

# 肺癌の免疫療法耐性化機序の解明と克服

大阪大学医学系研究科 呼吸器・免疫内科学  
大阪大学免疫学フロンティア研究センター 感染症態学分野  
小山 正平

## 1. はじめに

### 緒言・序論

非小細胞肺癌に対する免疫療法としてチェックポイント阻害薬の抗 PD-1 抗体が保険診療で使用可能となり、臨床的に頻繁に活用されるようになった。しかしながらこれまでの臨床試験の結果から PD-1 阻害薬の有効性は全非小細胞肺癌の 20%程度に留まり、また当初治療効果を認めた症例の中でも再燃してくるケースが問題となっている。

### 背景

申請者らはこれまで、ヒト肺癌を遺伝学的に再現したトランスジェニック肺癌マウスモデル (Kras もしくは EGFR 変異陽性) を用いて、腫瘍環境の構成細胞、特に癌細胞・各種免疫細胞の網羅的トランスクリプトーム解析を行う手法を確立すると共に [1, 2]、これらのマウスとヒト検体を用いて、抗 PD-1 抗体に対して初期には治療の効果を示すにも関わらず再発してくる症例 (獲得耐性) のメカニズムに注目し、その原因として TIM-3 をはじめとした PD-1 以外のチェックポイントの発現上昇が寄与する可能性を報告した [3]。この発見は、Kinase Inhibitor などの分子標的薬が特に腫瘍によって耐性が獲得されるのに対し、宿主免疫応答を標的とする免疫療法に関しては、腫瘍だけでなく、宿主 (免疫) 細胞そのものが耐性に寄与してしまうことを示唆している。

### 目的

上述のように、肺癌の免疫療法に対する耐性化メカニズムの解明及び克服には、癌細胞のみでなく宿主側の細胞成分の寄与を細かく検証する必要がある。本研究では、申請者がこれまで解析してきたマウスモデルをさらに発展させ、これまで確立してきた腫瘍細胞・免疫細胞の解析に加え、脈管構築や線維化を 3 次元的に評価可能なモデルを開発し、Imaging 技術を駆使し、腫瘍の立体構築が細胞学的・物理学的にどのように耐性化に寄与するのかそのメカニズムを検討することを目的とした。また、現行の免疫療法の効果を改善するために必須となるリンパ球の腫瘍内への誘導促進を可能とする治療法を開発し耐性化克服をめざすことを最終目標として遂行した。

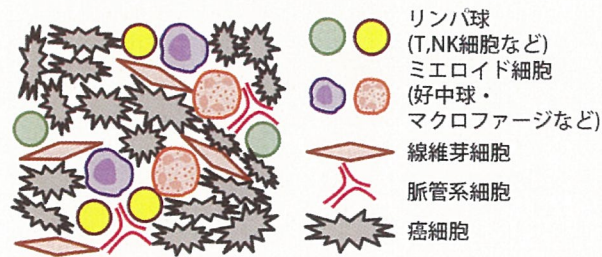
## 2. 方法

本研究は主に 2 つの研究計画に基づいて遂行した。

1) Imaging を含めた 3 次元的腫瘍環境の評価が可能な新規マウスモデルの開発：申請者がこれまでにこなってきた解析 [1, 2, 4] (図 1) では、線維組織に対して検出力の高い抗体が存在せず、特に脈管構築及び線維化に関しては評価が困難であった。そのため、これまで使用してきた Kras 及び Kras/p53 遺伝子異常を有するトランスジェニックマウスモデルに線維化の評価可能な aSMA-GFP マウス (東京大学藤生先生より譲渡) を掛け合わせ、蛍光顕微鏡で評価可能なモデルを開発し、脈管構築に関しても CD31 抗体を用いて評価する。この研究により、腫瘍環境を構成する癌細胞・各種免疫細胞の性質だけでなく、腫瘍の 3 次元構築・物理的バリアの存在を Imaging することが可能となり、新たな免疫療法耐性化の機序の解明を目指す。

2) 耐性化に寄与する腫瘍細胞及び宿主細胞由来の分子標的を検索し治療する：申請者はこれまでに TIM-3 などのチェックポイントが獲得耐性のメカニズムに関わることを示す [3] と共に、好中球や炎症性サイトカインの過剰産生が腫瘍環境中への T 細胞浸潤を阻害し、抗 PD-1 抗体による治療効果を減弱していることを見出した [2]。これらのサイトカインを標的とした治療や好中球の除去抗体 (既存治療) が腫瘍環境における線維化・脈管構築に与える影響を評価すると共に、VEGF 阻害剤や核酸アジュバント (共同研究者より提供：新規治療薬) によって腫瘍環境に T 細胞の誘導が可能かを Imaging 及びフローサイトメトリーを用いて解析し、さらにこれら治療によるトランスクリプトーム変化を解析することで新規の治療標的を探索する。また治療標的が抗 PD-1 抗体の初期耐性及び獲得耐性にどのように影響しているかについて評価する。

