

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2019～2021  
 課題番号：19K07459  
 研究課題名(和文) リンパ節CD169陽性マクロファージのがん免疫賦活機構解明による予後予測診断開発

研究課題名(英文) Development of prognostic diagnosis by elucidating the mechanism of cancer immunostimulation by lymph node CD169-positive macrophages

研究代表者  
 西東 洋一 (Saito, Yoichi)  
 熊本大学・大学院先端科学研究部(工)・特任助教

研究者番号：20783567  
 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)：CD169-DTR(ジフテリア毒素受容体)マウスを用いた解析で、所属リンパ節CD169陽性洞マクロファージがCD8陽性T細胞を介した抗腫瘍免疫を賦活し、PD-(L)1抗体薬の治療効果発現を決定づけていることが分かった。  
 非小細胞肺癌(417症例)、腎癌(38症例)切除標本、ヒト腫瘍細胞株(41種類)及びヒト単球由来マクロファージを用いた解析で、腫瘍細胞のIFNsに対するPD-L1発現が3種に分類でき、各がんのコンパニオン診断基準との整合性を示した。大腸癌(83症例)切除標本を用いた解析で、CD169、CD8とミスマッチ修復機能欠損症例に相関がないことが分かった。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

PD-(L)1抗体薬の治療効果発現に、所属リンパ節CD169陽性洞マクロファージが賦活する腫瘍免疫が関与していることを明らかにした。CD169は非常に高額なPD-(L)1抗体薬の治療効果予測として活用できる可能性があり、より高精度な患者選択(コンパニオン診断)の開発が可能となることで、治療成績の向上による患者利益の増加と、医療費削減による社会利益をもたらす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Analysis using CD169-DTR mice revealed that the regional lymph node CD169-positive sinus macrophages activate anti-tumor immunity mediated by CD8-positive T cells, which determines the onset of therapeutic effect of PD-(L)1 antibody drugs. Analysis of non-small cell lung cancer (417 cases), renal cancer (38 cases) resection specimens, human tumor cell lines (41 types), and human monocyte-derived macrophages showed that IFNs-derived PD-L1 expression in tumor cells can be divided into three types. The results were consistent with the companion diagnostic criteria for each cancer. Furthermore, analysis of resected colorectal cancer specimens (83 cases) showed no correlation between CD169, CD8 and mismatch repair deficiency cases.  
 Based on the above, we collected basic knowledge on the mechanism of therapeutic efficacy of PD-(L)1 antibody drugs involving CD169 in regional lymph nodes and the prediction of therapeutic efficacy.

研究分野：基礎病理学

キーワード：マクロファージ リンパ節 がん免疫 C169 PD-L1 MMR コンパニオン診断

## 1. 研究開始当初の背景

### 背景 1. 抗腫瘍免疫における CD169 陽性マクロファージ (M $\phi$ ) の重要性

所属リンパ節洞 M $\phi$  (rLNsM $\phi$ ) は腫瘍抗原を貪食し、直接的/間接的に T 細胞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。rLNsM $\phi$  には CD169 (Sigrec 1) が様々な程度で発現する。申請者らのヒトの rLN 切除標本を用いた解析で、CD169<sup>+</sup>sM $\phi$  が多い症例では CD8<sup>+</sup>T 細胞の腫瘍内浸潤、生存率が有意に高いことが分かった。以上から、CD169<sup>+</sup>sM $\phi$  数によって患者の抗腫瘍免疫に着目した新たな予後予測が可能であると仮説した。

