

165. 肉腫患者における免疫モニタリングによる新規治療開発

小林 英介

国立がん研究センター 中央病院 骨軟部腫瘍科

Key words : 免疫モニタリング, 肉腫, 免疫抑制細胞, T細胞, 免疫チェックポイント分子

緒言

肉腫（悪性骨軟部腫瘍）とは、骨肉腫やユーイング肉腫を代表とする悪性骨腫瘍、および脂肪肉腫、未分化多型肉腫、横紋筋肉腫などを代表する悪性軟部肉腫の2つに大別される。症例自体が極めて少なく、近年は希少がんとも称され、がん対策基本法の改訂もあり、国を挙げてその治療開発に力を入れ始めている。しかし症例数の観点および経済的観点からも新規の治療開発が困難な領域である。加えて組織型が多彩であり、個別の疾患で標準治療が存在するのは骨肉腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫と非常に限られた疾患のみである。教科書的には軟部肉腫の治療において生存率の向上に寄与するとして確立されている抗腫瘍薬はDoxorubicinとIfosfamidの2剤のみであるが、薬剤耐性肉腫も多いことから、治療に難渋することは臨床上の大きな問題点である。初診時転移のない軟部肉腫Ⅲ期（UICC/AJCC）の5年生存率が約50-60%、転移のない骨肉腫は65%程度であり、化学療法の導入で改善してきたものの、AYA世代を始めとする若年者に多い疾患でもあり、未だ予後不良である。また新規薬剤の開発が過去30年でほとんどないのが現状であり、治療成績改善のためにも新しい治療戦略が必須である。

固形がんにおいては、手術、化学療法、放射線療法に続くがんに対する第4の治療法として免疫療法が期待され多くの研究が行われてきた。近年、前立腺がんに対する樹状細胞ワクチン療法（Sipuleucel-T）や進行性メラノーマに対する抗CTLA-4抗体（Ipilimumab）、抗PD-1抗体（Nivolumab）がFDAで承認され、他の癌種においても抗PD-L1、PD-1抗体の大規模な臨床試験でも創薬として有望な結果が得られてきており、これまで以上にがん免疫療法に注目が集まっている。また、m-MDSC（Monocytic Myeloid Derived Suppressor Cells：単核系骨髄由来免疫抑制細胞）が悪性黒色腫の予後と関連するという報告など、治療のみならず、腫瘍の予後マーカーとしてもがん免疫領域は注目されている。しかしながら、多くの抗がん剤や分子標的薬剤と同様に、がん免疫療法も全ての患者に有効ではない。現在より高い有効性を求めるために、免疫療法に適した患者のバイオマーカー検索、また手術や従来の抗がん剤や分子標的薬剤と免疫療法の併用療法が欧米では試みられており、本邦でも今後、同様の研究や臨床試験が計画されていくと予想される。併用療法には理論上は免疫機能に好ましい影響を与える抗がん剤と免疫療法の組み合わせが望ましく、もしくは少なくとも免疫機能を高度に抑制しない抗がん剤と免疫療法を組み合わせることが必要条件と考えるが、どの薬剤と免疫療法の組み合わせが最適かに関して、肉腫領域では全くの未知であり、国内外でも報告は皆無である。さらには抗がん剤治療のレジメン毎に免疫機能への影響についての情報が必要となるが、前述のごとく肉腫においてその情報は皆無である。そこで、肉腫に対する標準治療として一般的に行われている手術や抗がん剤治療レジメンが、免疫機能に与える影響を解析することを目的とし本研究を計画した。本研究の結果、免疫機能が受ける影響に治療方法で差を認めることや、抗がん剤が免疫機能に与える影響に個体差があることが確認できれば、新たな視点に基づいた個別化された免疫療法開発や新規予後マーカーの開発にもつながることが期待される。

方法

本研究は、2015年4月に国立がん研究センター中央病院研究倫理審査委員会の承認を得た上で、悪性骨軟部腫瘍患者のうち標準治療である1. 手術単独例、2. 新規術前化学療法導入例、3. 進行例に対する化学療法例の患者を対象に、実地臨床に合わせて各3ポイントでの前向き採血（ヘパリン管10ml×2本）を実施した。1. 手術単独例では、①手術前、②手術後1ヶ月、③手術後6ヶ月のポイントで、2. 新規術前化学療法導入例では、①化学療法開始前、②

2 コース開始前、③手術施行前のポイントで、3. 進行例に対する化学療法例では、①化学療法開始前、②2 コース開始前、③化学療法開始後3ヶ月でのポイントで各々3ポイントで採血を施行した。

