

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08654

研究課題名(和文)免疫チェックポイント分子に着目した薬剤性肺傷害発症機序の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of drug-induced lung injury focusing on immune checkpoint molecules

研究代表者

浜田 直樹 (Hamada, Naoki)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：00423567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：間質性肺疾患症例について気管支肺胞洗浄液中リンパ球の免疫チェックポイント分子の発現を解析した。ICIによる薬剤性肺炎症例ではPD-1、TIM-3、TIGITの発現が有意に上昇していた(Int Immunol. 2020)。MDA5抗体陽性急性間質性肺炎では近似性を認めた(Rheumatology (Oxford). 2021)。サルコイドーシスでは自然軽快群でPD-1、TIM-3の発現が上昇していた(Biomedicines 2021)。マウスナフタレン肺傷害にEGFR-TKIを併用すると第1,2世代EGFR-TKIでは好中球優位の、第3世代では好中球とリンパ球優位の肺傷害を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤性肺炎の機序は不明であるが一般的にリンパ球の上昇が認められる。今回、気管支肺胞洗浄液中のリンパ球が上昇する疾患として、薬剤性肺炎、膠原病間質性肺炎、サルコイドーシスにて免疫チェックポイント分子の解析と、T細胞活性化を示すことができた。また動物モデルでもリンパ球上昇を伴う薬剤性肺炎モデルができつつある。これらの解析が、薬剤性肺傷害の発症予測、治療法の開発への大きな第一歩となりうる

研究成果の概要(英文)：Expression of immune checkpoint molecules in lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid was analyzed in cases of interstitial lung disease. The expression of PD-1, TIM-3, and TIGIT was significantly elevated in cases of drug-induced pneumonia by ICI (Int Immunol. 2020). A similar trend was observed in MDA5 antibody-positive acute interstitial pneumonia (Rheumatology (Oxford). 2021). In sarcoidosis, PD-1 and TIM-3 expression was elevated in the spontaneous improvement group (Biomedicines 2021).

Combined use of EGFR-TKI in mouse naphthalene lung injury resulted in exacerbation of lung injury. Increases in neutrophils were observed with 1st and 2nd generation EGFR-TKIs, and increases in neutrophils and lymphocytes were observed with 3rd generation EGFR-TKI.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：肺傷害 薬剤性間質性肺炎 上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬 免疫チェックポイント阻害薬

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

肺癌は本邦における癌の死因として最多であるが、非小細胞肺癌の30~40%に上皮成長因子受容体 (epithelial growth factor receptor: EGFR) 遺伝子変異が認められる。EGFR 遺伝子変異が陽性的の場合、この変異をターゲットとした分子標的薬が著効することが知られており、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-tyrosine kinase inhibitor: EGFR-TKI) と称される。一方、EGFR-TKI には薬剤性肺傷害という時に致死的となる副作用があることが知られている。肺の傷害を受ける部位は主に間質であり、一般的には薬剤性肺傷害、薬剤性間質性肺炎とよばれるが、第1世代 EGFR-TKI である gefitinib による薬剤性間質性肺炎の頻度は、米国では0.4%であった本邦では4%であり、日本人では10倍起こしやすい。よって特に本邦において病態解明と治療法の開発が強く求められている。しかしその発症機序に関しては、リンパ球を中心とした炎症反応浸潤をみとめることより、何らかの免疫学機序が推定されてはいるが、ほぼ何もわかっていない。

免疫チェックポイント阻害薬 (immune checkpoint inhibitor: ICI) には、nivolumab や pembrolizumab などの抗 PD-1 (programed cell death-1) 抗体、durvalumab などの抗 PD-L1 (PD-ligand 1) 抗体などがある。症例によっては悪性腫瘍の治療におけるパラダイムシフトとなる程に高い抗腫瘍効果を示すが、多彩な免疫関連有害事象が起こることが明らかとなっており、特に薬剤性間質性肺炎では治療関連死も相次いでいる。nivolumab では5%に薬剤性間質性肺炎が発症し、その機序については腫瘍特異的リンパ球による免疫反応が原因のひとつと考えられているが詳細は明らかではない。

