

平成 31 年 4 月 23 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16046

研究課題名(和文)線維細胞上の免疫チェックポイント分子に注目した肺癌免疫療法に関する治療戦略の開発

研究課題名(英文)Analyses of the immuno-modulatory function of fibrocytes in tumor immunity

研究代表者

荻野 広和 (OGINO, Hiromasa)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・助教

研究者番号：20745294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：線維細胞の腫瘍免疫における機能を解析すべく、まずヒト末梢血由来線維細胞の表面マーカーを解析し、PD-L1の他、CD54、CD86の高発現を確認した。線維細胞をヒト末梢血由来CD8陽性T細胞と共培養したところT細胞の増殖が促進され、これはCD54、CD86阻害でキャンセルされた。末梢血より単離直後のCD8陽性T細胞はPD-1を発現しないが、IL-2刺激にて発現が誘導された。IL-2存在下で線維細胞はT細胞の増殖を抑制し、これはPD-L1阻害でキャンセルされた。以上より線維細胞は非活性化T細胞の増殖をCD54、CD86を介し促進し、活性化T細胞の増殖はPD-L1を介し抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸部悪性腫瘍領域においても免疫チェックポイント阻害薬(ICI)が盛んに用いられているが、一部の症例では本薬剤による治療効果が得られず、より良い治療戦略の構築および薬効を規定するバイオマーカーの開発が臨床急務である。近年化学療法剤や血管新生阻害剤とICIの併用効果が報告されているが、至適併用法は未解明な部分が多い。

本研究では腫瘍間質に存在する線維細胞の腫瘍免疫における役割を解析し、上述の様に本細胞が腫瘍免疫を活性化する可能性が示唆された。本細胞を標的とする治療法の開発が癌免疫療法の有用性を向上させることにつながる可能性を含んでおり、本研究成果は学術的・社会的意義の大きいものであると考える。

研究成果の概要(英文)： In this study, we investigated the immuno-modulatory function of fibrocytes in tumor immunity. First, we evaluated the expressions of several immune-checkpoint molecules on fibrocytes, and found that fibrocytes overexpressed not only PD-L1 but also CD54 and CD86. Fibrocytes significantly upregulated T-cells proliferation in the co-culture experiment, and these effects were cancelled by the blocking of CD54 or CD86.

The naive CD8+ T-cells did not express PD-1, however, the expression of PD-1 on T-cells was induced by the stimulation of IL-2. Fibrocytes significantly suppressed the T-cells proliferation under the stimulation of IL-2, however, these effects were cancelled by the blocking of PD-L1.

These results show that fibrocytes may activate naive CD8+ T-cells via co-stimulatory factors, such as CD54 or CD86, whereas that suppress the activated CD8+ T-cells via PD-L1.

研究分野：肺癌

キーワード：線維細胞 免疫療法

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

1. 研究開始当初の背景

線維細胞 (fibrocyte) は、末梢血単核球由来のコラーゲン産生能を有する細胞であり、白血球分画中に占める割合は僅か 0.1-0.5%程度であるが、骨髄系の表面マーカーと線維芽細胞類似の細胞外基質産生能を持つユニークな細胞である。末梢血中から主に CXCL12-CXCR4 axis により線維化組織へ遊走し、組織修復や、肺線維症や気管支喘息などの組織の線維化に重要な役割を果たすと考えられている。しかし肺癌など悪性腫瘍における線維細胞の役割については殆ど検討がない。我々は以前、ヒト肺癌/悪性胸膜中皮腫細胞株を免疫不全マウスに移植するマウスモデルを用いて、血管新生阻害薬の治療効果について検討し、またそれに対する耐性メカニズムを解析する中で、耐性腫瘍内に線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF) -2 の発現上昇があり、その FGF-2 産生細胞が CXCR4 陽性かつ Collagen-1 陽性の線維細胞であることを発見した。また血管新生阻害薬治療後に外科的切除されたヒトの肺癌組織において線維細胞数が増加しており、線維細胞数が血管新生の程度と相関することを確認し、線維細胞が癌の血管新生を制御する重要な細胞であることが示唆された。一方で線維細胞は CD54, CD58, CD80, CD86 などの共刺激分子や、MHC-class 抗原を高発現し高い抗原提示能を持つことが知られており、他の腫瘍関連マクロファージや骨髄由来抑制細胞などの間質細胞同様に腫瘍進展、特に腫瘍免疫応答に寄与する可能性が考えられる。

