

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09187

研究課題名(和文)末梢血中循環腫瘍細胞を用いた非小細胞肺癌への化学療法による免疫原性細胞死の解析

研究課題名(英文) Immunogenic cell death using circulating tumor cell in peripheral blood of NSCLC treated with chemotherapy

研究代表者

高橋 祐介 (Takahashi, Yusuke)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫制御TR分野・主任研究員

研究者番号：00445214

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)：当施設で切除を受けた非小細胞肺癌でmRNAseq.とFACSを行った112例のうち導入化学療法を行った症例8例を解析した。

腫瘍浸潤リンパ球FACSでCD8陽性T-cellが抗がん剤投与後に有意に増加、特に腫瘍特異的とされるCD8陽性/CD39陽性/CD103陽性の分画が著増していた。またFoxP3、ICOS、LAG3、CTLA4などの免疫抑制性分子が抗がん剤投与後に低下、fresh tumor digestにおけるIFN gamma、IL1 beta、CXCL6の数値が有意に増加していた。これらのケモカインやサイトカインの発現によって腫瘍特異的な免疫反応が惹起され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

本研究では化学療法投与とimmunogenic cell deathの解析をするためにcirculating tumor cellの解析を計画していたが、COVID-19感染拡大の副次的な事情により困難となったため当初の研究計画の変更を余儀なくされた。血液や腫瘍検体を用いた殺細胞性抗がん剤の投与前後での腫瘍の免疫学的微小環境の解析によって、殺細胞性抗がん剤による免疫学的微小環境への影響、また免疫チェックポイント阻害剤の併用療法がより適した症例の免疫反応などを探るための基礎的知見をえることができたと考えている。今後はneoantigenを絡めた解析と論文投稿を予定している。

研究成果の概要(英文)：We analyzed 8 patients treated with preoperative induction chemotherapy out of 112 patients with non-small cell lung cancer underwent resection and who underwent mRNAseq. and FACS in our institution.

FACS of tumor-infiltrating lymphocytes showed a significant increase in CD8-positive T-cells after anticancer drug administration, especially in the CD8-/CD39-/CD103-positive fractions, which are considered tumor-specific immunogenic reaction. Immunosuppressive molecules such as FoxP3, ICOS, LAG3, and CTLA4 were decreased after treatment with anticancer agents, and IFN gamma, IL1 beta, and CXCL6 in the fresh tumor digest were significantly increased. It was suggested that the expression of these chemokines and cytokines may elicit tumor-specific immune responses.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 非小細胞肺癌 循環腫瘍細胞 化学療法 免疫原性細胞死

1. 研究開始当初の背景

近年、免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) が IV 期非小細胞肺癌に対する初回治療の標準選択肢となり、さらに ICI と殺細胞性抗癌剤との併用療法が無増悪生存期間を大幅に改善することが示され適応が急速に拡大している。一方で、殺細胞性抗癌剤との併用療法も奏効率は 47-55% と十分ではないうえ、間質性肺炎や心筋炎など重篤なものを含む有害事象が 48-70% と低い割合で起こることから適切な症例選択が必要である。現状では、ICI 単剤療法の臨床試験において効果予測バイオマーカーとして免疫組織化学による PD-L1 発現スコアや tumor mutation burden は生存曲線を層別化できるものの、予後良好群においても奏効率が 40% 程度であり、効果予測能は十分ではない。抗腫瘍免疫応答のカスケードの要点をより反映するバイオマーカーが望ましい。

“ Cancer-immunity cycle ” は抗腫瘍免疫応答が働くのに必要な 7 つのステップを便宜的に表したもので特にサイクルの端緒となる、がん抗原の放出が重要である。Immunogenic cell death (ICD) は、化学療法や放射線療法によって死にゆく細胞において、がん抗原の放出に加えて小胞体の calreticulin の細胞表面への露出や、HMGB1 や ATP の放出によって “Cancer immunity cycle ” が活性化、特異的抗腫瘍免疫応答を誘導する「免疫原性細胞死」とされている。In vitro では抗癌剤や放射線による ICD の分子的 hallmarks を介して抗腫瘍免疫応答が促進されるが、生体内ではその存在すら実証されていない。

2. 研究の目的

循環血中腫瘍細胞 (CTC) は化学療法や放射線治療などによって増加するとされおりその中には ICD を起こしている細胞が含まれている可能性が高い。本研究は、IV 期非小細胞肺癌で ICI・殺細胞性抗癌剤併用療法を受けた症例で末梢血から CTC を採取、その ICD hallmarks を解析し、奏功との関連を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では化学療法投与と immunogenic cell death の解析をするために circulating tumor cell の解析を計画していたが、COVID-19 感染拡大の副次的な事情により困難となったため当初の研究計画の変更を余儀なくされた。血液や腫瘍検体を用いた殺細胞性抗癌剤の投与前後での腫瘍の免疫学的微小環境の解析によって、殺細胞性抗癌剤による免疫学的微小環境への影響、また免疫チェックポイント阻害剤の併用療法がより適した症例の免疫反応などを探るための基礎的知見をえることができたと考えている。そのため愛知県がんセンター病院で切除を受けた非小細胞肺癌で mRNAseq. と FACS を行った 112 例のうち導入化学療法を行った症例 8 例を解析した。

4. 研究成果

愛知県がんセンターにおける症例集積では当該研究期間で完全切除を受けた原発性肺腺癌症例のうち mRNA シーケンスや FACS などの免疫学的解析を行った症例 112 例を解析の対象とした。そのうち導入化学療法を行った症例は 8 例であった。

まず、腫瘍浸潤リンパ球を FACS で解析すると CD8 陽性 T-cell の数が殺細胞性抗癌剤の投与によって増加していることがわかった。中でも腫瘍特異的とされる CD8 陽性/CD39 陽性/CD103 陽性の分画が有意に増加していることが明らかとなり、腫瘍特異的な免疫反応が誘導されている可能性が示唆された。同様に免疫抑制環境について解析すると、FoxP3、ICOS、LAG3、TIGIT、CTLA4 などの免疫抑制性分子の発現が抗癌剤の投与後に低下することがわかり、反対に、fresh tumor digest における interferon gamma、IL1 beta、CXCL6 の数値が抗癌剤の投与によって有意に増加することがわかり、これらのケモカインやサイトカインの発現によって抗腫瘍免疫の働きが惹起されるメカニズムが考えられた。

本研究では当初、化学療法投与と immunogenic cell death の解析をするために circulating tumor cell を採取するシステムを用いた解析を計画していたが、COVID-19 感染拡大の副次的な事情により困難となったため当初の研究計画の変更を余儀なくされた。

血液や腫瘍検体を用いた殺細胞性抗癌剤の投与前後での腫瘍の免疫学的微小環境の解析によって、殺細胞性抗癌剤による免疫学的微小環境への影響、また免疫チェックポイント阻害剤

の併用療法がより適した症例の免疫反応などを探るための基礎的知見をえることができたと考えている。今後は neoantigen を絡めた解析を予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Masago K, Fujita S, Oya Y, Takahashi Y, Matsushita H, Sasaki E, Kuroda H.	4. 巻 57
2. 論文標題 Comparison between Fluorimetry (Qubit) and Spectrophotometry (NanoDrop) in the Quantification of DNA and RNA Extracted from Frozen and FFPE Tissues from Lung Cancer Patients: A Real-World Use of Genomic Tests.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicina (Kaunas).	6. 最初と最後の頁 135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medicina57121375.	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 Kuroda H, Ichinose J, Masago K, Takahashi Y, Nakada T, Nakao M, Okumura S, Hashimoto K, Matsuura Y, Sakakura N, Matsushita H, Mun M.	4. 巻 57
2. 論文標題 Permissible Outcomes of Lobe-Specific Lymph Node Dissection for Elevated Carcinoembryonic Antigen in Non-Small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicina (Kaunas).	6. 最初と最後の頁 1365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medicina57121365.	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 Kuroda H, Masago K, Takahashi Y, Fujita S, Sasaki E, Nakada T, Sakakura N, Nakanishi H, Matsushita H, Yatabe Y.	4. 巻 41
2. 論文標題 Positive Correlation Between the Number of Circulating Tumor Cells in the Pulmonary Vein and Tumor Spread Through Air Spaces in Resected Non-small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 5499-5505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15363.	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 Nakada T, Takahashi Y, Sakakura N, Iwata H, Ohtsuka T, Kuroda H.	4. 巻 28
2. 論文標題 Prognostic Radiological Tools for Clinical Stage IA Pure Solid Lung Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Curr Oncol	6. 最初と最後の頁 3846-3856
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/curronc128050328.	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 Kuroda H, Takahashi Y, Shirai S, Takahara H, Nakada T, Sakakura N, Matsushita H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Survival benefit of immune checkpoint inhibitor monotherapy in patients with non-small cell lung cancer recurrence after completely pulmonary resection.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Transl Med.	6. 最初と最後の頁 1225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/atm-21-1492.	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 Nakai A, Nakada T, Okamoto S, Takahashi Y, Sakakura N, Nakada J, Kuroda H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Risk factors for postoperative nausea and vomiting after thoracoscopic pulmonary wedge resection: pitfalls of an increased fentanyl dose.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Thorac Dis	6. 最初と最後の頁 3489-3496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd-21-296.	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 Kuroda H, Sugita Y, Masago K, Takahashi Y, Nakada T, Sasaki E, Sakakura N, Yamaguchi R, Matsushita H, Hida T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Clinical Guideline-Guided Outcome Consistency for Surgically Resected Stage III Non-Small Cell Lung Cancer: A Retrospective Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 2531
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13112531.	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 Shigenobu T, Takahashi Y, Masugi Y, Hanawa R, Matsushita H, Tajima A, Kuroda H.	4. 巻 22
2. 論文標題 Micropapillary Predominance Is a Risk Factor for Brain Metastasis in Resected Lung Adenocarcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 e820-e828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clcl.2021.04.001.	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 -

1. 著者名 Kuroda H, Sakata S, Takahashi Y, Nakada T, Oya Y, Sugita Y, Sakakura N, Matushita H, Sakao Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Subsegmental resection preserves regional pulmonary function: A focus on thoracoscopy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Torac Cancer.	6. 最初と最後の頁 1033-1040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.13841.	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 Matsui T, Takahashi Y, Shirai S, Nakanishi K, Nakada T, Sakakura N, Haneda H, Okuda K, Nakanishi R, Kuroda H.	4. 巻 69
2. 論文標題 Comparison of surgical outcomes between thoracoscopic anatomical sublobar resection including and excluding subsegmentectomy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gen Thorac Cardiovasc Surg.	6. 最初と最後の頁 850-858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11748-020-01556-3.	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 -

1. 著者名 Nakada T, Shirai S, Oya Y, Takahashi Y, Sakakura N, Ohtsuka T, Kuroda H.	4. 巻 45
2. 論文標題 Four Hours Postoperative Mobilization is Feasible After Thoracoscopic Anatomical Pulmonary Resection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 World J Surg.	6. 最初と最後の頁 631-637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00268-020-05836-0.	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 -

1. 著者名 Oya Y, Kuroda H, Nakada T, Takahashi Y, Sakakura N, Hida T.	4. 巻 21
2. 論文標題 Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitor Monotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer with ALK Rearrangement.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 2623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21072623.	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 -

1. 著者名 Takahashi Y, Suzuki S, Hamada K, Nakada T, Oya Y, Sakakura N, Matsushita H, Kuroda H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Sarcopenia is poor risk for unfavorable short- and long-term outcomes in stage I non-small cell lung cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Transl Med.	6. 最初と最後の頁 325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/atm-20-4380.	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高橋祐介, 篠原周一, 松下博和
2. 発表標題 EGFR変異陰性非小細胞肺癌における腫瘍浸潤リンパ球の標的がん特異抗原の探索
3. 学会等名 第38回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋 祐介、Prasad S. Adusumilli
2. 発表標題 臨床病期I期の肺腺癌における組織亜型による経時的再発ハザードの層別化の有用性
3. 学会等名 第38回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋祐介、白井俊、高原弘知、鈴木あゆみ、仲田健男、坂倉範昭、黒田浩章
2. 発表標題 完全胸腔鏡下肺切除術における出血のトラブルシューティング
3. 学会等名 第34回日本内視鏡外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋祐介、白井俊、高原弘知、鈴木あゆみ、仲田健男、坂倉範昭、黒田浩章
2. 発表標題 非小細胞肺癌切除例における胸腔洗浄液細胞診陽性の長期予後への影響
3. 学会等名 第62回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2021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	松下 博和 (Matsushita Hirokazu) (80597782)	愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫制御TR分野・分野長 (83901)	
研究分担者	山口 類 (Yamaguchi Rui) (90380675)	愛知県がんセンター(研究所)・システム解析学分野・分野長 (83901)	

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