

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07316

研究課題名（和文）非小細胞肺がんのがん間質における低酸素応答の解析とがん免疫治療への応用

研究課題名（英文）Hypoxic responses of cancer stroma in non-small cell lung cancer

研究代表者

寺本 晃治（Teramoto, Koji）

滋賀医科大学・医学部・特任講師

研究者番号：10452244

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：低酸素状態では、腫瘍関連マクロファージのTGF- α とTGF- β のmRNAの発現レベルは増強すること、がん関連線維芽細胞をTGF- α を添加して低酸素状態で培養すると、TGF- β mRNAの発現レベルが増強することが判明した。

また、非小細胞肺がんにおいて、血漿中の可溶性PD-L1は、がん細胞だけでなく、PD-L1陽性のマクロファージにも由来していること、血漿中の可溶性PD-L1濃度が高値で、かつ、PD-L1陽性のマクロファージの腫瘍内密度が高値の群では、手術後の予後が不良であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん組織の増大とともに組織内は低酸素状態になるが、低酸素状態により、腫瘍関連マクロファージやがん関連線維芽細胞といったがん間質細胞のサイトカイン・TGF- β の発現が亢進することが判明した。TGF- β は抗腫瘍免疫応答の抑制に関与しているために、このことが、がん組織の増大とともに抗腫瘍免疫応答が抑制される一因であるかもしれない。

また、非小細胞肺がんの手術症例において、血漿中の可溶性PD-L1濃度やPD-L1陽性のマクロファージの腫瘍内密度を測定することは、手術後の予後予測の上で有用となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The mRNA levels of TGF- α and TGF- β of tumor-associated macrophages were elevated in the hypoxic condition. When cancer-associated fibroblasts were cultured in the hypoxic condition in supplement with TGF- α , the mRNA level of TGF- β of these cells was upregulated. In non-small cell lung cancer, soluble PD-L1 in peripheral blood derived not only from PD-L1-positive cancer cells but also from PD-L1-positive macrophages. In the group with higher density of PD-L1-positive macrophages and higher level of soluble PD-L1 in plasma has a poorer prognosis after surgery in patients with non-small cell lung cancer

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：非小細胞肺がん 腫瘍微小環境 低酸素応答 抗腫瘍免疫応答 がん関連線維芽細胞 腫瘍関連マクロファージ PD-L1 HIF-1

1. 研究開始当初の背景

非小細胞肺癌に対する免疫チェックポイント阻害薬は、現在、標準療法としての地位を確立しているが、根治を目指した、より治療効果の高いがん免疫治療法を開発するためには、腫瘍微小環境におけるがん免疫応答の複雑性や多様性を理解することが重要である。がん組織は、がん細胞とがん間質から成る複合組織であり、がん間質には、がん関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts, CAF)、腫瘍関連マクロファージ (TAM)、細胞傷害性 T リンパ球を含む腫瘍浸潤リンパ球が存在している。これまでに申請者は、CAF を阻害すると、がん免疫治療の抗腫瘍効果が増強すること (Ohshio Y, Teramoto K, et al. Cancer Sci 2015)、また、非小細胞肺癌の CAF には PD-L1 (programmed cell death ligand-1) 分子が発現している (Teramoto K et al. Lung Cancer 2019) ことなど、CAF のがん免疫応答への関与について明らかにしてきた。また、がん組織内の生理学的環境に着目すると、がん組織は、増大とともに低酸素状態という特徴的な生理学的環境を獲得する。申請者は、がん組織での低酸素応答 (Semenza ら、2019 年にノーベル医学生理学賞) に早くから着目し、低酸素応答における鍵分子である Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) によるがん免疫応答の制御について研究を進めてきた。

2. 研究の目的

本研究では、非小細胞肺癌のがん間質細胞が、低酸素環境によって受ける影響に着目した。そこで、低酸素環境、つまり、低酸素応答の鍵分子である HIF-1 の活性化によって、がん間質細胞の受ける免疫学的な影響を分子レベルで解明することと目的にした。また、これまでに、非小細胞肺癌の CAF には PD-L1 分子が発現している (Teramoto K et al. Lung Cancer 2019) ことを明らかにしてきたが、さらに、非小細胞肺癌における、がん間質細胞の PD-L1 の発現の臨床的意義を解明することも目的にした。

3. 研究の方法

(1) 低酸素応答とがん間質細胞

本研究期間内においては、がん間質細胞のうち、腫瘍関連マクロファージ (TAM) に着目して、HIF-1 の活性化による影響を調査した。ヒト末梢血単核球から CD14 陽性細胞を分離して、これをサイトカイン・M-CSF (マクロファージコロニー刺激因子) の存在下に 6 日間、培養して M2 マクロファージを誘導した。その後、LPS (リポポリサッカライド) を培養液中に添加して、活性化型の M2 マクロファージとした。このようにして誘導した活性化型の M2 マクロファージ (Type 2 マクロファージ) は、そのマーカーである CD163 と CD203 が発現していることをフローサイトメトリーで確認した。このようにして誘導した M2 マクロファージに HIF1 分解阻害剤である DFO (Deferoxamine mesylate) を添加して、仮想低酸素環境を作製した。DFO の添加は高濃度で短時間 (200 μ M で 5 時間) として急性の低酸素応答を評価する群、また、低濃度で長時間 (100 μ M で 48 時間) として慢性の低酸素応答を評価する群の 2 群を設定した。その後、M2 マクロファージを回収して RNA を抽出して、抗腫瘍免疫応答の抑制に関与するサイトカイン・TGF- β (Transforming growth factor-beta) mRNA の発現の変化について Real-time PCR 法で解析した。

本研究期間内においては、がん間質細胞のうち、がん関連線維芽細胞 (CAF) に着目して、低酸素環境におけるサイトカイン・TGF- α (Transforming growth factor-alpha) による影響を調査した。ヒト非小細胞肺癌組織から単離した CAF に DFO を低濃度で長時間 (100 μ M で 48 時間) 作用させて、さらに同時に TGF- α を添加して培養した。CAF には、TGF- α のレセプターである EGFR (Epidermal growth factor receptor) が発現していることをフローサイトメトリーで確認した。培養後に、M2 マクロファージを回収して RNA を抽出して、サイトカイン・TGF- β 遺伝子の発現の変化について Real-time PCR 法で解析した。

(2) 非小細胞肺癌における、がん間質細胞の PD-L1 の発現の臨床的意義について

非小細胞肺癌の手術症例 (n=69) に対して、手術前、手術 1 ヶ月後と 3 ヶ月後に末梢血を採取して血漿を分離して、血漿中の可溶性 PD-L1 の濃度を ELISA 法で測定した。また、手術前の血漿中の可溶性 PD-L1 濃度と、腫瘍組織中の PD-L1 陽性細胞について、がん細胞の PD-L1 の発現レベル (免疫組織染色後に半定量的に数値化した) と PD-L1 陽性のがん間質細胞 (とくに TAM の腫瘍組織内密度) について解析した。さらに、根治的な手術が実施された症例

(n=61) を対象にして、手術前の血漿中の可溶性 PD-L1 濃度と患者の予後 (手術後の無再発生存期間に着目した) との関係について解析して、これらの臨床的意義について検討した。

4. 研究成果

(1) 低酸素応答とがん間質細胞

急性および慢性の低酸素応答により、M2 マクロファージの TGF- β mRNA のレベルは上昇した。急性と慢性の低酸素応答による影響を比較すると、TGF- β mRNA のレベルは、慢性の低酸素応答でより影響を受けることが判明した。

低酸素応答では、TGF- α 遺伝子の発現レベルが上昇することが知られているので、慢性の低酸素応答 + TGF- α が、CAF の TGF- β mRNA レベルにどのように影響を与えるのか調べた。その結果、慢性の低酸素応答、TGF- α の添加、それぞれによって、CAF の TGF- β mRNA レベルは

上昇するが、慢性の低酸素応答 + TGF- α では、相加的に CAF の TGF- β mRNA レベルは上昇した。これらのことから、慢性的な低酸素環境にある腫瘍組織内においては、M2 マクロファージや CAF の分泌する TGF- β のレベルが上昇して、これが抗腫瘍免疫応答の抑制に関与している可能性が考えられた。この研究成果は、日本人類遺伝学会 第 67 回・第 68 回大会で報告した。

(2) 非小細胞肺癌における、がん間質細胞の PD-L1 の発現の臨床的意義について

非小細胞肺癌手術症例において、血漿中の可溶性 PD-L1 濃度は、手術 1 ヶ月後に有意に上昇して、手術 3 ヶ月後には、手術前のレベルにまで低下した。また、血漿中の可溶性 PD-L1 濃度は、腫瘍組織中の PD-L1 陽性細胞の割合と有意に相関したが、PD-L1 の発現レベルや PD-L1 陽性の TAM の密度とは有意な相関は認めなかった。したがって、血漿中の可溶性 PD-L1 濃度は、単に PD-L1 陽性のがん細胞だけではなく、PD-L1 陽性の TAM などのがん間質細胞からも分泌されている可能性が示唆された。次に、根治的な手術が実施された症例 (n=61) を手術前の血漿中の可溶性 PD-L1 濃度とがん細胞の PD-L1 発現レベルをもとに 4 群に分けて、予後 (手術後の無再発生存期間) を解析した。その結果、手術前の血漿中の可溶性 PD-L1 濃度とがん細胞の PD-L1 発現レベルがともに高値の群で最も予後が良好で、手術前の血漿中の可溶性 PD-L1 濃度が高値でがん細胞の PD-L1 発現レベルが低値の群で最も予後が不良であった。そこで、後者の群において、可溶性 PD-L1 に寄与している細胞を探索すると、PD-L1 陽性の TAM の腫瘍組織内の密度が有意に高値であった。がん細胞の PD-L1 発現にはサイトカイン・IFN- γ (interferon-gamma) が関与していて、腫瘍組織内における IFN- γ の主要な産生源は活性化したリンパ球であること (Igarashi T, Teramoto K, et al, Oncol Rep, 2017) を考慮すると、がん細胞の PD-L1 発現レベルが高値であることは、リンパ球の活性化、つまり、抗腫瘍免疫応答の活性化を裏付けていると考えられる。このようなことを背景にして、手術前の血漿中の可溶性 PD-L1 濃度が高値で、これががん細胞の PD-L1 発現レベルの高値に起因する群では、最も予後が良好であったと考えられた。一方で、PD-L1 陽性の TAM は、抗腫瘍免疫応答の抑制に関与する。そのために、手術前の血漿中の可溶性 PD-L1 濃度が高値であっても、これが PD-L1 陽性の TAM に起因している群では、最も予後が良好であったと考えられた。これらのことから、非小細胞肺癌の手術症例においては、手術前に血漿中の可溶性 PD-L1 濃度を測定することと、腫瘍細胞および TAM の PD-L1 発現状態を測定することは、手術後の予後を予測するうえで有用であると考えられた。これらの研究成果については、論文発表をした (Teramoto K, et al, Cancer immunology, Immunotherapy, 72(11), 3755-3764, 2023)。

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 0件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Teramoto Koji, Igarashi Tomoyuki, Kataoka Yoko, Ishida Mitsuaki, Hanaoka Jun, Sumimoto Hidetoshi, Daigo Yataro | 4. 巻 70 |
| 2. 論文標題 Biphasic prognostic significance of PD-L1 expression status in patients with early- and locally advanced-stage non-small cell lung cancer | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy | 6. 最初と最後の頁 1063 ~ 1074 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-020-02755-w | 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 寺本晃治、住本秀敏、醍醐弥太郎 |
| 2. 発表標題 非小細胞肺癌におけるTGF の発現制御 |
| 3. 学会等名 第81日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 寺本晃治、住本秀敏、醍醐弥太郎 |
| 2. 発表標題 M2マクロファージにおける低酸素環境によるTGF , TGF- の発現制御 |
| 3. 学会等名 日本人類遺伝学会 第67回大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 寺本晃治、五十嵐知之、住本秀敏、醍醐弥太郎 |
| 2. 発表標題 非小細胞肺癌の末梢血におけるPD-1陽性細胞と予後との関連 |
| 3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 寺本晃治、住本秀敏、醍醐弥太郎 |
| 2. 発表標題 非小細胞肺癌におけるTGF- 1の発現制御 |
| 3. 学会等名 日本人類遺伝学会 第66回大会 |
| 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 | 片岡 瑛子 (Kataoka Yoko) (00746919) | 滋賀医科大学・医学部・助教 (14202) | |
| 研究分担者 | 醍醐 弥太郎 (Daigo Yataro) (30345029) | 滋賀医科大学・医学部・教授 (14202) | |

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 |
|---------|---------|