

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16317

研究課題名(和文) 抗PD-1抗体療法におけるCXCL2による腫瘍免疫制御機構の解明

研究課題名(英文) Dynamics of CXCL2 in anti-PD-1 antibody therapy

研究代表者

松尾 規和 (Norikazu, Matsuo)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：80839001

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)：CXCL2分泌とそのリガンドであるCXCR2の発現は肺癌細胞株の種類によって差を認めていた。CXCL2動態と腫瘍微小環境における免疫細胞プロファイルを確認するため、腫瘍移植マウスモデルに対して抗PD-1抗体を投与し、腫瘍微小環境の解析を行った。C57BL/6マウスを用いたMC38結腸癌モデルに対して、抗PD-1抗体を投与し、良好な腫瘍制御効果を認めた。抗PD-1抗体投与前後のCXCL2変化は投与後の腫瘍容積と相関していた。フローサイトメトリーにて治療終了時の脾臓ならびに腫瘍組織内のMDSC発現を確認した。PD-1抗体投与群では非投与群に対して脾臓におけるMDSC発現が有意に低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在肺癌に対して免疫チェックポイント阻害薬が幅広く使用されているが、その治療効果を予測するバイオマーカーの確立は十分とは言えない。我々は過去の研究において、CXCL2の変化が免疫チェックポイント阻害薬の効果と関係する事を報告している。今回の研究成果によりCXCL2動態と、それが腫瘍微小環境に対して与える影響が明らかになった。CXCL2は免疫チェックポイント阻害薬のバイオマーカーの候補となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：CXCL2 secretion and expression of CXCR2 differed among different lung cancer cell lines. To confirm CXCL2 kinetics and immune cell profiles in the tumor microenvironment, anti-PD-1 antibody was administered to a tumor transplant mouse model. Anti-PD-1 antibody was administered to MC38 colon cancer model using C57BL/6 mice, and good tumor control effect was observed. CXCL2 changes before and after anti-PD-1 antibody administration correlated with tumor volume after administration. Flow cytometry confirmed MDSC expression in spleen and tumor tissue at the end of treatment. MDSC expression in the spleen was significantly lower in the PD-1 antibody-treated group than in the non-treated group.

研究分野：肺癌

キーワード：肺癌 PD-1 PD-L1 CXCL2 CXCR2 免疫チェックポイント阻害薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は先行研究において、抗 PD-1 抗体療法中の末梢血中 CXCL2 の治療前後の変化が抗 PD-1 抗体の治療効果と関連している事を報告した。しかし、抗 PD-1 抗体療法中に末梢血中 CXCL2 濃度が変動するメカニズムと、CXCL2 が抗 PD-1 抗体療法中の腫瘍微小環境における免疫応答に与える影響については不明な点が多く残されている。上記について、肺癌細胞株と腫瘍移植マウスモデルを用いた実験を行い、CXCL2 が肺癌ならびに免疫療法中の免疫動態に与える影響を明らかにすることで、抗 PD-1 抗体療法の新たな治療戦略構築につなげたいと考えた。

2. 研究の目的

抗 PD-1 抗体はがんの日常臨床において欠かせない治療となっているが、耐性化により長期奏功が限定的であることが問題となっている。申請者らは先行研究において、抗 PD-1 抗体療法中の末梢血中 CXCL2 の治療前後の変化が抗 PD-1 抗体の治療効果と関係していることを見出した。この研究結果から、末梢血の CXCL2 測定が抗 PD-1 抗体の治療効果予測とモニタリングに応用できる可能性が示唆された。しかし、抗 PD-1 抗体療法中に末梢血中 CXCL2 値が変動するメカニズムと、末梢血 CXCL2 濃度の変化が腫瘍微小環境における免疫応答に及ぼす影響は不明な点が多い。肺癌細胞株と腫瘍移植マウスモデルを用い、抗 PD-1 抗体療法中に末梢血中 CXCL2 濃度が変動するメカニズムと、抗 PD-1 抗体療法中に CXCL2 が腫瘍微小環境における免疫応答に与える影響を明らかにすることを目的として当研究を実施した。

