様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月　 ２ 日現在

機関番号：１４４０１
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ１６０４５

研究課題名（和文）好中球の活性化抑制を介したT細胞の腫瘍内浸潤促進による肺癌免疫療法感受性の制御

研究課題名（英文）Regulating the sensitivity of lung cancer to immunotherapy through inhibiting neutrophil activation and promoting T cell infiltration in tumors

研究代表者
小山　正平（Koyama, Shohei）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：８０７６７５５９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　2,600,000円

研究成果の概要（和文）：マウスの肺癌モデルを用いた解析によって、特定の分泌蛋白や遺伝子変異により腫瘍環境に集積してくる好中球の性質や量が異なることを見出した。腫瘍環境の好中球は、例えば感染防御に関わるような好中球と比較して、アルギナーゼ活性が高く、がんを破壊する役割を持つ細胞傷害性Tリンパ球を抑制することが分かった。このようなメカニズムを介して、アルギナーゼを多く保有する悪玉好中球は、抗PD-1抗体による免疫療法の治療効果を有意に低下させることが、マウスおよびヒト患者検体を用いた解析から明らかになった。免疫療法の治療効果を改善するためにも、この様な悪玉好中球を標的とした治療の開発が重要であり、今後も検討を続ける。

研究成果の学術的意義や社会的意義
抗PD-1抗体に代表されるがん免疫療法は、肺がんに限らず、標準的な治療法の一つとして、様々な固形腫瘍に対して適応が拡大されるに至った。しかしながら、単剤での効果が不十分であることから、併用治療を行うことでその効果を改善する取り組みが行われている。今回アルギナーゼを高発現する好中球が多いことが、治療抵抗性に関わる因子として判明し、その阻害剤がマウスモデルで有効であることを示した。今後もこの悪玉好中球を除去できるような治療法との併用が免疫療法の効果改善の糸口になる可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the tumor microenvironment in mouse lung cancer, and found that tumor cells recruited neutrophils that suppressed anti-tumor CD8 T cell function as a result of arginine depletion by arginase. Based on this finding, we treated the tumors with an arginase inhibitor. The lung tumor volume was significantly lower in the treated group than in the untreated group. We confirmed that an increased number of neutrophils in the peripheral blood was significantly correlated with a reduced response rate to anti-PD-1 antibody treatment. Therefore, targeting immune-suppressive neutrophils can be a vital option for lung cancer treatment with immune checkpoint inhibitors such as anti-PD-1 antibodies.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：がん免疫　好中球　抗PD-1抗体　肺がん

※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。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

2002年以降の分子標的薬の出現に伴い、非小細胞肺癌の予後に改善が認められたが、依然として分子標的薬が適応とならないサブセットが大半を占めるというのが現状である(*Cardarella S* et al.*American journal of respiratory and critical care medicine* 2013)。臨床試験によって、免疫療法特にPD-1：PD-L1を遮断する抗PD-1抗体が全非小細胞肺癌の約20%に奏功することが示され、免疫治療は肺癌の標準治療の一つとして施行されるようになった(Garon EB et al.*The New England journal of medicine.* 2015)。しかしながら、特定の遺伝子変異に基づいて分子標的薬を選択する場合とは異なり、免疫療法が奏功する症例を予め推測するためのバイオマーカーは未だに不明な部分が多く、今後複数のファクターを考慮して免疫療法の良い適応となる患者を探し出すことが臨床上の課題となっている。

申請者はこれまでヒト肺癌と同じ遺伝子変異を再現したトランスジェニック肺癌モデルマウスを用いて肺癌微小環境の免疫解析を行ってきた。その研究から一部のモデル（EGFR変異モデル、Kras変異モデル）は抗PD-1抗体に対して治療感受性を示すのに対し、他のモデル（Kras変異+Stk11欠損モデル、Kras変異＋Tp53欠損モデル）では抵抗性を示すことを見出した(図1)。これらモデルの比較検討の中で、明らかにしてきた成果を図１に簡略化してまとめている。本研究の課題は図１の３行目:Kras/Stk11モデルから得られた知見に基づく。

図１

マウスモデル	抗PD-1抗体 に対する反応性	抵抗性の要因	効果改善の方法
*EGFR*変異	明らかな腫瘍の縮小	一度反応するが再燃 (獲得耐性化)	抗Tim-3抗体の 追加投与
*Kras*変異	腫瘍増大速度が低下		放射線照射 IFN誘導
*Kras*変異 +*Stk11*欠損	効果無し	炎症と好中球浸潤、 腫瘍内T細胞の減少	好中球の除去 IL-6の中和
*Kras*変異 ＋*Tp53*欠損	効果無し	腫瘍環境の線維化など	?

