

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16429

研究課題名(和文) 免疫チェックポイント阻害薬併用凍結療法の腫瘍免疫変調効果の検討

研究課題名(英文) Immunomodulatory effects of cryoablation combined with immune checkpoint inhibitors

研究代表者

山内 良兼 (Yamauchi, Yoshikane)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：30445390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：凍結療法の研究の一環として、免疫抑制性の腫瘍微小環境を破壊するPD-1受容体およびそのリガンドであるPD-L1に対する抗体との併用による治療効果が示されつつある。今回、腫瘍の微小環境形成に重要な役割を果たすと考えられている骨髄由来抑制細胞(MDSCs)とT細胞免疫について着目した。MDSCとT細胞免疫について、凍結療法とICIを組み合わせた場合の腫瘍自身と腫瘍周辺環境における免疫調節の役割について検討した。その結果、凍結療法とICIの併用は相乗的な抗腫瘍効果をもたらす可能性があり、その効果はMDSCsとT細胞免疫のモニタリングによって評価できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍の微小環境形成に重要な役割を果たすと考えられている骨髄由来抑制細胞(MDSC)とT細胞免疫について、凍結融解術とICIを組み合わせた場合の腫瘍自身と腫瘍周辺環境における免疫調節の役割について検討しました。その結果、凍結融解術とICIの併用は相乗的な抗腫瘍効果をもたらす可能性があり、その効果はMDSCsとT細胞免疫のモニタリングによって評価できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We specifically addressed myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) and T-cell immunity, which are thought to play an important role in the formation of the tumor microenvironment. We investigated their role in tumor immunomodulation both in the tumor itself and in the tumor surrounding environment when combined with cryoablation and ICIs. Our findings suggest that the combination of cryoablation and ICI might have synergetic anti-tumor effects, which could be evaluated by monitoring of MDSCs and T-cell immunity.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：凍結療法 肺癌 免疫療法 MDSC

1. 研究開始当初の背景

原発性肺癌において早期の非小細胞性肺癌に対する治療の **gold standard** は肺葉切除および系統的リンパ節郭清を基とした定型手術である。しかし、耐術能の問題などから手術施行困難と判断される症例も数多く存在し、局所治療として手術に代る新たな代替治療が必要とされている。一方で、近年、免疫療法として PD-1/PD-L1 などを標的とした免疫チェックポイント阻害薬が臨床でも使用されるようになり、腫瘍周囲環境の免疫抑制状態をリセットすることが可能となってきた。

我々は、2008 年から CT ガイド下、経皮的アプローチによる肺腫瘍に対する凍結融解壊死療法 (percutaneous cryoablation of lung tumors; PCLT) の動物実験、およびその臨床応用に取り組んできた。PCLT は Joule-Thomson 効果を利用したコンパクトな機器が開発されたことにより臨床応用が可能となった比較的新しい治療である。主に急速な温度変化により細胞内の氷晶形成、浸透圧勾配による細胞内脱水、微小循環の循環障害とその後のアポトーシスが関与して細胞、組織の破壊壊死が得られる。これまでに我々は PCLT による安全性および局所制御能に関して実臨床レベルで十分な水準を確保できていることを報告してきた。一方で、PCLT は局所治療としての治療でしか無いため、PCLT を用いた全身治療の足がかりとなる治療方法の確立が求められている。

近年、腫瘍免疫の分野に cancer immunoeediting という概念が提唱されるようになった。すなわち、腫瘍形成の段階において外因性の腫瘍抑制として作用する免疫系に認識されるようになった後、時間をかけて腫瘍の免疫原性を編集しながらより免疫原性の低い腫瘍細胞を選び出してしまふ。その過程で、Elimination (排除相)、Equilibrium (平衡相)、Escape (逃避相) の 3 相の存在が提唱されており、一般に臨床で診療の対象となる悪性腫瘍はこの「逃避相」の状態にあると考えられている。すなわち、細胞レベルでの免疫原性の低下ならびに免疫抑制性の腫瘍周囲環境が完成している状態にある。一方、免疫チェックポイント阻害剤では、この腫瘍周囲環境を司っているマクロファージと T 細胞間での免疫抑制性シグナルを阻害する事が可能となり、細胞免疫原性を再回復する能力が期待される。

