

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16572

研究課題名（和文）悪性胸膜中皮腫の胸腔内マクロファージサブセットを標的とした新規免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel immunotherapy targeting pleural macrophage subsets in malignant pleural mesothelioma

研究代表者

河野 幹寛 (KOHNO, Mikihiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00906323

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：同所性中皮腫マウスモデルの腫瘍内（胸水中）免疫微小環境を解析し、胸水中のマクロファージに2つのサブセット（単球由来のsmall pleural macrophages：SPMと組織常在性のlarge pleural macrophages：LPM）を同定した。SPMは腫瘍投与後、腫瘍微小環境で急速に増加し、腫瘍免疫抑制性のM2様TAMの大部分に寄与した。SPMは腫瘍形成能を有し、SPMの遺伝子シグネチャー解析から同定したTREM2遺伝子の欠失はSPMの減少をもたらし、代償的にLPMが増加し、腫瘍増殖が抑制された。SPMが悪性胸膜中皮腫に対する新規免疫療法の標的となりうることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤など各種治療の進歩にも関わらず、悪性胸膜中皮腫（MPM）の予後は依然として極めて不良であり、新たな治療法の開発が急務である。腫瘍関連マクロファージ（TAM）は、様々な癌種において悪性度に関与しており、これを標的とした治療の有効性がマウスなどの前臨床モデルを用いた研究で報告されているが、一般臨床への応用には未だ至っていない。本研究により、MPMの腫瘍内免疫微小環境に2つのマクロファージサブセットがあることが同定され、腫瘍免疫抑制性に働く、単球由来のsmall pleural macrophagesがMPMに対する新規免疫療法の標的となりうることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Tumor immune microenvironment (pleural effusion) of a murine orthotopic mesothelioma model was analyzed, and two distinct macrophage populations, monocyte-derived small pleural macrophages (SPMs) and tissue-resident large pleural macrophages (LPMs), were identified. SPMs were tumorigenic. Deletion of Trem2 gene, which we identified from gene signature analysis of SPMs, led to reduced SPM M2-like tumor-associated macrophages with compensatory increase in LPM and slower tumor growth. SPMs may be a potential therapeutic target for novel immunotherapy for malignant pleural mesothelioma.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：悪性胸膜中皮腫 腫瘍内微小環境 腫瘍関連マクロファージ 免疫療法 中皮腫

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦における悪性中皮腫の死亡者数は確実に増加の一途をたどっており(2002年 810人、2017年 1,555人) その多くがアスベスト曝露と関連していることから社会的にも大きな問題となっている。悪性中皮腫の80-85%を占める悪性胸膜中皮腫(MPM)は早期に発見されたとしても根治可能な治療法が確立されておらず、手術・放射線治療・化学療法による集学的治療を行えたとしてもその予後は平均20ヶ月以下であり、長期生存は極めて限られる。最近、抗PD-1抗体や抗CTLA-4抗体を用いた免疫療法の有効性が示されたが、その奏功率は未だ十分ではない。したがって、腫瘍内微小環境の更なる解析と新たな治療法の開発がMPMの予後を改善するための最重要課題である。

腫瘍関連マクロファージ(TAMs)は、様々な癌種において悪性度に関与しており、これを標的とした治療の有効性がマウスなどの前臨床モデルを用いた研究で報告されているが、一般臨床への応用には未だ至っていない。MPMは胸膜中皮を発生母地とし、多くが胸水貯留で発見される。MPMは胸腔内が病変の主座であり、MPMの腫瘍内免疫微小環境は、他の固形癌とは大きく異なることが予測されるが、その詳細は不明である。

一方、腹腔内のマクロファージは、細胞表面マーカーF4/80の発現差異・細胞サイズなどにより、Small peritoneal macrophagesとLarge peritoneal macrophagesの2つのsubsetに分けられ、感染・炎症に伴ってdynamicに変化することが知られている(Cassado Ados A, et al. Front Immunol. 2015. Bain CC, et al. Nat Commun. 2016)。悪性腫瘍との関連では、卵巣癌腹膜播種マウスモデルにおいてSmall peritoneal macrophagesは腫瘍増殖に寄与することが報告されている(Rei M, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014. Cortes et al. EMBO J. 2017)が、MPMや肺癌胸膜播種における胸腔内マクロファージsubsetに着目した報告はない。

申請者は、MPM腫瘍内微小環境のマクロファージに着目して基礎的検討を開始し、胸腔内マクロファージにも腹腔内マクロファージと同様のsubsetがある(図1)ことを見出した。さらに、Small pleural macrophages (SPM)は腫瘍進展に伴ってM2 phenotypeを獲得していることがわかり、SPMが中皮腫の進行に関与している可能性が示唆された。SPMのMPM微小環境における役割を明らかにし、SPMを標的とした新規免疫療法を確立すべく、本研究を計画した。

