

學術獎勵賞受賞講演

1

ヒト $V\gamma 2V\delta 2$ 細胞の肺癌細胞に対する 細胞障害誘導における 新規ビスホスホネートプロドラッグとゾレドロン酸の比較

奥野 大輔

長崎大学病院 呼吸器内科(第二内科)

【緒言】近年、免疫チェックポイント阻害薬の開発によって肺癌治療は目覚ましい進歩を遂げているが、肺癌は依然として予後不良な疾患であり、新規の治療法開発が求められている。その候補として免疫細胞を用いた癌免疫細胞療法があるが、この分野において $\gamma\delta$ 型 T 細胞が注目されつつある。 $\gamma\delta$ 型 T 細胞は通常の T 細胞が有する α 、 β 鎖からなる TCR を持たず、 γ 鎖、 δ 鎖からなる TCR を有する T 細胞であり、感染や腫瘍免疫に関与している。ヒトの血液中に最も多く含まれる $\gamma\delta$ 型 T 細胞のサブセットは $V\gamma 2V\delta 2$ 型 T 細胞であるが、これは病原微生物由来の外來性抗原である (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate や、自己抗原である isopentenyl diphosphate (IPP) を認識する。IPP はメバロン酸代謝経路の中間産物であるが、ゾレドロン酸 (ZOL) をはじめとする窒素含有ビスホスホネートによってその代謝酵素である farnesyl diphosphate synthase (FDPS) が阻害され、その上流に位置する IPP が細胞内に蓄積する。 $\gamma\delta$ 型 T 細胞は標的細胞内の IPP 上昇を butyrophilin 3A1 を介して認識し、 $\gamma\delta$ 型 T 細胞の増殖や標的細胞の障害が誘導される。我々は以前より新規のビスホスホネートプロドラッグである tetrakis-pivaloyloxymethyl 2-(thiazole-2-ylamino) ethylidene-1, 1-bisphosphonate (PTA) を開発し、細胞内の IPP を効率よく蓄積させることで、高純度の $V\gamma 2V\delta 2$ 型 T 細胞を大量に培養することを可能とした。本研究では $V\gamma 2V\delta 2$ 型 T 細胞の肺癌細胞に対する細胞障害誘導における PTA の効果を ZOL と比較して検証した。

【方法】まず PTA の FDPS に対する作用を検証するために、癌細胞を PTA または ZOL で 2 時間処理し、細胞内の IPP を液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS) で測定を行った。続いて、血液中の末梢血単核細胞から $V\gamma 2V\delta 2$ 型 T 細胞を培養した。培養初日に PTA 1 μ M、2-9 日目に IL-2 100U/ml を投与し、計 11 日間の培養を行った。得られた $V\gamma 2V\delta 2$ 型 T 細胞と 4 種の肺癌細胞 (PC-9、PC-6、H1975、H520) を 96 well plate 上でそれぞれ共培養し、40 分、4 時間、16 時間後に細胞障害能を Europium assay または Luciferase assay で評価した。また肺癌細胞を PTA または ZOL で 2 時間処理し、 $V\gamma 2V\delta 2$ 型 T 細胞を投与して同様に細胞障害能を評価した。また共培養した上清中の IFN- γ を ELISA で測定した。

【結果・考察】PTA または ZOL で処理した癌細胞の細胞内の IPP を LC-MS で測定したところ、IPP は 0.010 ± 0.001 nmol (PTA 0nM)、 0.084 ± 0.003 nmol (PTA 10nM)、 0.152 ± 0.012 nmol (PTA 30nM)、 0.222 ± 0.005 nmol (PTA 100nM)、 0.001 ± 0.000 nmol (ZOL 100 μ M)、 0.002 ± 0.000 nmol (ZOL 300 μ M)、 0.07 ± 0.000 nmol (ZOL 1,000 μ M) であった。PTA は ZOL よりもより効果的に細胞内に IPP を蓄積させることが可能であった。また末梢血単核細胞

