

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）
分担研究報告書

肺がん転移性脳腫瘍発症における骨髄由来抑制細胞の役割と治療標的の同定

分担研究者 藤田 貢 愛知県がんセンター研究所腫瘍免疫学部 客員研究員

研究要旨 がん原発病変に対する治療成績向上に伴い転移性脳腫瘍の罹患率が増加している。なかでもその血行学的特性から肺がんを原発とするものが多い。近年がん増殖・浸潤・転移における免疫系の関わりが明らかとなりつつあり、また2011年初頭、非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drug; NSAID) の長期投与によりがん死亡率が低下することが報告された。一般的に NSAID はシクロオキシゲナーゼ阻害活性をもち、この作用により免疫賦活効果を有することが示されている。近年我々は、脳腫瘍発生初期において、炎症細胞の一種である骨髄由来抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cell; MDSC) がCCL2/CXCL12 ケモカイン依存性に病変部に集積し、発症のトリガーとなり、かつ NSAID により COX-2 阻害により MDSC 抑制および脳腫瘍発生抑制しうることを示してきた。それらの知見を元に、本研究では、特に肺がん転移性脳腫瘍発症における MDSC の影響を、マウスによる非臨床研究およびヒト臨床研究の両面から評価した。

A. 研究目的

がん原発巣に対する治療成績向上に伴い転移性脳腫瘍罹患率が漸増しており、がん患者の約 10 % が転移性脳腫瘍を発症するとされている。統計的には肺がんを原発とするものが最も多い (脳腫瘍全国統計第 12 版)。転移性脳腫瘍は頭蓋内圧亢進症状または局所神経症状により患者の QOL を低下させ、がんにおける主要な予後不良因子となっている (Steeg PS, et al. *Nat Rev Cancer*. 11:352-363, 2011)。従って、がん患者における転移性脳腫瘍予防の意義・需要は極めて大きい。

脳実質はリンパ系組織を欠き、実質内への生理的免疫細胞浸潤は極めて稀である。そのため脳・中枢神経系は免疫学的特権部位と言われる。しかし最近では脳組織および脳病変に対し強力な免疫応答が生じることが知られている (Ransohoff RM, et al. *Nat Rev Immunol*. 3:569-581, 2003)。これらの知見を基

に、脳・中枢神経系疾患に対してさまざまな免疫学的アプローチがなされており、脳腫瘍についても数多くの免疫療法が試みられている (Fujita M. *Brain Tumor*, InTech, 2011)。

脳腫瘍に対する免疫応答に関し、これまで我々は免疫抑制性細胞内シグナルおよびサイトカインに注目し、研究を行ってきた。特に近年では、STAT3 シグナルが脳腫瘍 CTL 療法に及ぼす影響 (Fujita M, et al. *J Immunol*. 180:2089-2098, 2008)、TGF- β サイトカインが脳腫瘍ペプチド免疫療法に及ぼす影響 (Ueda R, et al. *Clin Cancer Res*. 15:6551-6559, 2010)、CCL2 サイトカインが脳腫瘍ペプチド免疫療法に及ぼす影響 (Zhu X, et al. *J Neurooncol*. 104:83-92, 2011)、脳腫瘍に対する免疫監視機構における COX-2 カスケードの影響 (Fujita M, et al. *Cancer Res* 71:2664-2674, 2011) 等を明らかにした。

これらの研究の中で、原発性脳腫瘍のみな

らず転移性脳腫瘍発生において、炎症細胞の一種である骨髄由来抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cell; MDSC) が CCL2/CXCL12 ケモカイン依存性に病変部に集積し、発症のトリガーとなることが示唆された。それらの知見を元に、本研究では、特に肺がん転移性脳腫瘍発症における MDSC の影響を、マウスによる非臨床研究およびヒト臨床研究から評価した。

B. 研究方法

1) マウス肺がん脳転移モデルにおける MDSC の評価：

動物実験モデルとして以下の 2 つを用いた。まず C57B6 野生型マウス脳内に同系肺がん細胞株 LL/2 (1×10^5 /匹) を移植し、移植型転移性脳腫瘍モデルを作製した (実験モデル A)。また C57B6 野生型マウスの心尖部より LL/2 (1×10^6 /匹) を注入し、血行型転移モデルを作製した (実験モデル B)。一部のマウスでは LL/2 移植前よりアスピリンを経口投与した。また別のマウスでは、LL/2 移植前後に抗 Gr-1 抗体投与により MDSC を除去した。それぞれのモデルについて、生存率および腫瘍生着率、フローサイトメトリーによる腫瘍組織内の免疫細胞浸潤、腫瘍微小環境におけるサイトカイン/ケモカイン等を評価項目とした。MDSC のマーカーとしては CD11b、Ly6G、Ly6C を用いた。

