

令和元年6月13日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10680

研究課題名(和文) 胸部悪性腫瘍における腫瘍免疫抑制機構の解明とその臨床応用

研究課題名(英文) The mechanism of PD-L1 expression and the clinical significance

研究代表者

舟木 壮一郎 (Funaki, Soichiro)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：50464251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌をはじめとする胸部悪性腫瘍における免疫チェックポイント分子Programmed cell death 1 Ligand 1(PD-L1)に対する発現とその臨床病理学的背景の関係を明らかにした。その結果、PD-L1発現上昇しているものほど、再発率が高かった。またその発現制御を調べるため分子生物学的手法を用いて解析した結果、PD-L1の発現と、上皮間葉移行(Epithelial mesenchymal transition; EMT)が関与していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍に対して従来からの手術、化学療法、放射線治療に続く第4の治療法としてがん免疫を利用した免疫チェックポイント阻害剤の有効性が報告されている。これは悪性新生物としてのがんに対する免疫チェックポイント分子が免疫抑制に関与していることが判明しており、この関連性を排除することで、がんに対する免疫力を復活させて治療する全く新しい方法であるが、この免疫チェックポイント分子の発現機構については分かっていなかった。本研究では、その発現機構の一端を明らかにし、従来との治療に加えたcombination治療の可能性について論じた。

研究成果の概要(英文)：In cancer immunology, the programmed cell death 1-programmed cell death 1/ligand 1 (PD-1/PD-L1) pathway plays a major role. Another key process in cancer progression is epithelial-mesenchymal transition (EMT). We investigated the mechanism of PD-L1 expression as well as changes in its expression during the EMT process in non-small cell lung cancer (NSCLC) and thymic cancer (TC). PD-L1 expression was evaluated after treatment with TGF- $\beta$  or chemotherapeutic agents. The relationship between for PD-L1 and EMT in clinical specimens with NSCLC and TC after induction chemotherapy were analyzed by immunohistochemical staining. We found that PD-L1 expression was upregulated following TGF- $\beta$  induction. Furthermore, chemo-treatment enhances PD-L1 expression via autocrine TGF- $\beta$  induced EMT. Analysis of clinical samples revealed a significant relationship between PD-L1 expression and EMT status. In conclusion, our results suggest that PD-L1 expression is regulated by TGF- $\beta$  induced EMT.

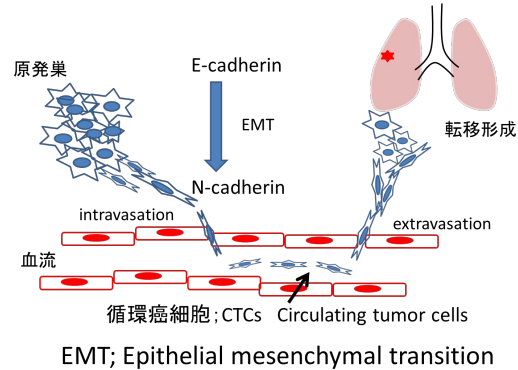
研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 胸腺上皮性腫瘍 腫瘍免疫

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

1. 研究開始当初の背景

我が国では癌は増加の一途をたどっており2人に1人が罹患する時代になっている。なかでも肺癌の発生率ももっとも高く我が国の癌死の第一位となっている。肺癌治療成績の向上は国民衛生・厚生において重要な課題である。現在の主な治療法は外科切除、化学療法、放射線治療の3本柱であるが、いまだ満足な結果が得られていない。最近になり第4の治療法としてがん免疫療法が開発され広く注目されている。がん微小環境において、免疫チェックポイント経路の一つであるPD-1 (Programmed cell death-1)/ PD-L1 (Programmed cell death-1-Ligand1) は特に重要な役割を担っており、がんが宿主からの免疫回避の重要な役割を担っている。最近になり、それらの阻害薬が開発され、国内外の臨床試験で様々な固形癌において有効性が証明されている。その適応基準については、がん細胞におけるPD-L1 蛋白の発現で決定されるが、その発現制御については、その多くが不明である。この発現機構の解明は、がん免疫を理解する一助となり、がん治療に幅広い恩恵をもたらすものと期待できる。一方、がん微小環境下における上皮間葉転換 (EMT; Epithelial-Mesenchymal Transition) はがんの悪性化や遠隔転移において重要な役割を担っているとされている。EMT とは上皮細胞が上皮としての形質を失い、線維芽細胞などの間葉系の形質を獲得する現象であり癌細胞では間葉系へと形質転換し、遊走能を獲得、血管へ浸潤し (intravasation) 循環癌細胞 (Circulating tumor cells; CTCs) となり血中を移動し、血中外へ浸潤し (extravasation) 転移巣 (Metastasis) を形成すると考えられている。さらに抗癌剤に癌細胞が暴露されると EMT が誘導され、癌幹細胞様形質を獲得し、抗癌剤や放射線への耐性化が誘導されることもわかっており、EMT が癌の進展だけでなく、癌幹細胞様形質を獲得することで治療抵抗性においても重要な役割を果たしていることがわかっている。このように腫瘍微小環境においては、がん細胞は EMT の段階を経て原発巣から転移先まで移動し、数多く出会うであろう免疫細胞の攻撃からの回避や、転移先で生着する際の免疫寛容を獲得するメカニズム (腫瘍免疫) についてはほとんど論じられていない。本研究では肺癌や胸腺癌における EMT と免疫チェックポイント経路に焦点をあて研究を進めた。



2. 研究の目的

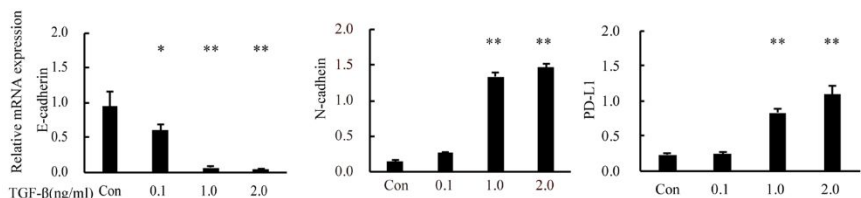
本研究では、がんの悪性化や遠隔転移において重要な役割を担っている上皮間葉転換 (EMT; Epithelial-Mesenchymal Transition) とがん免疫に深く関与する PD-L1 発現制御との関連性を調べることで、がん免疫機構の一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

肺癌細胞株 (A549) を用い、EMT 誘導物質である TGF- $\beta$  を投与し、EMT 関連分子や PD-L1 の mRNA やタンパクの発現変化を RT-PCR 法、Western blot 法にて確認する。また TGF- $\beta$  阻害剤付加や TGF- $\beta$  付加しない培養液に条件変更した環境下での mRNA、タンパク発現変化も併せて分析する。また抗癌剤処理することにより、EMT を誘導させ PD-L1 の発現制御についても確認する。一方術前導入化学療法前後の肺癌の臨床切除検体を用いることにより、その治療前後における EMT 関連蛋白 (E-cadherin, N-cadherin, TGF- $\beta$ )、PD-L1 発現変化を免疫染色にて評価する。肺癌以外の胸部悪性腫瘍として胸腺癌も同じく導入化学療法前後での切除検体を用い、PD-L1 の発現変化と EMT 変化について免疫染色にて評価した。

4. 研究成果

まず肺癌細胞株 (A549, H358) を用い EMT と PD-L1 発現制御について検討した。肺癌細胞株に EMT 誘導因子である TGF- $\beta$  を加えると、細胞の形態は紡錘状に間葉系細胞様に変化し、mRNA (RT-PCR)、蛋白 (Western blot) とともに E-cadherin の減少と N-cadherin は増加を認め EMT 現象が確認できた。そしてこの EMT 現象に呼応するように PD-L1 の発現上昇も認められた (図 ) さらに TGF- $\beta$  の容量依存的に PD-L1 の発現も上昇することが確認できた (図 )。



A549にTGF- $\beta$  加えると濃度依存的にN-cadやPD-L1が上昇する。

次に TGF- $\beta$  と TGF- $\beta$  受容体抗体 (SB) を同時に投与したところ、細胞の形態変化や EMT マーカーの発現変化は生じず EMT 現象が抑制されたが、PD-L1 の発現変化もそれに呼応するように抑制された。これは TGF- $\beta$  が PD-L1 発現制御に関与し、EMT と関連していることを示唆している (図 1)。

