

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17207

研究課題名（和文）免疫抵抗性克服のための非小細胞肺癌における放射線照射がもたらす免疫応答の解析

研究課題名（英文）Analysis of immune response induced by radiotherapy in non-small cell lung cancer

研究代表者

突田 容子（Tsukita, Yoko）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50822566

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）：本研究の目的は未治療進行非小細胞肺癌患者を対象として、初回の免疫療法＋殺細胞性抗癌剤開始前に姑息的な放射線照射を施行した際の免疫応答を解明することである。姑息照射を受けた13例の治療開始前後の末梢血単核細胞の細胞分画や血漿中のサイトカインやダメージ関連分子パターンについて検討したが、統計学的、臨床的に有意な変化が見られた因子を同定することができなかった。奏効群13例と非奏効群6例を比較検討すると、奏効群では治療前血液中のNK細胞、PD-1陽性Tim-3陽性CD4陽性T細胞、CXCL10が有意に上昇していた。これらの3つの因子を組み合わせることでより高精度に効果予測ができる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未治療進行非小細胞肺癌において、免疫療法と殺細胞性抗癌剤との併用療法の効果予測となりうる因子を同定した。組織ではなく血液を使用することでより低侵襲に治療効果を予測できれば、肺癌患者の治療選択に貢献できると考える。

研究成果の概要（英文）：Our objective was to elucidate the immune response in untreated advanced non-small cell lung cancer patients who underwent radiotherapy prior to initiation of immunotherapy plus cytotoxic agents. Peripheral blood mononuclear cells, cytokines and damage-associated molecular patterns in plasma before and after the treatment were examined in 13 patients who received radiotherapy. It was not possible to identify any factors that showed statistically or clinically significant changes by radiotherapy.

A comparison of 13 patients in the response group with 6 patients in the non-response group showed that NK cells, PD-1 positive Tim-3 positive CD4 positive T cells and CXCL10 in the pretreatment blood were significantly elevated in the response group. We found the combination of these three factors may be a more useful predictive biomarker in clinical practice.

研究分野：肺癌

キーワード：非小細胞肺癌 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

肺がんは本邦における年間死亡数が男性第1位、女性第2位の罹患者数が多く完治が困難ながんである(国立がん研究センターがん情報サービス がんの統計)。近年、進行肺がんの約8割を占める非小細胞肺癌の領域では免疫療法の登場により治療のパラダイムシフトが起こっている。2018年12月には初回治療で一部の免疫療法と殺細胞性抗癌剤との併用療法が承認された。このうち、非扁平上皮癌を対象としてプラチナ製剤+ペメトレキセドに対してペムプロリズマブを追加することの有効性を評価したKEYNOTE-189試験と、扁平上皮癌を対象としてプラチナ製剤+パクリタキセルまたはナブパクリタキセルに対して、ペムプロリズマブを追加することの有効性を評価したKEYNOTE-407試験では、ペムプロリズマブの上乗せが主要評価項目である無増悪生存期間(PFS)、全生存期間(OS)を有意に延長することが示された(N Engl J Med.2018;378:2078-92, N Engl J Med.2018;379:2040-51)。この結果に基づいて、全身状態が良好であれば初回治療として免疫療法と殺細胞性抗癌剤の併用療法が標準治療として選択されている。しかしながらKEYNOTE-189, 407における併用療法の奏効率それぞれ47.6%, 57.9%であり、併用療法による腫瘍縮小効果を得られない症例も約半数存在するため、免疫療法の有効性を高めるための新たな治療法の開発は喫緊の課題であった。