3. 研究の方法

がん細胞株を用い CXCL2 の癌細胞成長へ与える影響の確認：複数のがん細胞株から蛋白質を抽出し、Western Blotting を用いて CXCL2 と CXCR 2 の発現を確認する。また、ELISA 法を用いて各細胞株の CXCL2 産生能を確認する。それぞれの細胞株に対して リコンビナント CXCL2 蛋白を用いた MTT アッセイにより増殖能を評価する事で、CXCL2 ががん細胞増殖能に与える影響を評価する。

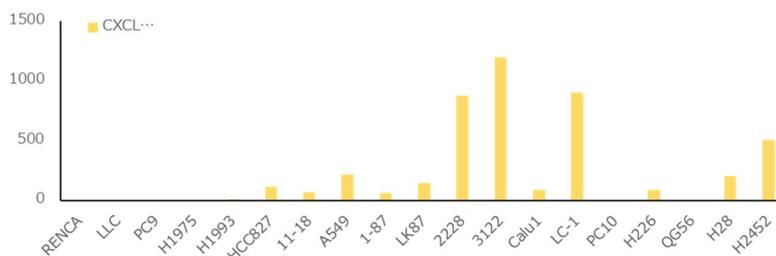
腫瘍移植マウスモデルにおける CXCL2 動態と腫瘍微小環境における免疫細胞プロファイルの解明：C57BL/6 マウスに MC38 結腸癌細胞を皮下移植し、MC38 結腸癌モデルを作成する。抗 PD-1 抗体 (BioXcell In VivoPlus anti-mouse PD-1) isotype 抗体 (BioXcell In VivoPlus rat IgG2 aisoype) それぞれを投与した群で治療前後の末梢血と治療後の脾臓と腫瘍組織を採取する。末梢血中 CXCL2 の測定には ELISA 法を用いる。脾臓と腫瘍組織から細胞浮遊液を作成し、Ly-6G 抗体, Ly-6C 抗体, CD11b 抗体を用いたフローサイトメトリーで MDSC の集簇を確認する。腫瘍組織標本を作製し、PD-L1、CD8、CD64、CD168、CXCL2、CXCR2 などの抗体で免疫染色を行い、腫瘍微小環境における CXCL2 と腫瘍周囲 T リンパ球やマクロファージなどの免疫細胞との関係を解析する。

ヒト組織検体を用いた抗 PD-1 抗体療法治療前後における腫瘍微小環境と CXCL2 動態の関係：抗 PD-1 抗体療法の治療前後のヒト組織検体に対して、PD-L1、CD8、CD64、CD168、CXCL2、CXCR2 などの抗体で免疫染色を行い、腫瘍微小環境における CXCL2 と腫瘍周囲 T リンパ球やマクロファージなどの免疫細胞との関係を解析する。また、その結果と既に解析済みである末梢血中 CXCL2 値の変化を比較し、両者の関係を解析する。

4. 研究成果

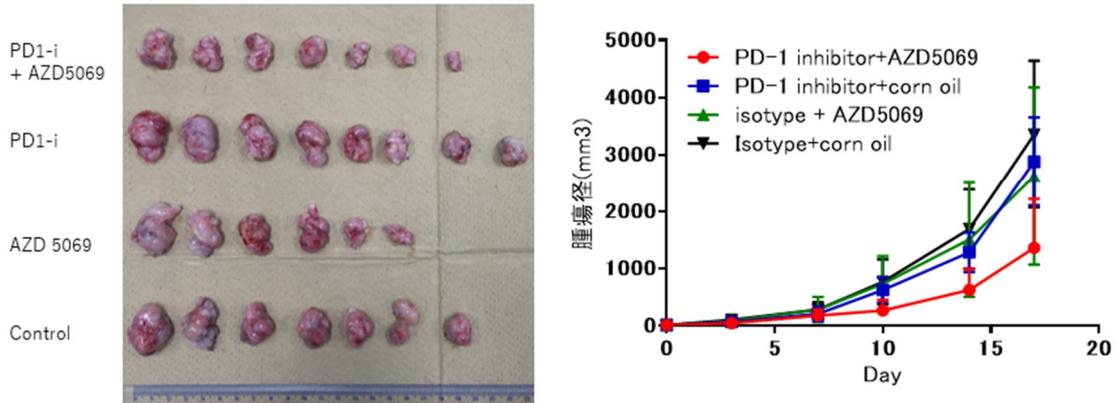
がん細胞株を用いた CXCL2 の癌細胞成長へ与える影響の確認：17 種類のがん細胞株 (PC9, H1975, H1993, HCC827, 11-18, A549, LK87, H2228, H3122, EBC-1, Calu-1, LC-1, PC-10, H226, QG56, H28, H2452) における CXCL2 分泌を、培養上清に対して CXCL2 の ELISA kit を用いることで解析を行った。CXCL2 分泌は H2228, H3122, LC-1, H2452 で高値であったが、H1975, H1993, 11-18, PC-10, QG56 からの分泌を認めなかった(図 1)。

図1. 肺癌細胞株におけるCXCL2分泌

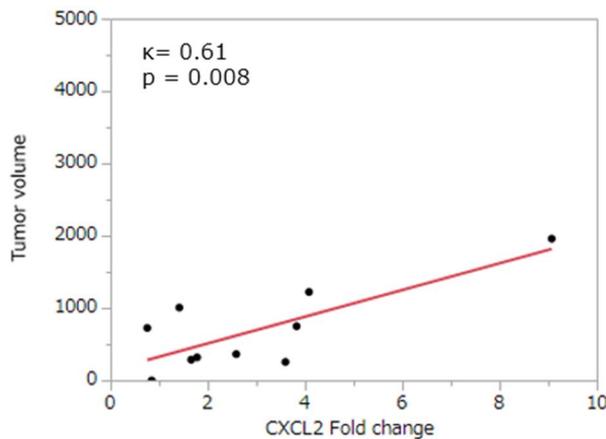


また、各がん細胞株における CXCR2 発現を Western Blotting を用いて確認した。CXCR2 は PC-9, H1993, 11-18, H3122, EBC-1, Calu-1 において強発現しており、LK-87, H2228, LC-1, PC-10, H28, H2452 では発現していなかった。CXCR2 発現を認めたがん細胞株に CXCL2 リコンビナント蛋白を加え、MTT アッセイによる細胞増殖能評価を行ったが、CXCL2 は癌細胞増殖に影響を及ぼさなかった。Wild type mouse において高 PD-1 抗体投与は末梢血中の CXCL2 濃度に影響しなかった。腫瘍移植マウスモデルにおける CXCL2 動態と腫瘍微小環境における免疫細胞プロファイルの解明: C57BL/6 マウスを用いた MC38 結腸癌モデルに対して、抗 PD-1 抗体を投与し、良好な腫瘍制御効果を認めた(図 2)。

図2. MC38結腸癌モデルに対する抗PD-1抗体の効果

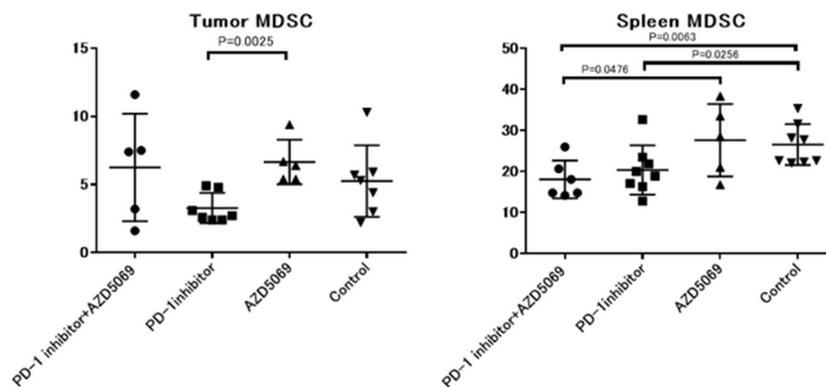


抗 PD-1 抗体投与前後の CXCL2 変化は投与後の腫瘍容積と相関していた(図 3)。



フローサイトメトリーにて治療終了時の脾臓ならびに腫瘍組織内の MDSC 発現を確認した。PD-1 抗体投与群では脾臓における MDSC 発現が非投与群と比較して有意に低下していた(図 3)。

図3. 腫瘍、脾臓における抗PD-1抗体投与後のMDSC



以上の結果から、CXCL2 は肺癌細胞増殖に直接影響は与えないものの、肺癌免疫微小環境において免疫応答に影響を与えている可能性が示唆された。

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