### 背景 2. PD-(L)1 抗体薬と現行コンパニオン診断 (CDx) である PD-L1 免疫染色の問題点

CD8<sup>+</sup>T 細胞は IFN- $\gamma$  を分泌して腫瘍細胞に傷害活性を示すが、腫瘍細胞は PD-L1 を発現して CD8<sup>+</sup>T 細胞の PD-1 と結合することで細胞傷害活性を抑制する。PD-(L)1 抗体薬は腫瘍細胞のこの防御機構を阻害する。そのため、腫瘍細胞の PD-L1 発現が治療効果予測の CDx として活用されている。しかし、治療機序に基づく真の治療予測は「腫瘍に CD8<sup>+</sup>T 細胞が浸潤しているかどうか」のはずである。また、一部の腫瘍細胞は CD8<sup>+</sup>T 細胞に無関係に遺伝子異常によって PD-L1 を恒常的に過剰発現したり、全く発現しなかったりする。さらに、腫瘍浸潤 M $\phi$  (TAM) も PD-L1 を多く発現し、治療効果に対する意義ははっきりしていない。現行の CDx には以上のような多くの問題点・疑問点がある。

## 2. 研究の目的

CD169<sup>+</sup>rLNsM $\phi$  による腫瘍特異的な CD8<sup>+</sup>T 細胞の活性化が、PD-(L)1 抗体薬の治療効果発現に寄与することを明らかにする。上記の基礎的知見を基に、rLN 切除標本の CD169 免疫染色を PD-(L)1 抗体薬のより高精度な CDx に臨床応用することを目指す。

## 3. 研究の方法

(1) CD169-DTR (ジフテリア毒素受容体) マウスの腫瘍移植モデルにおいて DT 皮下投与による CD169<sup>+</sup>rLNsM $\phi$  除去が腫瘍増殖を促進することを明らかにする。さらに、PD-L1 抗体投与を追加し、治療効果発現に CD169<sup>+</sup>rLNsM $\phi$  が必須であることを明らかにする。

(2) 様々な外科切除病理組織標本に免疫染色を行い、rLNsM $\phi$  の CD169 発現と腫瘍細胞の PD-L1 発現との関連性を解析し、CD169<sup>+</sup>rLNsM $\phi$  が PD-(L)1 抗体薬の治療効果を予測することを明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) CD169<sup>+</sup>rLNsM $\phi$ を除去したマウスでは皮下植込腫瘍の増殖が促進した

リッターメイトの CD169-DTR (ジフテリア毒素受容体) /WT マウスを用いて、DT 皮下投与後に免疫原性の高いマウス大腸癌細胞株 MC-38 の同部位皮下移植を行った。14 日間の飼育観察後、腫瘍重量測定を行ったところ、CD169-DTR マウス群が WT 群と比較して有意に腫瘍重量が増加した。この結果は脾臓癌細胞株でも同様であった。

### (2) CD169<sup>+</sup>rLNsM $\phi$ を除去したマウスでは、治療投与した PD-L1 抗体の薬効が腫瘍増殖が減弱した

(1)の腫瘍増殖が宿主マウスの抗腫瘍免疫の抑制によることを確認するため、PD-L1 抗体薬の早期 1 回投与を追加した皮下腫瘍治療モデルを行なった。DT 皮下投与後の CD169-DTR/WT マウスに MC-38 の同部位皮下移植を行い、早期に PD-L1 抗体/Ct 抗体を腹腔内に早期に投与した 4 群について腫瘍重量の増加を解析した。結果、Ct 抗体群間では(1)と同様の結果を確認した。PD-L1 抗体群では、WT マウスの大半で腫瘍の拒絶が起こるのに対して、CD169-DTR マウスでは治療効果が消失し、Ct 抗体群の腫瘍重量と有意な差を認めなかった。当該腫瘍の組織標本作製し、腫瘍に浸潤する CD8<sup>+</sup>T 細胞を免疫染色によって解析したところ、腫瘍重量が大きくなるにつれて CD8<sup>+</sup>T 細胞の浸潤が減少している傾向を認めた。

以上から、CD169<sup>+</sup>rLNsM $\phi$  が CD8<sup>+</sup>T 細胞を介した抗腫瘍免疫を賦活し、PD-(L)1 抗体薬の治療効果発現を決定づけていることが分かった。

### (3) マウスに皮下投与した DT は DTR 非存在下でも腫瘍増殖促進効果を示した

(1), (2)の解析の際、当初は CD169<sup>+</sup>rLNsM $\phi$  除去群/非除去群を CD169-DTR マウスの DT 投与群/PB 投与群として解析を行なった。後に、リッターメイトマウスの供給体制が整ったため、CD169-DTR/WT マウスに DT 投与を行うモデルへ変更した。この解析方法の変更により、群間の腫瘍増殖差が縮まり、DT 投与は PBS 投与と比較して腫瘍が増大する印象であった。そこで、DTR を持っていない WT マウスを DT/PBS 投与群に分けて腫瘍移植モデルで解析したところ、DT 投与群で有意に腫瘍が増大した。DT は明らかにマウスの腫瘍モデルに腫瘍増殖促進的な影響を与え

ていることが分かった。

この結果から、マウスを「DT 非感受性動物」としていた業界認識が間違っている可能性があり、腫瘍モデルに DTR マウスを用いることの妥当性を再考する必要がある。一方で、DT が DTR 非依存的にマウス皮下腫瘍の増殖を促進する機序は大変興味深く、新たな動物病理学や毒性病理学の研究テーマになると考える。

**(4) CD169-DTR マウスの CD169 には市販のフローサイトメトリー用 CD169 抗体が結合しない**  
 ここまでの解析で、皮下植込腫瘍と rLN のフローサイトメトリーも行なった。WT マウスで問題無く検出可能な複数の市販 CD169 抗体を用いたものの、CD169-DTR マウスでは CD169 を全く検出しなかった。CD169-DTR マウスでは DTR タンパクとのキメラ化によって CD169 のエピートープが変化し、CD169 抗体が結合しなくなっていると判断した。方法論的問題点として CD169-DTR マウスでは市販の CD169 抗体を用いたフローサイトメトリーによる CD169 検出が出来ないことが分かった。

**(5) 様々な腫瘍細胞の IFNs に対する PD-L1 発現パターンは 3 種に分類でき、各がんの CDx 基準との整合性を示した**

非小細胞肺癌 (417 症例、うち腺癌 231 症例、扁平上皮癌 186 症例)、腎細胞癌 (38 症例) 切除標本に対して、PD-L1 と CD8 の免疫染色を行い、腫瘍細胞の PD-L1 陽性率 (TPS) と CD8 陽性腫瘍浸潤リンパ球 (CD8<sup>+</sup>TIL) の相関をがん種毎に解析したところ、腎細胞癌と比較して非小細胞肺癌の TPS が有意に高く、非小細胞肺癌内では腺癌に比較して扁平上皮癌の TPS が有意に高いことが分かった。全てのがん種に共通して CD8<sup>+</sup>TIL の浸潤は低く、TPS との明らかな相関は認められなかった。腎細胞癌では TPS と CD8<sup>+</sup>TIL のどちらも低値であることが分かった。このことは、PD-L1 免疫染色による高い TPS cut-off 値を用いた CDx が非小細胞肺癌以外で実用化されていないことと一致する。

次に、ヒト腫瘍細胞株 (41 種類) 及びヒト単球由来 Mφ (HMDM) を IFNs ( $\alpha, \beta, \gamma$ ), LPS で刺激し PD-L1 の発現の変化をウェスタンブロットで解析した (図 1)。IFNs 刺激に対する腫瘍細胞の PD-L1 発現は、刺激しても無発現のグループ (Low response)、刺激で発現するグループ (Adaptive)、刺激に無関係に常時発現するグループ (Innate) の 3 種に大別できた。細胞株が分類されるグループに偏りがあるがん種 (Low response: 肺小細胞癌、子宮体癌; Adaptive: 悪性黒色腫、腎細胞癌、大腸癌; Innate: 膀胱癌、食道扁平上皮癌) と、多様性があるがん種 (非小細胞肺癌、肉腫、卵巣癌) が存在した。これらの結果を総合すると、細胞株毎の発現パターンに多様性がある非小細胞肺癌は、外科切除腫瘍も比較的高い TPS (= 幅広い PD-L1 発現) を示したと考えられる。逆に、細胞株が Adaptive グループに偏っている腎細胞癌は、外科切除腫瘍では (CD8<sup>+</sup>TIL がほとんど浸潤しない状況で) 低い TPS を示したと考えられる。