のPTA、IL-2を用いた計11日間の培養によって、99%以上の高純度のV γ 2 δ 2型T細胞を得ることができた。得られたV γ 2 δ 2型T細胞を肺癌細胞に投与したところ、投与後40分の時点では細胞障害は確認できなかったが、4時間、16時間後では、V γ 2 δ 2型T細胞の濃度依存的に細胞障害を認めた。続いてPTAで肺癌細胞を処理したところ、細胞障害能の増強を認め、PTA 10-30nMの処理で、V γ 2 δ 2型T細胞の投与後40分でも細胞障害を認めた。ZOLでも同様に細胞障害能の増強効果が認められたが、PTAと比較すると、100-300 μ Mと高濃度の処理が必要であった。市販のゾレドロン酸4mgを経静脈投与した場合、血中のゾレドロン酸濃度は1-2 μ M程度であり、ゾレドロン酸を用いた癌細胞の十分な感作は困難と思われた。またPTAまたはZOLで処理した肺癌細胞にV γ 2 δ 2型T細胞を投与し、その上清中のIFN γ を測定したところ、どちらの処理でもIFN γ の産生を認めた。産生に必要なPTA、ZOLの量はそれぞれ10-30nM、100-300 μ Mであり、PTAの方がより低濃度でIFN γ の産生誘導が可能であった。これらの結果から、PTAはZOLと比較してより低濃度での肺癌細胞の感作が可能であり、 $\gamma\delta$ 型T細胞による癌免疫細胞療法への応用が期待される結果が得られた。

2

小細胞肺癌の亜分類に応じた遺伝子発現プロファイルの検証と 主要発現分子の機能解析

天神 佑紀

熊本大学大学院生命科学研究部 呼吸器内科学講座

小細胞肺癌 (SCLC) は高悪性度神経内分泌腫瘍であり、喫煙者に多く、予後不良である。SCLC には *achaete-scute complex homolog 1* (*ASCL1*) や *yes-associated protein1* (*YAP1*)、*SOX2* といった oncogene の増幅が報告されているが、最近の研究では SCLC はこれらの master oncogene の発現別に応じて亜分類が提唱されている。具体的には、SCLC-A (*ASCL1*)、SCLC-N (*NEUROD1*)、SCLC-Y (*YAP1*)、そして SCLC-P (*POU2F3*) の4つに分類されるが、今回我々は SCLC の中で最も頻度が高い SCLC-A と、それとは明らかに腫瘍としての性質が異なることが知られる SCLC-Y subtype に関して、遺伝子発現プロファイルの検証と主要発現分子の機能解析を行った。

まずは SCLC 培養株を複数株用いて、SCLC-A と SCLC-Y で各々 RNA-sequence を行った。*ASCL1* は SCLC の系統特異的な発癌遺伝子であり、*ASCL1* が高発現した SCLC-A は神経内分泌分化の性質が強く、薬剤感受性であることが知られている。また、*YAP1* が高発現した SCLC-Y は、神経内分泌分化の性質が乏しく、薬剤抵抗性であることが知られている。RNA-sequence の結果に基づいて、今回我々は *ASCL1* と、その標的遺伝子として推定され、治療の新たな標的分子と期待された *SOX2*、*WNT11* に注目した。*ASCL1* と *SOX2*、*WNT11* の発現パターンを検証する為に、外科切除肺癌組織を用いて免疫組織化学染色で発現解析を行い、SCLC 培養株を用いてウエスタンブロッティングで解析を行った。また、他の研究グループが公開している多数の SCLC 患者の標本を用いた RNA-sequence や microarray の transcriptome dataset を用いて、これらの遺伝子の発現に関する相関関係も解析した。その結果、*ASCL1* と *SOX2*、*WNT11* は SCLC-A で特に強い正の相関性をもって高頻度に発現していた。更に、*ASCL1* 遺伝子をプラスミドベクターによって A549 肺腺癌株に導入した結果、*SOX2* や *WNT11* の発現増加を認め、神経内分泌分化も誘導され、SCLC への形質転換が認められた。*SOX2* は *ASCL1* と高い正の相関性をもって SCLC-A で発現していた一方で、SCLC-Y でも高度に発現していた為、より詳細な機能解析を行う為に、SCLC 培養株用いて、*SOX2* に関して ChIP-sequence を施行した。結果、SCLC-Y subtype では、*SOX2* は *YAP1* の発現を制御していることが分かった。SCLC 培養株を用いて *WNT11* に関して遺伝子導入実験を行った結果、*AKT* や *P38* のリン酸化が強く亢進し、*WNT11* は SCLC 培養株では腫瘍細胞の増殖を促進することが示唆された。RNA 干渉 (si RNA) によるノックダウン実験の結果、SCLC-A では *ASCL1* や *SOX2*、*WNT11* が腫瘍細胞の生存・増殖に強く寄与することが示唆される結果を得た。

SCLCにおいてASCL1は重要な転写因子であり、SOX2やWNT11の発現制御分子の一つである。ASCL1とSOX2、WNT11が協調した機構が中心になって、SCLCの中で最も高頻度であるSCLC-Aの分子生物学的動態は制御されている可能性がある。今回の研究結果により、SCLC-AにおいてASCL1-SOX2-WNT11シグナル軸は、将来有望な治療標的となり、更にこれらは生物学的マーカーとして臨床的に意義がある可能性が示唆された。