我々の研究グループでは皮下腫瘍モデルマウスに凍結治療を行い凍結治療後の腫瘍組織の免疫学的状態を観察したところ、7 割以上の腫瘍組織の凍結により抗腫瘍免疫治療にとって好適な環境になることを報告した。さらに、これまでの PCLT の臨床研究において、局所治療では根治不可能な病期であったものの慎重に PCLT を施行した症例を経験した。そのうち少数ではあるが、予測された予後よりもはるかに良好な経過を得られた症例が存在した。こうした背景から、PCLT そのものにも腫瘍周囲環境の変調作用があることが期待されるものの、これが十分に作用するかどうかは別の因子が関与していると示唆された。

このため、我々は免疫チェックポイント阻害を併用することにより PCLT の腫瘍周囲環境の変調作用を通じて相乗的な抗腫瘍効果が惹起される可能性に着目し、その分子メカニズムを明らかにするとともに併用療法の可能性を探索したいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍周囲環境の形成に重要な役割を持つと考えられている骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC) および T 細胞免疫に着目し、PCLT を免疫チェックポイント阻害剤と併用することにより腫瘍本体並びに腫瘍周囲環境における腫瘍免疫変調に果たす役割およびその分子メカニズムを検討し、本併用療法の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

免疫機能解析マウスモデルを作成した。具体的には、マウス肺癌モデルとして、C57BL/6 マウスを準備し、市販されているマウス肺癌株を片側大腿部皮下に注入して皮下腫瘍モデルマウスを作成した。大腿部皮下腫瘍が 1cm 大になったところを day0 とし凍結療法を実施した。また同時に治療介入日を day0 とし、抗 PD-L1 抗体および抗 PD-1 抗体を使用し、day11 で犠牲死させ、脾臓、骨髄、腫瘍本体を採取し、組織内 MDSC および T 細胞の数を評価した。具体的には、フローサイトメトリーによる評価として、MDSC は CD11b+Ly6G+Ly6Clow を多形核型骨髄由来免疫抑制細胞 (PMN-MDSC) と CD11b+Ly6G-Ly6Chi を単球系骨髄由来免疫抑制細胞 (Mo-MDSC) と定義した。T 細胞機能の解析では、CD4+ T 細胞および CD8+ T 細胞を抽出した後、CD45RA+CD62L+細胞をナイーブ T 細胞、CD45RA- CD62L+細胞をエフェクター T 細胞、CD45RA+ CD62L-細胞をエフェクターメモリー T 細胞、CD45RA- CD62L-細胞をセントラルメモリー T 細胞、としてそれぞれゲーティングして、T 細胞の分類ごとの数を評価した。

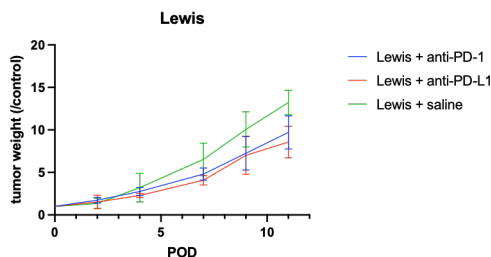
マウスは Wild-type C57BL/6 (黒マウス) を使用した。マウス肺癌細胞株には Lewis (PD-L1 陰性)、CMT-167 (PD-L1 陽性) の 2 種類の細胞株を使用した。凍結療法は液体窒素を用い、皮膚腫瘍治療用プローベ (Cry-Ac-3, Brymill Cryogenic Systems, CT, US) を使用した。投与する抗体は、PD-1 抗体 (clone RMP1-14, BioXCell, West Lebanon, NH, US) と PD-L1 抗体 (clone#10F.9G2, BioXcell) をそれぞれ使用した。

