

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700998

研究課題名(和文) 肺がん脳転移に対する非ステロイド系抗炎症薬による免疫学的予防法の確立

研究課題名(英文) COX-2 blockade immunologically suppresses brain metastasis of lung cancer

研究代表者

藤田 貢 (FUJITA, Mitsugu)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：40609997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：肺がん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。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、NSAIDの長期投与によるがん死亡率低下が報告された。近年我々は、脳腫瘍発生初期において骨髄由来抑制細胞(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。

研究成果の概要(英文)：Associations between the regular use of NSAIDs and reduced cancer risks in human have been shown. NSAIDs function as COX-2 inhibitors that prevent the production of PGE<sub>2</sub>, which induces MDSCs in cancer-bearing hosts. We thus hypothesized that COX-2 blockade would suppress brain metastasis of cancers by inhibiting MDSC development and their chemokine-mediated accumulation in the tumor microenvironment (TME). In both mouse and human brain metastasis cases, the expression levels of COX-2 and CCL2, a chemokine primarily attracting MDSCs, were increased in the tumor tissues compared with the periphery or normal brain. Concomitantly, the infiltration of MDSCs was observed at high levels in the tumor tissues. In the mouse brain tumor models using LL/2 murine lung cancer cell line, treatment with NSAIDs inhibited brain metastasis formation with the suppression of MDSCs. Our findings show that the COX-2 pathway promotes brain metastases of lung cancers by development and accumulation of MDSCs.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：肺がん 転移性脳腫瘍 非ステロイド系抗炎症薬 免疫抑制性細胞

## 1. 研究開始当初の背景

(1) がん原発巣に対する治療成績は向上しているものの、それ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 を低下させるため、がんにおける主要な予後不良因子である (Steege PS. *Nat Rev Cancer* 2011, 11:352)。したがって、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。

(2) 解剖学的には脳血管内皮は血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) を構成しており、脳内への液性物質および細胞等の移行を厳密に制御している。この BBB のために化学療法薬の多くは脳実質内透過性に乏しい。実際には数多くの化学療法薬が使用されているが、これまでのところ転移性脳腫瘍に対して著効するものは知られていない (Steege PS. *Nat Rev Cancer* 2011, 11:352)。このような背景から、化学療法を代替・補助する新規治療法の出現が望まれている。

(3) 免疫学的に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、実際に多発性硬化症をはじめとした自己免疫疾患の発症はよく知られるところである (Ransohoff RM. *Nat Rev Immunol* 2003, 3:569)。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、ペプチドワクチン療法、樹状細胞ワクチン療法、T 細胞養子免疫療法等、数多くの免疫療法が試みられている (Fujita M. *Brain Tumor*, InTech, 2011)。

(4) そのような潮流の中、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、これらを阻害することで脳腫瘍に対する免疫治療効果を増強させることを試みてきた。近年の研究により、腫瘍細胞由来のサイトカインが腫瘍微小環境で STAT3 シグナルを亢進させ、脳腫瘍 CTL 療法の治療効果を減弱させることを示した (Fujita M. *J Immunol* 2008, 180:2089)。次いで同様に、腫瘍由来 TGF- $\beta$  サイトカインが抗脳腫瘍ペプチド免疫療法の治療効果を減弱させることを示した (Ueda R. *Clin Cancer Res* 2010, 15:6551)。さらに近年では CCL2 ケモカインが腫瘍微小環境に抑制性免疫細胞を誘導し、抗脳腫瘍ペプチド免疫療法の治療効果を減弱させることも示した (Zhu X. *J Neurooncol* 2011, 104:83)。これらの結果より、腫瘍微小環境における免疫抑制性シグナ

ルの制御が、獲得免疫系による抗腫瘍効果の増強に必須であると考えられた。

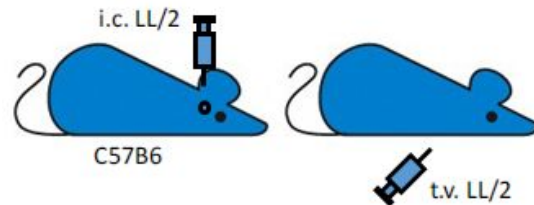
(5) 非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drug; NSAID) は抗炎症作用を有する薬剤の総称である。NSAID はシクロオキシゲナーゼ (COX-2 等) 活性を可逆的に競合阻害し、アラキドン酸からプロスタグランジン (PGE<sub>2</sub> 等) が合成されるのを抑制し、薬理作用を示す。2011 年初頭、NSAID の長期投与によりがん死亡率が顕著に低下することが明らかとなった (Rothwell PM. *Lancet* 2011, 377:31)。原発性脳腫瘍についても類似の疫学データが報告されている (Scheurer ME. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008, 17:1277)。これらの観察と一致し、我々は自発発生型脳腫瘍マウスモデルを用いて COX-2 阻害により脳腫瘍発生が抑制され、免疫機能が関与していることを示した (Fujita M. *Cancer Res* 2011, 71:2664)。

