

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09215

研究課題名(和文) 肺線維症合併肺癌に対する新規免疫療法の開発

研究課題名(英文) Immunotherapy for lung cancer with pulmonary fibrosis

研究代表者

中村 祐太郎 (Nakamura, Yutaro)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60436962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌は本邦で最多の癌死の原因であり、甚大な健康被害を与え続けている。一方樹状細胞(DC)を介した細胞性免疫は抗腫瘍免疫に必須の生体反応である。申請者らは、効率的に優れた細胞性免疫をきたす細胞性免疫誘導型DCワクチン(DC1)が動物モデルにて各種腫瘍に、有望なワクチンであることを報告してきた。本研究で、ヒトの血液のDC1の性質および免疫応答の解析を行った結果、タイプ1免疫に關与するケモカインの産生が亢進し、NK細胞は活性化、制御性T細胞は抑制されることが明らかとなった。DC1は、現在臨床で用いられる免疫療法を中心に各種薬剤との併用治療の候補として有望である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer is the most deadly cancer in Japan. Type-1 immune response play a critical role in anti-tumor response via dendritic cells (DCs). We previously developed type-1 polarized DCs (DC1s), which induced strong anti-tumor effect in various animal tumor models. Here we showed that human DC1s significantly produced chemokines associated with type-1 immune response. Furthermore human DC1s activated NK cells, and suppressed the proliferation of regulatory T cells. DC1s is a promising candidate for combination cancer therapy with currently available drugs.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：免疫療法 樹状細胞 肺癌

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は今日最も深刻な病態のひとつであり、本邦においても年間約 35 万人以上が死亡している。殊に肺癌による死亡は、最近の分子標的薬等の発展にもかかわらず、癌死において最多となっている。こうした癌による社会的損失は多大であることから、新たな治療法が求められている。一方、肺線維症は、高頻度に肺癌を合併することが知られ、殊に特発性間質性肺炎の中で最大多数を占める特発性肺線維症は、喫煙とは独立した肺癌の危険因子であり、肺癌発症のリスクは 7~10 倍と報告されている。こうした肺線維症合併肺癌の病態には、現在用いられている化学療法、外科療法、放射線療法の何れの治療においても急性肺障害を来す可能性が高く、治療法が極めて限定されている。したがってこれらの患者には、合併症のない肺癌患者以上に安全で優れた効果を持った治療法の開発が切望されている。

最近、各種免疫療法が開発され欧米諸国を中心に臨床試験がなされている。特に生体で最も強力な抗原提示細胞である樹状細胞 (Dendritic cell; DC) を用いた樹状細胞ワクチン (DC ワクチン) は、癌細胞排除に最も肝要とされる細胞性免疫を誘導することから、その臨床効果が期待され、2010 年には、DC 類似の抗原提示細胞を用いた細胞ワクチンが、前立腺癌に対して米国において認可された。

我々は、DC ワクチンの効果につき、マウスのモデルを用いて DC に抗原蛋白を表出させた遺伝子導入 DC ワクチンや、より簡便な抗原共培養 (パルス) DC ワクチンのアジュバントとの併用および投与方法などの違いによる有効性を検討してきた。一方 DC の誘導する細胞性免疫は、主としてキラー T 細胞 (CD8<sup>+</sup>T 細胞) によって直接腫瘍細胞や感染細胞を攻撃することから、抗腫瘍免疫及び感染防御能の誘導に必須である。細胞性免疫の誘導は

様々な DC からのサイトカインによってなされ、中でも IL12 p70 が中心的な役割を果たしている。細胞性免疫誘導型 DC は、申請者が共同研究者らとともに研究開発してきた DC であり、生体内、外で特定のサイトカイン刺激或いは T 細胞からのシグナルなどにより DC を細胞性免疫のきたしやすい状態に誘導し、ワクチンとして用いる方法である。最近申請者らは動物モデルにおいて、多量の IL-12 を産生し、強い細胞性免疫誘導能を有する細胞性免疫誘導型 DC ワクチンが、肺腫瘍を含む複数の腫瘍、および結核菌と同じ細胞内寄生菌にきわめて有効であることを確認した。しかし、未だ肺癌患者に対するワクチンとしての有効性を検討した報告はなく、その臨床効果が強く期待される。

## 2. 研究の目的

本研究は、細胞免疫誘導型 DC ワクチンの肺癌患者血液における免疫応答を解析することにより、治療選択の極めて限定されている肺線維症合併例を含む肺癌患者に対し、治療ワクチンとしての研究基盤を確立することが目的である。