採血採取後、まず遠心分離機を用いて1500 bpm、10分の条件で血漿を分離・保存した。次に、10% FBS (Fetal Bovine Serum) で2倍希釈し、15 ml チューブにリンパ球分離液 (Histopaque®-1077: SIGMA 社) 5 ml 加えた後に、希釈した検体を10 ml ゆっくり重層した。その後、遠心分離機を用いて、2,080 bpm、20分の条件で遠心分離・上澄みを除去し、末梢血リンパ球 (peripheral blood mononuclear cell: PBMC) を回収した。

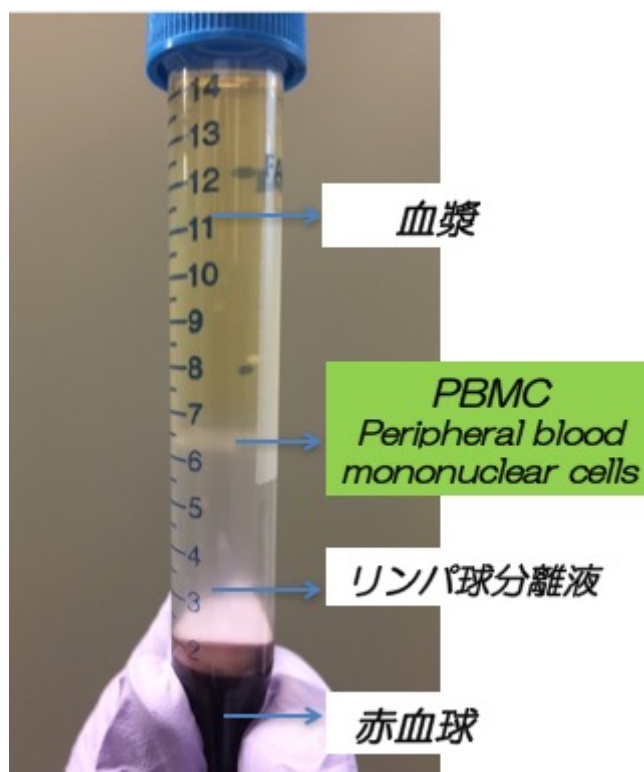


図1. PBMC 分離

リンパ球分離液 (Histopaque®-1077: SIGMA 社) を用いて PBMC を分離。

一部を細胞凍結保存液 (タカラバイオ社: Cellbanker) にて凍結保存し、一部を Flow cytometry (BD 社 LSR Fortes X-20) を用いて多重染色法を用いたマルチカラー解析を行った。新鮮な検体を用いて、免疫抑制細胞骨髄由来免疫抑制細胞 (Myeloid-derived suppressor cell: MDSC) サブセットである単球系 MDSC (Monocytic(M)-MDSC) と顆粒球系 MDSC (Granulocytic(G)-MDSC) 及び樹状細胞のサブセットである myeloid (mDC) と plasmacytoid (pDC) について解析を行った。M-MDSC は、Lineage (CD3/CD16/CD19/CD20/CD56) ⁻ / CD11b⁺ / CD33⁺ / HLA-DR^{low} / CD14⁺ / CD15^{low} と、顆粒球系 MDSC は Lineage⁻ / CD11b⁺ / CD33⁺ / HLA-DR^{low} / CD14⁻ / CD15⁺ と定義しゲーティングを行った。同様に、m-DC に関しては lineage⁻ / HLA-DR^{high} / CD11c⁺、p-DC は、lineage⁻ / HLA-DR^{high} / CD123⁺ と定義し解析を行った。また、凍結保存検体を用いて、T・B・NK 細胞のフェノタイプ・活性化マーカーや免疫チェックポイント発現などの解析を行った。

結 果

2015年4月～2017年3月までに105症例に対して免疫モニタリング採血を施行した。内訳は、1. 手術単独例51例、2. 新規術前化学療法19例、3. 進行例に対する化学療法例が35例であった。また、疾患内訳は、脂肪肉腫28例、未分化多型肉腫 (Undifferentiated pleomorphic sarcoma: UPS) 15例、骨肉腫12例、粘液線維肉腫9例、デスマイド8例、軟骨肉腫7例、他26例であった (Table 1)。

Table 1. Characteristics of Patients (n=105)

