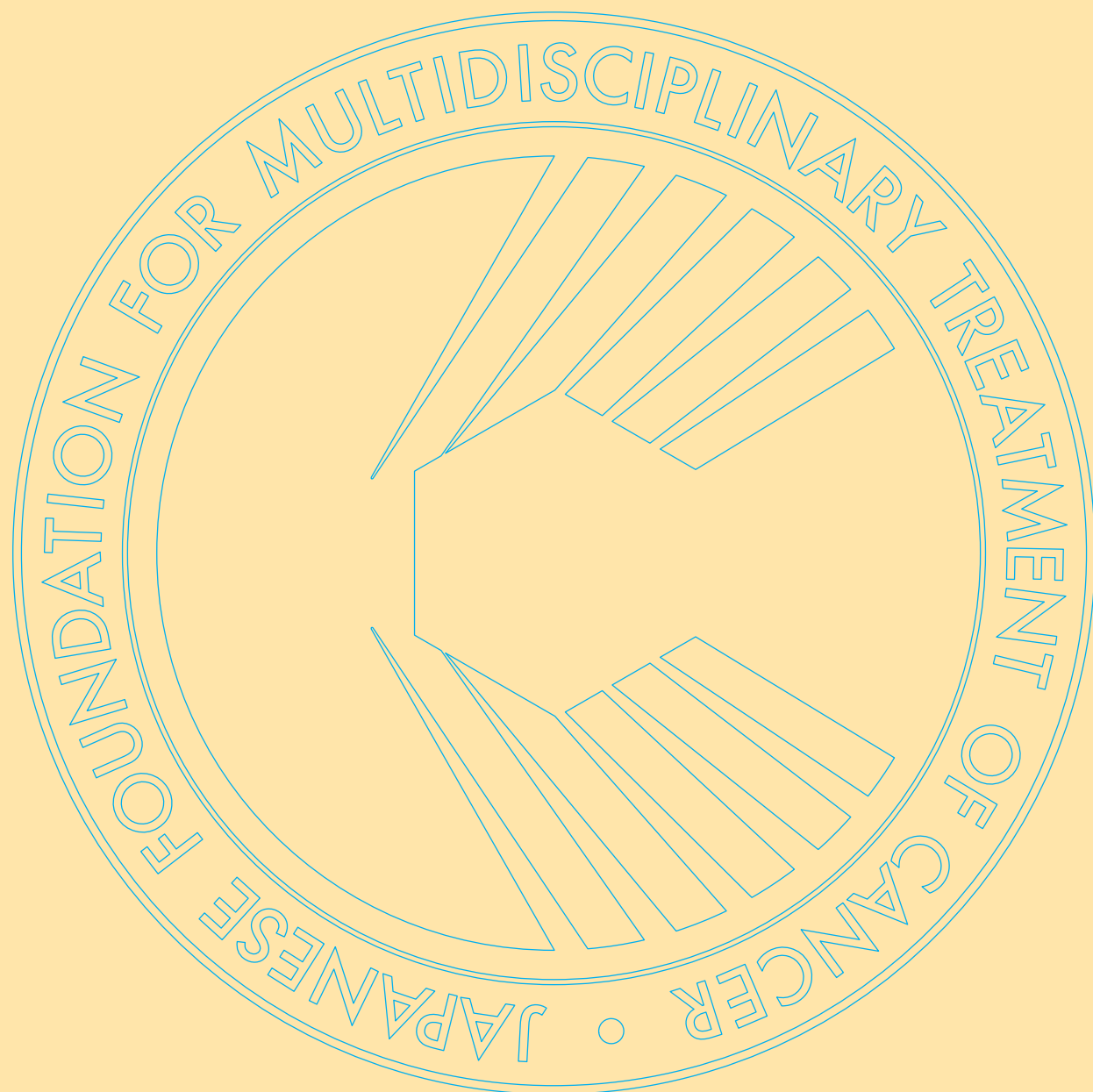


Advances in Cancer Treatment

がん治療のあゆみ

2023/第43回一般研究助成



43

公益財団法人 がん集学的治療研究財団

巻 頭 言

理事長 山 岸 久 一

公益財団法人がん集学的治療研究財団（以下財団）は、一般財団法人として1980年（昭和55年）に井口 潔 九州大学名誉教授を理事長として設立され、2013年（平成25年）に佐治重豊 岐阜大学名誉教授が理事長の時に公益財団法人となって以来、公益に資することを第一に活動を行ってまいりました。