## 2. 研究の方法

肺がん免疫療法の分野は、本研究計画以降の特に最近 3 年間で、極めて多くの技術発展とともに、めざましい治療効果を上げ始めている。従って、急速かつ大幅なこの分野の発展とともに、当初の研究計画もより効果的な免疫を誘導するための研究デザインへの変更を余儀なくされている。研究代表者は研究分担者および米国の協力者とも討議を重ね、がんと同様に内因性抗原を標的とする細胞内寄生菌 (結核) 患者由来の細胞性免疫誘導型 DC ワクチンをさらに詳細に解析することで、より有効性の高い DC ワクチン開発へと繋げる研究に焦点を据えた。

## 1. 細胞性免疫誘導型 DC の誘導およびワクチンとしての性質の解析

インフォームド・コンセントを行い書面にて同意を得た上で患者から採血を行う。単核球を Percoll およびプラスチック付着法または CD14+ 磁気ビーズを用いて分離する。GM-CSF と IL-4 で DC へと培養する。その後、細胞性免疫誘導型 DC を誘導するため、TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , Poly-I:C を添加し培養する。一方通常型 DC として TNF- $\alpha$ , PGE2, IL-1 $\beta$ , IL-6 を添加、同様に培養する。培養後フローサイトメトリーにて表面抗原)の発現を確認する。その後 CD40L を発現させた J558 細胞 (マウス腫瘍細胞) で 24 時間刺激する。上清を回収し、有効なタイプ 1 免疫の誘導のための、サイトカインおよびケモカイン産生能を検討する。

## 2. 作成した細胞性免疫誘導型 DC ワクチンの免疫誘導能の解析

有効な細胞性免疫の誘導を確認するため、上記で得られた患者血液の PBMC と、抗原、および細胞性免疫誘導型 DC または通常型 DC とともに培養し、免疫担当細胞への影響を検討した。

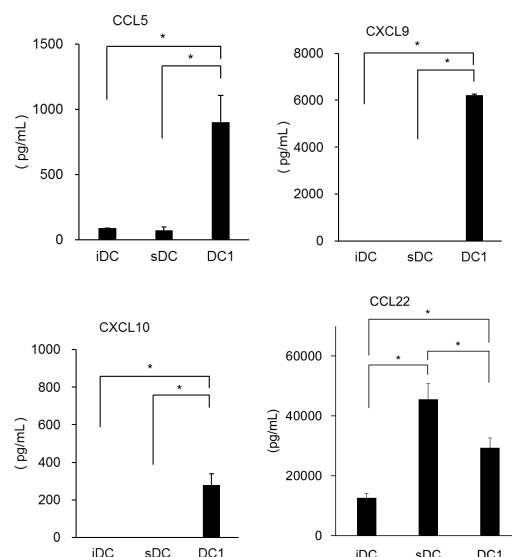
### 4. 研究成果

#### 1. 細胞性免疫誘導型 DC の誘導およびワクチンとしての性質の解析

これまでにウシ胎児血清 (FBS) を用いて培養した細胞性免疫誘導型 DC は、通常型 DC と比較して有意に IL-12 産生能を有すること、また今後の臨床応用を見据えて無血清培地を用いた DC ワクチンの作成を行った結果、ほぼ同様の発現、機能がみられることを確認した。さらにがんと同様内因性抗原も標的とする結核患者の細胞性免疫誘導型 DC のケモカインおよびサイトカイン産生能を確認したところ、タイプ 1 免疫誘導に關与する CCL5, CXCL9, および CXCL10 の産生能は細胞性免疫誘導型 DC で最も産生が亢進していた一方、抑制的に作用する CCL22 は通常型 DC に比し低下していた (図 1)。さらにタイプ 2 型免疫に關与するサイトカインである IL-5 の産生

は極めて低値であった。

図 1.

