

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861118

研究課題名(和文) 新たな免疫制御細胞に着目した悪性胸膜中皮腫に対する複合免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of the combined immunotherapy using novel immunoregulatory cells for malignant pleural mesothelioma

研究代表者

田川 哲三 (TAGAWA, Tetsuzo)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90419557

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)：本研究は、悪性胸膜中皮腫の病変中に含まれ、免疫反応を弱らせることにより腫瘍の進行を促進させる免疫抑制細胞の動態を明らかにし、中皮腫に対する新たな免疫療法を確立するための基礎的検討を行うことを目的とした。マウスを用いた検討により、中皮腫の進行とともに胸水中の免疫抑制細胞が増加することを明らかにした。また、患者胸水中にも同様の細胞が存在することを明らかにした。さらに、中皮腫患者のデータベースを解析し、免疫に影響を及ぼす炎症マーカー、栄養指標が、治療後の生存期間と関係することを明らかにした。これらの結果より、胸水中の免疫抑制細胞を操作することによる新しい免疫療法が有効である可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study is to elucidate the impact of immune-regulatory cells (MDSC) in the pathogenesis of malignant pleural mesothelioma (MPM) and to demonstrate the possibility of novel immunotherapy for MPM using MDSC. By using an intrathoracic murine MPM model, we found that the number of MDSC increased in the pleural effusion after intrathoracic tumor cell injection. We also demonstrated that there are significant amount of MDSC in the pleural effusion of the MPM patient. In addition, we elucidated that c-reactive protein/albumin ratio which combines patient's immune and nutritional status is a novel prognostic marker in MPM patients. These results suggest that novel immunotherapy targeting immuno-regulatory cells such as MDSC may be useful for MPM.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：悪性腫瘍 薬物療法 免疫療法 悪性胸膜中皮腫 肺癌 呼吸器外科

### 1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫は標準療法が確立されていない難治性疾患であり、最新の集学的治療をもってしても平均生存期間は2年未満と不良であり、新たな治療法の開発が急務であった。悪性胸膜中皮腫は免疫原性の高い腫瘍であることより、免疫療法が有効な治療法となる可能性が示唆されていた。CTLA-4 や PD-L1 などの免疫チェックポイント分子を標的とした免疫チェックポイント阻害剤の開発・治療が悪性黒色腫、肺癌を中心に行われ、抗 PD-L1 抗体が悪性黒色腫において治療効果が認められることが示された。しかし、抗 CTLA 抗体を用いた、悪性胸膜中皮腫に対する免疫療法の第 II 相試験の結果(Calabro L et al. Lancet Oncol 2013)は、奏効率 7%、中間生存期間 10.7 ヶ月と満足のいく成績が得られず、免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせることのできるより強力な免疫療法の開発が望まれていた。

### 2. 研究の目的

本研究は、悪性胸膜中皮腫に対する新たな複合免疫療法を確立するための基礎的検討を行うことを目的とした。具体的には、悪性胸膜中皮腫の胸水中に含まれる、免疫抑制細胞の一種であるミエロイド由来抑制細胞 (Myeloid derived suppressor cell, MDSC) の動態、免疫抑制効果をマウスモデルおよびヒトにおいて解析することであり、MDSC 制御により抗腫瘍免疫応答を増強させ、従来の免疫療法と組み合わせた複合免疫療法を開発するための基礎的研究を行うことであった。

### 3. 研究の方法

#### (1)同所性マウス中皮腫モデルの作成

同所性マウス中皮腫モデル作成のため、マウス中皮腫細胞株(AB12)を Balb/c マウスの右胸腔内に 27G 針を用いて注入した(投与量:  $2 \times 10^6$  cells/PBS200ml)。14 日後にマウスを安楽死させ、胸壁播種結節および肺組織を採取

し、HE 染色を行った。

#### (2)同所性マウス中皮腫モデルにおける胸水中 MDSC のカインेटイクスの解析

作成したマウスモデルを使用し、AB12 投与前および投与後 7、14、21、28 日目に脾臓と胸水を採取した。脾臓はセルストレーナー上ですりつぶして脾細胞を抽出した。脾細胞および胸水細胞は溶血処理を行い、赤血球を除去した。抗マウス CD11b、Ly-6G、Ly-6C、CD45、CD8、CD4、PD-L1、PD-1 抗体 (BioLegend)を用いて染色し、FACSCalibur (BD Bioscience)を用いてフローサイトメトリーによる解析を行った。本実験では  $CD11b^+Ly-6G^+Ly-6C^{low}$  を示す分画を granulocytic MDSC (gMDSC)、 $CD11b^+Ly-6G^+Ly-6C^+$  を示す分画を monocytic MDSC (mMDSC)と定義した。また、gMDSC および mMDSC 上の PD-L1 発現、CD8 陽性リンパ球および CD4 陽性リンパ球上の PD-1 発現の解析も行った。データの解析は FlowJo Software (Tree Star)を用いて行った。

