

令和元年6月3日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10677

研究課題名(和文) がん間質での免疫応答に着目した非小細胞肺癌に対する新規がん免疫治療の開発

研究課題名(英文) Development of cancer immunotherapy targeting for the immune responses in tumor stroma in non-small cell lung cancer

研究代表者

寺本 晃治 (Teramoto, Koji)

滋賀医科大学・医学部・特任講師

研究者番号：10452244

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)：本研究においては、非小細胞肺癌のがん間質におけるがん免疫応答を解析するために、主要ながん間質細胞であるがん関連線維芽細胞(CAF)における免疫チェックポイント分子であるPD-L1の発現制御と、その意義について解析を行った。その結果、CAFのPD-L1発現は、インターフェロンガンマにより可逆的に制御されることが判明した。非小細胞肺癌において、PD-L1を発現したCAFの存在する群では、存在しない群に比較して、有意に予後(手術後の無再発生存期間)が良好であり、独立した予後因子であることが判明した。このことから、CAFのPD-L1発現は、抗腫瘍免疫応答の誘導を示唆している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非小細胞肺癌組織において、免疫チェックポイント分子であるPD-L1は、単にがん細胞のみならず、がん間質のがん関連線維芽細胞(CAF)も発現していることを見出した。CAFにおけるPD-L1発現は、インターフェロンガンマにより可逆的に制御されることが、活性化リンパ球との細胞間相互作用が必要であることが示唆された。臨床的意義については、転移を有さない非小細胞肺癌において、CAFにおけるPD-L1発現は独立した予後因子であることが判明した。このことから、CAFのPD-L1発現は、非小細胞において抗腫瘍免疫応答の誘導を示唆しており、手術後の予後予測のバイオマーカーとなると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, to clarify the immune responses in tumor stroma in non-small cell lung cancer (NSCLC), we focused on a dominant stromal cell type, cancer-associated fibroblasts (CAFs). We examined the regulation of PD-L1 expression on CAFs and the clinical significance of PD-L1 expression on CAFs in NSCLC. As results, PD-L1 expression on CAFs is reversibly regulated by interferon-gamma. Patients with PD-L1-positive CAFs had significantly better prognosis (prolonged relapse-free survival after surgery) than patients with PD-L1-negative CAF, demonstrating that PD-L1 expression on CAFs is an independent prognostic biomarker. These results suggest that PD-L1 expression on CAFs indicates the induction of anti-tumor immune responses in NSCLC.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：がん関連線維芽細胞 非小細胞肺癌 PD-L1 がん間質 がん免疫応答 予後予測バイオマーカー

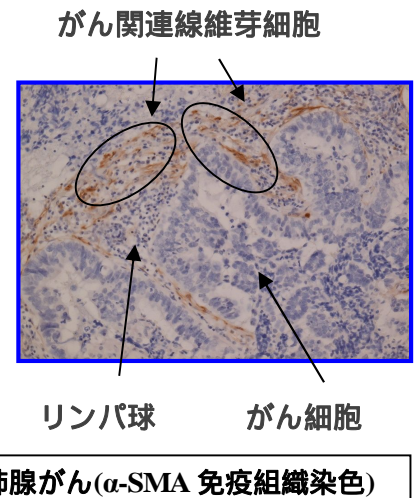
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、免疫チェックポイント阻害薬やキメラ抗原受容体発現 T 細胞療法の開発により、がん免疫治療は大きな発展を見せている。免疫チェックポイント阻害薬である抗 PD-1 抗体の Nivolumab は、129 例の進行非小細胞肺癌に対する第 I 相試験で、奏効率が 17%、中央生存期間 9.9 か月という抗腫瘍効果を示した (Topalian SL et al. N Engl J Med, 2015)。しかし、抗 PD-1 抗体単剤での抗腫瘍効果は、非小細胞肺癌の根治という目的においては、未だ、満足できるものではない。非小細胞肺癌の根治のためには、非小細胞肺癌における抗腫瘍免疫応答の複雑性やがん組織の不均一性を考慮した、新しい概念に基づく新規のがん免疫治療法の研究開発が必要である。

我々は、早くから、がん免疫応答の複雑性に注目して、がん免疫治療の開発に関する研究を行ってきた。つまり、従来のがん免疫治療では、がん細胞を傷害する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の活性化のみに主眼が置かれていたが、我々は、CTL だけではなくヘルパー T 細胞を含む他のエフェクター免疫細胞群を同時に活性化した総力で抗腫瘍効果を獲得することが重要であると報告してきた (Teramoto K et al. Cancer Res 2003, Teramoto K et al. Cancer Immunol Immunother 2007, Teramoto K et al. J Cancer Res Clin Oncol 2012)。