HMDM は Adaptive グループに属し、IFNs 刺激による PD-L1 発現が腫瘍細胞株と比べて著しく強く、持続も著しく長いことが分かった。このことは、PD-L1 免疫染色を用いた CDx の判定基準が腫瘍細胞のみ (TPS) から、Mφ を含む免疫細胞を加味する基準 (CPS) に置き換わりつつあること合致する。LPS 刺激による PD-L1 発現は HMDM で特に顕著に認められ、肺炎等の細菌感染を契機に PD-(L)1 抗体薬の治療効果が変化する可能性を示唆する。同様に、IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  刺激は HMDM を含む Adaptive グループの細胞株で PD-L1 発現を誘導する。これらの 1 型 IFN は腎細胞癌や

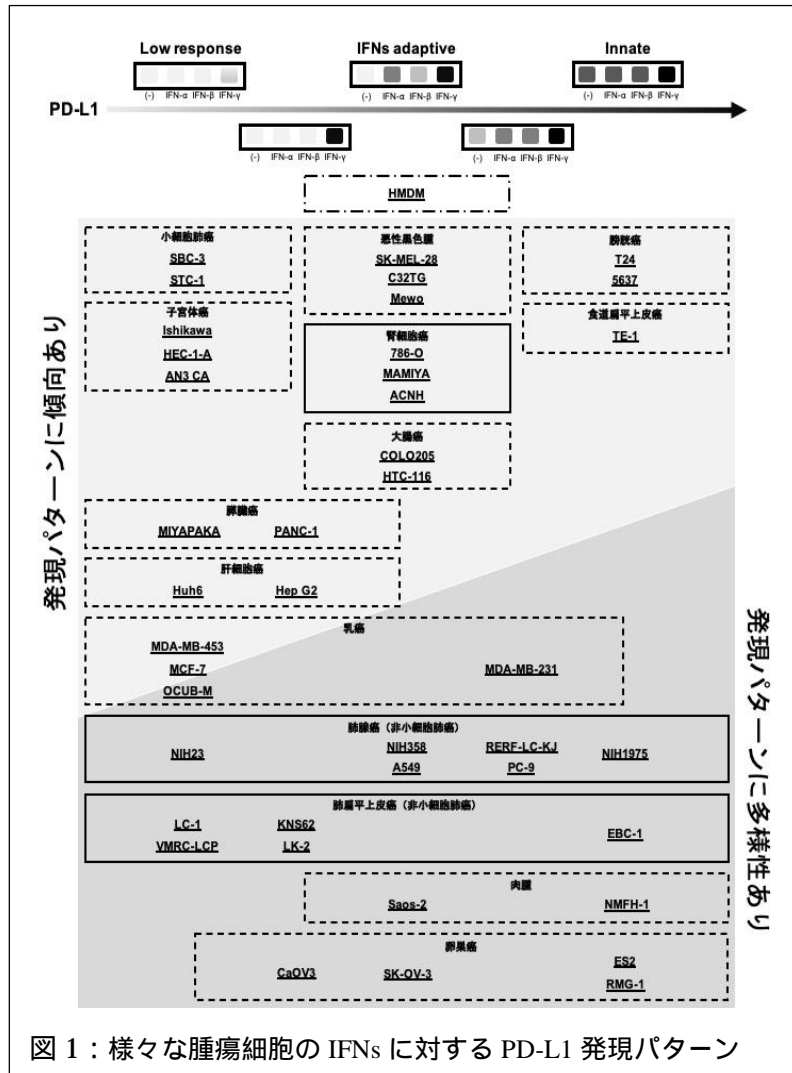


図 1: 様々な腫瘍細胞の IFNs に対する PD-L1 発現パターン

悪性黒色腫の治療に古くから用いられており、LPS と同様に PD-(L)1 抗体薬の治療感受性を変化させる可能性がある。

本解析結果をまとめた論文は Cancer Science 誌に 2022 年 4 月 20 日付で Accept された。

#### (6) 大腸癌では CD169, CD8 とミスマッチ修復機能欠損 (dMMR) は相関がしない

大腸癌 (83 症例) 切除標本に対して、ミスマッチ修復タンパク (PMS2, MSH6, MLH1, MSH2) の免疫染色を行い 9 症例の dMMR 症例を同定した。全症例で所属リンパ節標本: Mφ マーカー (CD68, CD169); 原発腫瘍: T 細胞マーカー (CD3, CD4, CD8, TIA-1) の免疫染色を行い、CD169 や TIL と MMR status の相関を解析した。