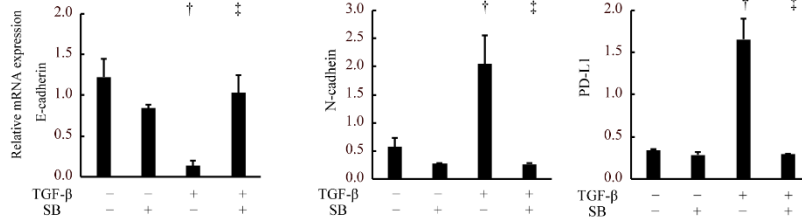


図 1

一方がん細胞に抗癌剤を投与すると EMT が誘導され、その耐性化にも関与していることが以前より分かっている。そこで A549 細胞株に抗癌剤を投与し、EMT 現象と PD-L1 発現 (図 2) について調べた。抗癌剤を投与して生存するがん細胞を解析したところ TGF- $\beta$ 、N-cadherin も上昇し、細胞形態も紡錘状に形態変化することから EMT が誘導されていることが確認できた。さらに PD-L1 の上昇も認めた (図 3)。以上の発現変化は TGF- $\beta$  阻害剤にて抑制された (SB ; TGF- $\beta$  阻害剤)。

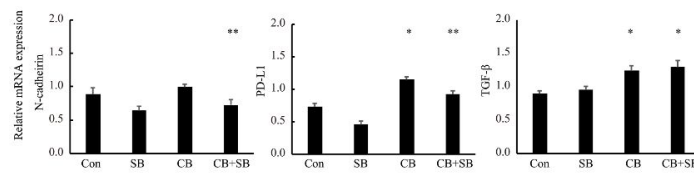
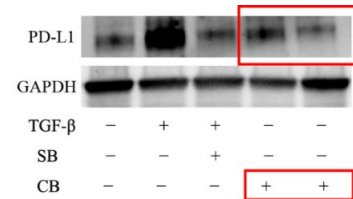


図 2



カルボプラチン (CB) を加えることにより PD-L1 の蛋白発現上昇

上記のことを臨床検体を用いて確認した。術前導入化学療法前後で原発性肺癌症例の生検検体と切除検体を用い免疫染色で評価し比較した。その結果、抗癌剤投与前後で EMT マーカーの発現が上昇し (N-cadherin の上昇)、PD-L1 の発現も併せて上昇していることが確認された (図 4)。

以上の基礎研究および臨床解析の結果から、抗癌剤投与にて EMT が誘導され、抗癌剤耐性化とともに PD-L1 の発現も上昇していると考えられる。さらに、PD-L1 の免疫染色で予後を比較したところ発現上昇群で有意に予後不良であった (図 5)。また、肺癌と同様に胸腺癌でも術前導入化学療法前後の手術臨床検体を用い免疫染色を行った。肺癌の結果と同様に PD-L1 高発現群で有意に予後不良との結果であった。また導入療法前後で EMT 関連蛋白の変化を認め、それに呼応するように PD-L1 の発現も上昇していた (図 6、7)。

以上は免疫チェックポイント阻害剤が抗癌剤投与後の再発症例に対する有効な治療法としての可能性を示すとともに、抗癌剤との併用にて上乗せ効果が期待できる新規レジメン開発のきっかけとなる重要な研究成果と考えられる。さらに免疫療法の適応基準が従来の PD-L1 解析に加え、EMT 関連蛋白の有用性も示しており新たなバイオマーカー研究としての可能性も秘めている。

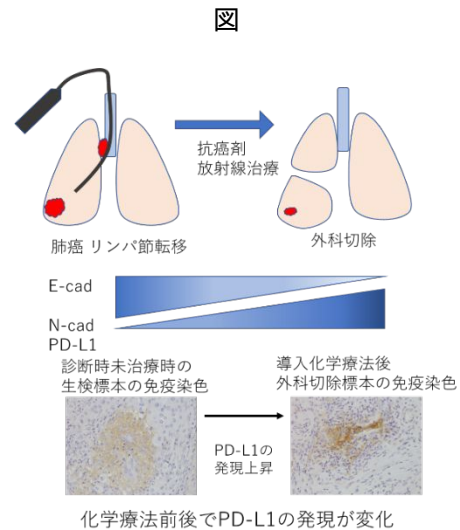


図 4

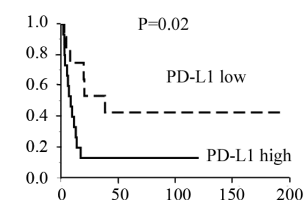


図 5 肺癌の PD-L1 発現による予後

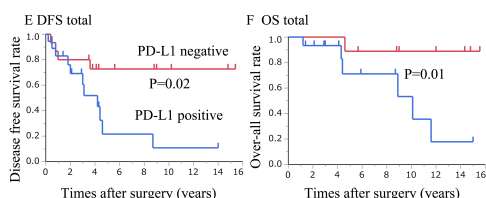


図 7 胸腺癌における PD-L1 の予後

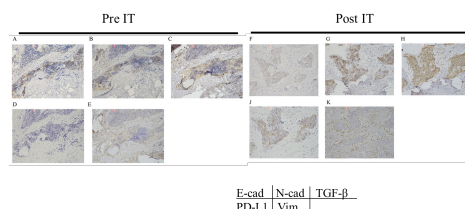


図 8 導入療法前後での EMT と PD-L1 の免疫

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Funaki S, Shintani Y, Fukui E, Yamamoto Y, Kanzaki R, Ose N, Kanou T, Minami M, Mori E, Okumura M. The prognostic impact of programmed cell death 1 and its ligand and the correlation with epithelial-mesenchymal transition in thymic carcinoma. *Cancer Medicine*. 査読有、2019、8(1):216-226. doi: 10.1002/cam4.1943. Epub 2019 Jan 1.

Funaki S, Shintani Y, Kawamura T, Kanzaki R, Minami M, Okumura M. Chemotherapy enhances programmed cell death 1/ligand 1 expression via TGF- $\beta$  induced epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*. 査読有、2017;38(4):2277-2284. doi: 10.3892/or.2017.5894. Epub 2017 Aug 9.

### 〔学会発表〕(計 7 件)

舟木壮一郎、新谷 康、大瀬尚子、神崎 隆、南 正人、奥村明之進 胸腺癌における PD-1 陽性腫瘍内リンパ球・(PD-1 + tumor-infiltrating lymphocytes ; TIL) の臨床的意義、第 37 回日本胸腺研究会、2018

舟木壮一郎、新谷 康、大瀬尚子、神崎 隆、狩野 孝、南 正人、奥村明之進 胸腺癌における免疫チェックポイント分子 PD-L1 の発現制御と臨床病理学的意義について、第 34 回日本呼吸器外科学会総会、2018

Funaki S, Shintani Y, Yamamoto Y, kimura K. The clinical significance of Programmed cell death 1 Ligand 1(PD-L1) in thymic carcinoma. 第 77 回日本癌学会学術総会、2018

舟木壮一郎、福井絵里子、川村知裕、神崎 隆、新谷 康、南 正人、奥村明之進 非小細胞性肺癌における PD-L1 発現制御について、第 117 回日本外科学会定期学術集会、2017

舟木壮一郎、福井絵里子、川村知裕、神崎 隆、新谷 康、南 正人、奥村明之進 免疫チェックポイント経路 PD-1/PD-L1 の発現制御による肺癌治療法の確立、第 34 回日本呼吸器外科学会総会、2017

Funaki S, Shintani Y, Fukui E, Kawamura T, Minami M, Okumura M. The Regulation Of PD-L1 in Non Small Cell Lung Cancer. EUROPEAN SOCIETY FOR MEDICAL ONCOLOGY Annual congress.2016

舟木壮一郎、川村知裕、木村 亨、神崎 隆、新谷 康、南 正人、奥村明之進 サイズ選択的検出法による原発性肺癌の循環癌細胞の臨床的意義、第 57 回日本肺癌学会学術集会、2016

### 〔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：南 正人  
ローマ字氏名：(Masato Minami)  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：医学部附属病院  
職名：准教授  
研究者番号(8桁)：10240847

研究分担者氏名：新谷 康  
ローマ字氏名：(Yasushi Shintani)  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：医学系研究科  
職名：准教授  
研究者番号(8桁)：90572983

研究分担者氏名：奥村 明之進  
ローマ字氏名：(Meinoshin Okumura)  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：医学系研究科  
職名：招へい教授  
研究者番号(8桁)：40252647

研究分担者氏名：川村 知裕  
ローマ字氏名：(Tomohiro Kawamura)  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：医学系研究科  
職名：助教  
研究者番号(8桁)：30528675

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。