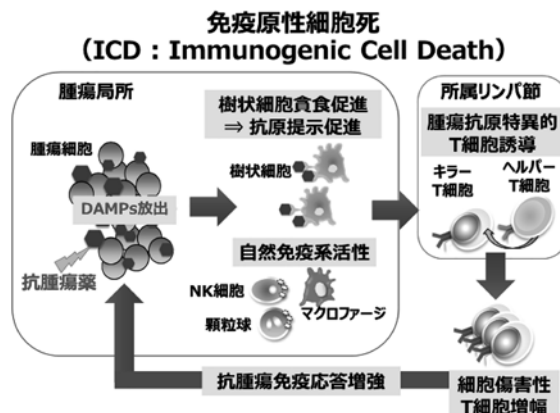
3

非小細胞肺癌における細胞傷害性抗癌剤および分子標的治療薬によるカルレティキュリンの誘導についての研究

古川 里恵

九州大学大学院医学研究院 臨床医学部門内科学講座 呼吸器内科学分野

進行期非小細胞肺癌の治療は細胞傷害性抗癌剤、分子標的治療薬、免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) を用いた全身薬物療法が主体であるが、複数の臨床試験において ICI と抗癌剤の併用療法により生存期間の延長が示されている (Remon, J, et al. J Thorac Oncol.2020 ; 15 : 914-947)。ICI と抗癌剤の併用による相乗効果誘導の要因として、癌細胞死の過程で放出される damage-associated molecular patterns (DAMPs) による免疫原性細胞死 (Immunogenic cell death : ICD, 下図) の関与が注目されている。複数の DAMPs が同定されるなか、アントラサイクリンなど一部の抗癌剤は、小胞体に存在するカルレティキュリン (CRT) を癌細胞表面に移行させることで樹状細胞による貪食を促進すると報告されている (Obeid, M, et al. Nature Medicine. 2007 ; 13(1) : 54-61)。しかし、非小細胞肺癌に用いられる抗腫瘍薬が CRT に与える影響については不明である。今回われわれは、非小細胞肺癌治療で使用される薬剤が CRT を誘導するかを検討するため、7種類の細胞傷害性抗癌剤 (シスプラチン、カルボプラチン、ビノレルビン、ドセタキセル、パクリタキセル、ジェムシタビン、ペメトレキセド) および第三世代 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤であるオシメルチニブがヒト非小細胞肺癌細胞株で細胞膜表面へのカルレティキュリン (Ecto-CRT) を誘導するかを評価した。さらに、細胞傷害性抗癌剤単剤 (ドセタキセル、ペメトレキセド) またはオシメルチニブで治療中の非小細胞肺癌患者の血漿中の可溶性 CRT を測定し評価した。



非小細胞肺癌細胞株上の Ecto-CRT は、MTS アッセイで求めた IC₅₀濃度の細胞傷害性抗癌剤で72時間治療した後にフローサイトメトリーで評価した。その結果、6種類の非小細胞肺癌細胞株 (A549, H1299, EBC1, PC9, H1650, 11-18)において、7種すべての細胞傷害性抗癌剤が Ecto-CRT を誘導し、プラチナ製剤に比べ代謝拮抗薬および微小管阻害薬においてより強く Ecto-CRT を誘導する傾向がみられた。真核生物翻訳開始因子 2a (eIF2a) のリン酸化は、小胞体 (ER) ストレス兆候の一つで下流の ecto-CRT 誘導に関連すると報告されている (Panaretakis. T, et al. EMBO, 2009 ; 28 : 578-590)。各殺細胞性抗癌剤処理による EBC1細胞における eIF2aのリン酸化強度を比較検討した。イムノブロット解析の結果、プラチナ製剤と比較し、代謝拮抗薬や微小管阻害薬は同細胞における eIF2aリン酸化を強く誘導した。Ecto-CRT と同時にアポトーシスに関連する Annexin V の共染色を行ったところ、Ecto-CRT 発現量と Annexin V 発現量に強い正の相関を認めるとともに、細胞傷害性抗癌剤により増強した Ecto-CRT は汎カスパーゼ阻害薬の Z-VAD-FMK により減弱することが示されたことから、Ecto-CRT 誘導とカスパーゼ依存性のアポトーシスの関連が示された。EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌細胞株 (PC9, H1650, 11-18, HCC827, HCC4006) を用いてオシメルチニブによる同様の実験を行ったところ、オシメルチニブも殺細胞性抗癌剤と同様にアポトーシスの過程で Ecto-CRT を誘導することが示された。さらに、ペメトレキセドもしくはドセタキセル単剤治療を受けた16人の患者の血液を、1コース目の開始前、Day3、Day8、最終日に採取し、可溶性 CRT を ELISA で測定した結果、治療開始後の最大値は治療開始前よりも有意に上昇していた ($p < 0.01$)。同様に、オシメルチニブ治療を受けた9名の患者において、治療開始後の血液中可溶性 CRT 最大値は治療開始前よりも有意に増加していた ($p < 0.001$)。