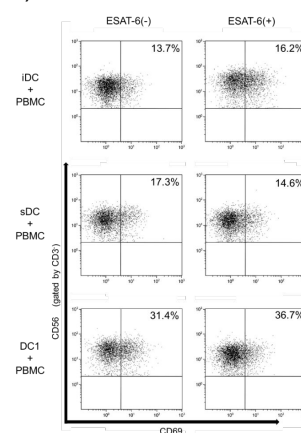


## 2. 作成した細胞性免疫誘導型 DC ワクチンの免疫誘導能の解析

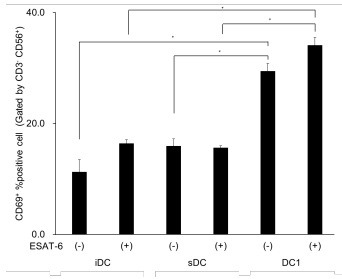
内因性抗原を標的とする結核患者の細胞性免疫誘導型 DC において、抗原 (ESAT-6) を添加 / 非添加した iDC, sDC, DC1 と PBMC を共培養し IFN- $\gamma$  産生を比較すると抗原を添加した DC1 で有意に IFN- $\gamma$  産生能が高値であった。同様に NK 細胞の活性化を比較すると、抗原の有無にかかわらず、DC1 で最も NK 細胞活性が強く認められた (図 2)

図 2

a)



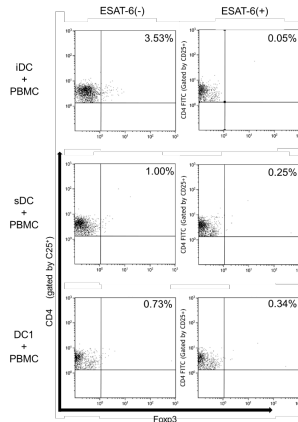
b)



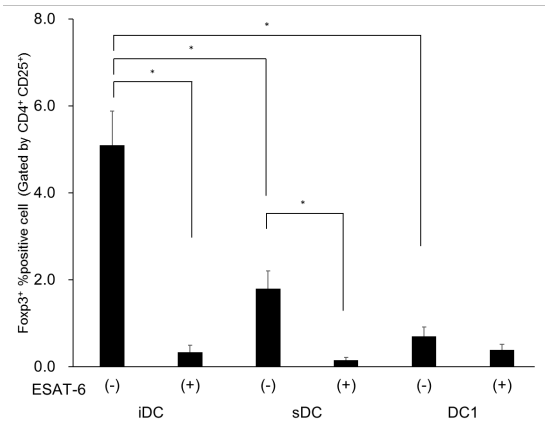
さらに制御性 T 細胞の誘導能を比較すると、DC1 群で明らかに誘導能が低値であった (図 3)。

図 3

a)



b)



現在はマウスモデルを用いての免疫チェックポイント阻害薬との併用療法，腫瘍特異的変異抗原を使用した併用個別化免疫療法への準備を進めている。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Kato S, Inui N, Hozumi H, Inoue Y, Yasui H, Karayama M, Kono M, Suzuki Y, Furuhashi K, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Watanabe H, Suda T: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients with sarcoidosis. *Respir Med.* ;138S:S20-S23, 2018 (査読あり)
2. Karayama M, Inui N, Mori K, Kono M, Hozumi H, Suzuki Y, Furuhashi K, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Watanabe H, Suda T. Respiratory impedance is correlated with airway narrowing in asthma using three-dimensional computed tomography. *Clin Exp Allergy* 48(3):278-287, 2018. (査読あり)
3. Suzuki Y, Oyama Y, Hozumi H, Imokawa S, Toyoshima M, Yokomura K, Nakamura H, Kuroishi S, Karayama M, Furuhashi K, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Koshimizu N, Yamada T, Mori K, Masuda M, Shirai T, Hayakawa H, Sumikawa H, Johkoh T, Suda T. Persistent impairment on spirometry in chronic eosinophilic pneumonia: A longitudinal observation study (Shizuoka-CEP study). *Ann Allergy Asthma Immunol.* Nov;119(5):422-428.e2. 2017 (査読あり)
4. Enomoto Y, Nakamura Y, Satake Y, Sumikawa H, Johkoh T, Colby TV, Yasui H, Hozumi H, Karayama M, Suzuki Y, Furuhashi K, Fujisawa T, Enomoto N, Inui N, Iwashita T, Kuroishi S, Yokomura K, Koshimizu N, Toyoshima M, Imokawa S, Yamada T, Shirai T, Hayakawa H, Suda T: Clinical diagnosis of idiopathic pleuroparenchymal