本研究では、腫瘍環境中の炎症性サイトカインの過剰産生状態とそれに伴う好中球浸潤が、活性化T細胞の腫瘍内への遊走に与える影響について、さらに詳細なメカニズムについて解析する。例えば、腫瘍内に大量に集積した好中球は、正常部位に存在する好中球に比べて、Arginase1、IL-6、MFG-E8などの免疫抑制・腫瘍増殖因子を高発現しており（Koyama S et al Cancer Res. 2016)、このような因子が実際に抗PD-1抗体による免疫療法をうけて効果が認められなかった肺癌患者で高発現しているのかを、血液・気管支鏡検体・胸水などを使用して解析する。また、好中球の遊走に重要なサイトカインであるIL-17を強制発現させ、好中球を腫瘍に集積させたKras腫瘍モデルを作成し、様々な治療標的に対して治療効果を評価するモデルとして活用する準備が整っている（マウスは作成済み・データの一部は論文投稿準備中)。また、肺癌外科切除検体（非小細胞肺癌36例）を用いた解析から、腫瘍内の好中球数がT細胞数と有意に逆相関することを見出している。

２．研究の目的

本研究では、３つの課題を設定し、それを解決することを目的とする。

(1) IL-17発現Kras肺癌モデルの解析により好中球の遊走が腫瘍環境に与える変化を評価する。主にT細胞の浸潤と活性化状態を指標として、好中球由来の炎症によってT細胞が抑制される

メカニズムを明らかにする。申請者は、共同研究者とすでにIL-17発現Krasモデルを作成し、基礎実験を済ませ、現在様々な治療により好中球減少を介して、腫瘍環境にT細胞の浸潤を回復する治療法を探索している。
(2) Arginaseが腫瘍環境中のT細胞浸潤に与える影響を評価する。先述の通り、腫瘍に浸潤した好中球では様々な免疫抑制因子の発現が亢進している。中でも Arginase1 は特に変化が大きく、さらに腫瘍環境やアレルギー疾患で特徴的なM2マクロファージのマーカーとしても活用されている。共同研究者とすでにArginase1阻害薬による治療効果の評価を開始し、Krasモデルで Arginase阻害剤が抗腫瘍活性を認めため、メカニズムを含めた免疫学的解析を行っていく。
(3) (1),(2)よりマウスモデル・外科切除検体からは腫瘍における好中球とT細胞浸潤の逆相関が認められているが、実際に抗PD-1抗体の治療を受ける患者から回収可能な検体（手術検体以外）で、好中球richかつT細胞poorの腫瘍環境を推測可能か、またこの状態は抗PD-1抗体への抵抗性に関わるかの検討を行う。好中球は、凍結によって破壊されるため、新鮮な検体での解析が必須であることから、新鮮末梢血を用いた解析を中心に治療前後での評価を行う。

３．研究の方法

すでに共同研究者のAkbay研究員と共に作成したIL-17/Kras変異のマウスモデルの解析を継続するとともに、Arginase 阻害剤による治療効果発現の機序を中心に解析を進める。申請時すでに腫瘍環境に大量の好中球が集積しているなどの基礎データは確認済み。

2・3年目は、初年度で明らかになった好中球の関与する肺癌の免疫学的病態が実際に抗PD-1抗体の治療効果にも影響しているのかを検討するとともに、抗PD-1抗体治療を受けた患者由来の新鮮末梢血を用いて、どのような免疫プロファイルを行うことが抵抗性を予測するのに重要か、またマウスモデルで好中球を減少させる治療によって T 細胞の腫瘍内浸潤が回復することが、どのようにヒトで実現可能かについて解析・評価を行う。Arginase 阻害薬などのマウスを用いた治療効果の判定などは共同研究者の Akbay 研究員によって行われる。ヒトの検体回収は大阪大学医学部付属病院もしくは刀根山病院で行い、免疫解析は新鮮な状態で当研究室にて施行する。