局所放射線照射によりがん抗原が放出され、樹状細胞がT細胞に抗原を提示してT細胞を活性化し、放射線照射部位以外の病巣も縮小する現象(アブスコパル効果)が観察されており(N Engl J Med. 2012;366:925-31)。肺がんにおいて放射線照射が免疫単剤治療の効果をも高める可能性については複数の後ろ向き研究と少数の前向き研究で報告されている。我々は、免疫療法と放射線療法は相性が良く、免疫療法施行前の姑息照射は重篤な有害事象を増やさずに免疫療法の効果をも高める可能性があるとの仮説のもと、未治療進行非小細胞肺癌患者を対象として、初回薬物療法(免疫療法+殺細胞性抗癌剤)開始前に姑息照射を施行することの有効性を検討する多施設共同単群第Ⅲ相試験を施行中であり、治療前後の血液検体を付随研究として採取・保存している。放射線照射による免疫応答の変化についてはマウスを用いた研究結果により、インターフェロンの産生が増加すること、免疫細胞分画が変化すること、damage-associated molecular patterns (DAMPs) が放出されることなどが報告されているが、ヒト肺がん検体を用いた前向き研究はほとんどなく、少数例においてT細胞活性化やT細胞受容体の変化が示唆されているに過ぎない(Nat Med. 2018;24:1845-51)。さらに、殺細胞性抗癌剤と免疫療法との併用療法に姑息照射を組み合わせた場合の免疫応答の変化については全くの未知である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、未治療進行非小細胞肺癌患者を対象として、初回薬物療法(免疫療法+殺細胞性抗癌剤)開始前に姑息照射を施行した際の免疫応答を臨床効果と紐づけて解明することである。本研究で腫瘍縮小効果が得られた症例と腫瘍縮小効果が得られなかった症例における免疫応答の違いを解析することで、免疫療法の効果をさらに高めるため新たな分子基盤の発見につながる可能性がある。また、姑息照射を併用しない症例を対象群として試験症例と比較することで、姑息照射により誘導される免疫環境の変化を解明し、姑息照射と薬物療法の併用効果を免疫学的観点から裏付けることができると考える。

3. 研究の方法

(1) 患者同意を得て姑息照射併用症例の血液検体の収集・保存を行う。非照射症例も対象群として同様に収集・保存する。

治療開始前と治療効果判定のCTを施行するタイミングである6週から9週の患者血液をそれぞれBDバキュティナ®CPT™単核球分離用採血管(ベクトン・ディッキンソン株式会社)で2本分採取する。採血管1本分の単核球分画はフローサイトメトリー用として培養液で懸濁して液体窒素で保存する。もう1本分の単核球分画はT細胞受容体レパトア解析用としてTRIZOL® Reagentに懸濁して-80℃で保存する。それぞれの試験管で得られた血漿はプールして-80℃で保存する。

(2) 上記検体を用いて、フローサイトメトリー、サイトカイン測定、ダメージ関連分子パターン(DAMPs)の測定を施行し、治療前と治療後、有効例と非有効例、照射症例と非照射症例、における違いを解析する。

フローサイトメトリーによる免疫細胞分画の解析

フローサイトメーターにより末梢血単核細胞中のNK細胞、CD8陽性T細胞、CD4陽性エフェクターT細胞、CD4陽性制御性T細胞、骨髄由来抑制細胞などの割合やその比を解析する。また、放射線照射によりリンパ球のPD-1発現や活性が変化することが予想され、T細胞におけるPD-1, Tim-3などの疲弊マーカー陽性割合の変化を解析する。

血漿を用いたインターフェロンやサイトカインの測定

マルチプレックスサスペンションアレイは少量の検体で同時に多数のインターフェロンやサイ

トカインの定量的測定が可能となる。インターフェロンとサイトカインを網羅的に調べ、有効例と無効例や照射例と非照射例で有意差のあるサイトカインを抽出する。

血漿を用いた DAMPs の測定

殺細胞性抗癌剤や放射線照射によりがん細胞がダメージを受けると、HMGB1 やカルレティキュリンなどの DAMPs が放出されることが知られている。治療開始前と開始後の血漿を用いて ELISA にて DAMPs を測定し、有効例と無効例や照射症例と非照射症例における治療前後の DAMPs の差異を解析する。

4. 研究成果

(1) 同意を得たのち免疫療法と殺細胞性抗癌剤との併用療法前に姑息照射を施行した 13 例と姑息照射を施行していない 6 例の血液検体を収集した。照射部位は骨が 6 例、肺が 3 例、リンパ節が 3 例、その他が 1 例であった。照射群と非照射群の年齢、性別に有意差はなかったが、組織型は照射群で腺癌が多く、非照射群では扁平上皮癌が多かった。PD-L1 のステータスは両群間で差はなかった。

(2) フローサイトメトリーによる免疫細胞分画の解析

NK 細胞、NK-T 細胞、T 細胞、骨髄由来抑制細胞 (MDSC) 制御性 T 細胞、T 細胞のサブポピュレーション (CD45RA と CD62L の発現によるナイーブ、エフェクター、セントラルメモリー、エフェクターメモリー、Tim-3 と PD-1 発現による疲弊) を解析した。

下記 (図 1, 2) に解析結果の一部を掲載したが、照射群と非照射群において、治療前と治療後の変化率に差異のある分画を見出すことができなかった。

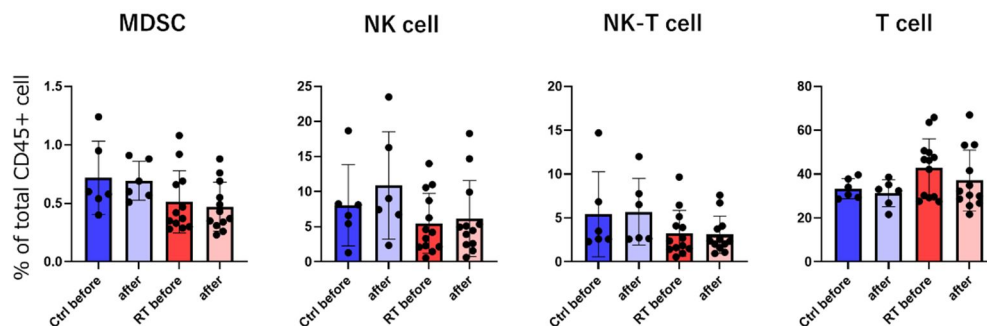


図 1 Ctrl before/after : 非照射群治療前/治療後、RT before/after : 照射群治療前/治療後

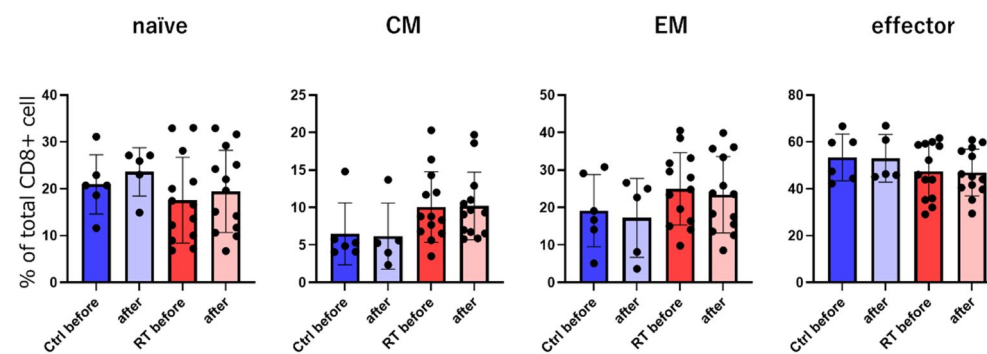


図 2 CD8 陽性 T 細胞のサブポピュレーション

CM : セントラルメモリー、EM : エフェクターメモリー

Ctrl before/after : 非照射群治療前/治療後、RT before/after : 照射群治療前/治療後

次に、照射群と非照射群とを区別せずに、治療効果予測因子を探索するために 19 例のうちで奏功が得られた症例 (PR : 部分奏効) と奏効が得られなかった症例 (SD/PD : 安定/増悪) との治療前の血液検体における差異を解析した。その結果、NK 細胞と PD-1 陽性 Tim-3 陽性 CD4 陽性 T 細胞の分画が奏効群で有意に高く、効果予測因子となりうることが示唆された (図 3)。