図1. 腫瘍は癌細胞と宿主由来の  
様々な細胞から構成される



### 3. 結果・研究成果

1) に関しては、Kras/aSMA-GFPマウスおよびKras/p53/aSMA-GFPマウスの作成を終了した。今回の助成機関内では実際に induction を行って腫瘍環境を評価するまでには至らなかった(induction から肺癌発症までに約3ヶ月を要するため、2018年春頃に最初の担癌マウスの解析を開始する予定)。一方、Kras/p53 の細胞株を静脈注射することによって転移性肺癌モデルを作成することは問題なく進められ、aSMA-GFP マウスを用いて腫瘍環境の線維化を評価する手法を確立することが出来た (成果報告会にて発表済)。このマウスモデルでは腫瘍環境における免疫細胞・癌細胞のみでなく、線維化の構築をモニターすることが可能なため、今後これらを用いて肺癌の免疫療法に対する耐性化の機序についてその詳細な解析を進めていく。また各種細胞をソーティングして、トランスクリプトームプロファイルを含めた網羅的な細胞評価を行っていく。

2) に関しては、より多くの活性化型好中球を腫瘍環境に誘導するIL-17産生Kras肺癌のモデルを作成し、そのモデルがKras肺癌モデルと比較して、抗PD-1抗体治療に対して抵抗性になることを報告した[5]。このモデルにおける免疫細胞の解析から、好中球増多は T細胞の数的・質的な抑制状態 (有意な腫瘍内の細胞数減少と疲弊マーカーの上昇・増殖マーカーの低下などを認めた) と相関していることが分かった。また共同研究により、ヒト肺癌の外科切除検体を用いた解析を行ったところ、マウスモデルと同様の表現型を認めた。さらに、共同研究者と共に、改編型核酸アジュバントの製造を行い、抗PD-1抗体に感受性のあるMC38 (大腸癌の細胞株) の皮下移植モデルを用いてまずはその治療効果を評価したところ、腫瘍に局注した場合および静脈注射した場合に単剤でも抗腫瘍効果を発揮することが分かった。さらに、改編型核酸アジュバントと抗PD-1抗体との併用効果を評価したところ、よりCD8 T細胞を活性化することによって抗腫瘍活性を高めることが証明出来たため現在論文作成中である。

### 4. 考察 まとめ

助成期間の1年間という短い期間で、トランスジェニック肺癌の作成までは進められたものの、それらのマウスを用いた解析までには至らなかった。しかしながら、同じ遺伝子変異を持つ細胞株の肺転移モデルを評価することで腫瘍環境の線維化を証明することができ、これまでの免疫学的な網羅的解析に加えて、何らかの治療により腫瘍内の組織構築を評価することが可能となった。また今回のモデルマウスの解析により、抗PD-1抗体の耐性化・治療感受性という観点において、好中球の異常な活性化や腫瘍内の線維化がそのメカニズムとして関わる可能性に一步近づけることができた (好中球による治療感受性の低下については論文発表を行った)。また抗PD-1抗体治療に対する感受性を引き上げるような治療の候補として、改編型核酸アジュバントの開発にも成功し、抗PD-1抗体との併用治療の有望なパートナーとして今後も評価を続けていく (論文作成中)。

今回貴重な研究助成を受けることができ、マウスモデル開発において前進することが出来たことを深謝するとともに、今後もより一層研究に邁進していきたい。

5. 発表論文、

腫瘍環境の線維化と抗 PD-1 抗体への抵抗性の関連を証明する実験は現在進行中であるが、腫瘍環境内の好中球（腫瘍に IL-17 を強制発現させて、腫瘍内への好中球浸潤を促したモデル）と抗 PD-1 抗体への抵抗性を示す論文を報告した。この論文の中では、本研究で用いた Kras/p53 の細胞株を用いた検証も行い、Acknowledgement にて貴財団からの助成を頂いていることを明記している。

Interleukin-17A Promotes Lung Tumor Progression through Neutrophil Attraction to Tumor Sites and Mediating Resistance to PD-1 Blockade.

Akbay EA, Koyama S (co-first), et al. *J Thorac Oncol*. 2017 Aug;12(8):1268-1279. doi: 10.1016/j.jtho.2017.04.017.

参考文献

1. Akbay EA, Koyama S, Carretero J et al. Activation of the PD-1 pathway contributes to immune escape in EGFR-driven lung tumors. *Cancer Discov* 2013; 3: 1355-1363.
2. Koyama S, Akbay EA, Li YY et al. STK11/LKB1 Deficiency Promotes Neutrophil Recruitment and Proinflammatory Cytokine Production to Suppress T-cell Activity in the Lung Tumor Microenvironment. *Cancer Res* 2016; 76: 999-1008.
3. Koyama S, Akbay EA, Li YY et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat Commun* 2016; 7: 10501.
4. Herter-Sprue GS, Koyama S, Korideck H et al. Synergy of radiotherapy and PD-1 blockade in Kras-mutant lung cancer. *JCI Insight* 2016; 1: e87415.
5. Akbay EA, Koyama S, Liu Y et al. Interleukin-17A Promotes Lung Tumor Progression through Neutrophil Attraction to Tumor Sites and Mediating Resistance to PD-1 Blockade. *J Thorac Oncol* 2017; 12: 1268-1279.