2) 肺がん脳転移症例からの MDSC 採取および評価：

健常人および肺がんの既往がある脳腫瘍症例より末梢血細胞 (PBMC) を採取した。PBMC より CD14⁺CD15⁻HLA-DR^{low} の分画を採取し、mRNA を抽出した。mRNA 純度を確認した上で、Ovation PicoSL WTA System V2 (Nugen Technologies) を用いて cDNA を合成、次いで SureTag DNA Labeling Kit (Aligent) にて蛍光標識後、SurePrint G3 Human 8x60K v2 (Agilent) DNA マイクロアレイチップとハ

イブリダイゼーションした。結果は Feature Extaction Software にて検出後、R Environment を用いて解析した。臨床検査項目は、年齢、性別、腫瘍組織系、脳腫瘍サイズ、脳腫瘍組織系 (直達手術症例)、NSAID 服用歴などとした。

C. 研究結果

1) マウス肺がん脳転移モデルの作製：

モデル A においては、アスピリン継続投与により脳腫瘍生着率の著明な低下および生存率上昇がみられた。また腫瘍形成したマウス脳腫瘍組織を採取し、腫瘍内浸潤免疫細胞を抽出、フローサイトメトリーにて解析したところ、MDSC 腫瘍内集積の著明な低下を認めた。さらにアスピリン治療群の腫瘍組織内では、CCL2 および CXCL12 ケモカインの発現低下があり、それぞれが MDSC 集積に関わっていると考えられた。抗 Gr-1 抗体投与による MDSC 除去マウスでは著明な生存率上昇がみられた。モデル B においては、アスピリン治療群では転移性脳腫瘍のみならず、肝・腎・肺への転移頻度の低下がみられた。

2) 肺がん脳転移症例からの MDSC 採取および評価：

肺がん転移性脳腫瘍症例では健常人と比較し、末梢血中の MDSC 増加がみられた。また転移性脳腫瘍症例の MDSC では CD276 (B7-H3) の発現上昇がみられ、かつ NSAID 服用歴との統計学的有意な相関もみられた。

D. 考察

マウス実験モデルにより、転移性脳腫瘍の発症初期に MDSC が組織内に集積し、腫瘍に有利な微小環境を形成していると考えられた。また肺がん脳転移症例から得られた MDSC 解析により、共刺激分子 CD276 が MDSC の免疫抑制機能に関わっていることが示唆された。

E. 結論

肺がん転移性脳腫瘍発症では MDSC 増加および腫瘍床への集積がおり、転移性腫瘍生着に有利な微小環境を形成している。転移性脳腫瘍発症制御のためには、従来の抗癌剤治療に加え、MDSC 除去を目的とした新規治療法の可能性が示唆され、その MDSC 特異的標的分子として CD276 が考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okuda T, Fujita M, Yoshioka T, Tasaki T, Kato A. Novel surgical technique to solidify cyst-type metastatic brain tumors using autologous fibrin glue for complete resection. *Surg Neurol Intl.* in press.
- 2) Okuda T, Hayashi H, Fujita M, Yoshioka H, Tasaki T, Nakagawa K, Kato A. Administration of gefitinib via nasogastric tube effectively improved the performance status of a patient with lung adenocarcinoma-derived meningeal carcinomatosis. *Intl Canc Conf J.* DOI

10.1007/s13691-013-0148-0, 2014.

- 3) Okuda T, Yamashita J, Fujita M, Yoshioka H, Tasaki T, Kato A. Chicken egg and skull model of endoscopic endonasal transsphenoidal surgery improves trainees drilling skills. *Acta Neurochir.* DOI 10.1007/s00701-014-2035-7, 2014.
- 4) Kohanbash G, McKaveney K, Sakaki M, Ueda R, Mintz AH, Amankulor N, Fujita M, Ohlfest JR, Okada H. GM-CSF Promotes the Immunosuppressive Activity of Glioma-Infiltrating Myeloid Cells through Interleukin-4 Receptor-alpha. *Cancer Res.* 73:6413-6423, 2013.

2. 学会発表

- 1) 藤田 貢、中田 晋、加藤天美、義江修. COX-2阻害による肺癌脳転移抑制の免疫学的作用機序. 第 72 回日本癌学会学術集会総会、横浜市、2013年10月

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし