

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08542

研究課題名（和文）線維細胞を用いた血管新生阻害薬の薬剤耐性及び安全性に関わるバイオマーカー開発

研究課題名（英文）Development of biomarkers related to drug resistance of angiogenesis inhibitors

研究代表者

軒原 浩（Nokihara, Hiroshi）

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・センター病院・呼吸器内科 医長

研究者番号：00505919

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）：線維細胞はPD-L1を発現していること、抗原提示能を有し、抗PD-L1抗体によって抗原提示能が増強することを明らかにした。さらに、抗VFGF抗体は腫瘍浸潤線維細胞を増加させ抗腫瘍効果を増強させること、線維細胞は共刺激分子を高発現すること、腫瘍浸潤線維細胞の共刺激活性は抗PD-L1抗体によって増強されること、腫瘍周囲への線維細胞移植により抗PD-L1抗体の抗腫瘍効果を増強すること、腫瘍浸潤線維細胞がTGF- β /SMADシグナルを通じて筋線維芽細胞様の表現型を獲得することを明らかにした。一方、抗PD-L1抗体はCXCL10/11ケモカインの分泌を介して腫瘍血管新生を阻害することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、血管新生阻害薬の効果予測や耐性のバイオマーカーとしての線維細胞の可能性を検討した。線維細胞に着目した血管新生阻害薬の有効性及び安全性に関わるバイオマーカー開発のアプローチは国内外ともに見当たらない。線維細胞の抗原提示細胞としての機能を明らかにしたこと、腫瘍浸潤線維細胞に対する抗PD-L1抗体による影響を明らかにしたこと、抗PD-L1抗体による腫瘍血管新生阻害することを明らかにしたことは、血管新生阻害薬や免疫チェックポイント阻害薬の効果予測や薬剤耐性のバイオマーカー確立にも寄与する。さらには血管新生阻害薬や免疫チェックポイント阻害薬の個別化治療や新たな薬剤の開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We found that fibrocytes express PD-L1, that they work as antigen-presenting cells, and that their antigen-presenting ability is enhanced by anti-PD-L1 antibodies (J Immunol. 2021). Furthermore, anti-VFGF antibody increases tumor-infiltrating fibrocytes and enhances the anti-tumor effect of anti-PD-L1 antibody, fibrocytes highly express co-stimulatory molecules, co-stimulatory activity of tumor-infiltrating fibrocytes is enhanced by anti-PD-L1 antibody, peritumoral implantation of fibrocytes enhances the anti-tumor effect of anti-PD-L1 antibody, and anti-PD-L1 antibody is effective against tumor-infiltrating fibrocytes, tumor-infiltrating fibroblasts acquire myofibroblast-like phenotypes through TGF- β /SMAD signaling (Cell Rep. 2023). In addition, we also found that anti-PD-L1 antibodies inhibit tumor angiogenesis via secretion of CXCL10/11 chemokines (Cancer Sci. 2021).

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：線維細胞 血管新生 免疫チェックポイント ケモカイン 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

(1) 血管新生阻害薬の耐性メカニズムにおける線維細胞の役割

がんの増殖・新転移は血管新生が必須であり、血管新生は様々な因子で調節されている。血管内皮増殖因子 (VEGF) は血管新生促進因子として中心的な役割を担い、血管新生阻害薬であるベバシズマブ (抗 VEGF ヒト化モノクローナル抗体) は肺がんを含め様々ながん種に承認され、日常診療で広く用いられている。血管新生阻害薬も他の分子標的薬と同様に耐性化が問題となっているが、血管新生阻害薬の有効性を予測するバイオマーカーは存在せず、耐性メカニズムも不明である。

我々はこれまでに臨床における転移様式を再現したヒト肺がんの多臓器転移マウスモデルを確立し、同モデルを用いて宿主細胞を介した遠隔転移の分子メカニズムの解析や血管新生因子を標的とした新規治療法の開発を行ってきた。その中で血管新生阻害薬耐性に関わる重要な細胞として線維細胞 (fibrocyte) を同定し、線維細胞がベバシズマブの有効性及び耐性化を予測するバイオマーカーになりえる可能性が示唆されている。

(2) 間質性肺炎の急性増悪における線維細胞の役割と間質性肺炎を合併する進行肺がんに対する治療開発

線維細胞は血球系と間葉系の性質を併せ持つ単球由来の間葉系前駆細胞であり、組織線維化を誘導することで創傷治癒に関与する細胞と認識されてきた。しかし、近年、血中の線維細胞数と特発性肺線維症患者の早期死亡との相関が報告されるなど、線維細胞は線維化肺においては肺の病的線維化を促進する負の側面を持つことが明らかとなっている。線維細胞は化学療法や血管新生阻害薬による間質性肺炎の急性増悪のバイオマーカーにもなりえる可能性がある。

特発性間質性肺炎は難治性疾患であり、高頻度に肺がんを併発する。間質性肺炎を合併した肺がんでは、急性増悪が深刻な問題であり、急性増悪は手術、放射線療法、化学療法のいずれを契機としても生じ得るため、治療上の大きな制約となっている。ベバシズマブは非小細胞肺がんにおいてプラチナ併用化学療法に上乘せすることにより、生存期間の延長効果が示されている。しかし、間質性肺炎合併非小細胞肺がんに対するベバシズマブの有効性、安全性は不明である。そこで、間質性肺炎を合併する未治療進行非小細胞肺がんに対する新たな治療開発を目的に CBDCA + S-1 + ベバシズマブ療法の多施設共同第 Ⅲ 相試験の附随研究として有効性及び急性増悪に関するバイオマーカー研究を計画した。

2. 研究の目的

本研究は、腫瘍細胞株や健常人の血液検体、及び患者血液検体を用いて線維細胞及び線維細胞由来の液性因子が血管新生阻害薬の効果予測や耐性のバイオマーカー、及び間質性肺炎合併肺がんにおける間質性肺炎急性増悪のバイオマーカーになりうるかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスの肺組織、肺がん患者や健常人の血液検体から線維細胞を分離し、線維細胞の免疫チェックポイント分子の発現や抗原提示能等の免疫調節機能を検討した。また、KLN205 (マウス肺扁平上皮癌)皮下移植モデルや AB1-HA (マウス中皮腫)皮下移植モデルを用いて血管新生阻害薬耐性のバイオマーカーの探索、腫瘍免疫における線維細胞の役割についての解析、PD-L1 (programmed death ligand 1) 抗体による腫瘍抑制効果と腫瘍内新生血管への影響等を検討し

た。

(2) CBDCA + S-1 + ベバシズマブ療法の実施共同第 相試験において、治療前、2 コース後、4 コース後、肺がん増悪時、間質性肺炎の急性増悪時に血液検体採取を行うこととした。血液中の線維細胞を分離し、線維細胞数及び線維細胞から採取した RNA や培養上清を用いて、増殖因子、ケモカイン、血管新生関連因子などの発現を検討した。

4 . 研究成果

(1) 線維細胞の免疫調節機能の検討 (J Immunol . 206(6) : 1204-1214, 2021)

線維細胞は PD-L1 を含む免疫チェックポイント分子を発現し、マウスとヒトの CD8 陽性 T 細胞の増殖を強く促進した。抗 CD86 抗体と抗 CD54 抗体で処理すると、線維細胞によって誘導された CD8 陽性 T 細胞の増殖が抑制された。抗 PD-L1 抗体は、CD8 陽性 T 細胞の増殖をさらに促進した。肺腺がん患者またはマウス MC38 腫瘍の血液由来の線維細胞は、PD-L1 遮断により CD8 陽性 T 細胞の増殖を増強した。これらの結果より、線維細胞が抗原提示細胞としての機能を有し、腫瘍部位に浸潤している線維細胞が、PD-L1/PD-1 遮断によって活性がさらに増強された場合、CD8 陽性 T 細胞によって媒介される抗腫瘍免疫に関与する可能性が示唆された。

(2) PD-1/PD-L1 遮断による線維細胞の腫瘍免疫における役割(Cell Rep . 42(3) : 112162, 2023)

抗 VEGF 抗体は、in vivo で腫瘍浸潤線維細胞を増加させ、抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果を増強した。In vivo および肺腺がん患者において、「線維細胞クラスター」を同定し、サブクラスター解析により、共刺激分子を高発現する線維細胞サブクラスターが明らかになった。また、抗 VEGF 抗体は抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果を in vivo で増強させること、線維細胞クラスターは共刺激分子を高発現すること、腫瘍浸潤性線維細胞の CD8 陽性 T 細胞共刺激活性は抗 PD-L1 抗体によって増強されること、腫瘍周囲への線維細胞移植により in vivo での抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果を増強すること、腫瘍浸潤性が transforming growth factor /small mothers against decapentaplegic シグナルを通じて筋線維芽細胞様の表現型を獲得することを明らかにした。これらの結果より線維細胞が PD-1/PD-L1 遮断に対する反応を調節する役割を担うことが示唆された。

(3) 血管新生阻害における PD-1/PD-L1 遮断の効果 (Cancer Sci . 112(12) : 4853-4866, 2021)

マウス皮下移植モデルにおいて、抗 PD-L1 抗体は腫瘍血管新生を阻害し、免疫チェックポイント阻害薬感受性細胞株においてのみ低酸素を誘導した。マウスの腫瘍組織および血清において、PD-1/PD-L1 遮断によりインターフェロン- (IFN-) 誘導性血管新生ケモカイン CXCL10/11 が上昇した。In vitro では、腫瘍細胞株における IFN- 刺激による CXCL10/11 遺伝子の増強は、PD-1/PD-L1 遮断の感受性と相関していた。腫瘍細胞における CXCL10/11 受容体 CXCR3 中和抗体は、in vivo における PD-1/PD-L1 遮断の血管新生阻害効果を阻害した。 期の非小細胞肺がん患者で初回治療としてペムプロリズマブ(抗 PD-1 抗体)治療を受けた 17 例において治療前の血清中 CXCL10/11 濃度と無増悪生存期間は有意に相関していた。これらの結果より PD-1/PD-L1 遮断が血管新生抑制機能を示すとともに、腫瘍由来の CXCL10/11 が治療感受性を示す循環バイオマーカーとなる可能性を示された。

(4) S-1 の骨髄由来抑制細胞への影響と PD-1/PD-L1 遮断の効果(Cancer Sci . 114(2) : 384-398, 2023)

フルオロウラシル(5-FU)およびその経口製剤である S-1 による治療が、担癌マウスにおいて腫瘍の進行を抑制し、骨髄由来抑制細胞 (MDSC) の蓄積を抑制することを明らかにした。S-1 投与マウスでは、腫瘍浸潤 T 細胞および樹状細胞が有意に増加した。5-FU は腫瘍細胞が骨髄由来

抑制細 MDSC をリクルートする能力を抑制したが、in vitro ではマウス MDSCs の生存と分化を抑制しなかった。また、5-FU または S-1 は、腫瘍由来の Bv8 および S100A8 の発現を有意に低下させることも明らかにした。腫瘍細胞における Bv8 または S100A8 のノックダウンは、in vivo で腫瘍増殖と MDSC の動員を抑制した。さらに、ペメトレキセドと比較して、S-1 の投与は、カルボプラチンを併用した、または併用しない抗 PD-1 抗体の相乗的治療効果を改善した。これらの結果より S-1 が良好な腫瘍微小環境をプライミングするという可能性が示唆された。

(5) 間質性肺炎合併非小細胞肺癌に対する 2 次化学療法の有効性と安全性の検討 (Thoracic Cancer 13(21):2978-2984, 2022)

間質性肺炎合併非小細胞肺癌に対する 2 次化学療法を受けた患者を後方視的に解析し、全奏効率は 11.4%、病勢コントロール率は 68.6%、無増悪生存期間中央値は 4.1 ヶ月、全生存期間中央値は 6.4 ヶ月であった。間質性肺炎の急性増悪は 8 例に認められ、うち 5 例が Grade5 であった。急性増悪の有意な危険因子として CT における usual interstitial pneumonia パターンと UIP と vital capacity 低値が検出された。

(6) CBDCA + S-1 + ベバシズマブ療法におけるバイオマーカー解析

新型コロナ感染症拡大の影響を受け、CBDCA + S-1 + ベバシズマブ療法の多施設共同第 相試験の実施が遅れ、患者登録及び患者検体収集が完了していない状況である。患者登録及び検体収集完了後に増殖因子、ケモカイン、血管新生関連因子などを解析予定である。

