ml)にて48時間刺激したところ、IDO1、PD-L1タンパクともにコントロールと比較し、有意に高い発現を認めた。

これらの結果は、IDO1発現が肺腺癌において予後不良因子であり、IDO1発現が治療標的となる可能性を示すものであった。また、IDO1とPD-L1の共発現が、高悪性度の腺癌と相関しており、IDO1とPD-L1を同時に治療標的とする免疫療法の有効性を示唆する結果であった。

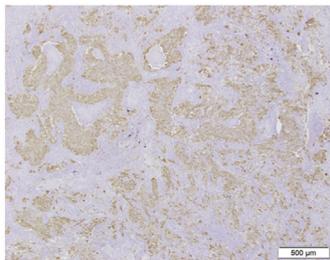


図1: 肺腺癌のIDO1発現(>50%)

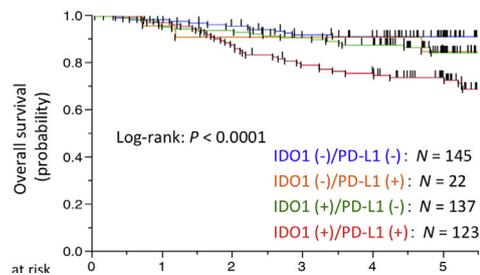


図2: IDO1とPD-L1発現による全生存

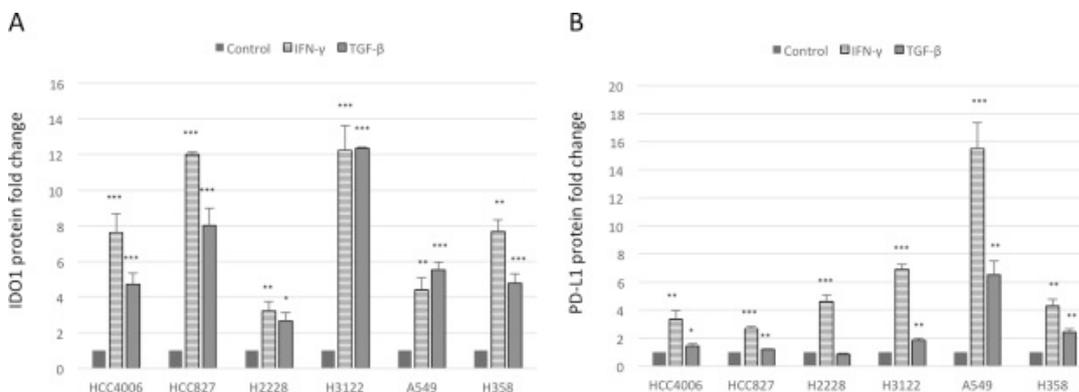


図3: 肺腺癌細胞株におけるIFN- $\gamma$ 、TGF- $\beta$ 刺激時のIDO1、PD-L1蛋白発現

- (2) 悪性胸膜中皮腫(MPM)患者のデータベースを構築し、臨床病理学的因子および予後の解析

を行った。1995年から2015年にかけて九州大学病院および九州がんセンターにて治療を行ったMPM患者100例に対して、治療前の血清CRP値/血清アルブミン値比(CAR)を算出し、予後との関連を検討した。その結果、CARと予後に相関を認め、CAR高値群が全生存期間、および無再発/無増悪生存期間に関する予後不良因子であること、多変量解析にてCARが手術、化学療法などの治療後の患者において独立した予後不良因子であることが明らかとなった。これらの結果から、炎症、免疫および栄養学的因子がMPMの悪性度、予後と相関することが示唆された。