Characteristics	① Only Surgery	② Preoperative Chemotherapy	③ Chemotherapy for advanced cases
Number of Patients	51	19	35
Tumor	Liposarcoma 10 (WDLS 7, Myxoid 3) UPS 8 MFS 8 Desmoid 5 Chondrosarcoma 5 Synovial sarcoma 2 OS 2 DFSP 2 ES 2 MPNST 2 ASPS 1 Fibrosarcoma 1 Hemangiosarcoma 1 Malignant perineurolima 1 Leiomyosarcoma 1	OS 6 Liposarcoma 6 (Myxoid 4, WDLS 2) UPS 3 Chondrosarcoma 1 Leiomyosarcoma 1 MPNST 1 Synovial sarcoma 1	Liposarcoma 11 (WDLS 6, Pleomorphic 3, Myxoid 2) OS 3 UPS 4 Desmoid 3 MPNST 3 Leiomyosarcoma 2 Malignant rhabdoid tumor 2 Synovial sarcoma 2 Chondrosarcoma 1 Evans tumor 1 Myxofibrosarcoma 1 Rhabdomyosarcoma 1
Median age (range)	54 (19-83)	48 (24-66)	55 (21-77)
Sex			
Male	32	13	14
Female	19	6	21
PS	0 (39) 1 (10) 2 (1) 3 (1)	0 (13) 1 (3) 2 (2) 3 (1)	0 (15) 1 (11) 2 (6) 3 (2) 4 (1)
Regimen		AI 15 MAP 3 A 1	A 11 Paz 10 GD 6 AI 4 Eriburin 1
Stage of disease	I B 8 II A 4 II B 5 III 34	I B 2 II A 2 II B 4 III 11	I B 3 III 9 IV 23

※ WDLS: well-differentiated liposarcoma, UPS: undifferentiated pleomorphic sarcoma, MFS: Myxofibrosarcoma, MPNST: malignant peripheral nerve sheath tumor, ES: Epithelioid sarcoma, ASPS: Alveolar soft part sarcoma
A: Adriamycin, I: Ifosfamide, MAP: Methotrexate, Adrimycin and Cisplatin, Paz: Pazopanib, GD: Gemcitabine + Docetaxel

また、使用したレジメンは、2. 新規術前化学療法例では、AI (A: Adriamycin, I: Ifosfamide) 15例、MAP (Methotrexate, Adrimycin and Cisplatin) 3例、A: 1例であった。3. 進行例に対する化学療法例では、A: 11例、Pazopanib: 10例、GD (Gemcitabine + Docetaxel) 6例、AI: 4例、Eriburin: 1例であった。現在までにMDSCサブセットであるM-MDSCとG-MDSC、及び樹状細胞のサブセットであるmyeloid DCとplasmacytoid DCについて解析を行った (Fig. 1)。1. 手術単独例、2. 新規術前化学療法例では加療前後の2ポイントで解析を行ったが、MDSC、樹状細胞のサブセットでは有意差はみられなかった。しかしながら、3. 進行例に対する化学療法例においては、加療前後で単球系MDSCで加療後で減少し有意差がみられた。

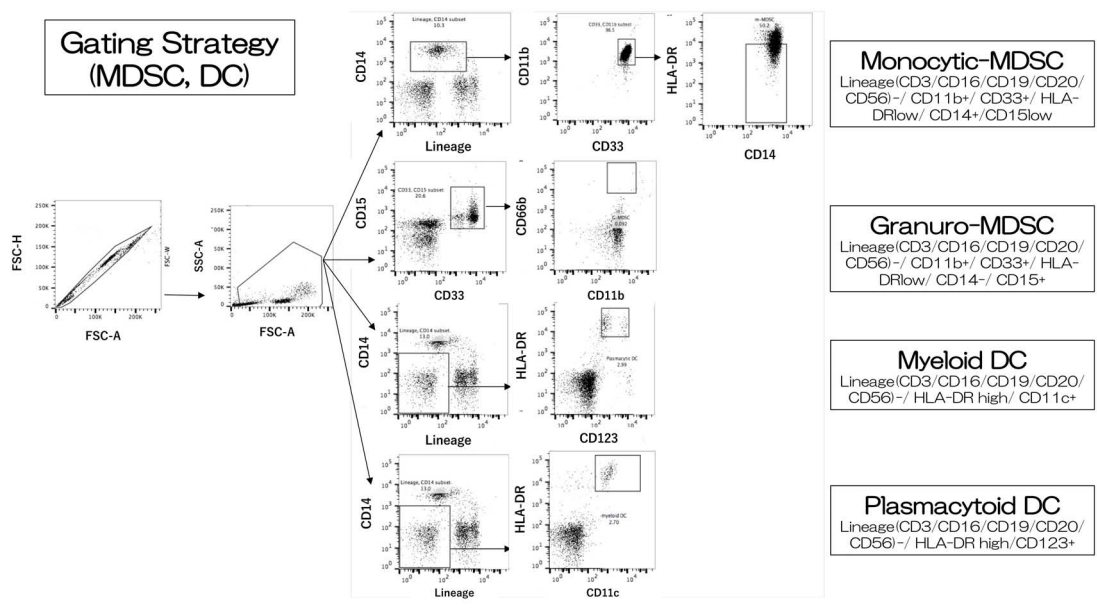


Fig. 1. Flow cytometric analysis
Gating strategy and representative dot plots for M-MDSC, G-MDSC, M-DC, p-DC.

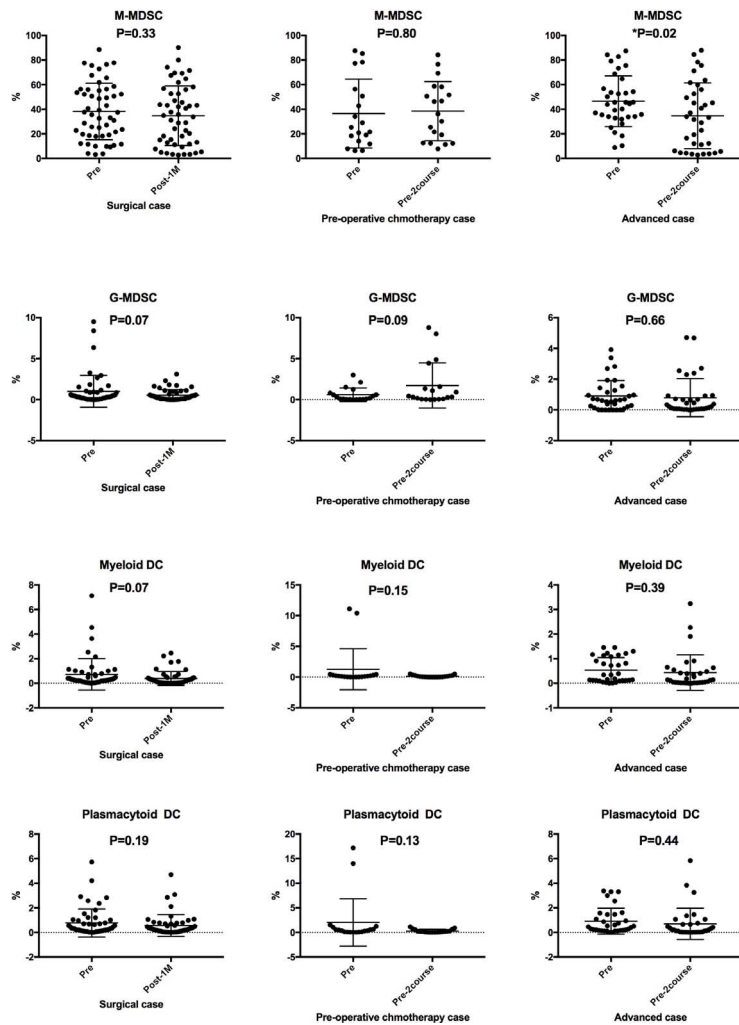


Fig. 2. Relationship between immune status subset
P values were calculated by a t test.

現在、T/B/NK 細胞のサブセット及び免疫チェックポイント発現に関しては解析中である。

考 察

MDSC は、顆粒球、樹状細胞、マクロファージなどの前駆細胞であり、サイトカインなどの腫瘍産生因子に反応し誘導され、担癌患者の免疫抑制状態を担う細胞であることが明らかになってきている。[1\)](#) そのため、制御性 T 細胞と並んで癌患者の免疫抑制状態に重要な役割を演じている。このような免疫抑制細胞をいかに制御するかが、免疫療法ははじめとした癌治療の効果を上げるために重要であると考えられるようになってきている。MDSC は単球系 MDSC (m-MDSC) と顆粒球系 MDSC (G-MDSC) の二つに大きく分けられ、近年、悪性黒色腫や大腸がんの化学療法抵抗例において、MDSC 高発現が予後不良因子である事が報告されている。[2,3\)](#) 本研究における現在までの結果から、進行例における化学療法例において、治療前後で優位に MDSC が減少している事から、骨軟部腫瘍領域の標準的なレジメン (Doxorubicin, Doxorubicin+Ifosfamide, Pazopanib, Gemcitabin+Docetaxel) に関しては、免疫応答抑制を少なからず解除する方向に働いていると考えられる。それ故に免疫療法との併用は、現在の標準レジメンにおいて優位に作用する可能性が示唆された。今後、T/B/NK 細胞のサブセット及び免疫チェックポイント分子発現についても解析を行っていく予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、国立がん研究センター中央病院先端医療科の北野滋久先生、同病院造血幹細胞移植科の伊藤歩先生、同病院骨軟部腫瘍科の金栄智先生、順天堂大学整形外科の末原義之先生である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009;9:162-74.
- 2) Kitano S, Postow MA, Ziegler CG, et al. Computational algorithm-driven evaluation of monocytic myeloid-derived suppressor cell frequency for prediction of clinical outcomes. *Cancer Immunol Res* 2014;2:812-21.
- 3) Tada K, Kitano S, Shoji H, et al. Pretreatment Immune Status Correlates with Progression-Free Survival in Chemotherapy-Treated Metastatic Colorectal Cancer Patients. *Cancer Immunol Res* 2016;4:592-9.