- fibroelastosis: A retrospective multicenter study. *Respir Med*, 133:1-5, 2017. (査読あり)
5. Nishimoto K, Fujisawa T, Yoshimura K, Enomoto Y, Enomoto N, Nakamura Y, Inui N, Sumikawa H, Johkoh T, Colby TV, Suda T. The prognostic significance of pneumothorax in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology*. 2017 Nov 12. (査読あり)
6. Satake Y, Nakamura Y, Kono M, Hozumi H, Nagata T, Tsujimura K, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Fujiyama T, Tokura Y, Matsui T, Yokomura K, Shirai T, Hayakawa H, Suda T: Type-1 polarized dendritic cells are a potent immunogen against *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis.*, 21:523-530, 2017. (査読あり)
7. Uehara M, Enomoto N, Oyama Y, Suzuki Y, Kono M, Furuhashi K, Fujisawa T, Inui N, Nakamura Y, Suda T: Body size-adjusted dose analysis of pirfenidone in patients with interstitial pneumonia. *Respirology*, 2017. (査読あり)
8. Enomoto Y, Nakamura Y, Colby TV, Johkoh T, Sumikawa H, Nishimoto K, Yoshimura K, Matsushima S, Oyama Y, Hozumi H, Kono M, Fujisawa T, Enomoto N, Inui N, Iwashita T, Suda T: Radiologic pleuroparenchymal fibroelastosis-like lesion in connective tissue disease-related interstitial lung disease. *PLoS One*, 12:e0180283, 2017. (査読あり)
9. Nishimoto K, Karayama M, Inui N, Mori K, Kono M, Hozumi H, Suzuki Y, Furuhashi K, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Watanabe H, Suda T: Relationship between fraction of exhaled nitric oxide and airway morphology assessed by three-dimensional CT analysis in asthma. *Sci Rep*, 7:10187, 2017. (査読あり)
10. Hozumi H, Fujisawa T, Enomoto N, Nakashima R, Enomoto Y, Suzuki Y, Kono M, Karayama M, Furuhashi K, Murakami A, Inui N, Nakamura Y, Mimori T, Suda T: Clinical Utility of YKL-40 in Polymyositis/dermatomyositis-associated Interstitial Lung Disease. *J Rheumatol*, 44:1394-1401, 2017. (査読あり)
11. Fujisawa T, Hozumi H, Kono M, Enomoto N, Nakamura Y, Inui N, Nakashima R, Imura Y, Mimori T, Suda T: Predictive factors for long-term outcome in polymyositis/dermatomyositis-associated interstitial lung diseases. *Respir Investig*, 55:130-137, 2017. (査読あり)
12. Enomoto Y, Nakamura Y, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Suda T: Japanese herbal medicine-induced pneumonitis: A review of 73 patients. *Respir Investig*, 55:138-144, 2017. (査読あり)
13. Karayama M, Inui N, Mori K, Kono M, Hozumi H, Suzuki Y, Furuhashi K, Hashimoto D, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Watanabe H, Suda T: Respiratory impedance is correlated with morphological changes in the lungs on three-dimensional CT in patients with COPD. *Sci Rep*, 7:41709, 2017. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 1. Nakamura Y, Colby T, Kono M, Enomoto N, Oyama Y, Enomoto Y, Mori K, Hozumi H, Suzuki Y, Karayama M, Furuhashi K, Fujisawa T, Inui N, Baba S, Miura K, Suda T: Prognostic significance of histopathologic features in rheumatoid lung disease. American Thoracic Society. 2017.5. (Washington, DC)
2. Nakamura Y: Dendritic Cell based Vaccines: Current Status for Cancer Immunotherapy and Application for Infectious Diseases. Hamamatsu-Kyungpook Joint Medical Symposium. 2015. Daegu (Korea) 【preliminary speaker】
3. Nakamura Y, Satake Y, Johkoh T, Sumikawa H, Hozumi H, Kusagaya H, Oyama Y, Kono M, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Colvy T.V., Suda T: Idiopathic pleuroparenchymal fibroelastosis: Consideration of its diagnosis. 111 th American Thoracic Society International Conference. 2015. Denver (USA).

〔図書〕(計 1 件)

1. 中村祐太郎, 須田隆文: Pleuroparenchymal fibroelastosis (PPFE). 呼吸器疾患: Clinical-Radiological-Pathological Approach. 藤田次郎(編), 南江堂, p136-39. 2. 2017.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

浜松医科大学第二内科(呼吸器内科)

ホームページ:

<http://hamamatsu-lung.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 祐太郎 (NAKAMURA YUTARO)

浜松医科大学附属病院 講師

研究者番号: 60436962

(2) 研究分担者

須田 隆文 (SUDA TAKAFUMI)

浜松医科大学 医学部 教授

研究者番号: 30291397