

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03528

研究課題名（和文）がん関連線維芽細胞の多様性による免疫チェックポイント阻害薬の効果予測の機序解明

研究課題名（英文）Mechanism of predicting the effects of immune checkpoint inhibitors based on the diversity of cancer-associated fibroblasts

研究代表者

安藤 雄一（Ando, Yuichi）

名古屋大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：10360083

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：Meflinは、がん関連線維芽細胞（CAF）の新規マーカーである。本研究では、Meflin陽性CAFの存在量が免疫チェックポイント阻害薬の良好な治療効果に相関することを、淡明細胞型腎細胞癌と尿路上皮癌の臨床検体を用いて明らかにした。さらに、このMeflin陽性CAFによる腫瘍免疫制御メカニズムは、補体C3とその分解産物iC3bを介したCD11b陽性細胞の腫瘍内浸潤の抑制であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん関連線維芽細胞（CAF）の新規マーカーとしてMeflinを同定し、Meflin陽性CAFの存在量が免疫チェックポイント阻害薬の良好な治療効果に相関することを明らかにした。この分子メカニズムは、補体C3とその分解産物iC3bを介したCD11b陽性細胞の腫瘍内浸潤の抑制であることを明らかにした。局所間質産生補体C3は神経科学や発生学などで注目されているが、腫瘍微小環境におけるCAF由来補体C3に着目した研究は、我々の知る限り、本研究が最初である。

研究成果の概要（英文）：Meflin is a novel marker of cancer-associated fibroblasts (CAFs). In this study, we demonstrated that the prevalence of Meflin-positive CAFs correlates with favorable therapeutic effects to immune checkpoint inhibitors, using clinical specimens from patients with clear cell renal carcinoma and urothelial carcinoma. Furthermore, we clarified that the mechanism of tumor immunoregulation by this Meflin-positive CAF is the suppression of intratumor infiltration of CD11b-positive cells via complement C3 and its degradation product iC3b.

研究分野：がん薬物療法

キーワード：がん関連線維芽細胞 腫瘍免疫応答 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

(1) 免疫チェックポイント阻害薬 (immune checkpoint inhibitor: ICI) は現在までに様々な悪性腫瘍の薬物治療に使用されるようになったが、今後の重要な課題として治療効果が期待できる症例の予測があげられる。免疫チェックポイント分子 PD-L1 の腫瘍細胞あるいは腫瘍組織における陽性割合やマイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability)、腫瘍遺伝子変異総量 (tumor mutation burden) が臨床応用されているが、いずれも患者選択マーカーとして十分ではない。すなわち、高精度、低コスト、かつ簡便な効果予測マーカーが求められている。

(2) 腫瘍組織の間質は免疫細胞、血管、がん関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast: CAF) 及び細胞外基質から構成される。免疫細胞の多様性と免疫療法応答の関連に着目した研究は多いが、CAF の多様性と腫瘍免疫の関係についてはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

研究代表者らは最近、非小細胞肺癌の間質に存在する CAF の新規マーカーとしてロイシンリッチリピートを有する GPI アンカー型膜分子 Meflin を同定し、Meflin 陽性 CAF の存在量と ICI による薬物治療後の奏効率との間に非常に高い相関関係を見出した。本研究の目的は、

(1) 薬物治療に ICI を単剤で使用する肺癌以外の悪性腫瘍、具体的には淡明細胞型腎細胞癌と尿路上皮癌において、治療後の奏効率と腫瘍組織の CAF における Meflin の発現との関連を明らかにすること、及び

(2) Meflin 陽性 CAF が治療奏効率を制御する分子メカニズムを明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 名古屋大学医学部附属病院及び共同研究機関において、ICI 単剤療法 (ニボルマブ、ペムブロリズマブのいずれか) を開始した淡明細胞型腎細胞癌 (ccRCC) と尿路上皮癌 (UC) の症例について、CAF における Meflin の発現率を解析し、客観的奏効割合、全生存率及び無増悪生存率との相関関係を検討した。

(2) Meflin 陽性細胞特異的に補体 C3 遺伝子を欠損するマウス (Meflin 系譜細胞特異的補体 C3 欠損マウス) を作出し、MC-38 細胞株を用いて、腫瘍局所における補体 C3 の発現が ICI への反応性に与える影響を評価した。さらに、腫瘍組織の免疫染色による CD11b 陽性細胞浸潤量の比較、CD11b 陽性初代培養細胞あるいは細胞株を用いた細胞浸潤アッセイを実施した。

4. 研究成果

(1) 淡明細胞型腎細胞癌 (ccRCC) と尿路上皮癌 (UC) の症例それぞれ 21 例と 49 例から採取した腫瘍組織を用いて、CAF における Meflin 発現率を評価した。Meflin 発現率は、全間質細胞のうち Meflin 陽性 CAF の占める割合が 15%以上を高発現、15%未満を低発現と判定した。いずれにおいても、全間質細胞中 Meflin 陽性 CAF が 15%以上の症例において奏効割合は有意に高く (図 1)、また無増悪生存期間及び全生存期間は共に延長していた (図 2)。

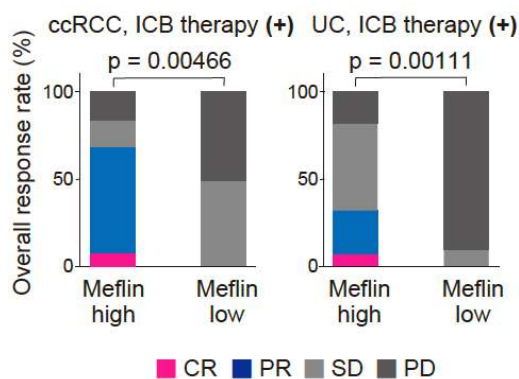


図 1 ICI 単剤投与を受けた ccRCC (左) と UC (右) 症例における Meflin 陽性細胞の多寡での奏効割合の比較
Meflin 陽性 CAF が 15%以上の症例の奏効割合は有意に高かった。

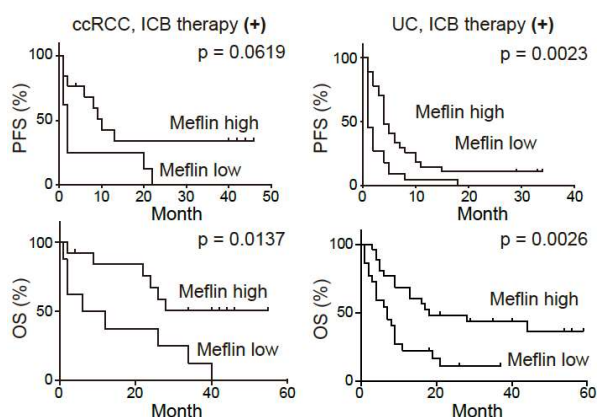


図 2 ICI 単剤投与を受けた ccRCC (左) と UC (右) 症例における Meflin 陽性細胞の多寡での無増悪生存期間 (上段) 及び全生存期間 (下段) の比較
Meflin 陽性 CAF ≥15%の症例で無増悪生存期間及び全生存期間が延長していた。

(2) Meflin 系譜細胞特異的補体 C3 欠損マウス及び対照マウスに大腸癌由来細胞株 MC-38 を皮下に移植し、抗 PD-1 抗体あるいはアイソタイプ抗体で治療したときの腫瘍増殖曲線を描画し、底を 2 とする腫瘍体積の対数で表した増殖曲線の傾きに与える一般化線形混合モデルで推定した固定効果を評価した。その結果、Meflin 系譜細胞特異的に補体 C3 を欠損させても、腫瘍増殖には影響を与えなかったが、PD-1 抗体による腫瘍増殖の抑制効果は減弱した (図 3)。

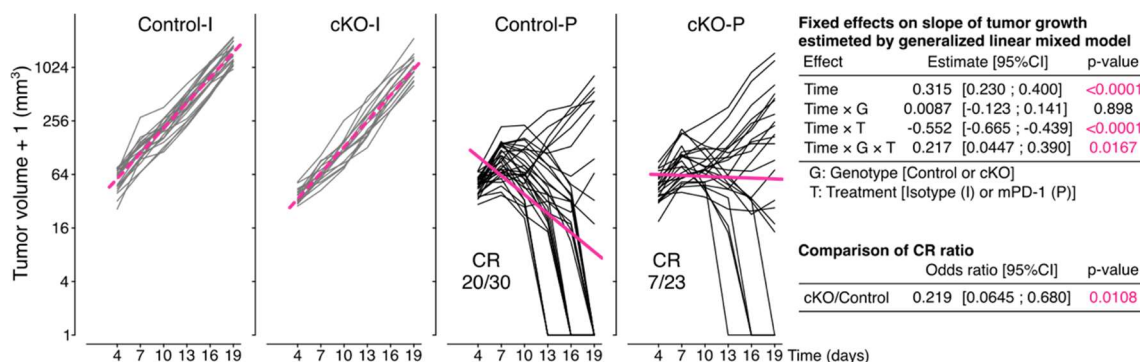


図 3 Meflin 系譜細胞特異的補体 C3 欠損マウス(cKO)及び対照マウス (Control) に移植した MC-38 腫瘍の増殖曲線 (左) とその傾きに寄与する各パラメータ別の固定効果の推定値 (右) I: アイソタイプ抗体、P: 抗 PD-1 抗体、G: 遺伝子型 (Control 又は cKO)、T: 治療法 (I あるいは P)、CR: 完全奏効

Meflin 系譜細胞特異的に補体 C3 を欠損させても、腫瘍増殖には影響を与えなかったが、PD-1 抗体による腫瘍増殖の抑制効果は減弱した。

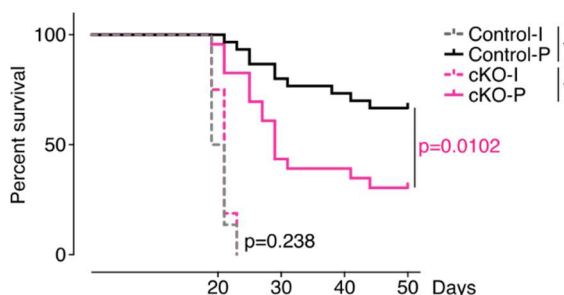


図 4. MC-38 移植モデルにおける各群の生存曲線 Control: 対照マウス、cKO: Meflin 系譜細胞特異的補体 C3 欠損マウス、I: アイソタイプ抗体、P: 抗 PD-1 抗体、***: $p < 0.0001$

補体 C3 欠損マウスを抗 PD-1 抗体で治療したときの予後は対照群より短縮していた。

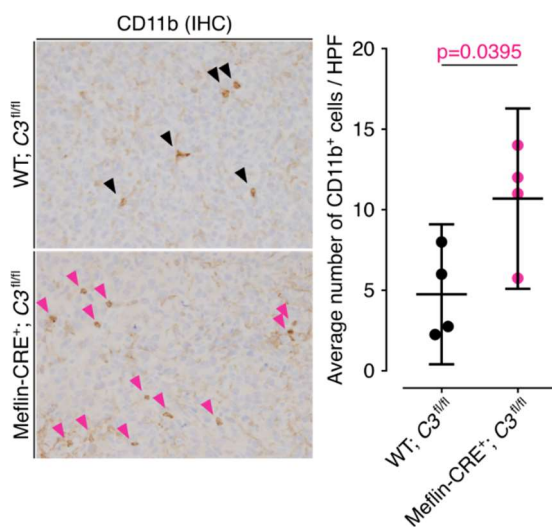


図 5 MC-38 腫瘍組織の CD11b の免疫染色 WT; C3^{fl/fl}: 対照マウス、Meflin-CRE⁺; C3^{fl/fl}: Meflin 系譜細胞特異的補体 C3 欠損マウス

補体 C3 欠損マウスでは CD11b 陽性細胞の浸潤量が多かった。

また、Meflin 系譜細胞特異的補体 C3 欠損マウスにおいて、抗 PD-1 抗体で治療したときの予後は、抗 PD-1 抗体で治療した対照群と比較して短縮した。(図 4)。

次に、Meflin 系譜細胞特異的補体 C3 欠損マウス及び対照マウスの MC-38 腫瘍組織内の CD11b 陽性細胞の浸潤量を免疫染色にて評価したところ、Meflin 系譜細胞特異的補体 C3 欠損マウスで有意に CD11b 陽性細胞の浸潤量が多かった (図 5)。この結果は、補体 C3 が CD11b 陽性細胞の浸潤に影響を与えることを示唆しており、マウス腹腔由来 CD11b 陽性細胞や、CD11b 陽性ミエロイド系細胞株 THP-1 細胞を用いた細胞浸潤アッセイによって、線維芽細胞培養上清、補体高発現細胞株 HepG2 細胞培養上清、ヒト由来補体 C3 あるいはその分解産物 iC3b の効果を検討したところ、補体 C3 特にその分解産物 iC3b が CD11b 陽性細胞の浸潤抑制に寄与していた。

本研究では、腫瘍間質中の Meflin 陽性 CAF が ICI 治療の反応性を増強することを、まず 2022 年に非小細胞肺癌症例の臨床検体及びマウス移植モデルを用いて報告した (Miyai et al., *Life Sci. Alliance*, 2022)。続いて、腎細胞癌及び尿路上皮癌においても同じ結果を得た。そして、この Meflin 陽性 CAF による腫瘍免疫制御メカニズムは、補体 C3 とその分解産物 iC3b を介した CD11b 陽性細胞の腫瘍内浸潤の抑制であることを明らかにした。最近、局所間質産生補体 C3 は神経科学や発生学などで注目されているが、腫瘍微小環境における CAF 由来補体 C3 に着目した研究は、我々の知る限り、本研究が最初である。今後論文報告する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuki Miyai, Daisuke Sugiyama, Tetsunari Hase, Naoya Asai, Tetsuro Taki, Kazuki Nishida, Takayuki Fukui, Toyofumi Fengshi Chen-Yoshikawa, Hiroki Kobayashi, Shinji Mii, Yukihiro Shiraki, Yoshinori Hasegawa, Hiroyoshi Nishikawa, Yuichi Ando, Masahide Takahashi, Atsushi Enomoto.	4. 巻 5
2. 論文標題 Meflin-positive cancer-associated fibroblasts enhance tumor response to immune checkpoint blockade	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202101230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202101230	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Miyai Y, Enomoto A, Ando Y, Takahashi M
2. 発表標題 Significance of meflin-positive cancer-associated fibroblasts in predicting response to immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer
3. 学会等名 2020 ASCO annual meeting Virtual Format (Poster) Abstract ID: 3118(#182) May 2020 (国際学会)
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	榎本 篤 (Enomoto Atsushi) (20432255)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	

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