以下の検討グループを作成して比較した。

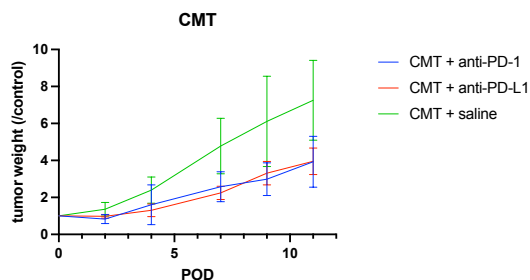
①コントロール、②抗 PD-1 抗体投与群、③抗 PD-L1 抗体投与群、④凍結療法実施群、⑤凍結療法実施+抗 PD-1 抗体投与群、⑥凍結療法実施+抗 PD-L1 抗体投与群

4. 研究成果

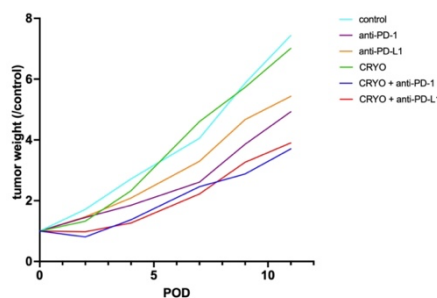
腫瘍サイズに関する経時的変化を最初に比較した。Lewis 細胞株に対して、凍結療法実施群、凍結療法実施+抗 PD-1 抗体投与群、凍結療法実施+抗 PD-L1 抗体投与群を比較したグラフは右のとおりである。Day 11 の時点で腫瘍サイズの比較をしたところ、凍結療法群に比べて凍結療法実施+抗 PD-1 抗体投与群では平均値で 73%に縮小していた。また凍結療法群に比べて凍結療法実施+抗 PD-1 抗体投与群では平均値で 65%に縮小していた。



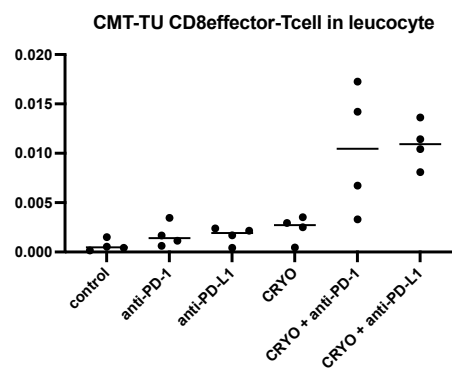
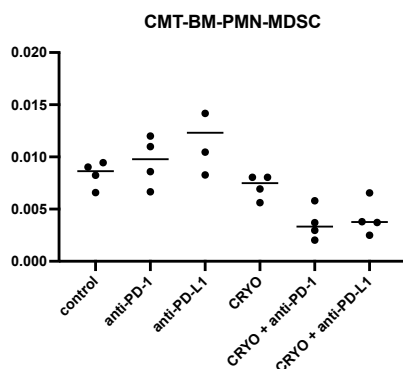
CMT-167 細胞株に対して凍結療法実施群、凍結療法実施+抗 PD-1 抗体投与群、凍結療法実施+抗 PD-L1 抗体投与群を比較したグラフは右のとおりである。Day 11 の時点で腫瘍サイズの比較をしたところ、凍結療法群に比べて凍結療法実施+抗 PD-1 抗体投与群では平均値で 54%に縮小していた。また凍結療法群に比べて凍結療法実施+抗 PD-1 抗体投与群では平均値で 54%に縮小していた。



