

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09663

研究課題名(和文) 肺線維症合併肺癌に対する制御性T細胞を標的とした新たな治療戦略の探索

研究課題名(英文) Search for new therapeutic strategies targeting regulatory T cells for lung cancer with pulmonary fibrosis

研究代表者

本津 茂人 (Shigeto, Hontsu)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90458034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：当院で2012年1月からの5年間に手術療法を行った肺線維症(IPF)合併肺癌を試験群、年齢、病期、組織型等を調整した症例を対照群とし、無再発生存期間(PFS)、全生存期間(OS)、腫瘍に浸潤する制御性T細胞(Treg)および細胞傷害性T細胞(CTL)の検討を行った。IPF合併肺癌はPFS、OSとも有意に悪く、予後因子として腫瘍浸潤Treg数の増加、CTL/Treg比の低下が関連していた。プレオマイシン誘導肺線維症モデルに肺癌細胞株を接種し、IPF合併肺癌モデルを作成した。IPF合併肺癌モデルでは、腫瘍が顕著に増加、増大しており、腫瘍へのTreg浸潤が線維化と腫瘍増大と関連する事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺線維症合併肺癌患者の予後不良因子の免疫学的機序の1つとして、制御性T細胞(Treg)の腫瘍浸潤の増加および細胞傷害性T細胞/Treg比が低下する事が明らかになった。更に、肺線維症合併肺癌マウスモデルにおいて、腫瘍増大および肺線維化の双方にTregの関与が示唆された。肺線維症合併肺癌の治療において腫瘍増大および肺線維化の両方を抑制する治療ターゲットとしてTregの重要性を示唆する知見が得られた。今後、抗体によるTregの除去やTregの分化、活性化および増殖に関する遺伝子や分子を標的とした治療の開発により、肺線維症合併肺癌の治療成績の向上につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lung cancer patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) who underwent surgical treatment for 5 years from January 2012 at Nara Medical University hospital were enrolled as a test group, and patients adjusted for age, stage, histology, etc. were enrolled as control group for progression-free survival (PFS), overall survival (OS), tumor-infiltrating regulatory T cells (Treg) and cytotoxic T cells (CTL) were investigated. Lung cancer patients with IPF was significantly worse in both PFS and OS, and was associated with an increase in the number of tumor infiltrating Tregs and a decrease in the tumor infiltrating CTL / Treg ratio as prognostic factors. A lung cancer cell line (LLC) was inoculated into a bleomycin-induced lung fibrosis mouse model to create a lung cancer model with IPF. In the lung cancer model with IPF, tumors increased and expanded significantly, suggesting that Treg infiltration into tumors is associated with lung fibrosis and tumor enlargement.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：制御性T細胞 肺線維症合併肺癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

肺の線維化は炎症反応や様々な刺激によって生じた肺胞上皮細胞の傷害に対して、過剰な修復が起こった結果引き起こされ、慢性化すると換気障害などの呼吸困難を起こして死に至る。その大部分は原因が特定されていない特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis, IPF) であり、国内患者数約 1 万 5 千人、5 年生存率が約 30%と予後不良の難病として、厚生労働省から特定疾患に指定されている。IPF は他の間質性肺炎と比べて、ステロイドや免疫抑制剤に対する反応性が悪く、近年開発されたビルフェニドンやニンテダニブも、その効果は病態進行の抑制に留まっている。また、高率に肺癌を合併することが臨床問題となっている。肺癌は呼吸不全、心不全に次ぐ IPF の死因であり、肺癌発症率は通常の 7-14 倍高いことが報告されている (Hubbard et al, 2000)。しかし、IPF 合併肺癌では、線維化と腫瘍が互いにどのような影響を与えているかは十分に理解されておらず、低肺機能、急性増悪を懸念して、既存の治療法 (手術療法、放射線治療、化学療法) は困難な場合が多い。よって、肺線維症の病態を悪化させず、肺癌を抑制することができる新たな治療法の開発が望まれている。