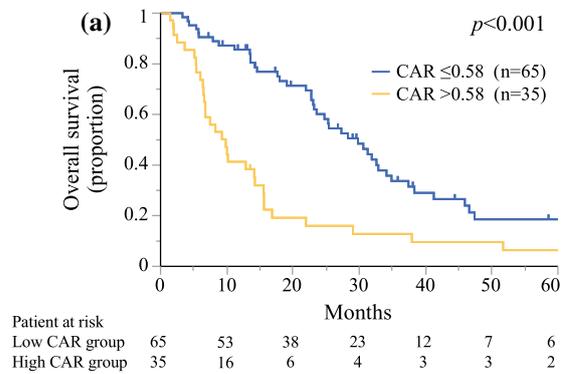


図4：MPM患者におけるCARと全生存

(3) 2001年から2019年に九州大学、九州がんセンター、九州医療センターにて切除もしくは生検を行われたMPM185例におけるIDO1発現を免疫組織化学染色にて検討し、PD-L1発現を含む臨床病理学的因子および予後との関係を検討した。

185例の背景は65歳以上：75例(40.5%)、男性155例(83.8%)、喫煙症例：120例(64.9%)、StageI/II：89例(48.6%)、組織型は上皮型95例(51.3%)、その他29例(15.6%)、不明61例(33.0%)であった。根治手術例が53例(28.6%)、化学療法施行症例が162例(87.6%)、全生存期間中央値が15.7ヶ月、無増悪生存期間中央値が10.8ヶ月であった。九州大学病院で切除した46例のIDO1発現に関しては1%未満：14例(30.4%)、1-5%：13例(28.3%)、5-50%：9例(19.6%)、50%以上：10例(21.7%)であった。PD-L1発現に関しては1%以上：2例(SP142抗体)、3例(28-8抗体)であった。IDO1発現と臨床病理学的因子に有意な関連はなかったが、非上皮型においてIDO1 $\geq$ 5%が多い傾向があった( $p=0.0618$ )。予後とは有意な関連は認められなかった。

(4) マウス胸腔にAB12(マウスMPM細胞株)を注入しMPMモデルを作成し、day3,7,10,14に腫瘍および胸水、脾臓を採取した。腫瘍のIDO1、CD8、CD4、Foxp3の免疫染色を行い、系時的に評価した。また、胸水・脾臓の免疫細胞の表面抗原をフローサイトメトリーにて評価した。MPMモデルマウスの腫瘍においてIDO1は約20-30%の腫瘍細胞に発現が認められた。フローサイトメトリーでは腫瘍接種後、徐々に胸水中のミエロイド抑制細胞(MDSC)が増加していることが認められた。IDO1がMDSCの活性化、誘導に関与しているとの報告もあり、MPMにおけるIDO1の抗腫瘍免疫抑制作用の一端を見ている可能性が考えられた。

(5) 2007年～2012年に九州大学病院で手術を行った肺腺癌切除症例218例の腫瘍細胞上のIDO1発現を免疫染色にて解析し、腫瘍浸潤リンパ球上のCD4、CD8、Foxp3、Granzyme B発現との関連を解析した。また、腫瘍内のTLSをCD20、DC-lamp染色により評価し、IDO1との関連およびその他の臨床病理学的因子・予後との関連を解析した。

評価法：腫瘍内 5ヶ所の炎症細胞浸潤部をランダムに選択し、0.04mm<sup>2</sup>の円周内の各種陽性リンパ球数をカウントし、全生存を指標とした ROC 曲線から Cut off 値を算出した。

TLS に関しては、CD20 陽性細胞のリンパ球集簇を TLS と判定し、TLS の成熟度を DC-lamp によって評価した。3か所の TLS で 0.04mm<sup>2</sup>の円周内の DC-lump 陽性細胞数を計測し、全生存に対する ROC より cut off 値を決定し、DC-Lamp $\geq$ 1.3 個/0.04mm<sup>2</sup> を mature TLS、DC-Lamp $<$ 1.3 個/0.04mm<sup>2</sup> を immature TLS と判定した。