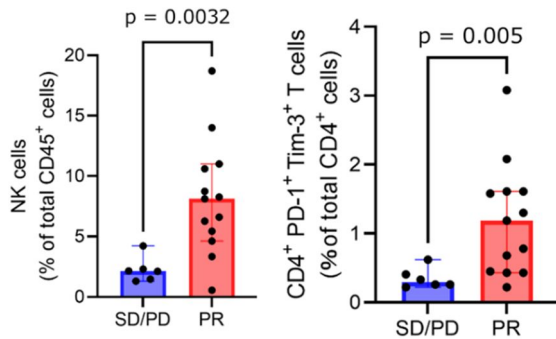


図3 治療開始前の細胞分画（左：NK細胞、右：PD-1陽性Tim-3陽性CD4陽性T細胞）
SD/PD：安定/増悪（非奏効群） PR：部分奏効（奏効群）

(2) 血漿を用いたインターフェロンやサイトカインの測定

IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17A, CCL2, CXCL8, CXCL10, IFN-, TGF-1, TNF- を網羅した LEGENDplex の HU Essential Immune Response Panel (13-plex) w/VbP を用いてサイトカインの測定を行った。その結果、CXCL10 のみが奏効群において非奏効例と比して有意に上昇していた。

さらに、NK細胞とPD-1陽性Tim-3陽性CD4陽性T細胞とCXCL10を組み合わせることで、より高精度に奏効群と非奏効群とに分けることができた。3つの因子のうち、2つ以上が中央値よりも高い群 (n=12) の無増悪生存期間中央値が未到達 (95%信頼区間 6.6 か月-未到達) であったのに対して、1つ以下の群 (n=7) の無増悪生存期間中央値は 5.6 か月 (95%信頼区間 1.5 か月-7.4 か月) であった (HR 0.16, p=0.0002)。

(2) 血漿を用いた DAMPs の測定

姑息照射前後においても、奏効例の治療前後においても、DAMPs の量に変化を認めず、今回の検討では照射や殺細胞性抗癌剤によって DAMPs が放出されることが治療効果につながるという仮説を証明することはできなかった。

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 1件）

1. 著者名 Tsukita Y, Yamamoto T, Mayahara H, Hata A, Takeda Y, Nakayama H, Tanaka S, Uchida J, Usui K, Toyoda T, Tamiya M, Morimoto M, Oya Y, Kodaira T, Miyauchi E, Jingu K, Sugiura H	4. 巻 160
2. 論文標題 Intensity-modulated radiation therapy with concurrent chemotherapy followed by durvalumab for stage III non-small cell lung cancer: a multi-center retrospective study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Radiotherapy and Oncology	6. 最初と最後の頁 266-272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.radonc.2021.05.016	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 Yoko Tsukita, Eisaku Miyauchi, Masahide Fukudo, Takaaki Sasaki, Masakazu Ichinose	4. 巻 133
2. 論文標題 Immunotherapy-related hepatitis and thrombocytopenia induced by the very low dose of only 90 mg of atezolizumab	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European journal of cancer	6. 最初と最後の頁 22-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejca.2020.04.008	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 Tsukita Yoko, Inoue Akira	4. 巻 52
2. 論文標題 First-line therapy in non-small cell lung cancer patients with <i>EGFR</i> activating mutations: a consideration of the clinical position of osimertinib based on the subset of Japanese patients in the FLAURA study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 405 ~ 410
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyac012	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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoko Tsukita, Takaya Yamamoto, Eisaku Miyauchi, Hiroshi Mayahara, Akito Hata, Yuichiro Takeda, Hidetsugu Nakayama, Satoshi Tanaka, Junji Uchida, Kazuhiro Usui, Tatsuya Toyoda, Motohiro Tamiya, Masahiro Morimoto, Yuko Oya, Takeshi Kodaira, Keiichi Jingu, Hisatoshi Sugiura
2. 発表標題 A retrospective study of chemoradiotherapy with intensity-modulated radiotherapy for unresectable stage III NSCLC
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村望、突田容子、渋谷里紗、宮内栄作、他4名
2. 発表標題 非小細胞肺癌に対する殺細胞性抗癌剤・免疫チェックポイント阻害薬併用療法の効果予測因子の探索
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023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