EGFR-TKI と ICI の併用については、EGFR-TKI の種類、ICI の種類によって、抗腫瘍効果のみならず肺傷害にも違いが報告されているが、ICI 治療歴のある患者に EGFR-TKI を使用して死亡例が相次いだことより、2016年7月に厚生労働省より安全対策課長通知が発出された。実際の臨床では、ICI と EGFR-TKI を逐次的に使用したい症例が存在するが、肺傷害の発症を懸念して使用できない状況であり対策が求められている。

損傷後の肺組織の修復には、肺組織や骨髄などからの幹細胞が関与するが、細気管支上皮の幹細胞としてはクラブ細胞が考えられている (Hong KU et al. Am J Respir Cell Mol Biol 2001)。マウスモデルでは、ナフタレン投与によりクラブ細胞のみが傷害される気道傷害モデルがあり、マウスにナフタレンを投与すると、約24時間後には細気管支上皮のクラブ細胞のほとんどを脱落させることができる。また、脱落したクラブ細胞は自然に再生し14-21日後にはほぼもとに戻るため、気道上皮の再生のモデルとして広く用いられている (Kim CF, et al. Cell 2005)。

EGFR-TKI、免疫チェックポイント阻害薬による薬剤性肺傷害の機序を解明するためには、動物実験モデルの解析が有用であると考えられるが、動物モデルにおいて、EGFR-TKI 投与のみ、もしくはICI投与のみで、肺傷害を起こしたという報告はない。以前、我々は第1世代 EGFR-TKI である gefitinib がナフタレンマウス肺傷害モデルを増悪させることを報告 (Harada C, Hamada N, et al. Am J Respir Crit Care Med 2011) し、第2世代 EGFR-TKI

である afatinib でも同様に肺傷害が増悪することを確認した (Hamada N, et al. Biochem Biophys Res Commun 2017) が、それが唯一の再現性のある報告である。

薬剤性間質性肺炎では、一般的に気管支肺胞洗浄(bronchoalveolar lavage: BAL)液中のリンパ球の増加が認められる。BAL 液中のリンパ球の解析については、古典的な CD4、CD8 比の研究をはじめいくつかの報告が認められるが、PD-1、PD-L1 など腫瘍免疫にかかわる表面マーカーについて解析した報告はない。我々は、既に間質性肺炎、薬剤性肺炎症例の BAL 液について、フローサイトメトリーを用いたリンパ球表面マーカーの解析を開始(九州大学倫理審査委員会承認)しており、その一例として、成人 T 細胞白血病症例に合併した肺病変の BALF 中の CD8+T 細胞に、高度に PD-1 と PD-L1 が共発現していることを世界で初めて見出した (Yanagihara T, Hamada N, et al Ann Hematol. Ann Hematol. 2018)。

2 . 研究の目的

本研究の究極的な目的は「肺傷害を引き起こすメカニズム」の解明と新たな治療法の開発を目指すことであるが、肺傷害には複雑な免疫系が絡み合っていると推測される。ただその免疫学的機序の主役の一つとして、上記のリンパ球が挙げられる。今回の目的は免疫チェックポイントを主眼においたリンパ球の表面マーカーの解析と、そのリンパ球が実際に肺傷害を引き起こすかどうか、そして引き起こす機序を明らかにすることである。

まずヒト検体について、我々は臨床の現場において得られた BALF の気管支肺胞洗浄液のフローサイトメトリー解析を 100 例以上行っており(九州大学臨床研究倫理審査委員会承認) 更に症例数を増やして解析を進め、臨床データと併せた解析を行う。

また動物実験において、EGFR-TKI によるマウス肺傷害を増悪させたモデルを確立しているのは、世界的に見ても我々の報告のみであり、そのマウスモデルから得られたリンパ球のプロファイル解析を行う。それらを通じて、肺傷害が引き起こされる原因解明の足がかりとしたいと考えている。

