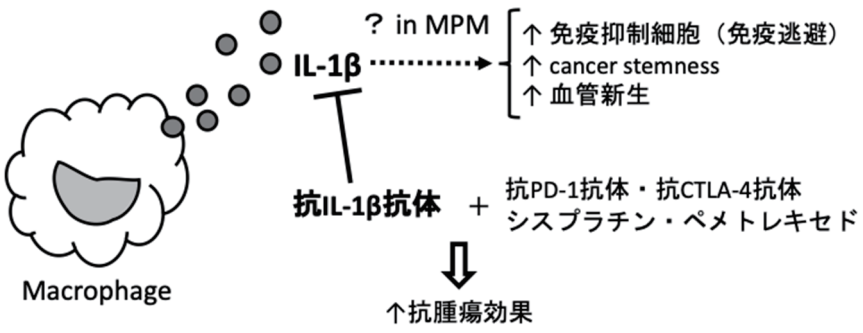
166　IL-1βを標的とした悪性胸膜中皮腫の新規複合免疫療法	河野　幹寛

【目的】近年、多くの悪性腫瘍で免疫チェックポイント阻害剤の有効性が報告され、免疫療法が日常の癌診療に使用されるようになった。一方、腫瘍関連マクロファージ（TAMs）は、様々な癌種において悪性度に関与しており、これを標的とした治療の有効性が前臨床モデルを用いた研究で報告されているが、一般臨床への応用には未だ至っていない。IL-1βは主に単球・マクロファージにより産生される。悪性腫瘍においてIL-1βは腫瘍侵襲性・血管新生の促進や免疫抑制細胞の動員に関与していることが報告されているが、MPM進展におけるIL-1βの意義・役割は不明である。本研究の目的は、マウスMPM同所性腫瘍モデルを用いて、MPMにおけるIL-1βの意義を明らかにし、IL-1βを標的とした、MPM の新たな免疫療法、あるいは既存治療と組み合わせた新規集学的治療を開発することである。本研究によって、IL-1βのMPM進展における役割が明らかとなり、極めて予後不良なMPMの予後改善につながることが期待される。

【方法】本研究では、前臨床マウスMPM同所性腫瘍モデルとして、Balb/cマウスにAB12（Balb/cマウスにアスベストを暴露させて作製した中皮腫細胞株）を胸腔内投与した同種同所性腫瘍マウスモデルを使用した。1. 同所性中皮腫マウスモデルの作製：Balb/cマウスに0.5×10^{6} cells/200μlの AB12を右胸腔内投与し、腫瘍生着・生存を観察した。2. 腫瘍内免疫微小環境の解析：同所性中皮腫マウスモデルの、腫瘍投与前・投与後3、7、10、14日目の胸水（あるいは胸腔内洗浄液）を回収し、マクロファージ、Tリンパ球（CD3、CD4、CD8、regulatory T cell）など各種免疫細胞の動態をFlow cytometryにて解析した。3. 腫瘍内微小環境のIL-1β濃度の測定：同所性中皮腫マウスモデルの、腫瘍投与後10日目の胸水を回収し、ELISAでIL-1β濃度を測定した。

【結果】1. 同所性中皮腫マウスモデルの作製：本方法で作製した同所性中皮腫マウスモデルは、ヒト中皮腫と同様に、胸腔内にびまん性に腫瘍を認めた。しかし、生存期間中央値は約55日であり、これまでの先行研究と比較して長く、細胞培養・腫瘍投与などの条件を検討し、これまでの先行研究に近いエンドポイントとなるモデルを作製した。2. 腫瘍内免疫微小環境の解析：腫瘍進展に伴って、胸水中に、マクロファージ、CD8陽性Tリンパ球、制御性T細胞が増加していた。特に、マクロファージに関しては、2つの胸腔内マクロファージの subset（$F4/80^{low}$ Small pleural macrophages（SPM）と $F4/80^{high}$ Large pleural macrophages（LPM））があることがわかった。$F4/80^{low}$ SPMは、腫瘍進展の早期に著しく増加し、腫瘍進展に伴ってM2マクロファージ（腫瘍免疫抑制性、すなわち腫瘍増殖に促進的に作用する）のマーカーであるCD206の発現が高くなった。3. 腫瘍内微小環境のIL-1β濃度の測定：ELISAで胸水中のIL-1β濃度を測定したが、測定不能であった。原因として、胸水量が少なく希釈したうえでELISAを行ったためと考え、現在条件設定などを行っているところである。