近年、がん免疫療法は、抗 CTLA-4 抗体 (イピリムマブ) ならびに抗 PD-1 抗体 (ニボルマブ) などの免疫チェックポイント阻害薬の開発、実用化によって飛躍的な進歩を遂げた。これらは、抗原認識時または標的攻撃時に働く免疫回避機構を解除することで、T 細胞の活性化を増強し、効果的な免疫応答を誘導するものである (図 1)。

日本ではイピリムマブが悪性黒色腫と非小細胞肺癌に対して適応承認されており、現在も様々ながんに対して臨床試験が行われている。しかし、IPF 合併肺癌に対しては、腫瘍に対する免疫の活性化が線維化を増悪させるリスクを考慮して臨床試験の対象から除外され

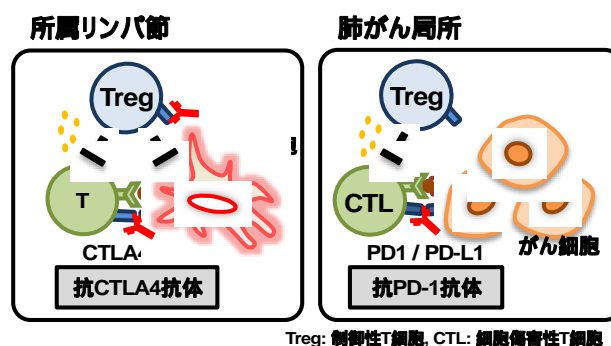


図1. がん免疫抑制機構と免疫チェックポイント分子阻害薬

れており、肺の線維化と腫瘍が共存する環境での免疫系の働きを理解する必要がある。

申請者は免疫応答の抑制に働く制御性 T 細胞 (Regulatory T cells, Treg) に着目し、Treg の分化ならびに機能維持に必須な転写因子 Foxp3 に対する抗体を樹立し、Treg が腫瘍局所および所属リンパ節で抗腫瘍免疫を抑制することを明らかにした (Hontsu et al 2005)。その後、様々ながんにおいて腫瘍局所へ浸潤した制御性 T 細胞数と予後が関連することが示され (Petersen et al 2006)、Treg の除去は種々の腫瘍モデルで顕著な効果をあげたことから、Treg 除去を対象とした抗体療法の臨床試験が試みられている。また、Treg は CTLA-4 や PD-1 を介して免疫応答を抑制することから (Zhang et al, 2016)、免疫チェックポイント阻害薬の標的の一つと考えられている。腫瘍における明確な役割とは異なり、Treg が線維化に与える影響は一致した見解が得られていない。線維化の抑制に寄与するという報告 (Kotsianidis et al, 2009; Galati et al, 2014) と、増悪化させるという報告 (Lo Re et al, 2011; Birjandi et al, 2016) が混在しており、臨床検体や動物モデルを用いたさらなる検討が必要である。一方、分子レベルでは、線維化の促進と Treg の分化に TGF- $\beta$  が共通する。IPF 患者は肺中の TGF- $\beta$  産生が健常人に比べ有意に高く (Khalil et al, 2001)、TGF- $\beta$  は線維芽細胞を活性化し、コラーゲンや細胞外マトリックスを大量に産生させることで線維化を誘導する (Tsukui et al, 2013)。Treg に対しては、ナイーブ T 細胞からの分化や機能維持・安定化を誘導する (Belladonne et

al, 2008)。これらの知見は、Treg の線維化局所での役割は不明であるものの、線維化の病態に深く関与することを示唆している。

Treg は抗腫瘍免疫の抑制に働くと推測されるが、線維化に対してはどのような影響を与えているかは不明である(図2)。また免疫療法により Treg を除去あるいは免疫抑制を解除した時に、線維化が改善するか、それとも急性増悪のトリガーとなるかも明らかになっていない。申請者は、IPF 合併肺癌における肺線維化・腫瘍に与える免疫系の影響を Treg の観点から明らかにすることが、病態の理解ならびに治療戦略の基盤確立へとつながるのではないかと考えた。