#### (3)同所性マウス中皮腫モデルにおける胸水中 MDSC の T 細胞抑制機能の解析

作成したマウスモデルを使用し、AB12 投与前および投与後 28 日後に脾臓と胸水を採取した。脾細胞および胸水細胞を MDSC MACS isolation kit、CD8+ T cell MACS isolation kit (Miltenyi Biotec)にて gMDSC、mMDSC、CD8+ T cell へ分離した。データの解析は FlowJo Software (Tree Star)を用いて行った。

#### (4)ヒト中皮腫患者における胸水中 MDSC の解析 悪性胸膜中皮腫疑い患者の胸水、腫瘍組織より単核球を分離し、表面抗原の解析を行った。 MDSC は CD14、CD15、CD11b、HLA-DR 抗体にて染色し、フローサイトメトリーによって解析した。

#### (5)悪性胸膜中皮腫患者における免疫・栄養学的指標と予後との関連

1995 年から 2015 年にかけて九州大学病院および九州がんセンターにて悪性胸膜中皮腫

に対して治療を行った患者のデータベースを後方視的に解析し、免疫・栄養に関連する指標と予後との関連を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1)同所性マウス中皮腫モデルの作成

マウス胸腔内には 300uI 程度の血性胸水が貯留しており、胸壁および肺に腫瘍結節を認め、胸壁結節と肺組織の HE 染色では腫瘍細胞の集簇を認め、中皮腫の形成を確認できた(図 1、図 2)。

図 1. 胸壁の HE 染色

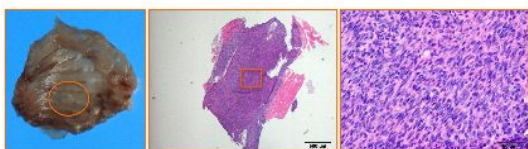
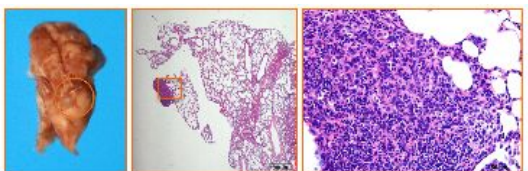


図 2. 肺組織の HE 染色



##### (2)同所性マウス中皮腫モデルにおける胸水中 MDSC のカイネティクス

フローサイトメトリーでの解析にて gMDSC の分画は脾臓で AB12 投与前から 7 日後、14 日後、21 日後、28 日後で 2.02% 1.94% 2.11% 1.71% 1.38%とほぼ変化なかったが、胸水では AB12 投与 7 日後、14 日後、21 日後、28 日後で 1.74% 3.12% 4.69% 5.12%と gMDSC が増加していた。mMDSC の分画に関して脾臓での 0.60% 0.43% 0.30% 0.41%に対して、胸水では 0.84% 0.73% 0.63% 1.09%と、胸水中の mMDSC が多いという結果であった。脾臓、胸水中の CD8+ T cell の分画は脾臓で 8.9% 13.6% 9.1% 14.1% 10.4%、胸水で 8.0% 10.3% 7.5% 6.5%と、いずれもほとんど変化を認めなかった(図 3)。