本研究計画の概略



166. IL-1β を標的とした悪性胸膜中皮腫の新規複合免疫療法

河野　幹寛

*九州大学病院 呼吸器外科（2）

Key words：悪性胸膜中皮腫，IL-1β，腫瘍内免疫微小環境，腫瘍関連マクロファージ，免疫療法

緒　言

悪性胸膜中皮腫（MPM）は早期に発見されたとしても、根治可能な治療法が確立されていない。手術・放射線治療・化学療法による集学的治療を行えたとしてもその予後は平均 20 ヶ月以下であり、長期生存は極めて限られる。最近、抗 PD-1 抗体や抗 CTLA-4 抗体を用いた免疫療法の有効性が示されたが、その奏功率は未だ十分ではない。したがって、腫瘍内微小環境の更なる解析と新たな治療法の開発が MPM の予後を改善するための最重要課題である［1〜3］。

MPM で高頻度に変異している遺伝子は CDKN2A、BAP1、NF2、TP53 で、いずれも癌抑制遺伝子である。そのため、原発性肺腺癌などで頻繁に認める活性型の癌遺伝子変異（EGFR などのチロシンキナーゼ）をターゲットとした分子標的薬のように遺伝子変異を治療の直接的な標的にすることは、MPM では困難であり、異なるアプローチによる治療法開発が必要である。中皮腫細胞では、NF2-Hippo 経路がしばしば不活化されており、この経路の異常は YAP と TAZ という転写コアクチベーターを活性化させ、インターロイキン 1β（IL-1β）という炎症性サイトカインの転写が亢進し、悪性度獲得に寄与している［4］。

IL-1β は、マクロファージから分泌され、乳癌・結腸癌・膵癌などで cancer stemness に関与していることが報告されており、IL-1β が癌幹細胞—免疫細胞間のクロストークに関与している可能性が示唆されている［5］。乳癌マウスモデルを用いた研究では、IL-1β 阻害により腫瘍増殖が抑制され、さらに抗 PD-1 抗体との併用で相乗的な抗腫瘍効果を認めた［6］。また、抗 IL-1β 抗体を用いた抗炎症療法が心血管イベント再発を予防することを示した大規模臨床試験において、その後の探索的解析で、プラセボ群と比較して抗 IL-1β 抗体投与群において肺癌の発生・死亡が有意に少なかったことが報告された［7］。乳癌・結腸癌などにおいて IL-1β 阻害による抗腫瘍効果をみる臨床試験が現在進行しているが、MPM においてはマウスなどの前臨床モデルを用いた検討も未だ行われていない状況である。

本研究の目的は、同所性中皮腫マウスモデルを用いて、IL-1β を標的とした、MPM の新たな免疫療法、あるいは既存治療と組み合わせた新規集学的治療を開発することである。本研究によって、IL-1β の MPM 進展における役割が明らかとなり、極めて予後不良な MPM の予後改善につながることが期待される。

方　法

本研究では、前臨床マウス MPM 同所性腫瘍モデルとして、Balb/c マウスに AB12（Balb/c マウスにアスベストを暴露させて作製した中皮腫細胞株）を胸腔内投与した同種同所性腫瘍マウスモデルを使用した。本研究は、九州大学大学院医学研究院等動物実験委員会で承認されている（承認番号：A21-365-0）。

1. 同所性中皮腫マウスモデルの作製

Balb/c マウスに 0.5×10^{6} cells/200μl の AB12 を右胸腔内投与し、腫瘍生着・生存を観察した。これまでの先行研究において、本モデルは無治療では 15〜20 日ほどでエンドポイントとなる［8］ことが分かっている。

*現在の所属：九州大学病院 呼吸器外科

2. 腫瘍内免疫微小環境の解析

同所性中皮腫マウスモデルの、腫瘍投与前・投与後 3、7、10、14 日目の胸水（あるいは胸腔内洗浄液）を回収し、マクロファージ、T リンパ球（CD3、CD4、CD8、regulatory T cell）など各種免疫細胞の動態を Flow cytometry にて解析した。

3. 腫瘍内微小環境の IL-1β 濃度の測定

同所性中皮腫マウスモデルの、腫瘍投与後 10 日目の胸水を回収し、ELISA で IL-1β 濃度を測定した。

結　果

1. 同所性中皮腫マウスモデルの作製

本方法で作製した同所性中皮腫マウスモデルは、ヒト中皮腫と同様に、胸腔内にびまん性に腫瘍を認めた（図 1a）。ただし、生存期間中央値は約 55 日であり（図 1b）、これまでの先行研究［8］と比較して長く、細胞培養・腫瘍投与などの条件を検討し、これまでの先行研究に近いエンドポイントとなるモデルを作製した。