近年肺癌においても抗 PD-1(Programmed cell death-1)抗体、抗 PD-L1(Programmed cell death-ligand 1)抗体が臨床応用され盛んに用いられるようになってきている。これら免疫チェックポイント阻害薬は一部の症例においては非常に長期にわたり治療効果が持続することが知られており、その薬効に関するバイオマーカーの同定を目指した研究が盛んに行われている。腫瘍細胞の PD-L1 発現強度、体細胞変異量、腫瘍内の免疫フェノタイプなどがバイオマーカーとして報告されているが、臨床上満足のものではない。一方で近年腫瘍組織内に浸潤した免疫細胞に発現する PD-L1 発現が薬効と相関するという報告がされており、腫瘍間質細胞の重要性が示唆されている。線維細胞が PD-L1, PD-L2 を高発現していることから、抗 PD-1/PD-L1 抗体での治療課程において線維細胞が何らかの役割を果たしている可能性、および薬効のバイオマーカーとなり得る可能性が示唆される。

2. 研究の目的

線維細胞が肺癌進展において重要な役割を果たしている可能性が高いこと、またそれが免疫チェックポイント分子を高発現していることを踏まえ、本研究では、担癌状態において線維細胞が発現する免疫チェックポイント分子の機能を解析し、腫瘍免疫に及ぼす影響について解明することを目的に研究を行った。

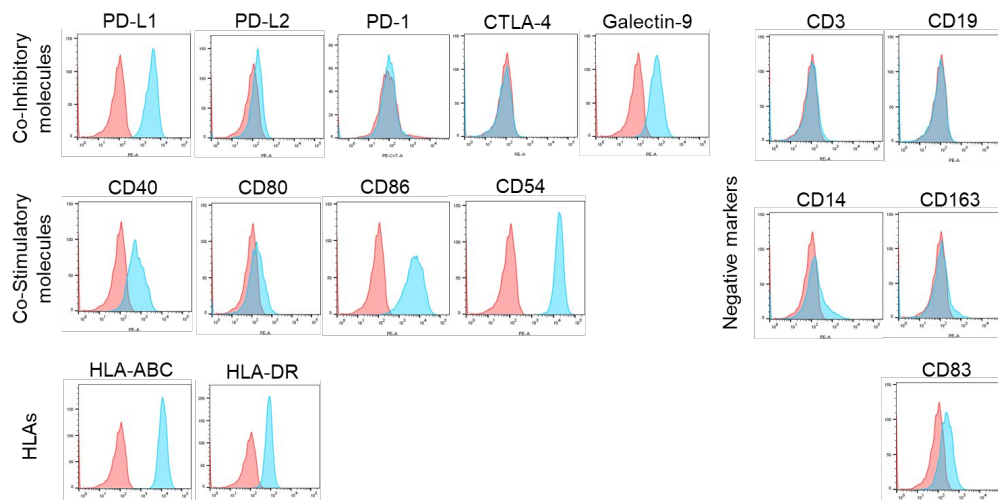
3. 研究の方法

ヒト末梢血より比重遠心法で分離した単核球を、20%ウシ胎児血清を添加した RPMI1640 培地を用いてフィブロネクチンコートディッシュ上で1週間培養し、付着細胞を分離する方法で線維細胞を単離した。線維細胞上の各種表面マーカーの解析は Flow cytometry を用いて行った。ヒト CD8 陽性 T 細胞は末梢血由来単核球より磁気ビーズを用いて単離し、線維細胞の CD8 陽性 T 細胞増殖に及ぼす影響について共培養の系にてトリチウム取り込みアッセイにて評価した。

4. 研究成果

(1) はじめに線維細胞における各種免疫チェックポイント分子発現プロファイルについて Flow cytometry を用いて解析した。その結果、線維細胞は共抑制分子である PD-L1 の他、共刺激分子である CD54、CD86 を高発現することが分かった(図1)。

図1: ヒト線維細胞における各種免疫チェックポイント分子発現プロファイル



(2) 次に線維細胞の CD8 陽性 T 細胞の増殖に及ぼす影響を検討する目的で、線維細胞とヒト末梢血由来 CD8 陽性 T 細胞を共培養したところ、T 細胞の増殖が著しく亢進し、これらの効果は CD54、CD86 の阻害にて抑制された(図 2)。これらの結果は、線維細胞は CD54、CD86 を介して CD8 陽性 T 細胞を活性化する可能性が示唆された。

(3) また上記と並行して C57BL/6 マウス由来の肺癌細胞株である 3LL、BALB/c 由来中皮腫細胞株である AB1-HA を同系統マウス皮下に移植することで肺癌/中皮腫マウスモデルを確立した。

(4) 次に線維細胞と CD8 陽性 T 細胞の共培養の系において PD-L1 阻害により T 細胞の更なる活性化が生じるか検討したが、そのような効果は認められなかった。そこで、ヒト末梢血より単離した直後の CD8 陽性 T 細胞上の PD-1 発現を検討したがその発現を認めなかった。そこで末梢血由来 CD8 陽性 T 細胞を IL-2 にて刺激したところ PD-1 発現が誘導され、IL-2 存在下で線維細胞と CD8 陽性 T 細胞を共培養すると T 細胞の増殖は著しく抑制され、この効果は PD-L1 阻害にてキャンセルされた(図 3)。これらの結果から、線維細胞は非活性化 T 細胞(ナイーブ T 細胞)の増殖を CD54、CD86 を介して促進するが、活性化 T 細胞の増殖を PD-L1 を介して抑制する可能性が示唆された。

図 2: 線維細胞による CD8 陽性 T 細胞の増殖促進作用

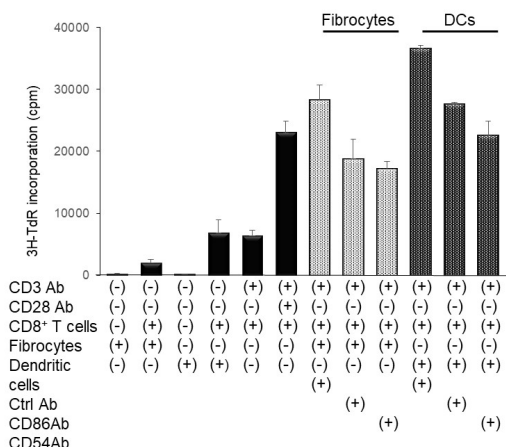
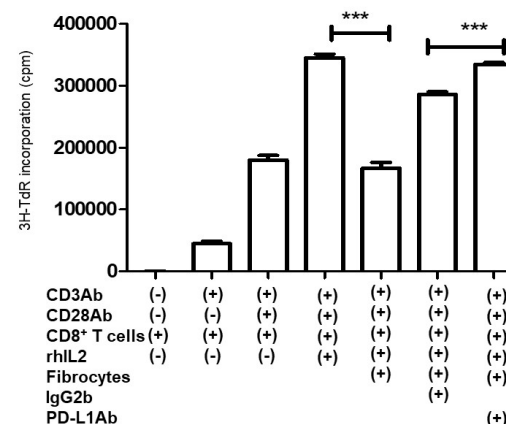


図 3: 線維細胞による活性化 CD8 陽性 T 細胞の増殖抑制作用



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Tania Afroj, Hirokazu Ogino, Makoto Tobiume, Hirotto Yoneda, Masatoshi Kishuku, Atsuro Saijo, Atsushi Mitsunashi, Kazuya Koyama, Hisatsugu Goto, Yasuhiko Nishioka. Analyses of immuno-modulatory function of fibrocytes in tumor immunity. 第 59 回日本呼吸器学会学術講演会・東京国際フォーラム(東京都・千代田区). 2019 年 4 月 14 日.
 荻野広和, 後東久嗣, 大塚憲司, 西條敦郎, 埴淵昌毅, 西岡安彦. 線維細胞が腫瘍免疫に及ぼす影響についての検討. 第 22 回日本がん分子標的治療学会学術集会・都市センターホテル(東京都・千代田区). 2018 年 5 月 16 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究分担者氏名：Tania Afroj

ローマ字氏名：(AFROJ, tania)