がん組織に関しては、がん組織の不均一性、つまり、がん組織は、単にがん細胞のみから成る均一な組織ではなく、がん細胞とこれらを涵養する間質細胞からなる複雑な複合組織であることに着目してがん治療法の開発を行ってきた。そこでは、単にがん細胞のみを標的にした治療法では、抗腫瘍効果に限界が生じると考え、がん細胞のみならず、がん間質細胞の制御をも組み込んだ治療法が理想的であると考えた。この観点から研究を進めた結果、がん細胞とがん間質細胞が分泌する Transforming growth factor- β (TGF- β) が、抗腫瘍免疫応答の惹起の場である腫瘍所属リンパ節で抗腫瘍免疫応答を抑制しており、腫瘍所属リンパ節における TGF- β の機能阻害が、全身性の抗腫瘍免疫応答を改善させることを見出した (Fujita T, Teramoto K* et al. Cancer Res 2009, *corresponding author)。また、がん間質細胞のうち、がん関連線維芽細胞が、抑制性の免疫細胞群を活性化させること (Ohshio Y, Teramoto K* et al. Scand J Immunol 2014, Cancer Sci 2015. *corresponding author) から、がん間質におけるがん関連線維芽細胞と免疫担当細胞群との細胞間相互作用を介した “pro-tumorigenic” な働き着目するようになった (上図: α -SMA はがん関連線維芽細胞のマーカー)。



また、別の観点から、がん患者の抗腫瘍免疫応答の疲弊は、がん組織の増大と共に変化する生理学的な組織内環境にも起因していると推察した。がん組織に特徴的な組織内環境の一つである低酸素状態 (Hockel M et al. J Natl Cancer Inst 2001) と、低酸素応答で鍵分子として主要な役割を果たす転写因子である Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) (Semenza GL. Nat Rev Cancer, 2003) に着目して、抗腫瘍免疫応答との関連性について検証を行ったところ、担がんマウスモデルにおいて HIF-1 機能を阻害すると、腫瘍組織内の TGF- β の分泌が減少して腫瘍所属リンパ節で抑制性の免疫細胞群の割合が減少した結果、全身性のがん抗原特異的な抗腫瘍免疫応答が改善し、腫瘍増殖が抑制されることを見出した。

これらのことから、非小細胞肺癌において、がん組織の増大に伴う低酸素状態により、がん間質におけるがん関連線維芽細胞と免疫担当細胞群との相互作用は、どのような影響を受け

のかという疑問が生じ、がん組織の増大→がん間質における低酸素状態が進行→がん関連線維芽細胞の HIF-1 機能の活性化→がん関連線維芽細胞の“pro-tumorigenic”な機能の増強→がん関連線維芽細胞による抗腫瘍免疫応答のより強力な抑制、という仮説を立てた。このことから、低酸素状態にあるがん間質は、がん間質細胞群の相互作用によって抗腫瘍免疫応答が制御される場であると推察され、がん間質での抑制性の細胞間相互作用を阻害して抗腫瘍免疫応答を改善できれば、このような概念は、非小細胞肺癌に対する新規のがん免疫治療法に応用でき得ると考えた。

2．研究の目的

非小細胞肺癌に対するがん免疫治療は、免疫チェックポイント阻害薬の登場により注目を浴びているが、それでも、未だ根治には至らず、非小細胞肺癌の根治のためには、新規の概念に基づくがん免疫治療法の開発が必要である。本研究では、非小細胞肺癌組織の不均一性に着目し、がん間質の“pro-tumorigenic”な機能、特に、がん組織の増大に伴って生じる低酸素状態という特徴的な腫瘍内環境において、代表的ながん間質細胞であるがん関連線維芽細胞に制御を受けるがん免疫応答に焦点を当てる。低酸素状態でのがん間質におけるがん関連線維芽細胞と免疫担当細胞群との相互作用を系統的に解明することを通して、がん間質における抑制性ががん免疫応答の阻害を戦略として応用した非小細胞肺癌に対する新規がん免疫治療法の開発を目的とする。

3．研究の方法

低酸素状態の進行に伴うがん間質細胞のプロファイルの変化に関する研究:非小細胞肺癌の増大に伴う低酸素状態と、がん間質の免疫担当細胞群のプロファイルとの関連について調査する。

低酸素状態のがん関連線維芽細胞の特性と免疫担当細胞との相互作用に関する研究:低酸素状態によって影響を受けるがん間質線維芽細胞のがん免疫応答に関連する液性因子や表面マーカーの発現と、免疫担当細胞群との相互作用を介した抗腫瘍免疫応答への影響について調査する。