結果、CD169<sup>+</sup>rLNsMφ 数と各 T 細胞マーカー陽性 TIL 数、生命予後は前回解析時 ([Ohnishi K, Komohara Y and Saito Y et al. Cancer Sci 104: 1237-1244, 2013](#)) よりも強い正相関を認めた。しかし、MMR status とは CD169<sup>+</sup>rLNsMφ 数、各 T 細胞マーカー陽性 TIL 数、生命予後のいずれも相関を認めなかった (図 2)。

この結果から、大腸癌では dMMR というだけでは抗腫瘍免疫を効率的に誘導できていないということが分かった。このことは、腫瘍そのものの免疫源性の高さと実際の抗腫瘍免疫誘導が一对一の関係では無いことを意味しており、抗腫瘍免疫の結果と考えられる高 CD8<sup>+</sup>TIL を予測する CD169<sup>+</sup>rLNsMφ の意義を強める結果であると考えられる。

本解析結果をまとめた論文は現在投稿作業を進めている。

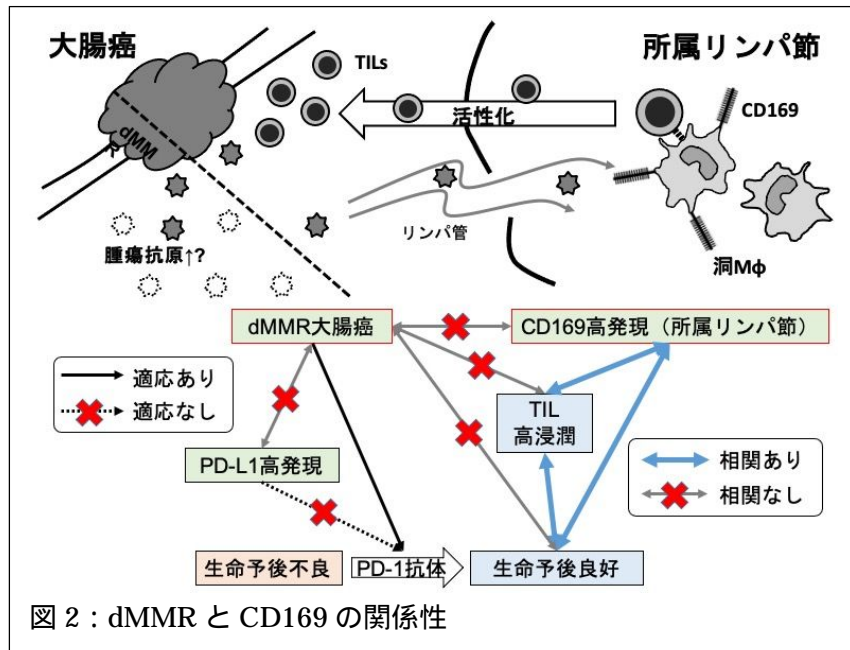


図 2 : dMMR と CD169 の関係性

#### (7) rLN における高 CD169 症例は大腸癌の PD-L1 発現が高い傾向にある

上記解析で用いた大腸癌 (83 症例) 切除標本のうち、CD169<sup>+</sup>rLNsMφ 数の高・低各 5 症例を抽出し、CDx と同様の手法で PD-L1 免疫染色を行なった。結果、CD169<sup>+</sup>rLNsMφ 数の高い症例において、PD-L1 TPS も高い傾向にあった。また、(4)の *In vitro* 解析において、IFNs や LPS が HMDM に顕著な PD-L1 発現を誘導したが、同時に CD169 の発現も誘導することが分かった。腫瘍局所と rLN はリンパ管を通じてクロストークしており、がん抗原のみではなく IFNs を介した sMφ の CD169 発現誘導機構が存在する可能性がある。この腫瘍局所と rLN の IFNs を介した連関を解明するため、追加の解析を継続している。前半(1), (2)の結果と共に論文執筆を行う予定である。

