

平成30年6月21日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19977

研究課題名(和文) がん間質細胞の骨髄からの導引阻害を組み込んだ肺がん免疫治療法の開発

研究課題名(英文) Study on lung cancer immunotherapy incorporating inhibition of derivation of CAFs progenitor from bone marrow

研究代表者

大塩 恭彦 (Ohshio, Yasuhiko)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：60731916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス肺がん細胞株、ヒト肺がん細胞株を用いての検討ではアンジオテンシン 受容体拮抗薬はがん細胞が分泌する重要なケモカインCCL2の分泌能に影響を与えなかった。肺癌手術検体を用いた評価では腫瘍内のがん間質線維芽細胞の分布と喫煙に関連する因子とが関連しており、3次元画像解析ワークステーションを用いて算出された肺野における低吸収域LAAが最も関連していた。喫煙に伴う血中の炎症性サイトカイン濃度の上昇が、腫瘍微小環境におけるCAFの分化、増殖に寄与しているものと推察され、肺気腫の客観的指標であるLAAが血中の炎症性サイトカイン濃度の予測因子となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：CAF in lung cancer tissue were increased in COPD. The degree of emphysematous change would be more related by the frequency of CAFs. Among the various COPD parameters, LAA would be more related to the number of CAFs in tumor microenvironment. Because parameters obtained from the pulmonary function test and smoking index are often affected by the skill and memory of the patients, LAA might be more reliable to predict the frequency of CAFs. These results suggested that intervention in COPD might be one of the CAFs targeted strategies.

研究分野：腫瘍微小環境

キーワード：がん間質細胞

## 1. 研究開始当初の背景

手術、化学療法、放射線治療に続く第4のがん治療法としてがん免疫治療が注目されている。我々は肺がんに対しがん抗原の1つMUC-1を標的とした樹状細胞ワクチン療法を高度先進医療で行ってきた。樹状細胞ワクチン療法は、腫瘍抗原ペプチドを付与した樹状細胞を肺がん患者に投与することで、腫瘍抗原特異的に細胞傷害性Tリンパ球を誘導し、これにより抗腫瘍効果を獲得するものである。しかし、がん組織はがん細胞とこれを涵養するがん間質細胞との複合体であることを考えると、単にがん細胞のみを標的した従来の樹状細胞ワクチン療法では抗腫瘍効果がやはり不十分である。

我々は、より抗腫瘍効果の高い樹状細胞ワクチン療法の開発には、がん細胞とがん間質細胞が共に標的とされるべきと考えている。がん関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts, CAF) は腫瘍微小環境において主要な間質細胞であり、増殖因子、細胞外マトリックスやプロテアーゼの産生能が高く、腫瘍の増殖を促進する役割を担っており、肺がんをはじめ様々ながん種においてCAFのがん組織中での含有率が予後と逆相関することが分かっている。

これまでに我々は、CAFが抑制性の免疫細胞である抑制性T細胞 (Treg) や骨髄由来抑制性細胞 (MDSC) の誘導能をもつこと、抗線維化薬トラニラスト (リザベン®) によりCAFを阻害することでTreg、MDSCの誘導能を抑制することを確認した (Ohshio Y et al. Scand J Immunol, 80:408-16, 2014)。さらに担がんマウスモデルにおいて、腫瘍内のCAFをトラニラストで阻害することで、担がん状態により疲弊した全身性の免疫応答を改善し、さらに樹状細胞ワクチン療法の抗腫瘍効果を増強させ得ることを、肺がんをはじめリンパ腫、メラノーマ細胞株を用いて確認した (Cancer Sci. 106:134-42, 2015)。ただこのトラニラストによる阻害機序は、CAFの増殖能の抑制およびCAFによる抗腫瘍免疫を負に制御する液性因子の分泌抑制を介したTreg、MDSCの減少からなっている。CAFの細胞分裂能はがん細胞に比べ著明に低く、腫瘍内に多数のCAFを維持するには恒常的なCAF前駆細胞の腫瘍内への取り込みとCAFへの分化誘導が必要と考えられることから、CAF前駆細胞の腫瘍内への供給を抑制できれば、より効果的に抗腫瘍免疫応答を増強できるのではと考えた。