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 Afroj Tania, Mitsuhashi Atsushi, Ogino Hirokazu, Saijo Atsuro, Otsuka Kenji, Yoneda Hiroto, Tobiume Makoto, Nguyen Na Thi, Goto Hisatsugu, Koyama Kazuya, Sugimoto Masamichi, Kondoh Osamu, Nokihara Hiroshi, Nishioka Yasuhiko	4. 巻 206
2. 論文標題 Blockade of PD-1/PD-L1 Pathway Enhances the Antigen-Presenting Capacity of Fibrocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1204 ~ 1214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2000909	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 Mitsuhashi Atsushi, Kondoh Kensuke, Horikawa Kazuki, Koyama Kazuya, Nguyen Na Thi, Afroj Tania, Yoneda Hiroto, Otsuka Kenji, Ogino Hirokazu, Nokihara Hiroshi, Shinohara Tsutomu, Nishioka Yasuhiko	4. 巻 112
2. 論文標題 Programmed death (PD) 1/PD ligand 1 blockade mediates antiangiogenic effects by tumor derived CXCL10/11 as a potential predictive biomarker	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4853 ~ 4866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15161	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 Nguyen Na T., Mitsuhashi Atsushi, Ogino Hirokazu, Kozai Hiroyuki, Yoneda Hiroto, Afroj Tania, Sato Seidai, Nokihara Hiroshi, Shinohara Tsutomu, Nishioka Yasuhiko	4. 巻 114
2. 論文標題 S 1 eliminates <sc>MDS</sc> and enhances the efficacy of <sc>PD</sc> 1 blockade via regulation of tumor derived Bv8 and <sc>S100A8</sc> in thoracic tumor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 384 ~ 398
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15620	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 Mitsuhashi Atsushi, Koyama Kazuya, Ogino Hirokazu, Afroj Tania, Nguyen Na Thi, Yoneda Hiroto, Otsuka Kenji, Sugimoto Masamichi, Kondoh Osamu, Nokihara Hiroshi, Hanibuchi Masaki, Takizawa Hiromitsu, Shinohara Tsutomu, Nishioka Yasuhiko	4. 巻 42
2. 論文標題 Identification of fibrocyte cluster in tumors reveals the role in antitumor immunity by PD-L1 blockade	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112162 ~ 112162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.112162	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 Otsuka Kenji, Nokihara Hiroshi, Mitsuhashi Atsushi, Ozaki Ryojiko, Yabuki Yohei, Yoneda Hiroto, Ogino Hirokazu, Nishioka Yasuhiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Efficacy and safety of second line chemotherapy for patients with advanced non small cell lung cancer complicated by interstitial lung disease	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 2978 ~ 2984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.14645	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6件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Thi Na Nguyen, Atsushi Mitsuhashi, Hirokazu Ogino, Hiroyuki Kozai, Hiroto Yoneda, Tania Afroj, Kenji Otsuka, Hiroshi Nokihara, Yasuhiko Nishioka
2. 発表標題 S-1 reduces myeloid-derived suppressor cells in murine mesothelioma model and enhances the anti-tumor activity of anti-PD-1 antibody
3. 学会等名 APSR 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三橋惇志, 荻野広和, 米田浩人, 大塚憲司, 軒原浩, 西岡安彦
2. 発表標題 抗PD-1/PD-L1抗体による血管新生制御メカニズムの解析と治療効果予測バイオマーカーとしての応用
3. 学会等名 第62回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三橋惇志, 荻野広和, 西條敦郎, 大塚憲司, 杉本正道, 軒原浩, 西岡安彦
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬および血管新生阻害薬併用療法におけるfibrocyteの役割
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Mitsuhashi, Hirokazu Ogino, Hiroshi Nokihara, Yasuhika Nishioka
2. 発表標題 PD-1/PD-L1 blockade mediates antiangiogenic effects by tumor-derived CXCL10/11 as a potential predictive biomarker
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Na T. Nguyen, Atsushi Mitsuhashi, Hirokazu Ogino, Hiroyuki Kozai, Hiroto Yoneda, Hiroshi Nokihara, Yasuhiko Nishioka
2. 発表標題 Eliminates MDSCs and enhances the efficacy of immune checkpoint inhibitor in thoracic tumors
3. 学会等名 第63回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Mitsuhashi, Hirokazu Ogino, Masamichi Sugimoto, Hiroshi Nokihara, Yasuhiko Nishioka
2. 発表標題 Fibrocyte drives antitumor immunity via T cell-costimulation in combination immunotherapy
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
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	大塚 憲司 (Otsuka Kenji) (70776856)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・助教 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	三橋 悫志 (Mitsuhashi Atsushi) (00833732)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・特任助教 (16101)	

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