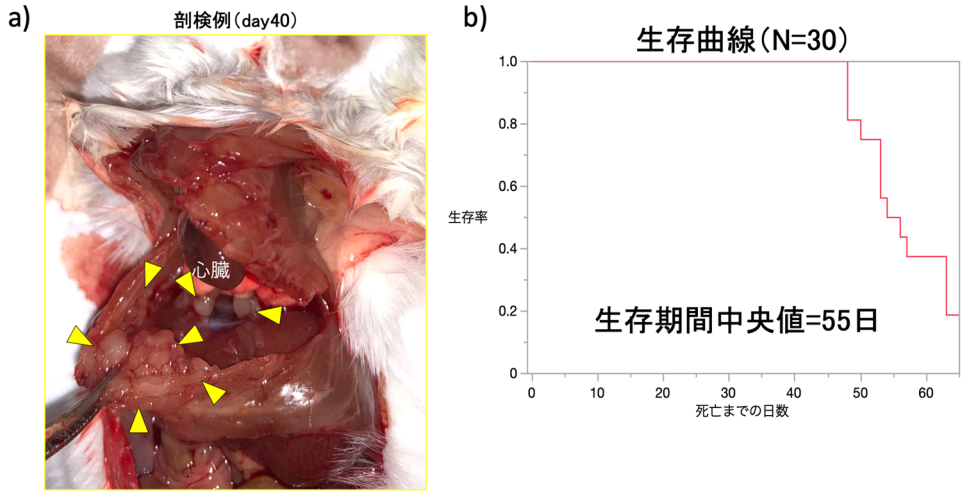


図 1. 同所性中皮腫マウスモデル

a）腫瘍細胞投与後 40 日目の胸腔内の腫瘍（黄矢印）。ヒト中皮腫と同様に、胸腔内にびまん性に腫瘍を認める。

b）生存曲線。

2. 腫瘍内免疫微小環境の解析

腫瘍進展に伴って、胸水中に、マクロファージ、CD8 陽性 T リンパ球、制御性 T 細胞が増加していた。特に、マクロファージに関しては、2 つの胸腔内マクロファージの subset（F4/80^{low} Small pleural macrophages（SPM）と F4/80^{high} Large pleural macrophages（LPM））があることがわかった（図 2a）。F4/80^{low} SPM は、腫瘍進展の早期に著しく増加（図 2b 左）し、腫瘍進展に伴って M2 マクロファージ（腫瘍免疫抑制性、すなわち腫瘍増殖に促進的に作用する）のマーカーである CD206 の発現が高くなった（図 2b 右）。