また、MDSC 上の PD-L1 発現、CD8+ T cell 上

の PD-1 発現は脾臓、胸水ともにほとんど変化を認めなかった(図 4)。

図 3. マウス胸水中の MDSC および CD8+ T cell のカイネティクス

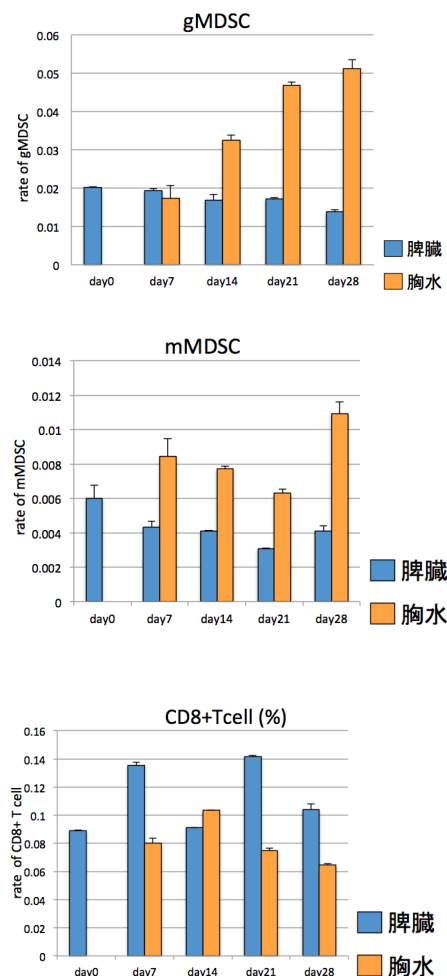
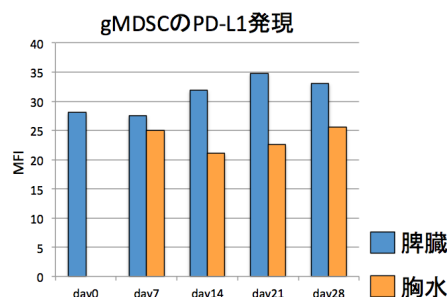
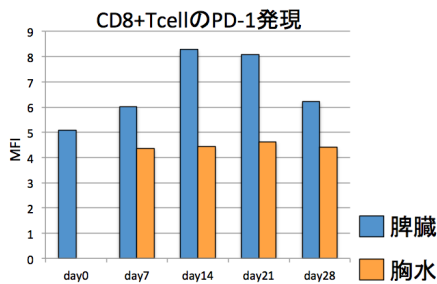
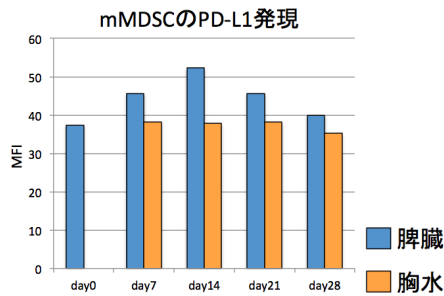


図 4. MDSC の PD-L1 発現、および CD8+ T cell の PD-1 発現





### (3) 同所性マウス中皮腫モデルにおける胸水 MDSC の T 細胞抑制機能の解析

マウス脾臓より MDSC と CD8 陽性 T 細胞の分離を Magnetic cell sorting (MACS)法を用いて行った。顆粒球系 MDSC(CD11b+/Ly6G+/Ly6clow)、単球系 MDSC(CD11b+/Ly6G-/Ly6chigh)、CD8 陽性 T 細胞の純度はそれぞれ 36.6%、4.22%、95.9%であり、MACS 法での MDSC 分離方法の再検討を要する結果となった。

(4) ヒト中皮腫患者における胸水 MDSC の解析  
胸水中には単球系 MDSC (CD14+/CD15-/CD11b+/HLA-DR low) が単核球中の 7-11% 認められ、顆粒球系 MDSC(CD14-/CD15+/CD11b+) が単核球中の 10-17% に認められた。また、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞はそれぞれ単核球中の 5.6-40.8%、7.7-11.3% に認められ、症例によって大きく異なることが判明した。

### (5) 悪性胸膜中皮腫患者における免疫・栄養学的指標と予後との関連

1995 年から 2015 年にかけて治療を行った悪性胸膜中皮腫患者 100 例に対して、治療前の

血清 CRP 値/血清アルブミン値比(CAR)を算出し、1 年生存率に関する ROC 曲線により cut off 値を算出し、0.58 を cut off 値と定めた。高 CAR 群(n=35)と低 CAR 群(n=65)の 2 群における全生存、無病/無増悪生存を比較したところ、高 CAR 群において有意に予後が不良であった。また、Propensity score-matching を行っても高 CAR 群が有意に予後不良であった。さらに多変量解析を行い、高 CAR は全生存、無病/無増悪生存に関して独立した予後因子であった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Takamori S, Toyokawa G, Shimokawa M, Kinoshita F, Kozuma Y, Matsubara T, Haratake N, Akamine T, Hirai F, Seto T, Tagawa T, Takenoyama M, Ichinose Y, Maehara Y. The C-Reactive Protein/Albumin Ratio is a Novel Significant Prognostic Factor in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma: A Retrospective Multi-institutional Study. *Annals of Surgical Oncology* 2018;25(6):1555-1563. DOI:10.1245/s10434-018-6385X

[学会発表](計 2 件)

Takamori S., Toyokawa G., Tagawa T., Kinoshita F., Kozuma Y., Matsubara T., Haratake N., Akamine T., Hirai F., Takenoyama M, Ichinose Y., Maehara Y. The C-reactive Protein/Albumin Ratio is a Novel Significant Prognostic factor in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma  
18th World Conference on Lung Cancer 2017

高森 信吉、豊川 剛二、木下 郁彦、松原 太一、上妻 由佳、原武 直紀、赤嶺 貴紀、平井 文彦、庄司 文裕、田川 哲三、岡本 龍郎、竹之山 光広、一瀬 幸人、前原 喜

彦. 術前Controlling Nutritional Status(CONUT)は胸膜悪性中皮腫患者における術後の予後予測因子である  
第117回日本外科学会定期学術集会  
2017年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田川哲三 (TAGAWA, Tetsuzo)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：90419557

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )