

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07426

研究課題名（和文）正常免疫マウスでのがん免疫療法によるサイトカイン放出症候群の病態解明と新治療開発

研究課題名（英文）Elucidation of pathogenesis of cytokine release syndrome by cancer immunotherapy in normal immunity mice and development of new treatment

研究代表者

岡山 哲也（Okayama, Tetsuya）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：30636535

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）：がん免疫療法により、治療効果は上がったが、副作用も強力となり、その最たるものは、サイトカイン放出症候群（CRS）と呼ばれ、しばしば致死的となる。その病態把握に対し、我々は、偶然にも免疫不全では無く、正常免疫マウスでの動物実験モデルを発見した。詳細な検討として、NK細胞の2回投与後の致死に至るまでに摘出した各種臓器（脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓）についてH E染色などによる検討を行ったが、各臓器には著明な炎症細胞浸潤や、損傷所見は認めなかったため、同時に採取した血清の31種のサイトカイン測定を行い解析を行った。その結果、CCL1、CCL7、CCL24が中心的な役割を担っている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん治療に革新をもたらした免疫チェックポイント阻害剤は、副作用も強力である。その最たるものは、サイトカイン放出症候群（CRS）であり、致死的となり得る。その病態解明や制御は喫緊の課題であり、我々は世界初の免疫不全マウスを用いない自然免疫下での動物実験モデルを確立した。このモデルを用い、網羅的なサイトカインの検索にて、CCL1、CCL7、CCL24が中心的である可能性が示唆された。今後これらの新たな知見からCRSの病態解明・制御に向けた検討を行うことは、がん免疫療法のみならず、CRSは新型コロナウイルス感染症でも注目されたものであり、学術的な意義のみならず、社会的意義も大きいものと思われる。

研究成果の概要（英文）：Although cancer immunotherapy has increased therapeutic efficacy, it also produces powerful side effects, the most notable of which is called cytokine release syndrome (CRS), which is often fatal. In order to understand the pathology, we happened to discover an animal model using normal immune mice, not immunodeficient mice. As a detailed study, various organs (brain, heart, lung, liver, kidney, spleen) excised until death after two doses of NK cells were examined by HE staining and other staining. Since there was no marked inflammatory cell infiltration or injury in each organ, 31 types of cytokines were measured and analyzed in the serum collected at the same time. As a result, it was suggested that CCL1, CCL7, and CCL24 might play a central role.