3 . 研究の方法

薬剤性肺炎を含む間質性肺疾患症例について、気管支肺胞洗浄(bronchoalveolar lavage: BAL)液中のリンパ球の解析を行う。古典的な CD4、CD8、および免疫チェックポイント分子(PD-1、PD-L1、TIM-3、TIGIT、LAG-3 など)に着目し表面マーカーについてフローサイトメトリーにて解析する。

マウスナフタレン肺傷害モデルについて、経時的に BAL 液、肺組織の解析を行う。マウスナフタレン肺傷害モデルは、投与 1 日後に細気管支が脱落し 14 日後には自然に回復してくるモデルであるため経時的な検討が必要である。次に、ナフタレン + EGFR-TKI 投与群についても同様に検討する。EGFR-TKI は第 1 世代である gefinitib、第 3 世代である osimertinib について検討する。ナフタレン + EGFR-TKI 投与群においては、ナフタレン投与開始日から 13 日まで EGFR-TKI を連日投与する。次に、ナフタレン投与 + ICI 投与群についても同様に

検討する。免疫チェックポイント阻害剤は抗 PD-1 抗体を用いる。ナフタレン投与 1 日後から 3 日おきに 13 日後まで抗 PD-1 抗体の投与を行う。BALF と組織の検討時期は、投与前、投与、7 日後、14 日に行う。BAL 液は細胞分画の他、主にリンパ球における免疫チェックポイント分子の経時的動態をフローサイトメトリーにて解析する。組織は HE 染色、EVG 染色で肺傷害の程度を検討し、免疫チェックポイント分子の免疫染色で組織浸潤の解析を行う。それらの結果に基づいてではあるが、ナフタレン投与 + EGFR-TKI 投与 + 免疫チェックポイント阻害薬投与群についても同様に検討する。

4 . 研究成果

我々は、当院において BAL 検査を施行する症例についてインフォームドコンセントを行い、同意を得られた症例について、BAL 液の解析を行った。ICI による薬剤性肺炎 13 例、他薬剤による薬剤性肺炎 5 例、膠原病関連間質性肺炎 18 例、サルコイドーシス 23 例について BAL 液の免疫チェックポイント分子 PD-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3、PD-L1 の発現を解析した。ICI による薬剤性肺炎症例では、CD8+T 細胞における PD-1、TIM-3、TIGIT の発現が、他の群と比し有意に上昇していることを見出した(Suzuki K, Yanagihara T, Hamada N, et al. *Int Immunol*. 2020. doi: 10.1093/intinn/dxaa022)。これらのリンパ球が肺傷害を起こしている可能性があると考えている。また MDA5 抗体陽性急性肺傷害におい BAL 液中の免疫チェックポイント分子の発現を検討し報告した(Suzuki K, Yanagihara T, Hamada N, et al. *Rheumatology (Oxford)*. 2021;60:e14-e16. doi: 10.1093/rheumatology/keaa412)。薬剤性肺傷害の発症機序との比較からも興味深いと考える。

また、薬剤性間質性肺炎以外に BAL 液中のリンパ球が上昇する疾患として、まずサルコイドーシスに着目し BALF 中の免疫チェックポイント分子の発現をフローサイトメトリーで解析した。自然軽快群、増悪群で比較検討すると、自然軽快群で、PD-1、TIM-3 の発現が有意に上昇していた (Kotetsu Y, Yanagihara T, Hamada N, et al. *Biomedecines* 2021;9:1231. doi: 10.3390/biomedecines9091231)。TIM-3、PD-1 は肺防護的に働く可能性があると考えられた。

続いて動物モデルにおいて、EGFR-TKI による薬剤性肺傷害、ICI による薬剤性肺傷害、EGFR-TKI と ICI の併用による薬剤性肺傷害について、リンパ球の免疫チェックポイント分子に着目した解析を行った。動物モデルは我々が以前に確立したマウスナフタレン肺傷害モデルに EGFR-TKI を併用することにより肺傷害が増悪するモデルを使用した。マウスナフタレンモデルに EGFR-TKI を投与すると、マウス肺傷害が増悪する。第 1 世代 EGFR-TKI である Gefinitib (Harada C, et al. *Am J Respir Crit Care Med* 2011)、第 2 世代 EGFR-TKI である Afatinib (Hamada N, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2017) で検討した結果では、リンパ球の軽度上昇も認められたが、主に増加していたのは好中球であり、病態の主体は好中球と思われた。実臨床においては、既に第 3 世代 EGFR-TKI である Osimertinib が治療効果の面から使用されることが多いが、Osimertinib は他の EGFR-TKI と比較して薬剤性

間質性肺炎を多いことが知られている。我々は、マウスはナフトレンモデルに Osimertinib を投与して肺傷害を検討したところ、Gefinitib よりも肺傷害が増悪し、かつ BALF 中や肺組織におけるリンパ球数の増加を認めた（第 62 回日本呼吸器学会にて発表）。Osimertinib はリンパ球が病態の主体である可能性がある。現在、このリンパ球の免疫チェックポイント発現について解析し、ナフトレンとオシメルチニブを併用したマウス肺傷害モデルに、免疫チェックポイント阻害薬と併用し更に肺傷害が増悪するか否かの実験を進めている。今年度中には発表できる見込みである。

これらの解析を通して、薬剤性肺傷害の発症予測、治療法の開発への大きな第一歩となりうると考えている。

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Suzuki K, Yanagihara T, Matsumoto K, Kusaba H, Yamauchi T, Ikematsu Y, Tanaka K, Otsubo K, Inoue H, Yoneshima Y, Iwama E, Arimura-Omori M, Harada E, Hamada N, Okamoto I, Nakanishi Y.	4. 巻 32
2. 論文標題 Immune-checkpoint profiles for T cells in bronchoalveolar lavage fluid of patients with immune-checkpoint inhibitor-related interstitial lung disease.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International immunology	6. 最初と最後の頁 547-557
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxaa022	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 Suzuki K, Yanagihara T, Matsumoto K, Chong SG, Ando H, Ide M, Arimura-Omori M, Hata K, Hamada N	4. 巻 60
2. 論文標題 Immune-checkpoint kinetics for T cells in anti-MDA5 positive interstitial lung disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rheumatology (Oxford)	6. 最初と最後の頁 e14-e16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/keaa412	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 Kotetsu Y, Yanagihara T, Suzuki K, Ando H, Eto D, Hata K, Arimura-Omori M, Yamamoto Y, Harada E, Hamada N.	4. 巻 9
2. 論文標題 Imaging Changes and Immune-Checkpoint Expression on T Cells in Bronchoalveolar Lavage Fluid from Patients with Pulmonary Sarcoidosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines9091231.	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木邦裕、柳原豊史、濱田直樹、池松祐樹、有村雅子、山本悠造、原田英治、松元幸一郎、中西洋一
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害剤による間質性肺疾患における気管支肺胞洗浄液中のT細胞の解析
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～2021年

1. 発表者名 鈴木邦裕、柳原豊史、濱田直樹、山本悠造、片平雄之、有村雅子、原田英治、松元幸一郎、中西洋一
2. 発表標題 サルコイドーシスにおける免疫チェックポイント発現
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古鉄泰彬、柳原豊史、鈴木邦裕、安藤裕之、衛藤大祐、秦兼太郎、有村雅子、山本悠造、原田英治、濱田直樹
2. 発表標題 肺サルコイドーシス患者における気管支肺胞洗浄液中のTリンパ球が発現するTIM-3と胸部CT画像変化との関連性
3. 学会等名 第41回日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasuaki Kotetsu, Toyoshi Yanagihara, Kunihiro Suzuki, Hiroyuki Ando, Daisuke Eto, Kentaro Hata, Masako Arimura-Omori, Yuzo Yamamoto, Eiji Harada1, Naoki Hamada
2. 発表標題 Imaging changes and immune-checkpoint expression on T cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with pulmonary sarcoidosis
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asia Pacific Society of Respiriology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤裕之、濱田直樹、鈴木邦裕、衛藤大祐、古鉄泰彬、秦兼太郎、山本悠造、柳原豊史、原田英治
2. 発表標題 EGFR-TKIと免疫チェックポイント阻害剤の併用によるマウス肺傷害についての検討
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
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
---------	---------