研究助成は設立当初から継続して行っている事業であり、今年で44年になりますが、研究事業526件に対しまして総額6億7,600万円の助成をしてまいりました。助成対象は、臨床応用が可能となり得る「がんの集学的治療」に関する研究であり、一般研究選考委員会（現選考委員長 掛地吉弘 神戸大学大学院医学研究科 教授）において、公平・厳正に評価を行っております。選考委員会の先生方には、毎年度、公募一題一題について深い議論の上評価頂いており、敬意を表すとともに感謝申し上げる次第であります。

本日お届けしました「がん治療のあゆみ第43巻」は、2022年度受賞者の研究成果報告であります。応募件数63件（がん薬物療法部門49件、医療機器部門14件）の中から選抜された研究であります。がん薬物療法部門として1)免疫チェックポイント阻害剤投与における1型糖尿病発症メカニズムの検討、2)慢性骨髄性白血病における無治療寛解維持達成の予測因子の探索、3)肺癌微小環境におけるIL-36 Familyの役割の検討、4)肝細胞癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の感受性に関わるバイオマーカーの探索の4演題、医療機器部門として1)インドシアニングリーンによる脳脊髄腫瘍に対する術中蛍光診断法改良の検討、2)青色LEDの腫瘍関連マクロファージおよび大腸癌細胞に対する効果の検討の2演題が掲載されております。それぞれに非常に興味深い成果が得られていますので、ご高覧頂き、ご批判賜れば、幸甚に存じます。

結びに、理事・役員、選考過程でご尽力頂きました選考委員の先生方にもご参加賜りましたことに心より感謝申し上げます。また、優れた研究を推進する受賞者の方々、関係された多くの方々に深謝申し上げます。

今後とも当財団へのご支援・ご指導を賜ります様、何卒宜しくお願い申し上げます。

2024年3月31日

選 考 経 過 報 告

一般研究選考委員会

選考委員長 掛 地 吉 弘

選考経過をご報告申し上げます。

対象課題として臨床応用が可能となりうる「がんの集学的治療」に関する研究を募集し、本年度は63件の非常に多数の応募をいただきました。

応募内容は、がん薬物療法部門49件、医療機器部門14件でした。

応募締め切りは毎年8月31日で、その63件全ての応募書類のコピーを事務局で集計し、全ての選考委員に送付し、事前評価をしていただきました。その事前評価では、絶対評価のほかに評価が偏らないように相対的な評価を行って、採点をお願いしております。その選考結果を事務局で集計し、去る2022年10月25日に第47回の一般研究選考委員会を開催いたしました。選考委員が上位から一題ずつ議論を充分に行って、そして厳正に評価を行いました。非常に甲乙つけ難いようなレベルの高い申請が集まりました。この選考委員会の議事録は、公平性及び透明性を考慮し、経緯や理由については記録して保存しております。その結果、6件の応募課題を助成対象候補として理事会に上申し、承認いただきました。

諸般の事情から2023年「一般研究発表会」は開催が見送りとなりましたが、この「がん治療のあゆみ第43巻」にて先生方の成果報告をご報告させていただきます。

助成金を受領された先生方をお願いします。

研究論文を発表される際に、どんどん論文を書いて仕上げていただきたいのですが、「がん集学的治療研究財団助成金」の補助を得たという旨を明記していただくようお願いします。先生方の業績に加わるとともに、財団からのこの助成金のがんの治療研究に役立ち、社会に貢献しているものと推察しております。本財団は公益法人ですので、acknowledgementにその旨をしっかりと付記していただくことが、重要な意味を持っております。

最後になりましたが、助成された6名の先生方、これを機に、より一層研究に邁進されますようご期待申し上げます。

またこの素晴らしい先生方をご推薦いただきました施設代表者の先生方にも厚くお礼申し上げます。

がん治療のあゆみ 目次

巻頭言 理事長 山 岸 久 一

選考経過報告 一般研究選考委員会・選考委員長 掛 地 吉 弘

〔がん薬物療法部門〕

●がん免疫療法における内分泌腺およびネオアンチゲン交差提示機構の解明 稲 葉 秀 文 1
日赤和歌山医療センター
糖尿病内分泌内科

●慢性骨髄性白血病 (CML) の無治療寛解維持達成のためのCML幹細胞制御免疫機構の解明: HLA拘束性T細胞が規定するCML関連エピトープの同定及び細胞障害性T細胞の果たす役割の解明 嬉 野 博 志 10
広島大学原爆放射線医学研究所
共同研究講座

●Interleukin (IL)-36 Familyの肺癌微小環境における役割の解明 木 下 郁 彦 15
九州大学病院
呼吸器外科

●全身性炎症と癌免疫微小環境に着目した肝細胞癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の感受性に関わるバイオマーカーの探索 美 馬 浩 介 22
熊本大学病院
消化器癌先端治療開発学寄附講座

〔医療機器部門〕

●悪性神経膠腫に対するインドシアニングリーン (ICG) および近赤外線を用いた術中リアルタイム蛍光診断確立と治療法の開発 武 藤 淳 26
藤田医科大学医学部
脳神経外科

●大腸癌に対する、青色LED光を用いた新たな光治療法の開発 良 元 俊 昭 32
徳島大学
消化器・移植外科

がん免疫療法における内分泌腺および ネオアンチゲン交差提示機構の解明

稲葉 秀文*

要旨 【背景】免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) による免疫関連有害事象 (irAE) の中で内分泌irAEの頻度は3-5割程度と高率である。申請者はこれまで、下垂体irAEおよび甲状腺irAEのバイオマーカーを報告した。今回、ICIによる1型糖尿病 (ICI-T1DM) のメカニズムにつき検討した。

【方法】ICI-T1DM患者とコントロールに関して臨床経過およびHLAタイピング検査結果とHLA分子アミノ酸多型を検討した。さらに、ICI-T1DMのプロインスリン抗原とHLA分子に関して、in silicoおよびin vitro結合アッセイを行った。

【結果と考察】ICI-T1DM患者 (N=12) において、急激な血糖値増加とインスリン分泌枯渇を認め、免疫学的機序による膵β細胞の破壊が示唆されたが、半数以上に抗腫瘍効果を認めた。さらにHLA-DR4とHLA-DP5遺伝子頻度の増加と、HLA-DRB1, DQB1, およびDPB1遺伝子座にICI-T1DM感受性アミノ酸多型を認めた。また、in vitro結合アッセイにてHLA-DP5およびHLA-DP15に対してinsulin β鎖およびα鎖にepitope clusterを認め、内分泌抗原とがん抗原の共通の免疫機構が示唆された。

はじめに

免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) は画期的な癌治療薬であるが、治療効果不十分例がその7割を占めるため、効果的なICI治療の開発が喫緊の課題である。

また、ICI治療の際には、免疫関連有害事象 (irAE) が高率に起こり得る。内分泌腺 (下垂体、甲状腺、副甲状腺、膵臓、副腎等) の免疫関連有害事象 (irAE) の発症率は3-5割であるが、その発症機序やバイオマーカーは不明である。

申請者はまず、バセドウ病の抗原と疾患感受性HLA-DR3に関し、in silicoおよびin vitro抗原結合アッセイと、HLAトランスジェニックマウスやバセドウ病患者の検討にて甲状腺エピトープを同定¹⁾⁻³⁾、新規免疫寛容誘導甲状腺ペプチドを発見し⁴⁾⁵⁾、甲状腺抗原とHLA-DR3の結合モチーフを解明した。その手法を応用し、内分泌irAEの基礎および臨床研究を行ってきた。

申請者はこれまで、甲状腺irAE⁶⁾⁻⁸⁾および下垂体irAE⁹⁾についての研究を行った。甲状腺irAEにおいては、ICIによる治療効果と甲状腺irAEの発症率が相関することや、甲状腺irAEにおける疾患感受性HLAと、甲状腺自己抗体およびサイトカイン動態を解明し、甲状腺irAEの疾患感受性HLA-DP2を発見した。一方、下垂体irAEに関しては、下垂体irAEの疾患感受性HLA-DP9を同定し、特発性ACTH単独欠損症と抗PD-1抗体によるACTH単独欠損症の臨経過の相違と危険因子としてのHLAを報告した。

さらに、本研究においては、膵臓irAEとしての、ICIによる1型糖尿病 (ICI-T1DM) の臨床および基礎的検討を行った¹⁰⁾。ICI-T1DMは致死的な場合があり、そのバイオマーカーの探索が急務となっている。なお、日本人1型糖尿病のリスク因子としてHLA-DRB1*04:05 (HLA-DR4) 等が報告されているが、ICI-T1DMのリスク因子は明らかではない。よって、がん抗原と内分泌腺抗原の共通免疫機構であるHLAに着目して、今回はICI-T1DMのリスク因子につき検討した。

*日赤和歌山医療センター 糖尿病内分泌内科

申請者は、ICI治療においてがん抗原および内分泌腺抗原がHLA分子表面上に提示され、両抗原をT細胞が認識する結果、がん細胞が治療されるとともに、内分泌腺irAEが発症すると考えている。本研究の目的は、HLA分子における内分泌腺抗原およびがん抗原に共通する交差性提示機構を明らかにし、内分泌腺irAEの発症予測、早期診断につなげ、ICIによるがん免疫療法の最適化を行うことである。

対 象

本研究は、罹患率が0.8%とごく少数である疾患のため、多施設共同前向き研究として各施設の倫理委員会の承認を得て実施された。

方 法

悪性腫瘍に対してICI治療を受けた全例にインフォームドコンセントを行い、ICI-T1DM患者とICI-T1DM非発症コントロール患者に分類した。つぎに、

- I. 臨床背景、臨床経過（血糖値、HbA1c、血算、生化学検査、血液ガス分析等）を検討した。
- II. ICI-T1DMの疾患感受性HLAおよびアミノ酸多型解析のため、11座のHLAタイピングを行い、その結果とHLA分子のアミノ酸配列・多型に関して、日本人データベースと合わせて比較検討した。
- III. ICI-T1DMの抗原検索のため、プロインスリン抗原とHLA分子に関して、in silicoおよびin vitro結合アッセイを行った。
 - III-1. コンピューターアルゴリズム（Net-MHC/SYFPEITHI）を用い、ICI-T1DMの危険因子であるHLA-DP5分子およびICI-T1DMに関する中立的コントロールであるHLA-DP15分子に対し、プロインスリン抗原との結合予測を行った。
 - III-2. 英国プロイムン社との共同研究によって、我々の実績¹⁾⁻³⁾を参考にして精製されたHLA-DP5およびHLA-DP15分子と、上述のプロインスリン抗原ペプチドとin vitro結合アッセイを行い、高結合（REVEAL SCORE）順にエピトープを同定した。

結果および考按・考察

ICI-T1DM患者（N=12：男性9名、女性3名）において、日・週単位の速い速度で急激に血糖値が増加していた（図1）。ICI-T1DM発症時の随時血糖は1名が278mg/dL、他全員が400mg/dL以上であり、

患者	年齢	性別	癌種	ICI種別	ICI-T1DM発症時期(週)	他のirAE	既往歴	DM家族歴	DM既往歴	症状	発症時HbA1c (%)	発症時随時血糖 (mg/dl)	糖尿病ケトアシドーシス
1	70	男性	NSCLC	P	9	発疹	高LDL血症	なし	なし	口渇	6	564	あり
2	80	男性	NSCLC	P	37	間質性肺炎 GI	高血圧症	なし	なし	口渇、倦怠感	7.3	420	あり
3	79	男性	NSCLC	P	12	なし	橋本病	なし	なし	口渇、倦怠感 食思不振	5.3	404	あり
4	71	男性	NSCLC	P	31	なし	高血圧症	なし	T2DM	口渇、倦怠感 体重減少	8.7	491	あり
5	72	男性	SCLC	D	6	なし	なし	なし	なし	口渇	6.5	502	あり
6	80	女性	MM	N/Ipi	N 60週、 Ipi 3週	なし	高血圧症	なし	なし	口渇、倦怠感	7.7	639	あり
7	78	男性	MM	N	29	なし	高血圧症	なし	なし	口渇、倦怠感	8.5	940	あり
8	70	女性	RCC	P	40	甲状腺炎	高血圧症	なし	T2DM	口渇、倦怠感	10.6	616	あり
9	75	男性	NSCLC	P	29	なし	心房細動	なし	T2DM	口渇、倦怠感	7.6	684	あり
10	71	女性	MM	N	21	なし	高血圧症	なし	なし	口渇	6.3	489	あり
11	66	男性	NSCLC	N	77	なし	高血圧症	なし	なし	口渇	6.9	1041	あり
12	55	男性	NSCLC	N	121	なし	なし	なし	T2DM	夜間頻尿	9.4	278	あり

MM, 悪性黒色腫; NSCLC, 非小細胞肺癌; SCLC, 小細胞肺癌; RCC, 腎細胞癌; P, pembrolizumab; N, nivolumab; Ipi, ipilimumab; D, durvalumab; HbA1c (正常値: 4.6-6.2 %); 血糖値 (73-109 mg/dl);

図1 ICI-T1DM患者の入院時検査結果

HbA1cは9名が8.7%未満であった。全員が糖尿病性ケトアシドーシスを呈し、インスリン分泌枯渇のため強化インスリン療法が導入となった。すなわち、膵β細胞の破壊が示唆された。

ICI-T1DMの発症時にはインスリンやCペプチド分泌を認めた例もあったが、糖尿病発症1か月後には全例がCペプチドは測定感度以下になりインスリン分泌が枯渇した(図2)。自己抗体に関しては、抗GAD抗体は全例で陰性で、一例で抗インスリン抗体が陽性であった。抗腫瘍効果は8名がPRあるいはCRの抗腫瘍効果を認めて、4名がPDであった。4名においてICI治療が中止された。

患者	年齢	性別	発症時HbA1c (%)	発症時随時血糖 (mg/dl)	発症時インスリン (μU/ml)	発症時Cペプチド (ng/ml)	発症1か月後空腹時Cペプチド (ng/ml)	GAD抗体/インスリン抗体	糖尿病既往歴	抗腫瘍効果	ICI継続
1	70	男性	6	564	0.8	0.17	<0.02	陰性/陰性	なし	PR	継続
2	80	男性	7.3	420	未検	<0.02	<0.02	陰性/陰性	なし	PR	継続
3	79	男性	5.3	404	7.7	2.31	<0.02	陰性/陰性	なし	PR	中止
4	71	男性	8.7	491	0.7	1.33	<0.02	陰性/陰性	2型糖尿病	PR	継続
5	72	男性	6.5	502	<0.4	<0.02	<0.02	陰性/陰性	なし	PR	継続
6	80	女性	7.7	639	未検	0.01	<0.01	陰性/陽性	なし	CR	継続
7	78	男性	8.5	940	2.5	0.16	<0.01	陰性/陰性	なし	CR	継続
8	70	女性	10.6	616	4.1	1.59	<0.01	陰性/陰性	2型糖尿病	PR	中止
9	75	男性	7.6	684	未検	<0.01	<0.01	陰性/陰性	2型糖尿病	PD	中止
10	71	女性	6.3	489	2.2	1.22	<0.01	陰性/陰性	なし	PD	継続
11	66	男性	6.9	1041	1.2	1.35	<0.01	陰性/陰性	なし	PD	継続
12	55	男性	9.4	278	未検	<0.01	<0.01	陰性/陰性	2型糖尿病	PD	中止

図2 ICI-T1DM患者の自己抗体と臨床経過

続いて、ICI使用後にいずれのIRAEも発症しなかったコントロール患者：ICI-コントロールと定義(N=35)、および日本人一般人データベースとの比較を行った。HLA-class I, class IIの遺伝子11座においてFisherの正確検定を行ったところ、ICI-T1DM患者においてICI-コントロールや一般人コントロールと比較して、HLA-DRB1*04:05 (HLA-DR4) およびHLA-DPB1*05:01 (HLA-DP5) の遺伝子頻度が増加していた(表1-3)(図3)。なお、HLA-DRB1*04:05はHLA-DQB1*04:01と連鎖不均衡であった。

多変量ロジスティクス回帰解析の結果も同様に、ICI-コントロールに比して、ICI-T1DM患者においてHLA-DR4およびHLA-DP5の遺伝子頻度が有意に増加していた(それぞれP=0.023, P=0.016)(図3)。

HLA遺伝子11座の頻度解析

HLA allele	ICI-T1DM	ICI-コントロール	一般人コントロール	ICI-T1DM vs 一般人コントロール		ICI-T1DM vs ICI-コントロール	
	頻度	頻度	頻度	P	オッズ比	P	オッズ比
DRB1*04:05	33.3%	7.1%	13.4%	0.03	3.34	0.003	6.50
DPB1*05:01	70.8%	34.3%	38.4%	0.005	3.96	0.004	4.66

ICI-T1DM患者においてHLA-DRB1*04:05およびDPB1*05:01の遺伝子頻度が増加(2×2表 Fisher's exact test)。

多変量ロジスティクス回帰解析

HLA allele	Predicted score	Standard error	P	オッズ比	95%CI
DRB1*04:05	0.755	0.333	0.023	4.53	1.22-16.70
DPB1*05:01	0.647	0.268	0.016	3.65	1.27-10.44

多変量解析においてもHLA-DRB1*04:05およびDPB1*05:01の遺伝子頻度が有意に増加。

なお、HLA-DRB1*04:05はHLA-DQB1*04:01と連鎖不均衡であった。95%CI: 95% 信頼区間

図3 HLA遺伝子11座の頻度解析, 多変量ロジスティクス回帰解析

表 1 ICI-T1DM患者およびコントロールにおけるHLA-DRB1 遺伝子のアレル頻度

allele	ICI-T1DM (N=24)		ICI-Controls (N=70)		^{††} Controls (N=618644) F (%)	ICI-T1DM vs general controls			ICI-T1DM vs ICI-controls		
	n	F (%)	n	F (%)		[‡] P	OR	95% CI	[‡] P	OR	95% CI
DRB1*01:01	0	0.0	5	7.1	5.65	NS			NS		
DRB1*04:01	0	0.0	0	0.0	1.03	NS			NS		
DRB1*04:03	0	0.0	5	7.1	3.13	NS			NS		
DRB1*04:05	8	33.3	5	7.1	13.41	0.03	3.34	1.26-9.20	0.003	6.50	1.95-21.60
DRB1*04:06	1	4.2	3	4.3	3.28	NS			NS		
DRB1*04:10	0	0.0	2	2.9	2.12	NS			NS		
DRB1*08:02	1	4.2	4	5.7	4.29	NS			NS		
DRB1*08:03	3	12.5	5	7.1	7.93	NS			NS		
DRB1*09:01	4	16.7	8	11.4	14.6	NS			NS		
DRB1*10:01	0	0.0	1	1.4	0.48	NS			NS		
DRB1*11:01	2	8.3	2	2.9	2.49	NS			NS		
DRB1*11:06	0	0.0	1	1.4	0.002	NS			NS		
DRB1*12:01	1	4.2	3	4.3	3.68	NS			NS		
DRB1*12:02	0	0.0	2	2.9	1.69	NS			NS		
DRB1*13:02	1	4.2	6	8.6	6.34	NS			NS		
DRB1*14:03	1	4.2	1	1.4	1.63	NS			NS		
DRB1*14:05	0	0.0	2	2.9	2.14	NS			NS		
DRB1*14:06	0	0.0	0	0.0	1.54	NS			NS		
DRB1*14:54	1	4.2	0	0.0	3.49	NS			NS		
DRB1*15:01	0	0.0	8	11.4	7.88	NS			NS		
DRB1*15:02	1	4.2	6	8.6	10.27	NS			NS		
DRB1*16:02	0	0.0	1	1.4	0.82	NS			NS		
Others	0	0.0	0	0.0	2.11	NS			NS		
total	24	100.00	70	100.00	100.00						

注釈: F, アレル頻度; OR, オッズ比; NS, 有意差なし 95%CI: 95% 信頼区間

表 2 ICI-T1DM患者およびコントロールにおけるHLA-DQB1 遺伝子のアレル頻度

allele	ICI-T1DM (N=24)		ICI-Controls (N=70)		^{††} Controls (N=1483) F (%)	ICI-T1DM vs general controls			ICI-T1DM vs ICI-controls		
	n	F (%)	n	F (%)		[‡] P	OR	95% CI	[‡] P	OR	95% CI
DQB1*03:01	4	16.7	6	8.6	11.43	NS			NS		
DQB1*03:02	2	8.3	10	14.3	9.59	NS			NS		
DQB1*03:03	4	16.7	11	15.7	15.54	NS			NS		
DQB1*04:01	8	33.3	5	7.1	12.9	0.03	3.34	1.26-9.20	0.003	6.50	1.95-21.60
DQB1*04:02	0	0.0	4	5.7	4.21	NS			NS		
DQB1*05:01	0	0.0	5	7.1	6.58	NS			NS		
DQB1*05:02	0	0.0	1	1.4	2.64	NS			NS		
DQB1*05:03	1	4.2	3	4.3	3.94	NS			NS		
DQB1*06:01	4	16.7	11	15.7	19.08	NS			NS		
DQB1*06:02	0	0.0	8	11.4	7.15	NS			NS		
DQB1*06:04	1	4.2	6	8.6	5.18	NS			NS		
Others	0	0.0	0	0.0	1.76	NS			NS		
total	24	100.00	70	100.00	100.00						

注釈: F, アレル頻度; OR, オッズ比; NS, 有意差なし 95%CI: 95% 信頼区間

表 3 ICI-T1DM患者およびコントロールにおけるHLA-DPB1 遺伝子のアレル頻度

allele	ICI-T1DM (N=24)		ICI-Controls (N=70)		^{††} Controls (N=1483) F (%)	ICI-T1DM vs general controls			ICI-T1DM vs ICI-controls		
	n	F (%)	n	F (%)		[‡] p	OR	95% CI	[‡] p	OR	95% CI
DPB1*02:01	3	12.5	17	24.3	24.11	NS			NS		
DPB1*02:02	0	0.0	6	8.6	3.41	NS			NS		
DPB1*03:01	0	0.0	6	8.6	3.98	NS			NS		
DPB1*04:01	0	0.0	6	8.6	5.06	NS			NS		
DPB1*04:02	1	4.2	7	10.0	9.78	NS			NS		
DPB1*05:01	17	70.8	24	34.3	38.4	0.005	3.96	1.54-10.18	0.004	4.66	1.73-12.48
DPB1*09:01	1	4.2	2	2.9	9.95	NS			NS		
DPB1*13:01	0	0.0	1	1.4	1.96	NS			NS		
DPB1*14:01	1	4.2	1	1.4	1.48	NS			NS		
DPB1*19:01	1	4.2	0	0.0	0.74	NS			NS		
Others	0	0.0	0	0.0	1.13	NS			NS		
total	24	100.00	70	100.00	100.00						