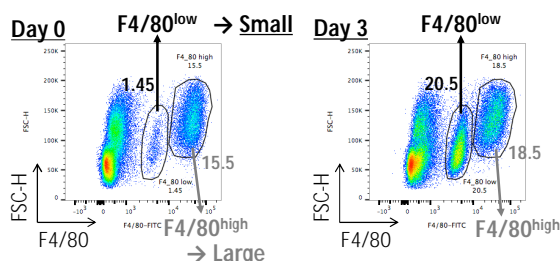


図1. 中皮腫細胞胸腔内投与前(Day 0)と投与後早期(Day 3)の胸腔内洗浄液のフローサイトメトリー。胸腔内マクロファージには、2つのsubsetがある。

細胞サイズを反映するForward scatter (FSC)強度から、F4/80^{low}はF4/80^{high}よりも細胞のサイズが小さいことがわかる

2. 研究の目的

本研究の目的は、SPMのMPM腫瘍内微小環境やMPM進展における意義を明らかにし、治療標的としての可能性を探究することである。そのために、以下のことを明らかにしていく。

- (1) MPM腫瘍内微小環境におけるSPMの特徴と動態を解明する(下記研究方法(1)(2))
- (2) SPMがMPM進展・悪性度にどのように関与しているかを解明する(方法(3))
- (3) SPMを標的としたMPMの新規免疫療法を開発する(方法(4))

3. 研究の方法

本研究では、Balb/cマウスにAB12(Balb/cマウスにアスベストを暴露させて作成した中皮腫細胞株)を胸腔内投与した同種同所性腫瘍マウスモデルを使用する。

- (1) 同所性中皮腫マウスモデルの作成: Balb/cマウスにAB12(0.5×10^6 cells)を胸腔内投与することにより、同所性中皮腫マウスモデルを作成する。このモデルは、腫瘍を胸腔内に接種した約10日後にはマウス胸腔内は腫瘍と胸水で満たされるため、免疫細胞の回収および解析が容易であり、さらに同所性であることから、これまで頻用されてきた腫瘍皮下接種モデルよりもMPM本来の病態に近いモデルである(Anraku M, et al. J Immunol. 2010. Kohno M, et al. J Immunol. 2020)。

- (2) 腫瘍内免疫微小環境の解析：(1)で作成した同所性中皮腫マウスモデルの、腫瘍投与前・投与後 3, 7, 10, 14 日目の胸水（あるいは胸腔内洗浄液）を回収し、マクロファージ（SPM, LPM）、Tリンパ球（CD3, CD4, CD8, regulatory T cell）、骨髄由来抑制細胞など各種免疫細胞の動態を Flow cytometry にて解析する。
- (3) SPM が腫瘍増殖に促進的に作用するかの検討：FACS で SPM をソーティングし、腫瘍形性能を解析する。
- (4) Single-cell RNA sequencing を行い、SPM に特異的に発現している遺伝子を同定し、同因子を阻害することによる腫瘍増殖抑制効果を検討する。

4. 研究成果

(1) Balb/c マウスに AB12 (0.5×10^6 cells) を胸腔内投与することにより、同所性中皮腫マウスモデルを作成した。図 2 の通り、胸腔内に腫瘍と血性胸水が満たされ、15-20 日ほどでエンドポイントとなった。

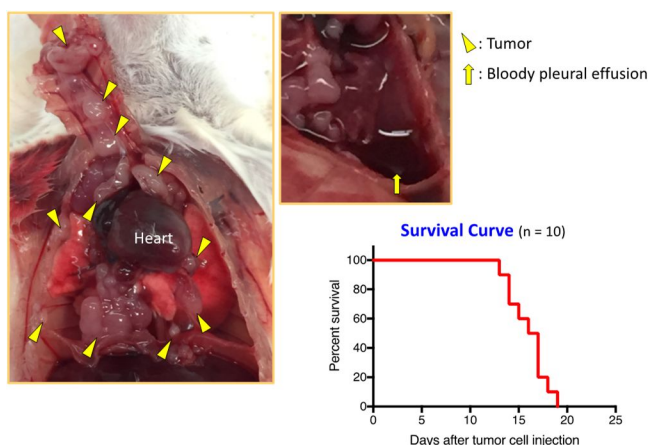


図 2. 腫瘍投与後 14 日目のマウス胸腔内、生存曲線

(2) (1)で作成した同所性中皮腫マウスモデルの、腫瘍投与前・投与後 3, 7, 10, 14 日目の胸水（あるいは胸腔内洗浄液）を回収し、各種免疫細胞の動態を解析した。図 3 に示す通り、胸腔内マクロファージに 2 つのサブセット（単球由来の small pleural macrophages : SPM と組織常在性の large pleural macrophages : LPM）を同定した。SPM は腫瘍投与後、腫瘍微小環境で急速に増加（図 3A）し、腫瘍進展に伴い CD206 陽性となり、M2 様 TAM の大部分に寄与した（図 3B）。