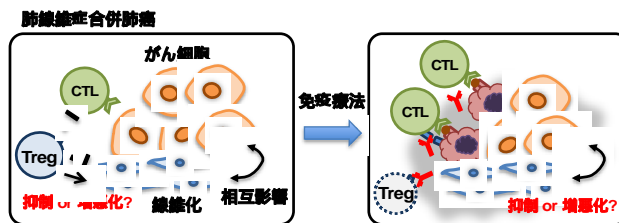


図2. 肺線維化合併肺癌における免疫療法の影響

## 2. 研究の目的

特発性肺線維症 (IPF) は高率に肺癌を合併するが、低肺機能・急性増悪を懸念して、既存の治療法は困難な場合が多い。また、免疫チェックポイント阻害薬の開発によってがんに対する免疫療法は格段の進歩を遂げたものの、IPF 合併肺癌に対しては、抗腫瘍免疫の活性化による線維化への影響が不明なことから、積極的な使用には至っていない。申請者は、免疫応答を抑制する制御性 T 細胞が IPF 患者の末梢血中に増加するという事実に着目した。

本研究では、IPF 合併肺癌の病態、特に線維化・腫瘍に与える免疫系の影響を制御性 T 細胞の観点から明らかにし、IPF 合併肺癌の治療戦略の基盤を確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) IPF 合併肺癌における制御性 T 細胞浸潤と予後の相関の解析

種々のがんにおいて、腫瘍局所への制御性 T 細胞の浸潤数は予後と相関することが知られている。そこで、奈良県立医科大学大学病院に保存されている IPF 合併肺癌ならびに非合併肺癌の病理組織を用いて、以下の2点を解析した。

IPF 合併肺癌における腫瘍局所への制御性 T 細胞浸潤と予後との相関

IPF 合併肺癌と非合併肺癌における制御性 T 細胞ならびにリンパ球浸潤の違い

腫瘍局所および腫瘍周囲の線維化領域へ浸潤した細胞を免疫組織学的に解析する。細胞傷害性 T 細胞 (IFN- $\gamma$  陽性 CD8 $^{+}$  T 細胞)、制御性 T 細胞 (Foxp3 陽性 CD4 $^{+}$  T 細胞) に着目した。これらの細胞浸潤と腫瘍の悪性度、予後との相関をレトロスペクティブに解析し、IPF 合併肺癌において制御性 T 細胞が予後を増悪させる因子となっているかについて検討した。

### (2) IPF 合併肺癌モデルの作製と病態解析

IPF 合併肺癌において、肺線維化が腫瘍の増殖に与える影響、逆に腫瘍が線維化の進行に与える影響は不明である。そこで、IPF 合併肺癌マウスモデルを作成し、その病態を解析することにより、線維化と腫瘍の関係性ならびに免疫系の影響を検討した。

C57BL/6 マウスへブレオマイシン (BLM) を気管内投与することで急性炎症を引き起こし、修復期に線維化が進行する。そこで、BLM 誘導性肺線維症マウスに肺がん細胞 Lewis Lung Carcinoma (LLC) を接種し、IPF 合併肺癌モデルマウスを作製した。肺線維症マウスならびに肺癌モデルマウスと比較して、線維化の進行と腫瘍増殖がどのように変化するかを検討した。線維化の進行は HE 染色、マッソントリクローム染色により、腫瘍の増大は腫瘍径により評価した。腫瘍および線維化に対する免疫応答は、腫瘍内のリンパ球性状 (制御性 T 細胞や細胞傷害性 T 細胞) を免疫染色、フローサイトメトリーにより解析した。