4．研究成果

低酸素状態の進行に伴うがん間質細胞のプロファイルの変化に関する研究：

がん組織における低酸素状態とがん間質における細胞間相互作用について、抗腫瘍免疫応答に着目して研究を行った。非小細胞肺癌組織から単離したがん関連線維芽細胞を低酸素状態で培養し、PD-L1 分子の発現について、フローサイトメトリーと RT-PCR で調べたが、タンパクレベルおよび mRNA レベル共に、発現の亢進は認めなかった。一方で、がん関連線維芽細胞をインターフェロンガンマで刺激して培養すると 48 時間後には、タンパクレベルおよび mRNA レベル共に、PD-L1 分子の発現の亢進を認めた。この時点で、インターフェロンガンマの刺激を中止すると、48 時間後には、PD-L1 分子の発現レベルはベースラインレベルにまで低下した。このことから、がん関連線維芽細胞の PD-L1 発現は、インターフェロンガンマにより可逆性に制御されることが判明した。

低酸素状態のがん関連線維芽細胞の特性と免疫担当細胞との相互作用に関する研究：

インターフェロンガンマは腫瘍微小環境においては、主に活性化したリンパ球から分泌されることから、活性化リンパ球とがん関連線維芽細胞の相互作用について調査した。ヒト末梢血

単核球から活性化リンパ球を誘導して実験に用いた。誘導した活性化リンパ球は、イオノマイシンとPMAで刺激すると、インターフェロンガンマを分泌すること、多くの誘導した活性化リンパ球は、CD8陽性細胞であることを確認した。このような活性化リンパ球を、がん関連線維芽細胞と共培養した後、がん関連線維芽細胞のPD-L1発現についてフローサイトメトリーで調べたところ、PD-L1発現の亢進を認めた。

次に、非小細胞肺癌手術例において、がん組織に対してPD-L1免疫組織染色を行い、PD-L1を発現したがん関連線維芽細胞の存在と、無再発生存期間との関連について調査した。その結果、PD-L1を発現したがん関連線維芽細胞が存在する群では、存在しない群に比較して、有意に予後（手術後の無再発生存期間）が良好であり、独立した予後因子であることが判明した。このことから、がん関連線維芽細胞のPD-L1発現は、抗腫瘍免疫応答の誘導を示唆している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Tomoyuki Igarashi, Koji Teramoto, Mitsuaki Ishida, Jun Hanaoka, Yataro Daigo. The mechanism of de novo expression of programmed cell death-ligand 1 in squamous cell carcinoma of the lung. *Oncology Reports*. 38(4), 2189-2196, 2017.
2. Yoko Kataoka, Yasuhiko Ohshio, Koji Teramoto, Tomoyuki Igarashi, Tohru Asai, Jun Hanaoka. Hypoxia-induced galectin-3 enhances RhoA function to activate the motility of tumor cells in non-small cell lung cancer. *Oncology Reports*. 41 (2), 853-862, 2019.

〔学会発表〕(計5件)

1. 寺本晃治、五十嵐知之、住本秀敏、醍醐弥太郎。非小細胞肺癌におけるがん関連線維芽細胞のPD-L1発現について。第15回日本臨床腫瘍学会学術集会。2017年7月27日～29日、神戸寺本晃治、片岡瑛子、五十嵐知之、住本秀敏、醍醐弥太郎。低酸素の腫瘍環境により誘導された抑制性免疫応答の制御。第76回日本癌学会学術総会。2017年9月28日～30日、横浜。
2. 寺本晃治、片岡瑛子、五十嵐知之、住本秀敏、醍醐弥太郎。低酸素の腫瘍環境により誘導された抑制性免疫応答の制御。第76回日本癌学会学術総会。2017年9月28日～30日、横浜。
3. 寺本晃治、五十嵐知之、住本秀敏、醍醐弥太郎。非小細胞肺癌におけるがん関連線維芽細胞のPD-L1発現。第16回日本臨床腫瘍学会学術集会。2018年7月19日～21日、神戸。
4. 寺本晃治、五十嵐知之、住本秀敏、醍醐弥太郎。非小細胞肺癌における血中可溶性PD-L1の継時的変動について。第77回日本癌学会学術総会。2018年9月27日～29日、大阪。
5. 寺本晃治、五十嵐知之、住本秀敏、醍醐弥太郎。非小細胞肺癌におけるがん関連線維芽細胞のPD-L1発現制御。日本人類遺伝学会 第63回大会。2018年10月11日～13日、横浜。
- 6.

〔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：醍醐弥太郎
ローマ字氏名：Daigo Yataro
所属研究機関名：滋賀医科大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：30345029

研究分担者氏名：五十嵐知之
ローマ字氏名：Igarashi Tomoyuki
所属研究機関名：滋賀医科大学
部局名：医学部
職名：助教
研究者番号（8桁）：00510314

研究分担者氏名：片岡瑛子
ローマ字氏名：Kataoka Yoko
所属研究機関名：滋賀医科大学
部局名：医学部
職名：医員
研究者番号（8桁）：00746919

(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。