実臨床を視野に入れたCAF前駆細胞の供給阻害法を模索する中、我々は高血圧治療薬として市販されているアンジオテンシン受容体拮抗薬 (ARB) がもたらす臓器保護作用にCCL2が関わっている事実に着目した。

CCL2はCAF前駆細胞の供給源として特に重要と考えられている骨髄 (Ishii G et al. Int J Cancer 117, 212-220, 2005) に存在する細胞を強力に導引する作用を持つ、おもにがん細胞が分泌する重要なケモカインの1つであり、同シグナルを標的とした治療法が有効な抗がん治療となる可能性が示唆されているが (Sica A et al. Cancer Lett. 267, 204-215, 2008)、ARBによるヒト単球からのCCL2分泌抑制や、肺線維症モデルでの肺組織内および糖尿病モデルでの糸球体におけるCCL2発現の抑制が報告されていることから

(Proudfoot JM et al. J Pharmacol Exp Ther. 305, 846-853, 2003, Tanaka J et al, Respir Investig. 51, 76-83, 2013, Kato S et al. Kidney Int. 56, 1037-1048, 1999) CAF前駆細胞は肺がん細胞が分泌するCCL2によって骨髄から導引されているのではないかと、CCL2の分泌をARBで阻害できないか、それによって腫瘍微小環境へのCAF前駆細胞の供給を抑制できないかと仮定した。さらに肺がん細胞によるCCL2分泌の阻害を介した腫瘍微小環境でのCAFの減少が、担がん宿主の抗腫瘍免疫応答を改善できないか、併用するがん免疫治療法の抗腫瘍効果をより増強できないかと考えた。

## 2. 研究の目的

これまでに我々は、正常マウスから採取した骨髄細胞をマウス肺がん細胞と共培養することで、形態学的にCAFと矛盾しない、CAF様細胞を誘導できることを予備的に確認している。上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、研究期間内には以下のことを明らかにすることとした。

1) CCL2により骨髄から導引される前駆細胞からCAFが誘導できるか調べる。

2) 肺がん細胞が分泌するCCL2をARBで阻害できるか、それにより腫瘍微小環境におけるCAFを減少できるか調べる。

3) 肺がん細胞によるCCL2分泌の阻害を介した腫瘍微小環境でのCAFの減少が、宿主の疲弊した抗腫瘍免疫応答にどのような影響を及ぼすのか調べる。

4) ARBによる骨髄からのCAF前駆細胞供給阻害を併用することで、樹状細胞ワクチン療法の抗腫瘍効果を増強できるか調べる。

以上をin vitro実験および担がんマウスモデルを用いたin vivo実験で確かめることを当初の計画としていた。

## 3. 研究の方法

(1) 各種肺がん細胞に与える ARB の影響についての解析

マウス肺がん細胞株 (LLC1、3LL)、ヒト肺がん細胞株 (A549、QG56) に各種 ARB (イルベサルタン、ロサルタン、テルミサルタンなど) を加えて 2~5 日間培養後、上清を回収し、腫瘍細胞の CCL2 分泌能に与える影響を ELISA 法で評価する。同時に腫瘍細胞を回収し、CCL2 の mRNA の発現に与える影響を RT-PCR 法で評価する。腫瘍細胞に ARB を加えて培養後、MTT アッセイを行って、ARB の腫瘍細胞の増殖能等への直接の影響が無いか確認しておく。

以降の実験には CCL2 への抑制効果の最も高かった ARB を用いて行うこととする。

(2) CAF 前駆細胞の導引に与える CCL2 の作用についての解析

マウス (C57BL/6) 骨髄細胞を用いて CCL2 の導引に関わる影響を明らかにする。

a. CCL2 により導引される細胞から CAF が誘導できるか。

多孔性メンブラン (孔径 5 $\mu$ m) で隔てられたダブルチャンバーの上室に正常マウスから採取した骨髄細胞を、下室にマウスリコンビナント CCL2 (5-10ng/mL) を置き (Kudo-Saito C et al. Clin Exp Metastasis 30, 393-405, 2013)、下室に遊走した細胞を回収する。さらにマウス肺癌細胞株 LLC1 あるいは 3LL と回収した細胞を共培養し、誘導される細胞の形態の観察や CAF のマーカー (SMA, podoplanin など) を確認することで、CAF 様の細胞が誘導されることを確認する。

b. 腫瘍細胞の CCL2 阻害が骨髄細胞の導引に影響を与えるか。

LLC1 あるいは 3LL に ARB を加えて培養した上清を上記同様にダブルチャンバー下室に置く。一方 LLC1 あるいは 3LL の培養上清にマウス抗 CCL2 (1-10 $\mu$ g/mL) 抗体を加え、同様にダブルチャンバー下室に置き、それぞれ上室においた骨髄細胞の下層への遊走に与える影響を、コントロール IgG 抗体を加えた群と比較する。LLC1 あるいは 3LL にマウス抗 CCL2 (1-10 $\mu$ g/mL) 抗体あるいはコントロール IgG 抗体を加えて培養し、MTT アッセイを行って、LLC1 への直接の影響が無いことを確認しておく。

(3) 腫瘍微小環境への CAF 前駆細胞の導引に与える CCL2 の作用についての解析

C57BL/6 野生型マウスに 10Gy の放射線を照

射後、GFP トランスジェニックマウスから採取した骨髄細胞を尾静脈から  $1 \times 10^7$  個移植する。骨髄細胞移植 1 ヶ月後に移植細胞の生着を確認し、LLC1 あるいは 3LL (5 $\times$ 105 個) を同マウスの側腹部に皮下移植し担がんマウスを作製して、腫瘍内あるいは腹腔内に ARB あるいはマウス抗 CCL2 抗体 (10-100 $\mu$ g、あるいはアイソタイプコントロール IgG) を投与して (Kudo-Saito C et al. Clin Exp Metastasis 30, 393-405, 2013)、腫瘍内に導引される CAF (GFP 陽性、SMA 陽性細胞) を免疫組織化学染色で評価する。

(4) CCL2 中和抗体による CAF 前駆細胞の導引阻害が抗腫瘍免疫応答に影響についての解析

上記 (3) で腫瘍内の骨髄由来 CAF が ARB あるいは CCL2 中和抗体の投与によって減少することが確かめられたら、LLC1 あるいは 3LL (5 $\times$ 105 個) を C57BL/6 野生型マウスの側腹部に皮下移植し担がんマウスを作製して、腫瘍内あるいは腹腔内に ARB あるいはマウス抗 CCL2 抗体 (10-100 $\mu$ g、あるいはアイソタイプコントロール IgG) を投与して、腫瘍内に導引される CAF (SMA 陽性細胞) を免疫組織化学染色で評価する。

さらに、腫瘍、腫瘍所属リンパ節、骨髄あるいは脾臓における Treg や MDSC の割合を免疫組織化学染色やフローサイトメトリーで評価する。抗原特異的細胞傷害性 T 細胞については、所属リンパ節や脾臓の細胞を腫瘍抗原ペプチドで刺激し、インターフェロンガンマを産生する T リンパ球をフローサイトメトリーで評価することで、局所および全身性の抗腫瘍免疫応答に与える影響を調べる。さらに、脾細胞を腫瘍抗原ペプチドで刺激し、腫瘍細胞と共培養し遊離される乳酸脱水素酵素 (LDH) を測定し、抗原特異的な細胞傷害性を評価する。また、腫瘍径をモニタリングし、腫瘍増殖に与える影響を評価する。

(5) 腫瘍微小環境への CAF 供給阻害が樹状細胞ワクチンの抗腫瘍効果に与える影響についての解析

上記 (4) で局所および全身性の抗腫瘍免疫応答の増強効果が確かめられたら、同様に得られた担がんマウスモデルに樹状細胞ワクチンを投与する。(4) 同様に抗腫瘍免疫応答に与える影響および腫瘍増殖に与える影響を評価し、ARB による骨髄から腫瘍微小環境への CAF 前駆細胞の供給阻害の併用が、樹状細胞ワクチンの効果を相乗的に増強させるかを確かめる。

#### 4. 研究成果

マウス肺がん細胞株 (LLC1、3LL)、ヒト肺

がん細胞株(A549, QG56)にイルベサルタン、ロサルタン、テルミサルタンなどを加えて2日間、あるいは5日間培養後、上清を回収し、腫瘍細胞のCCL2分泌量をELISA法を用いて評価したが、有意な差は認めなかった。一方でmRNAの発現や増殖能に対しても有意な影響を及ぼさなかった。

そこで、倫理委員会の承認の下、肺癌手術検体を用いてCAFの分布について免疫組織化学染色法を用いて評価を行った。血中の炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8などがCAFの活性化や増殖に寄与すると考えられることから、炎症性サイトカインの上昇に寄与し得る喫煙に焦点をあてることとした。

当科で2015年1月から12月までに行われた肺癌手術101例のうち1秒率が70%未満であった37例、70%以上であった8例に対し、腫瘍内のCAFの分布とBrinkman index(BI)一秒率、慢性閉塞性肺疾患(COPD)の病期、CT画像上の気腫性変化であるLow attenuation area(LAA)との関連を評価することとした。

LAAについては術前に施行されたCT検査で得られたDICOMデータをもとに、3次元画像解析ワークステーションSYNAPSE VINCENTを用いて算出した。なお今回の評価ではLAAをCT値が-950HU未満、全肺野面積に占めるLAAを%LAAと定義した。

結果、腫瘍内のSMA陽性細胞の分布は1秒率が70%以上の群は70%未満の群と比較し多い傾向にあったが有意差はなかった。単変量解析では性別、COPD病期では有意差はなく、年齢、%LAA、BI、1秒量で有意差を認めた。組織型やT因子、N因子、病理病期、分化度、胸膜浸潤、静脈侵襲、リンパ管侵襲などの臨床病理学的因子については有意差を認めなかった。%LAA、BI、1秒量について多変量解析を行ったところ、%LAAが腫瘍内のCAFの分布に有意に関連していることが分かった。

BIや1秒量は患者の記憶や技量に左右され、また肺気腫の間接的な指標であるといえる。一方LAAの評価についてはこれまで用いられてきたGoddard分類が主観的視覚評価であるのに対し、今回用いたSYNAPSE VINCENTなどの3次元画像解析ワークステーションはLAAを自動的に算出するもので、より客観的な指標といえる。

本検討から、喫煙に伴う血中の炎症性サイトカイン濃度の上昇が、腫瘍微小環境におけるCAFの分化、増殖に寄与しているものと推察され、肺気腫の客観的指標であるLAAが血中の炎症性サイトカイン濃度の予測因子となり得る可能性が示唆され、COPDに対する抗炎症治療や禁煙は、癌間質を阻害するターゲットとなりうると考えられた。なお、本検討で得られた結果については2017年10月14日に第58回日本肺癌学会学術集会で(一般演題(口演)44、肺癌と間質性肺炎、044-4)、2017年10月16日に国際学会である18th

World Conference on Lung Cancerで(P1.02 - Biology/Pathology)それぞれ発表した。

本検討とは別に、骨髄細胞を起源とし、がんの増殖やがん免疫応答への負の影響が報告されているがん間質細胞である間葉系幹細胞(MSC)や後者は腫瘍関連マクロファージ(TAM)についても評価すべく、CD105、CD73、CD90陽性細胞、あるいはCD11b、F4/80、CD68、CD163陽性細胞についても検討をはじめている。

## 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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

2017年10月14日  
第58回日本肺癌学会学術集会  
一般演題(口演)44、肺癌と間質性肺炎、  
「COPDが肺癌微小環境に与える影響についての検討」

2017年10月16日  
18th World Conference on Lung Cancer  
P1.02 - Biology/Pathology  
「The effect of chronic obstructive pulmonary disease on the tumor stroma in non-small cell lung cancer.」

[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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塩恭彦 ( Yasuhiko Ohshio )

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：60731916

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし ( )