## 4. 研究成果

### (1) IPF 合併肺癌における制御性 T 細胞浸潤と予後の相関の解析

肺線維症合併肺癌では非合併例と比較して予後が有意に悪く、手術症例でも同様である。また制御性 T 細胞 (Treg) の腫瘍内浸潤が多い症例では予後が不良であることが知られている。一方、肺線維症合併肺癌において予後因子の免疫学的機序の研究は進んでおらず、Treg の腫瘍浸潤が予後因子であるかどうかを検討した報告はない。

本学医の倫理審査委員会承認を受け、当院にて 2012 年 1 月～2016 年 12 月までの 5 年間で手術療法を行った 533 症例から CT 画像および病理学的に肺線維症合併肺癌と診断された 31 症例を試験群として選定し、年齢、性別、病期および組織型をマッチさせた 62 症例を対照群とした。試験群、対照群の無増悪生存期間 (PFS) および全生存期間 (OS) を検討し、腫瘍に浸潤する Foxp3 陽性 Treg および CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞を含む免疫細胞の検討を行った。肺線維症合併肺癌症例は非合併肺癌症例と比較し、PFS および OS が有意に不良であった (図 3)。予後因子として、腫瘍浸潤 Foxp3 陽性 Treg 数の増加および CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞/Foxp3 陽性 Treg 比の低下が関連している事が明らかとなった。本成果は関連学会での発表、論文投稿

予定である。

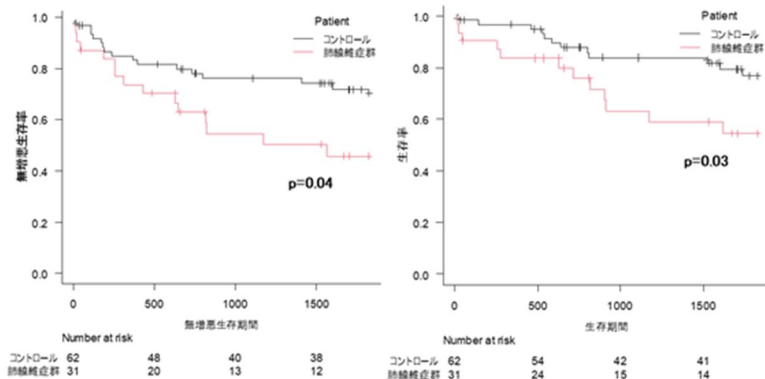


図3 IPF合併肺癌患者の無増悪生存期間および全生存期間

### (2) IPF 合併肺癌モデルの作成と病態解析

プレオマイシン (BLM) 誘導肺線維症マウスモデルに肺癌細胞株 (Lewis Lung Carcinoma; LLC) を尾静脈から投与し、肺線維症合併肺癌モデルを作製した。肺線維症合併肺癌マウスでは、通常の肺癌マウスに比して腫瘍が顕著に増大する事を明らかにした。肺線維症を誘導したマウス (非担癌マウス) では、対照群に比して肺内に存在する Foxp3 陽性 Treg の割合が有意に増加した。腫瘍投与群においても、肺線維症合併肺癌マウスは、肺癌マウスに比して肺内に存在する Foxp3 陽性 Treg の割合が増加し、CD8<sup>+</sup> T / Treg が低下していることを示した。これらの結果から、腫瘍局所への Foxp3 陽性 Treg の浸潤は肺線維化および腫瘍増大と強く関連している事を見出した。動物実験での成果は、2020 年度は新型コロナウイルス感染症のため発表できず、2021 年度には第 61 回日本呼吸器学会学術講演会で発表を行った。またこれらの結果については現在論文投稿準備中である。

本研究により、肺線維症合併肺癌患者の予後不良因子の免疫学的機序の 1 つとして、制御性 T 細胞 (Treg) の腫瘍浸潤の増加および細胞傷害性 T 細胞/Treg 比が低下する事が明らかになった。更に、肺線維症合併肺癌マウスモデルにおいて、腫瘍増大および肺線維化の双方に Treg の関与が示唆された。肺線維症合併肺癌の治療において腫瘍増大および肺線維化の両方を抑制する治療ターゲットとして Treg の重要性を示唆する知見が得られた。今後、抗体による Treg の除去や Treg の分化、活性化および増殖に関与する遺伝子や分子を標的とした治療の開発により、肺線維症合併肺癌の治療成績の向上につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kai Y, Matsuda M, Fukuoka A, Hontsu S, Yamauchi M, Yoshikawa M, Muro S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Remarkable response of non-small cell lung cancer to nintedanib treatment in a patient with idiopathic pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Thorac Cancer.	6. 最初と最後の頁 1457-1460
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1759-7714.13935	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 Ito K, Hontsu S et al.	4. 巻 145
2. 論文標題 Sequential therapy of crizotinib followed by alectinib for non-small cell lung cancer harbouring anaplastic lymphoma kinase rearrangement (WJOG9516L): A multicenter retrospective cohort study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur J Cancer .	6. 最初と最後の頁 183-193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejca.2020.12.026	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 本津茂人 田崎正人 太田浩世 熊本牧子 長 敬翁 藤田 幸男 山本佳史 山内基雄 吉川雅則 室 繁郎
2. 発表標題 当院におけるデュルバルマブ維持療法の治療経験
3. 学会等名 第60回 日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Kunimasa, K. Ito, T. Yamanaka, D. Fujimoto, M. Mori, K. Maeno, K. Tomomatsu, A. Tamura, H. Tanaka, S. Watanabe, S. Teraoka, O. Hataji, K. Suzuki, S. Hontsu, S. Hara15, A. Bessho, A. Kubo, M. Okuno, K. Nakagawa, N. Yamamoto
2. 発表標題 The safety assessment of crizotinib and alectinib from real world date of 840 ALK-inhibitor naive patients with NSCLC harboring ALK-rearrangement (WJOG9516L)
3. 学会等名 ESMO 2019 Congress（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本津茂人 田崎正人 太田浩世 熊本牧子 長 敬翁 鷓山広樹 藤田幸男 山本佳史 友田恒一 山内基雄 吉川雅則 室 繁郎
2. 発表標題 胸部放射線治療後の免疫チェックポイント阻害剤の安全性、有効性の検討
3. 学会等名 第59回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤利洋 檜山愛子 熊本牧子 北畠正大 王寺典子 本津茂人 安川元章 川口剛史 澤端章好 谷口繁樹 室 繁郎
2. 発表標題 特発性肺線維症に対する脂肪由来間葉系幹細胞療法への試み
3. 学会等名 第59回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊本牧子、檜山愛子、北畠正大、王寺典子、藤岡伸啓、吉川雅則、木村 弘、伊藤利洋
2. 発表標題 肺線維症に対する脂肪由来間葉系幹細胞治療の試み 新規マウスモデルによる検討
3. 学会等名 第16回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 齊藤 正一郎, 北畠 正大, 王寺 典子, 熊本 牧子, 西村 知子, 本津 茂人, 安川 元章, 川口 剛史, 澤端 章好, 谷口 繁樹, 室 繁郎, 伊藤 利洋
2. 発表標題 特発性肺線維症におけるAngiopoietin-like 4の役割 ヒト肺検体とマウスモデルでの検討
3. 学会等名 第60回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤岡 伸啓, 北畠 正大, 熊本 牧子, 王寺 典子, 藤田 幸男, 本津 茂人, 山内 基雄, 吉川 雅則, 室 繁郎, 伊藤 利洋
2. 発表標題 エラストラーゼ誘導肺気腫マウスモデルに対するヒト脂肪由来間葉系幹細胞療法の有用性の検討
3. 学会等名 第60回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020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	伊藤 利洋  (Ito Toshihiro)  (00595712)	奈良県立医科大学・医学部・教授   (24601)	
研究 分担者	北畠 正大  (Kitabatake Masahiro)  (60457588)	奈良県立医科大学・医学部・講師   (24601)	

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
---------	---------