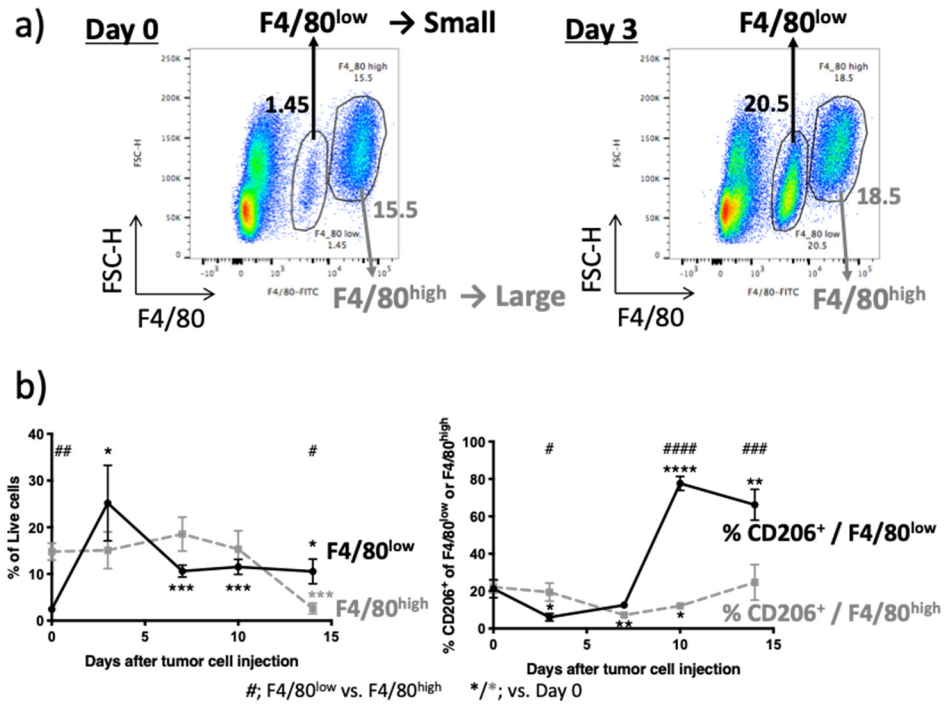


図 2. 同所性中皮腫マウスモデルの胸水中の腫瘍関連マクロファージの動態

a) 中皮腫細胞胸腔内投与前（Day 0）と投与後早期（Day 3）の胸腔内洗浄液のフローサイトメトリー。胸腔内マクロファージには、2 つの subset がある。細胞サイズを反映する Forward scatter（FSC）強度から、F4/80^{low} は F4/80^{high} よりも細胞のサイズが小さいことがわかる。

b) 左図:MPM 進展に伴う胸水中の F4/80^{low} macrophages と F4/80^{high} macrophages の動態。Day 0 では F4/80^{high} が大多数だが、Day 3 では F4/80^{low} が急増する。右図：2 つのマクロファージ subset における CD206（M2 マーカー）発現の動態。腫瘍進展に伴って F4/80^{low} macrophages の CD206 発現が高くなり、M2 phenotype を獲得していることがわかる。

Data：mean±SEM（n＝5 per group）。*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.001、****P＜0.0001；P＜0.05、##P＜0.01、###P＜0.001、####P＜0.0001（One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test）。

3. 腫瘍内微小環境の IL-1β 濃度の測定

ELISA で胸水中の IL-1β 濃度を測定したが、測定不能であった。原因として、胸水量が少なく希釈したうえで ELISA を行ったためと考え、現在条件設定などを行っているところである。

考　察

近年、多くの悪性腫瘍で免疫チェックポイント阻害剤の有効性が報告され、免疫療法が日常の癌診療に使用されるようになった。一方、腫瘍関連マクロファージ（TAMs）は、様々な癌種において悪性度に関与しており、これを標的とした治療の有効性が前臨床モデルを用いた研究で報告されているが、一般臨床への応用には未だ至っていない。

悪性中皮腫は胸膜あるいは腹膜から発生する悪性腫瘍で、その腫瘍微小環境の舞台は胸腔内・腹腔内であり、他の固形癌とは異なる微小環境と考えられている。我々は、胸腔内・腹腔内における悪性中皮腫の TAMs の

ontogeny を研究する中で、マウスの腹腔および胸腔において、単球由来の small peritoneal/pleural macrophages(SPM)と組織常在の large peritoneal/pleural macrophages(LPM)という 2 種類の異なるマクロファージ集団を同定した。さらに、SPM M2 様 TAM が中皮腫の発生に重要な役割を、LPM はより特異的に免疫反応に貢献することを示した［9］。したがって、単球由来の TAM を選択的に標的とすることで、組織に常在する TAM の代償的な拡大を通じて、抗腫瘍免疫を向上させることができると考えている。

IL-1β は主に単球・マクロファージにより産生される。悪性腫瘍において IL-1β は腫瘍侵襲性・血管新生の促進や免疫抑制細胞の動員に関与していることが報告されているが、MPM 進展における IL-1β の意義・役割は不明である。

本研究は現在も進行中で、下記の方法・計画で研究を継続していく予定である。

1）抗 IL-1β 抗体投与の抗腫瘍効果と腫瘍内免疫微小環境の解析：抗 IL-1β 抗体を投与することによって生存延長が得られるかを調べる。さらに、腫瘍投与後 10 日目の胸水を回収し、TAMs・樹状細胞や T リンパ球（CD3、D4、D8、egulatory T cell）など各種免疫細胞を Flow cytometry にて解析する。TAMs については、その分化・浸潤などに重要なシグナル伝達経路である CCR2-CCL2 axis や CSF1-CSF1R axis の受容体・リガンドを Flow cytometry や ELISA にて解析する。

2）抗 IL-1β 抗体と免疫チェックポイント阻害薬の併用効果の検討：免疫チェックポイント阻害剤（抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体）と、抗 IL-1β 抗体を併用することによって、抗腫瘍効果増強が認められるか評価し、新規の複合免疫療法・集学的治療を開発する。さらに、胸水中の各種免疫細胞の浸潤を Flow cytometry にて解析する。