CMT-167 細胞株に対して抗 PD-1 抗体投与群、抗 PD-L1 抗体投与群、凍結療法実施群、凍結療法実施+抗 PD-1 抗体投与群、凍結療法実施+抗 PD-L1 抗体投与群をそれぞれ比較したグラフは右のとおりである。コントロール群と凍結療法実施群では治療直後を除いてほぼ同じような経時変化を示した一方で、抗 PD-1 抗体投与群、抗 PD-L1 抗体投与群においてはコントロール群、凍結療法実施群に比べて腫瘍抑制効果が見られることが明らかになった。更に、凍結療法実施+抗 PD-1 抗体投与群、凍結療法実施+抗 PD-L1 抗体投与群においては、抗 PD-1 抗体投与群、抗 PD-L1 抗体投与群を上回る腫瘍抑制効果が見られることが明らかになった。さらに、PD-1 抗体と PD-L1 抗体ではその効果に大きな差が認められなかった。



更にフローサイトメトリーによる解析結果は右に示したとおりである。まず、骨髄に含まれる PMN-MDSC の頻度について、抗 PD-1 抗体投与群、抗 PD-L1 抗体投与群、凍結療法実施群においてはコントロール群と比較して大きな差が認められなかった。一方で、凍結療法実施+抗 PD-1 抗体投与群、凍結療法実施+抗 PD-L1 抗体投与群においては、PMN-MDSC が抑制されていることを確認した。加えて、腫瘍内の CD8 エフェクター T 細胞の頻度について、抗 PD-1 抗体投与群、抗 PD-L1 抗体投与群、凍結療法実施群においてはコントロール群と比較して大きな差が認められなかった。一方で、凍結療法実施+抗 PD-1 抗体投与群、凍結療法実施+抗 PD-L1 抗体投与群においては、CD8 エフェクター T 細胞の頻度が増加していることを確認できた。



こうした結果より、凍結療法と PD-1/PD-L1 抗体を用いた免疫療法の併用は相乗効果を得られる可能性があり、それを免疫学的評価により示すことができた。今後、凍結療法の条件を変える、免疫療法のレジメンを変更することにより更に大きな効果をもたらす事のできる方法を開発する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Safi Seyer, Yamauchi Yoshikane, Hoffmann Hans, Weichert Wilko, Jost Philipp J., Winter Hauke, Muley Thomas, Beckhove Philipp	4. 巻 12
2. 論文標題 Circulating Interleukin-4 Is Associated with a Systemic T Cell Response against Tumor-Associated Antigens in Treatment-Na?ve Patients with Resectable Non-Small-Cell Lung Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3496 ~ 3496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12123496	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 Safi Seyer, Yamauchi Yoshikane, Stamova Slava, Rathinasamy Anchana, op den Winkel Jan, J?nger Simone, Bucur Mariana, Umansky Ludmilla, Warth Arne, Herpel Esther, Eichhorn Martin, Winter Hauke, Hoffmann Hans, Beckhove Philipp	4. 巻 8
2. 論文標題 Bone marrow expands the repertoire of functional T cells targeting tumor-associated antigens in patients with resectable non-small-cell lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 OncoImmunology	6. 最初と最後の頁 e1671762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2162402X.2019.1671762	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 Yamauchi Yoshikane, Safi Seyer, Blattner Carolin, Rathinasamy Anchana, Umansky Ludmila, Juenger Simone, Warth Arne, Eichhorn Martin, Muley Thomas, Herth Felix J. F., Dienemann Hendrik, Platten Michael, Beckhove Philipp, Utikal Jochen, Hoffmann Hans, Umansky Viktor	4. 巻 198
2. 論文標題 Circulating and Tumor Myeloid-derived Suppressor Cells in Resectable Non?Small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine	6. 最初と最後の頁 777 ~ 787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1164/rccm.201708-17070C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoshikane Yamauchi, Yasuto Yamamoto, Yuichi Saito, Fumi Yokote, Hitoshi Dejima, Yukinori Sakao, Masafumi Kawamura
2. 発表標題 Immunomodulatory effects of cryoablation combined with immune checkpoint inhibitors in a murine lung cancer model
3. 学会等名 WCLC 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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