218 症例中、IDO1 高発現(IDO1 $\geq$ 1%)は 135 例(62%)、IDO1 低発現(IDO1 $<$ 1%)は 83 例(38%)であった。腫瘍浸潤リンパ球との関連では、IDO1 $\geq$ 1%は CD4 陽性細胞高浸潤(p=0.0498)、Foxp3 陽性細胞高浸潤(p=0.0019)、GranzymeB 陽性細胞低浸潤(p=0.0254)、mature TLS(p=0.0370)と有意な関連を認めた。TLS の成熟度と予後との関連では、mature TLS 群(n=106)が全生存、無再発生存に関して予後良好であった。IDO1 発現と TLS 成熟度を組み合わせると、IDO1 高発現かつ immature TLS の群(n=58)が他群と比較し、全生存、無再発生存に関して有意に予後不良であった。

Characteristics		IDO1 $<$ 1% (n=83)	IDO1 $\geq$ 1% (n=135)	P value
PD-L1 expression	Negative (<1%)	76 (91.6%)	84 (62.2%)	<0.0001
	Positive (>1%)	7 (8.4%)	51 (37.8%)	
TILs CD4	Low	47 (57.3%)	58 (43.0%)	0.0498
	High	35 (42.7%)	77 (57.0%)	
TILs CD8	Low	44 (53.7%)	57 (42.2%)	0.1228
	High	38 (46.3%)	78 (57.8%)	
TILs Foxp3	Low	50 (61.0%)	52 (38.5%)	0.0019
	High	32 (39.0%)	83 (61.5%)	
TILs GrB	Low	32 (38.6%)	74 (54.8%)	0.0254
	High	51 (61.4%)	61 (45.2%)	
TLS	immature	48 (57.8%)	58 (43.0%)	0.0370
	mature	35 (42.2%)	77 (57.0%)	

TILs：腫瘍浸潤リンパ球、GrB: Granzyme B、TLS：三次リンパ様構造

表 1：IDO1 発現と腫瘍浸潤リンパ球の phenotype、TLS との関連

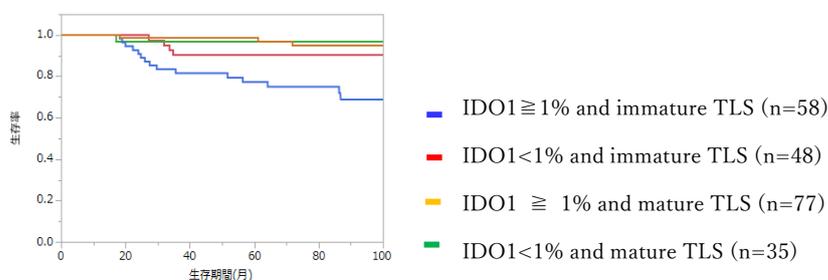


図 5 肺腺癌における IDO1 と TLS による全生存

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kozuma Yuka, Takada Kazuki, Toyokawa Gouji, Kohashi Kenichi, Shimokawa Mototsugu, Hirai Fumihiko, Tagawa Tetsuzo, Okamoto Tatsuro, Oda Yoshinao, Maehara Yoshihiko	4. 巻 101
2. 論文標題 Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 and programmed cell death-ligand 1 co-expression correlates with aggressive features in lung adenocarcinoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 20 ~ 29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejca.2018.06.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高田 和樹・孝橋 賢一・小野 雄生・田中 健祐・若洲 翔・木下 郁彦・上妻 由佳・松原 太一・赤嶺 貴紀・波呂 祥・小副川 敦・田川 哲三・小田 義直・前原 喜彦
2. 発表標題 肺扁平上皮癌におけるIDO1発現とPD-L1発現および腫瘍浸潤リンパ球との関係
3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2018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	豊川 剛二 (Toyokawa Gouji) (30627261)	独立行政法人国立病院機構九州医療センター（臨床研究センター）・その他部局等・呼吸器外科医師  (87105)	
研究分担者	平井 文彦 (Hirai Fumihiko) (70645407)	九州大学・医学研究院・共同研究員  (17102)	

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
---------	---------