## 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 Yusuke, Komohara Yoshihiro, Yonemitsu Kimihiro, Sato Kensaku, Ohnishi Koji, Saito Yoichi, Fujiwara Yukio, Mori Takeshi, Shiraishi Kenji, Ikeda Koei, Suzuki Makoto	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 Science	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) 10.1111/cas.14128	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 Hiroto, Ohnishi Koji, Shiota Takuya, Saito Yoichi, Fujiwara Yukio, Yagi Taisuke, Kiyozumi Yuki, Baba Yoshifumi, Yoshida Naoya, Asano Kenichi, Tanaka Masato, Baba Hideo, Komohara Yoshihiro	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 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	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) 10.3960/jslrt.19002	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 Fujiwara Yukio, Ohnishi Koji, Horlad Hasita, Saito Yoichi, Shiraishi Daisuke, Takeya Hiroto, Yoshii Daiki, Kaieda Shinjiro, Hoshino Tomoaki, Komohara Yoshihiro	4. 巻 9
2. 論文標題 CD163 deficiency facilitates lipopolysaccharide induced inflammatory responses and endotoxin shock in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical & Translational Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cti2.1162	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 Matsusaka Kotaro, Fujiwara Yukio, Pan Cheng, Esumi Shigeyuki, Saito Yoichi, Bi Jing, Nakamura Yuka, Mukunoki Ayumi, Takeo Toru, Nakagata Naomi, Yoshii Daiki, Fukuda Ryo, Nagasaki Taisei, Tanaka Ryusei, Komori Hisakazu, Maeda Hitoshi, Watanabe Hiroshi, Tamada Koji, Komohara Yoshihiro, Maruyama Toru	4. 巻 81
2. 論文標題 1-Acid Glycoprotein Enhances the Immunosuppressive and Protumor Functions of Tumor-Associated Macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4545 ~ 4559
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-20-3471	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 Saito Yoichi, Fujiwara Yukio, Shinchi Yusuke, Mito Reni, Miura Yuji, Yamaguchi Tomoya, Ikeda Koei, Urakami Shinji, Nakashima Yuta, Sakagami Takuro, Suzuki Makoto, Tabata Yasuhiko, Komohara Yoshihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Classification of PD L1 expression in various cancers and macrophages based on immunohistocytological analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15442	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西東洋一, 藤原章雄, 御任玲美, 新地祐介, 三浦裕司, 菰原義弘
2. 発表標題 各種がん細胞株のPD-L1発現の特徴分類から考察する 臨床がん組織でのPD-L1免疫染色の意義
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西東洋一, 藤原章雄, 大西紘二, 中島雄太, 菰原義弘
2. 発表標題 予後因子である所属リンパ節洞CD169+マクロファージはミスマッチ修復機能欠損大腸癌とは関連しない
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原章雄, 潘 程, 西東洋一, 大西紘二, 菰原義弘
2. 発表標題 腫瘍微小環境においてAGPIはマクロファージを介して腫瘍進展に関与する
3. 学会等名 第59回 日本リンパ網内系学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西東洋一, 藤原章雄, 中島雄太
2. 発表標題 治療効果予測のための多がん種におけるPD-L1発現・T細胞浸潤解析
3. 学会等名 第8回がん代謝研究会
4. 発表年 2022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	大西 紘二  (Ohnishi Koji)  (40613378)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特任准教授   (17401)	
研究分担者	藤原 章雄  (Fujiwara Yukio)  (70452886)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師   (17401)	
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)・准教授   (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
---------	---------