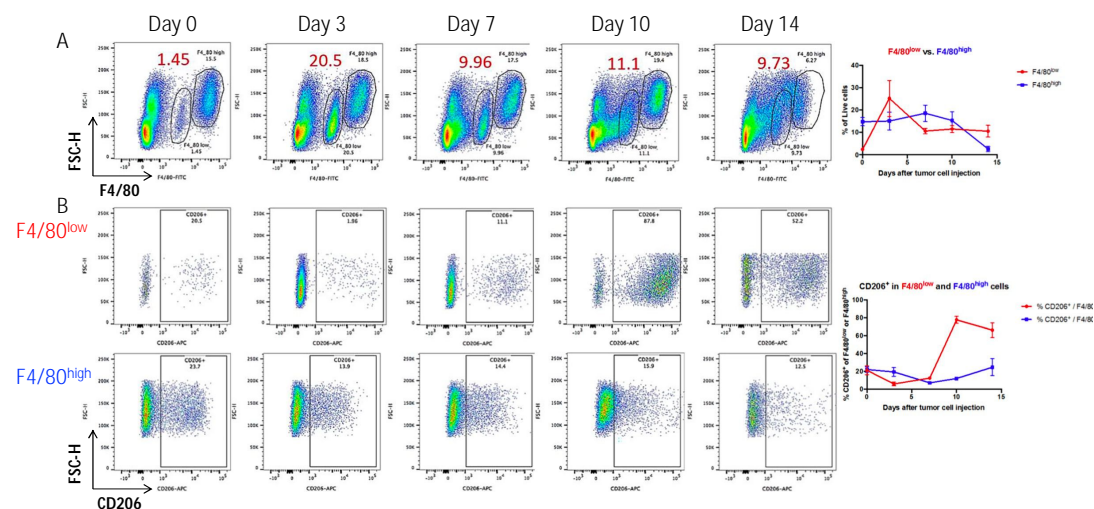


図 3.

(A) 腫瘍投与前・投与後 3, 7, 10, 14 日目の胸水中の F4/80 発現（左：Flow cytometry の代表的プロット、右：経時推移）
 (B) F4/80^{low} (上段)・F4/80^{high} (下段) 細胞における CD206 発現（左：Flow cytometry の代表的プロット、右：経時推移）

(3) FACS でソーティングした SPM にスフェア形成能を認め、SPM が腫瘍増殖に促進的に働くと

考えられた。

(4) 未治療の悪性胸膜中皮腫患者の胸水・腫瘍の Single-cell RNA sequencing による解析から、SPM の遺伝子シグネチャーの同定を試みた。特異的な治療標的となる可能性がある複数の遺伝子のうち、TREM2 遺伝子の欠失は SPM M2 様 TAM の減少をもたらし、代償的に LPM が増加し、腫瘍増殖が抑制された。

以上より、SPM M2 様 TAM は、悪性胸膜中皮腫に対する新規免疫療法の標的となりうることが示唆され、更なる検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Wu Licun, Kohno Mikihiro, Murakami Junichi, Zia Amin, Allen Jonathan, Yun Hana, Chan Meilin, Baciú Cristina, Liu Mingyao, Serre-Beinier Veronique, De Palma Michele, Felley-Bosco Emanuela, Yeung Jonathan, Pugh Trevor J., de Perrot Marc	4. 巻 120
2. 論文標題 Defining and targeting tumor-associated macrophages in malignant mesothelioma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2210836120	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 該当する