悪性腫瘍において IL-1β は腫瘍増殖に促進的に作用すると報告されているが、MPM では十分な検討がなされていない。前臨床モデルを用いた本研究によって、IL-1β 阻害の抗腫瘍効果、さらには免疫チェックポイント阻害剤と IL-1β 阻害の併用効果が明らかになる。ヒトの IL-1β 阻害薬として、抗 IL-1β モノクロナール抗体であるカナキヌマブが開発されている。前臨床モデルを用いた本研究結果をもとに、将来的には、IL-1β 阻害薬の効果を検証する臨床試験へ展開したいと考えている。以上より、本研究によって、極めて予後不良な MPM の予後改善につながることが期待される。さらに、この治療戦略は、他癌種に対しても応用できる可能性がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院消化器・総合外科大学院生の橋之口朝仁である。

文　献

1） Saddoughi SA, Abdelsattar ZM, Blackmon SH. National Trends in the Epidemiology of Malignant Pleural Mesothelioma: A National Cancer Data Base Study. Ann Thorac Surg. 2018 Feb;105(2):432-437. Epub 2017 Dec 7. PMID: 29223422. doi: 10.1016/j.athoracsur.2017.09.036.

2） de Perrot M, Feld R, Cho BC, Bezjak A, Anraku M, Burkes R, Roberts H, Tsao MS, Leighl N, Keshavjee S, Johnston MR. Trimodality therapy with induction chemotherapy followed by extrapleural pneumonectomy and adjuvant high-dose hemithoracic radiation for malignant pleural mesothelioma. J Clin Oncol. 2009 Mar 20;27(9):1413-8. Epub 2009 Feb 17. PMID: 19224855. doi: 10.1200/JCO.2008.17.5604.

3） de Perrot M, Wu L, Wu M, Cho BCJ. Radiotherapy for the treatment of malignant pleural mesothelioma. Lancet Oncol. 2017 Sep;18(9):e532-e542. PMID: 28884702. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30459-X.

4) Matsushita A, Sato T, Mukai S, Fujishita T, Mishiro-Sato E, Okuda M, Aoki M, Hasegawa Y, Sekido Y. TAZ activation by Hippo pathway dysregulation induces cytokine gene expression and promotes mesothelial cell transformation. Oncogene. 2019 Mar;38(11):1966-1978. Epub 2018 Nov 6. PMID: 30401981. doi: 10.1038/s41388-018-0417-7.
5) Bayik D, Lathia JD. Cancer stem cell-immune cell crosstalk in tumour progression. Nat Rev Cancer. 2021 Aug;21(8):526-536. Epub 2021 Jun 8. PMID: 34103704. doi: 10.1038/s41568-021-00366-w.
6) Kaplanov I, Carmi Y, Kornetsky R, Shemesh A, Shurin GV, Shurin MR, Dinarello CA, Voronov E, Apte RN. Blocking IL-1ß reverses the immunosuppression in mouse breast cancer and synergizes with anti-PD-1 for tumor abrogation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Jan 22;116(4):1361-1369. Epub 2018 Dec 13. PMID: 30545915. doi: 10.1073/pnas.1812266115.
7) Ridker PM, MacFadyen JG, Thuren T, Everett BM, Libby P, Glynn RJ; CANTOS Trial Group. Effect of interleukin-1ß inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. Lancet. 2017 Oct 21;390(10105):1833-1842. Epub 2017 Aug 27. PMID: 28855077. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32247-X.
8) Kohno M, Murakami J, Wu L, Chan ML, Yun Z, Cho BCJ, de Perrot M. Foxp3+ Regulatory T Cell Depletion after Nonablative Oligofractionated Irradiation Boosts the Abscopal Effects in Murine Malignant Mesothelioma. J Immunol. 2020 Nov 1;205(9):2519-2531. Epub 2020 Sep 18. PMID: 32948683. doi: 10.4049/jimmunol.2000487.
9) Wu L, Kohno M, Murakami J, Zia A, Allen J, Yun H, Chan M, Baciu C, Liu M, Serre-Beinier V, De Palma M, Felley-Bosco E, Yeung J, Pugh TJ, de Perrot M. Defining and targeting tumor-associated macrophages in malignant mesothelioma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2023 Feb 28;120(9):e2210836120. Epub 2023 Feb 23. PMID: 36821580. doi: 10.1073/pnas.2210836120.