４．研究成果

目的の3つの課題に関して、それぞれ成果を報告する。

(1) IL-17 高発現による好中球遊走が抗 PD-1 抗体への感受性に抑制的に影響することを示し、実際に肺癌患者の血清および手術検体を用いた解析においてもトランスジェニックマウスと類似の表現系を認めることを見出し、Journal of Thoracic Oncology 2017 Aug;12(8):1268-1279. doi:10.1016/j.jtho.2017.04.017. に報告した。
(2) (1)において認めた活性化好中球によるTリンパ球の抑制に関わる因子として Arginase1 に着目し、その抑制作用を確認した。さらに現在阻害薬を用いたT細胞機能の改善効果などについて共同研究者である Akbay 研究員と検討し、その治療効果を証明した。結果を J Immunother Cancer. 2019 Feb 6;7(1):32. doi: 10.1186/s40425-019-0504-5.に報告した。
(3) 大阪大学医学部附属病院呼吸器内科と国立病院機構刀根山病院呼吸器科にて、抗PD-1抗体治療を受けた患者から主に新鮮血を回収し、前向きに免疫学的プロファイルを行う観察研究をすでに開始し、60 名程度の患者を治療が長期に維持できた症例と比較的早期に次治療へ変更を余儀なくされた症例に分けて検討を進めた。末梢血中の好中球は治療効果に有意に影響していることが確認できた。その成果の一部をJCI Insight. 2018 Oct 4;3(19). pii: 59125. doi: 10.1172/jci.insight.59125.に報告した。

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　2件／うちオープンアクセス　5件）

１．著者名 Miret Juan J.、Kirschmeier Paul、Koyama Shohei, et al	４．巻 7
２．論文標題 Suppression of Myeloid Cell Arginase Activity leads to Therapeutic Response in a NSCLC Mouse Model by Activating Anti-Tumor Immunity	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40425-019-0504-5	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 該当する

１．著者名 Kinehara Yuhei、Nagatomo Izumi、Koyama Shohei, et al	４．巻 3
２．論文標題 Semaphorin 7A promotes EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung adenocarcinoma cells	５．発行年 2018年
３．雑誌名 JCI Insight	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.123093	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 Osa Akio、Uenami Takeshi、Koyama Shohei、Fujimoto Kosuke, et al.	４．巻 3
２．論文標題 Clinical implications of monitoring nivolumab immunokinetics in non-small cell lung cancer patients	５．発行年 2018年
３．雑誌名 JCI Insight	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.59125	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 Koyama Shohei、Nagatomo Izumi、Kijima Takashi、Kumanogoh Atsushi	４．巻 9
２．論文標題 Selecting suitable chemotherapies for PD-1/PD-L1 blockade to optimize the tumor immune microenvironment	５．発行年 2018年
３．雑誌名 Oncotarget	６．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.26028	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 Akbay Esra A.、Koyama Shohei、Liu Yan、Dries Ruben、Bufe Lauren E.、Silkes Michael、Alam MD Maksudul、Magee Dillon M.、Jones Robert、Jinushi Masahisa、Osa Akio、Kumanogoh Atsushi、Freeman Gordon J.、Awad Mark M.、Christiani David C.、Bueno Raphael、Hammerman Peter S.、Dranoff Glenn、Wong Kwok-Kin	4．巻 12
2．論文標題 Interleukin-17A Promotes Lung Tumor Progression through Neutrophil Attraction to Tumor Sites and Mediating Resistance to PD-1 Blockade	5．発行年 2017年
3．雑誌名 Journal of Thoracic Oncology	6．最初と最後の頁 1268～1279

掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtho.2017.04.017	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 該当する

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　2件）

1．発表者名 Akio Osa , Yujiro Naito , Shohei Koyama , Takeshi Uenami , Masahide Mori , Atsushi Kumanogoh
2．発表標題 Analysis of whole blood cell as a predictive marker in nivolumab-treated non-small cell lung cancer patients
3．学会等名 SITC(Society for Immunotherapy of Cancer) 2018 Annual Meeting（国際学会）
4．発表年 2018年

1．発表者名 A. Osa, S. Koyama, T. Uenami, K. Fujimoto, Y. Naito, H. Hirata, T. Takimoto, I. Nagatomo, Y. Takeda, H. Kida, M. Mori, T. Kijima, A. Kumanogoh
2．発表標題 Monitoring Nivolumab Binding as a Method to Clarify the Residual Therapeutic Effects in Previously Treated Lung Cancer Patients
3．学会等名 World Conference on Lung Cancer 2017（国際学会）
4．発表年 2017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