1. 著者名 Watanabe Kenji, Kinoshita Fumihiko, Takenaka Tomoyoshi, Nagano Taichi, Oku Yuka, Kosai Keisuke, Ono Yuki, Haratake Naoki, Kohno Mikihiro, Kamitani Takeshi, Yoshitake Tadamasu, Okamoto Tatsuro, Shimokawa Mototsugu, Ishigami Kousei, Yoshizumi Tomoharu	4. 巻 36
2. 論文標題 Skeletal muscle area predicts the outcomes of non-small-cell lung cancer after trimodality therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Interdisciplinary CardioVascular and Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/icvts/ivad020	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 Nagano Taichi, Kinoshita Fumihiko, Hashinokuchi Asato, Matsudo Kyoto, Watanabe Kenji, Takamori Shinkichi, Kohno Mikihiro, Miura Naoko, Shimokawa Mototsugu, Takenaka Tomoyoshi, Yoshizumi Tomoharu	4. 巻 30
2. 論文標題 Prognostic Impact of C-Reactive Protein-to-Lymphocyte Ratio in Non-small Cell Lung Cancer: A Propensity Score-Matching Analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 3781 ~ 3788
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-023-13250-8	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 Takenaka Tomoyoshi, Yano Tokujiro, Yamazaki Koji, Okamoto Tatsuro, Hamatake Motoharu, Takamori Shinkichi, Kohno Mikihiro, Miura Naoko, Shimokawa Mototsugu, Yoshizumi Tomoharu, Kyushu University Lung Surgery Study Group	4. 巻 14
2. 論文標題 Is radical local therapy effective in postoperative recurrent <sc><i>EGFR</i></sc> mutated non small cell lung cancer?	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 1660 ~ 1667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.14911	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 Nagano Taichi, Takamori Shinkichi, Hashinokuchi Asato, Matsudo Kyoto, Kohno Mikihiro, Miura Naoko, Takenaka Tomoyoshi, Kamitani Takeshi, Shimokawa Mototsugu, Ishigami Kousei, Oda Yoshinao, Yoshizumi Tomoharu	4. 巻 71
2. 論文標題 Comparison of radiological and pathological tumor sizes in resected non-small cell lung cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 General Thoracic and Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 708 ~ 714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11748-023-01938-3	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 Kosai Keisuke, Masuda Takaaki, Kitagawa Akihiro, Toba Taro, Ono Yuya, Ando Yuki, Takahashi Junichi, Haratake Naoki, Kohno Mikihiro, Takenaka Tomoyoshi, Yoshizumi Tomoharu, Mimori Koshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Transducin Beta-Like 2 is a Potential Driver Gene that Adapts to Endoplasmic Reticulum Stress to Promote Tumor Growth of Lung Adenocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 7538 ~ 7548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-023-13864-y	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 Kinoshita Fumihiko, Takada Kazuki, Wakasu Sho, Saito Shunichi, Hashinokuchi Asato, Matsudo Kyoto, Nagano Taichi, Akamine Takaki, Kohno Mikihiro, Takenaka Tomoyoshi, Shimokawa Mototsugu, Oda Yoshinao, Yoshizumi Tomoharu	4. 巻 30
2. 論文標題 Granzyme B (GZMB)-Positive Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Lung Adenocarcinoma: Significance as a Prognostic Factor and Association with Immunosuppressive Proteins	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 7579 ~ 7589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-023-14085-z	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 MATSUDO KYOTO, TAKENAKA TOMOYOSHI, HASHINOKUCHI ASATO, NAGANO TAICHI, KINOSHITA FUMIHIKO, TAKAMORI SHINKICHI, AKAMINE TAKAKI, KOHNO MIKIHIRO, MIURA NAKO, YOSHIZUMI TOMOHARU	4. 巻 43
2. 論文標題 Impact of Chronic Obstructive Pulmonary Disease on the Long-term Prognosis of Patients Undergoing Lobectomy for Non-small-cell Lung Cancer: A Propensity Score-matched Analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5215 ~ 5222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.16723	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 Ono Yuki, Tagawa Tetsuzo, Kinoshita Fumihiko, Haratake Naoki, Takada Kazuki, Kohno Mikihiro, Takenaka Tomoyoshi, Kamitani Takeshi, Shimokawa Mototsugu, Oda Yoshinao, Mori Masaki, Yoshizumi Tomoharu	4. 巻 13
2. 論文標題 Relationship between consolidation tumor ratio and tumor infiltrating lymphocytes in small sized lung adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 2134 ~ 2141
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.14524	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 Hashinokuchi Asato, Haratake Naoki, Takenaka Tomoyoshi, Matsudo Kyoto, Nagano Taichi, Watanabe Kenji, Kosai Keisuke, Oku Yuka, Ono Yuki, Takamori Shinkichi, Kohno Mikihiro, Baba Shingo, Ishigami Kousei, Yoshizumi Tomoharu	4. 巻 13
2. 論文標題 Clinical significance of the combination of preoperative SUVmax and CEA in patients with clinical stage IA lung adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 2624 ~ 2632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.14599	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
---------	---------