## 2. 研究の目的

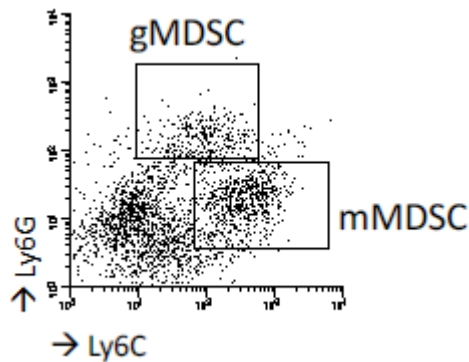
(1) 以上の背景を基に、本研究では転移性脳腫瘍発生における COX-2 の影響を疫学的・免疫学的見地から解析し、NSAID 投与とワクチン療法を軸とした転移性脳腫瘍予防法の確立を、世界に先駆けて試みた。特に肺がん転移性脳腫瘍発症における MDSC の影響を、マウスによる非臨床研究およびヒト臨床研究から評価した。

## 3. 研究の方法

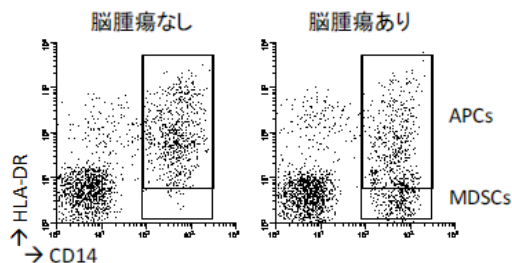
(1) マウス肺がん脳転移モデルにおける MDSC の評価: 動物実験モデルとして以下の 2 つを用いた。まず C57B6 野生型マウス脳内に同系肺がん細胞株 LL/2 (1 x 10<sup>5</sup>/匹) を移植し、移植型転移性脳腫瘍モデルを作製した (実験モデル A)。また C57B6 野生型マウスの心尖部より LL/2 (1 x 10<sup>6</sup>/匹) を注入し、血行型転移モデルを作製した (実験モデル B)。



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: 健康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<sup>+</sup>CD15<sup>-</sup>HLA-DR<sup>low</sup> 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。



#### 4. 研究成果

(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 抗体およびクロドロネート含有リポソームの投与による 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康人および非脳転移症例と比較し、末梢血中の著明な MDSC 増加がみられた。また転移性脳腫瘍症例の MDSC では、上記対照群と比較し、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。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

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 (査読あり)

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 (査読あり)

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 (査読あり)

Kohanbash G, Ishikawa E, Fujita M, Ikeura M, McKaveney K, Zhu J, Sakaki M, Sarkar S, Okada H. Differential activity of interferon- $\gamma$  promoter is regulated by Oct-1 and a SNP that dictates prognosis of glioma. *Oncoimmunology.* 1:487-492, 2012 (査読あり)

[学会発表](計 8 件)

Okuda T, Kanada Y, Yoshioka H, Tasaki T, Fujita M, Nakagawa K, Kato A. 非小細胞肺癌の転移性脳腫瘍に対する治療戦略 - driver oncogene を標的とした個別化治療への展望. 第 72 回日本脳神経外科学会学術集会総会、横浜市、2013 年 10 月 17 日

Yoshioka H, Fujita M, Okuda T, Tasaki T, Kato A. グリオーマ幹細胞テモダール耐性機序における ABC 輸送体の役割. 第 72 回日本脳神経外科学会学術集会総会、横浜市、2013 年 10 月 16 日

Fujita M, Nakata S, Okuda T, Kato A, Kuzushima K. COX-2 blockade

immunologically suppresses brain metastasis of lung cancer. 第 72 回日本癌学会学術集会総会、横浜市、2013 年 10 月 3 日

Yoshioka H, Fujita M, Okuda T, Tasaki N, Inoue T, Yoneda T, Hirota Y, Miyatake S, Kato A. Increased expression of ABC transporters is associated with drug resistance of glioma-initiating cells. 第 30 回日本脳腫瘍学会学術集会総会、広島市、2012 年 11 月 26 日

Tasaki N, Okuda T, Yoshioka H, Takada H, Fujita M, Kato A. Efficacy of preoperative FDG-PET or malignant brain tumor. 第 30 回日本脳腫瘍学会学術集会総会、広島市、2012 年 11 月 26 日

Fujita M, Zhang R, Miura R, Nakata S, Kato A, Kuzushima K. COX-2 blockade immunologically suppresses brain metastasis of lung cancer. The 17th Annual Meeting of the Society for Neuro-Oncology (November 16, 2012; Washington, DC)

Nakata S, Fujita M, Nakanishi H, Kuzushima K, Kondo E. Expression of stemness-related genes in hypoxic area of Sleeping Beauty transposon-mediated murine glioblastoma. 第 71 回日本癌学会学術集会総会、札幌市、2012 年 9 月 21 日

Fujita M, Zhang R, Miura R, Nakata S, Kato A, Kuzushima K. COX-2 blockade immunologically suppresses brain metastasis of lung cancer. 第 71 回日本癌学会学術集会総会、札幌市、2012 年 9 月 20 日

加藤 天美 (KATO, Amami)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号：00233776

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 貢 (FUJITA, Mitsugu)  
近畿大学・医学部・准教授  
研究者番号：40609997

### (2) 連携研究者

義江 修 (YOSHIE, Osamu)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号：10166910

中田 晋 (NAKATA, Susumu)  
愛知県がんセンター・研究所・主任研究員  
研究者番号：8059695

奥田 武司 (OKUDA, Takeshi)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号：10340796