本研究において、非小細胞肺癌治療で使用される細胞障害性抗癌剤 (シスプラチン、カルボプラチン、ビノレルビン、ドセタキセル、パクリタキセル、ジェムシタピン、ペメトレキセド) と分子標的薬であるオシメルチニブがヒト肺癌細胞における Ecto-CRT を誘導するとともに、患者血漿中の CRT を上昇させることが明らかとなった。これらの結果から、非小細胞肺癌に用いられる薬剤により腫瘍組織において CRT の発現が誘導され、複合免疫療法における抗腫瘍免疫効果の増強に寄与している可能性と血漿中 CRT が治療効果を予測する新たなバイオマーカーとなり得ることが示唆された。

4

2型自然リンパ球を介する好酸球性気道炎症における 長時間作用性ムスカリン受容体拮抗薬による抑制効果

松山 崇弘

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 呼吸器内科学

長時間作用性ムスカリン受容体拮抗薬(LAMA)は、中等症から重症の喘息患者において増悪頻度を減少させるが、そのメカニズムは不明である。喘息の増悪はウイルスや大気汚染物質などの曝露によって惹起される。これらの刺激は気道上皮から上皮由来サイトカイン(IL-25・IL-33・TSLP)を放出させて、2型自然リンパ球(group 2 innate lymphoid cell; ILC2)を刺激する。刺激を受けたILC2は、IL-5やIL-13を産生し自然免疫型の好酸球性気道炎症を誘導するため、喘息の病態に関与すると考えられている。このように、抗原非特異的な刺激による喘息増悪にILC2を介した2型免疫応答が関与することが注目されている。

今回、我々は、LAMAであるチオトロピウム(チオトロピウム)の自然免疫型の好酸球性気道炎症に対する効果を検討し、その作用メカニズムを明らかにすることを目的として本研究を行なった。

今回の研究では以下の結果が得られた。

1) LAMAは自然免疫型の2型気道炎症を減弱させる

マウスにパピンを点鼻投与して作成した自然免疫型の好酸球性気道炎症モデルにおいて、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の好酸球数とILC2数、2型サイトカイン(IL-5・IL-13)レベルがそれぞれ増加した。このパピンモデルにチオトロピウムを点鼻投与することで、好酸球数とILC2数、2型サイトカインレベルがいずれも抑制された。また、パピンはBALF中の上皮由来サイトカイン(IL-33、TSLP)レベルを増加させるが、チオトロピウムはパピン投与によるIL-33とTSLPの増加を抑制させなかった。以上の結果から、チオトロピウムは自然免疫型の好酸球性気道炎症を抑制することが判明した。また、チオトロピウムは上皮由来サイトカインより下流のカスケード、特にILC2を制御していると考えられた。

2) LAMAはILC2からのサイトカイン産生を間接的に抑制する

*In vitro*でマウス肺組織由来のILC2をIL-33で刺激すると、細胞上清中のIL-5とIL-13の濃度が上昇するが、チオトロピウムを添加してもIL-33刺激によるIL-5とIL-13の濃度上昇は抑制されなかった。チオトロピウムのターゲットであるムスカリンM3受容体(M3R)の発現をRNAシーケンスで検討したところ、M3RはILC2に発現していなかった。これらの結果から、チオトロピウムはILC2からの2型サイトカイン産生を直接抑制しておらず、チオトロピウムがその他の機序を介してILC2からの2型サイトカイン産生を抑制していると考えられた。

3) LAMA は好塩基球由来の IL-4 産生を抑制する

マウス由来の気道炎症細胞における M3R の発現を RNA シークエンスで検討したところ、M3R は好塩基球に強い発現を認め、好塩基球に注目して実験を行うこととした。マウス骨髄細胞を IL-3 で分化誘導した好塩基球を IL-33 で刺激すると、細胞上清中の IL-4 の濃度が上昇し、チオトロピウムは IL-33 刺激による IL-4 の濃度上昇を抑制した。ILC2 と好塩基球の相互作用を検証するため、ILC2 と好塩基球を IL-33、IL-33 + チオトロピウムで刺激した条件で共培養を行った。IL-33 の刺激で上昇する細胞上清中の IL-5 と IL-13 の濃度は、ILC2 の単独培養系と比べ、ILC2 と好塩基球との共培養系で更に上昇していた。チオトロピウムの添加により、ILC2 の単独培養系では IL-5 と IL-13 の濃度は抑制されないが、ILC2 と好塩基球との共培養系ではともに抑制された。以上より、チオトロピウムは好塩基球からの IL-4 産生を抑制することで、ILC2 からの IL-5 と IL-13 の産生を制御していると考えられた。