研究分野：がん免疫療法

キーワード：サイトカイン放出症候群

1. 研究開始当初の背景

切除不能進行・再発がんに対する治療目標は、従来「延命」であったが、2018年ノーベル生理学・医学賞を受賞したPD-1に代表される免疫チェックポイントの発見による、画期的ながん免疫治療薬の登場により、進行がんであっても「完治・治癒」を目指すことのできる新時代を迎えたが、この画期的な免疫療法においても効果が無いがん種や症例も依然として多く、克服すべき大きな問題となっている。この状況を打破する検討として、免疫チェックポイント阻害剤の効果増強や他剤との併用、更には新たながん免疫療法として、リンパ球のT細胞受容体を、特異的にがん抗原を認識する抗体を含む受容体に置き換えたキメラ型抗原受容体発現T細胞(Chimeric antigen receptor T cell; CAR-T)を用いたCAR-T療法が開発され、既にアメリカFDAにおいて数種類の血液がんに対して承認され、現在は日本でも使用が可能となっている。更に、キメラ型抗原の更なる改良や、細胞内シグナルの工夫などによる、より強力な治療法が開発されてきており、現在は血液がんが対象であるが、近い将来がん免疫療法でも治療抵抗性であり、腫瘍量も多い固形がんへの応用も視野に入り、加えて免疫チェックポイント阻害剤とCAR-T療法の併用も検討が始まっており(Nature Biotechnology 36, 9, 2018)、人類の進行がん克服への手段が整いつつある。しかし、強力ながん免疫療法によって、現在まで効果が得られなかった進行がんに対しても高い効果が期待できる半面、時に致死的になり得る副作用が起こることが、CAR-T療法での臨床試験で判明しており、致死的になる病態の主なものは、腫瘍崩壊をきっかけとしたサイトカイン放出症候群(Cytokine Release Syndrome; CRS)と呼ばれる、生体免疫の過剰反応によるものと考えられている(Blood. 124:188-195, 2014)。この病態に対する治療として、現在は免疫を抑制するステロイドや、抗IL-6抗体薬が使用されてはいるが(Blood, 128(22), 221, 2016)、制御不能である症例も多い。今後、免疫チェックポイント阻害剤とCAR-T療法の実臨床での併用や、新規の強力ながん免疫療法が腫瘍量が多い固形癌を含む難治がんに対して使用されていくことは間違いないが、腫瘍量の多いがん腫ほどCRSのリスクが高いことがCAR-T療法の臨床試験で判明しており(Ann Hematol. May 15, 2018)、CRSはがん克服のアキレス腱となるため、その病態把握や新規制御法の検討は喫緊の課題である。CRSの病態把握や制御法の検討には、動物実験での基礎的検討が必須であるが、現在までに報告されている動物実験モデルは、重度の免疫不全マウス(SCID beige mouse)に対して、ヒト血液腫瘍株であるRaji tumorを移植し、ヒトCAR-T細胞による治療モデルや(Nat Med. 24(6):731-738, 2018)、同じくSCID beigeマウスを用いてErbB分子をターゲットとしたヒトCAR-T細胞治療を行ったモデル(J Immunol. 191(9):4589-98, 2013 Nov)、更に別系統の重度免疫不全マウスであるNSGマウスにヒトALL細胞を移植し、ヒトCAR-T細胞治療を行ったモデルしかなく(Nat Med. 24(6):739-748, 2018)、いずれも重度の免疫不全マウスを用いており、壮大な免疫機能が関与するCRSの病態把握としては極めて不自然で不完全なモデルでの検討でしかなく、ヒトに応用可能な詳細な病態把握や制御法の検討は不可能であり、今後必ず問題となる、強力ながん免疫療法によるCRSの病態把握や新規治療法の検討を、免疫不全動物モデルでは無く、正常免疫の動物モデルにて行うことが強く望まれる状況であった。

2. 研究の目的

我々は、世界で初めて培養法を確立した担癌患者からの高純度・高活性NK細胞を用いて臨床試験を行ってきた(新開発NK細胞の担癌患者に対する第相臨床試験(J Transl Med. 25;13:277. 2015 Aug)、NK細胞によるADCC活性の効果増強を狙い、世界初のIgG1抗体薬併用NK細胞療法における第相臨床試験(Int J Cancer. 15;142:2599-2609. 2018 Jun.))。これらの検討にて担癌患者から培養したNK細胞を用いたがん免疫細胞療法の安全性は十分に確認され、更にNK細胞とIgG1抗体薬併用では、単独療法では無かった生体内の免疫機能の変動を認めたと、効果は不十分であり、今後は効果増強の手段の検討が必要な状況であった。そこで、効果増強の手段を探る基礎的検討として、がん免疫療法のセントラルドグマである腫瘍局所への免疫細胞浸潤の多い腫瘍、所謂HOT tumorにおいて効果が高いことに着目し(J Clin Oncol. Mar 2013.など)、腫瘍の能動的なHOT tumor化について検討していた。HOT tumor化を能動的に行う方策として、NK細胞は自然免疫系に属し、免疫感作を必要としないため、腫瘍局所への直接投与によって能動的にHOT tumorな腫瘍に強く変化させ、がん細胞を攻撃、腫瘍崩壊へと導き、更に新たながん抗原の提示(Antigen Spreading)も引き起こし、この新規抗原が獲得免疫系へ提示され、腫瘍局所に加え、全身への抗腫瘍効果の広がりをも獲得できる可能性を秘めた有望な細胞であり、以前より期待されていたが、担癌患者からのNK細胞培養が非常に困難であったため、検討することすら出来ない状況であった。そこで、我々が開発し、安全性を確認したNK細胞を用い、腫瘍局所への直接投与によるHOT tumor化を着想し、今後の臨床応用を目指し、動物実験モデルにて検討を開始した。その検討において、正常免疫マウスでのNK細胞単独局所投与にて抗腫瘍効果を確認

できたため、複数回 NK 細胞と投与することでの効果増強についての検討を行ったところ、NK 細胞 2 回目の投与後数時間以内にマウスがほぼ確実に急死する現象を発見した。この現象については、溶媒など NK 細胞以外の因子を比較し、繰り返し検討を行ったが、NK 細胞投与そのものに起因することが確実な現象であり、NK 細胞局所投与が引き金となった免疫不全マウスを用いない正常免疫マウスでのがん免疫療法による CRS 自然発症と考えられるモデルを世界で初めて発見した。現在までに正常免疫マウスを用いたがん免疫療法における CRS 自然発症動物モデルは全く存在せず、この新発見モデルを元に、今後のがん免疫療法において制御が非常に重要である CRS に対する治療法確立への応用に向けた病態解明についての基礎的検討を行っていくことを目的とした。

3 . 研究の方法

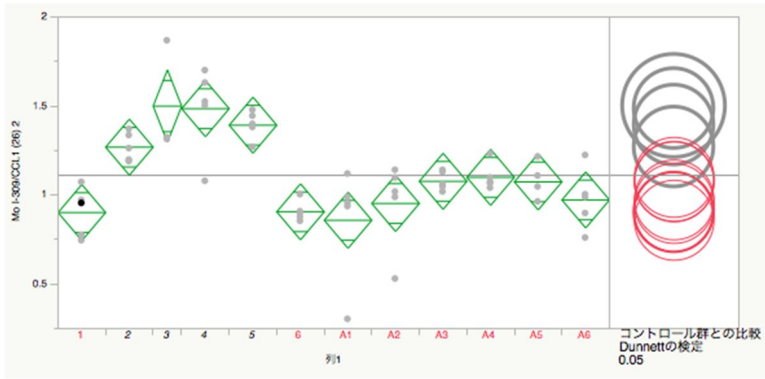
今回新発見した、がん免疫療法による CRS 自然発症動物実験モデルは、Balb/c マウスに Colon26 マウス大腸癌細胞株を皮下移植し、マウス脾臓より分離した NK 細胞を 2 回腫瘍局所投与することで発症するモデルであり、このモデルを用い以下の項目について検討していく。 ; CRS 発症による様々な臓器の変化を追うことは、今後の新規病態制御に繋がると思われるが、この点も実臨床では、詳細な検討を行うことは困難であるため、この動物実験モデルを用いて、2 回目投与前後の各全身臓器の時系列での病理学的検討を行っていく。 ; 今回新発見した実験モデルでは、2 回目投与直後から死に至るまでは数時間であり、投与前後数時間での血液中のサイトカインの時系列での変遷を ELISA などにてチェックする。具体的には、CRS についての臨床データの既報から、IL-6 や IFN が上昇している報告があるが、従来のデータは、発症してからの臨床データしかないので、発症前後を含めた本質的サイトカイン変動の検討は困難であり、既報のサイトカインを中心に網羅的なサイトカイン測定を行い、他のサイトカインの変動や、早期に変化し Predict marker となり得るものが無いかなどの検討を行う。

4 . 研究成果

; NK 細胞の 2 回投与後の致死に至るまでに摘出した各種臓器 (脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓) について H E 染色などによる検討を行ったが、各臓器には著明な炎症細胞浸潤や、損傷所見は認めなかったため、NK 細胞投与に伴う各種免疫細胞の相互作用などによるサイトカインなどの関連が示唆された。

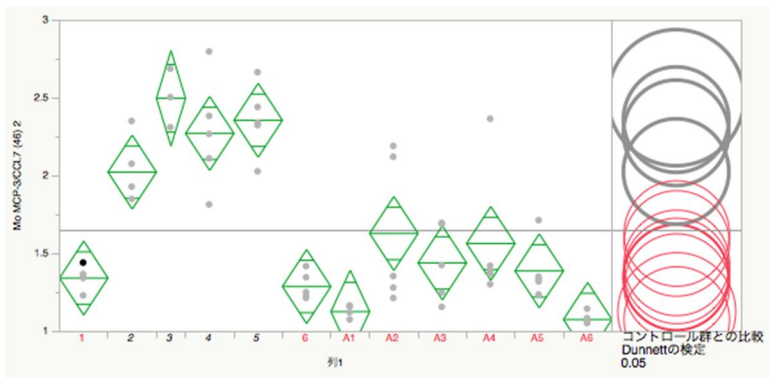
; 各臓器摘出と同時に NK 細胞の 2 回投与後の致死に至るまでの間に採取した血清を 31 種のサイトカインを測定するマルチプレックスにて測定を行い、解析を行った。その結果として、CCL1、CCL7、CCL24 のサイトカインが中心的な役割を担っている可能性が示唆された (図 1、2、3 : 群 1 ~ 6 は Balb/c マウス、群 A1 ~ A6 は C57BL/6 マウス。群 1、2、A1、A2 は溶媒のみ。群 3、4、5、A3、A4、A5 は NK 細胞 2 回投与群。群 6、A6 は生食投与群。)
今後、これらのサイトカインを中心に、阻害実験などによる CRS の詳細な病態把握に向けた検討を行い、治療薬創薬への足掛かりとしていきたいと考えている。

図 1 : CCL1



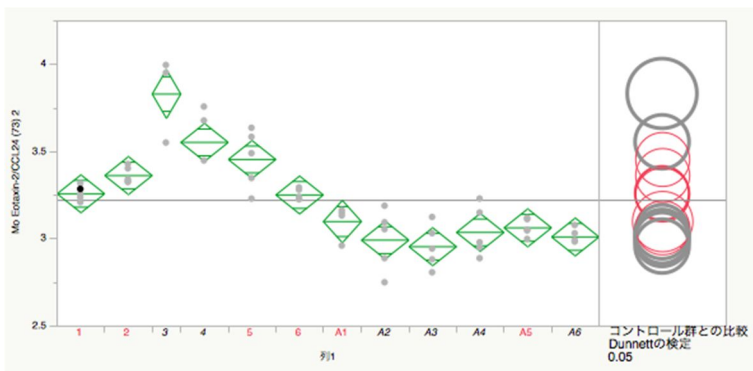
水準	Abs(Dif)-LSD	p値
3	0.232	0.0003*
4	0.266	<0.001*
5	0.174	0.0006*
2	0.05	0.0155*
A4	-0.12	0.4335
A3	-0.14	0.5741
A5	-0.14	0.5951
A6	-0.25	0.9974
A2	-0.27	0.9999
6	-0.31	1.0000
1	-0.32	1.0000
A1	-0.27	1.0000

図 2 : CCL7



水準	Abs(Dif)-LSD	p値
3	0.602	<0.001*
5	0.535	<0.001*
4	0.45	<0.001*
2	0.202	0.0018*
A2	-0.19	0.4847
A4	-0.26	0.7619
A3	-0.38	0.9988
A5	-0.43	1.0000
1	-0.48	1.0000
6	-0.42	1.0000
A1	-0.29	0.8350
A6	-0.21	0.5705

図 3 : CCL24



水準	Abs(Dif)-LSD	p値
3	0.319	<0.001*
4	0.076	0.0034*
5	-0.02	0.0980
2	-0.11	0.7334
1	-0.22	1.0000
6	-0.21	1.0000
A1	-0.07	0.3247
A5	-0.02	0.1023
A4	0.003	0.0460*
A6	0.029	0.0191*
A2	0.047	0.0100*
A3	0.085	0.0024*

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------