4) LAMA はヒト好塩基球由来の IL-4 の産生を抑制する

ヒト末梢血好塩基球におけるチオトロピウムの影響を検討した。ヒト末梢血好塩基球を IL-33 で刺激すると、細胞上清中の IL-4 の濃度が上昇し、チオトロピウムは IL-33 刺激による IL-4 の濃度上昇を抑制した。これはマウスでの実験と同じ結果だった。

今回、我々は、チオトロピウムが好塩基球からの IL-4 産生を抑制し、間接的に ILC2 の活性化を制御することで、ILC2 を介する好酸球性気道炎症を抑制することを証明した。これは、LAMA が好塩基球を介して抗炎症作用を有するという新たな機序を明らかにしたものである。これまで LAMA は喘息に対して、気管支拡張薬と考えられ、臨床研究では、安定期の喘息患者に対する LAMA の抗炎症作用は認められていない。LAMA を長期に併用することにより、喘息増悪期に気道炎症が抑制されることで、増悪を抑えている可能性がある。

5

Cicatricial organizing pneumonia associated with fibrosing interstitial pneumonia — A clinicopathological study

財前 圭晃

久留米大学医学部内科学講座 呼吸器・神経・膠原病内科部門

間質性肺疾患の中でも、慢性に線維化病変を呈し、かつ線維化の進行を示すものについて、近年進行性線維化を伴う間質性肺疾患(Progressive fibrosing interstitial lung disease: PF-ILD)という疾患概念がほぼ確立された。これは、最も進行性で予後不良である特発性肺線維症(IPF)以外の疾患においても、線維化の進行を呈するものは予後が不良であることが、過敏性肺炎や膠原病関連間質性肺炎においても指摘されている。PF-ILDには多くの疾患が含まれ、これらに対する治療戦略を決定するための指標として整備されている。一方、2013年に報告されたATS/ERSの声明(Am J Respir Crit Care Med, 188, 733-748, 2013)では慢性線維化性間質性肺炎(Chronic fibrosing interstitial pneumonia: CFIP)は病理組織学的にはUIPパターンもしくはNSIPパターンを示すと考えられている。すなわち、このCFIPが線維化の進行が特徴のPF-ILDの概念と一致しない。このため、CFIPの中で画像所見や肺機能が悪化し、PF-ILDに移行すると予想される予後因子を見つけることは、患者の治療戦略を決定するうえで重要である。近年、癆痕性の器質性肺炎(cicatricial organizing pneumonia: ciOP)の病理所見がCFIPと似た線維性変化であることが報告されている。本研究では、ciOPがCFIPの一部に存在していることに着目し、CFIPの中でciOPの存在が予後に関わる因子であるという仮説を立てた。外科的肺生検が実施された402症例の中で、その後の肺機能の変動など予後情報が収集可能であったCFIP患者121症例を解析した。ciOPの有無について組織学的に再評価を行い、CFIPにおいてciOPの有無が肺機能と予後への影響について解析した。121症例のCFIP患者の中で、48症例(39.7%)においてciOPが存在した。ciOPはCFIPにおいて比較的高頻度に見られる病理学的組織所見であることを発見した。ciOPが含まれるCFIPでは、診断時の肺機能検査において、ciOPを含まないCFIPと比較して拡散障害が強かった。間質性肺疾患において拡散障害が強いことは、その後の肺機能の低下が強いことと相関を示すことは既報にて示されている。しかし、ciOPが含まれるCFIPでは、診断6か月後の努力性肺活量の変動が+4.5%とむしろ改善しており、ciOPが含まれないCFIPと比較して有意に肺機能の悪化が少なかった。興味深いことに、ciOPが含まれるCFIPでは、診断後12か月以内の間質性肺炎急性増悪を示す症例はなかった。ciOPの病理組織所見を伴うCFIPでは予後を悪化する間質性肺炎急性増悪が少ないことが示唆された。これらの結果から、ciOPはCFIPにおける予後良好因子であることが示された。加えて、ciOPの病理組織所見を伴うCFIPは予後不良のPF-ILDと違う経過を示す可能性が示された。