注釈: F, アレル頻度; OR, オッズ比; NS, 有意差なし 95%CI: 95% 信頼区間

また、同様にHLA 遺伝子のアミノ酸配列につき検討したところ、ICI-T1DM患者においてDRB1 遺伝子座に4か所、DQB1 遺伝子座に12箇所、およびDPB1 遺伝子座に9か所のICI-T1DM感受性アミノ酸多型を認めた (P<0.05) (図4)。

アミノ酸多型に関しての多変量解析を行ったところ、HLA-DPB1 の遺伝子多型が最も影響が強い可能性が考えられた (表4)。以上の解析から、HLA-DR, HLA-DQ, およびHLA-DP 遺伝子のアミノ酸多型がICI-T1DMの発症に影響を及ぼすと考えられた。

HLA-allele	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	227	228	229
DPB1*02:01	R	A	T	P	E	N	Y	L	F	Q	G	R	Q	E	C	Y	A	F	N	G	T	Q	R	F	L	E	R	Y	I	Y	N	R	E	E	F	V	G	S	A
DPB1*02:02	R	A	T	P	E	N	Y	L	F	Q	G	R	Q	E	C	Y	A	F	N	G	T	Q	R	F	L	E	R	Y	I	Y	N	R	E	E	L	V	G	S	A
DPB1*03:01	R	A	T	P	E	N	Y	V	Y	Q	L	R	Q	E	C	Y	A	F	N	G	T	Q	R	F	L	E	R	Y	I	Y	N	R	E	E	F	V	G	S	A
DPB1*04:01	R	A	T	P	E	N	Y	L	F	Q	G	R	Q	E	C	Y	A	F	N	G	T	Q	R	F	L	E	R	Y	I	Y	N	R	E	E	F	A	G	S	A
DPB1*04:02	R	A	T	P	E	N	Y	L	F	Q	G	R	Q	E	C	Y	A	F	N	G	T	Q	R	F	L	E	R	Y	I	Y	N	R	E	E	F	V	G	S	A
DPB1*05:01	R	A	T	P	E	N	Y	L	F	Q	G	R	Q	E	C	Y	A	F	N	G	T	Q	R	F	L	E	R	Y	I	Y	N	R	E	E	L	V	G	S	A
DPB1*09:01	R	A	T	P	E	N	Y	V	H	Q	L	R	Q	E	C	Y	A	F	N	G	T	Q	R	F	L	E	R	Y	I	Y	N	R	E	E	F	V	G	S	A
DPB1*13:01	R	A	T	P	E	N	Y	V	Y	Q	L	R	Q	E	C	Y	A	F	N	G	T	Q	R	F	L	E	R	Y	I	Y	N	R	E	E	Y	A	G	S	A
DPB1*14:01	R	A	T	P	E	N	Y	V	H	Q	L	R	Q	E	C	Y	A	F	N	G	T	Q	R	F	L	E	R	Y	I	Y	N	R	E	E	F	V	G	S	A
DPB1*19:01	R	A	T	P	E	N	Y	L	F	Q	G	R	Q	E	C	Y	A	F	N	G	T	Q	R	F	L	E	R	Y	I	Y	N	R	E	E	F	V	G	S	A
DPB1*15:01	R	A	T	P	E	N	Y	V	Y	Q	L	R	Q	E	C	Y	A	F	N	G	T	Q	R	F	L	E	R	Y	I	Y	N	R	Q	E	F	A	G	S	A

K, Lysine; E, Glutamic acid; A, Alanine; S, Serine; V, Valine; G, Glycine; Y, Tyrosine; H, Histidine; Q, Glutamine; L, Leucine; R, Arginine; I, Isoleucine; F, Phenylalanine; D, Aspartic acid; M, Methionine; W, Tryptophan; P, Proline; T, Threonine; N, Asparagine; C, Cysteine

上記は、HLA-DPB1遺伝子を例にとって、アミノ酸35番目の多型を白抜きで示している。

HLA-DRB1遺伝子座にアミノ酸9, 57, 86, 96番目の4か所において(P<0.05),

HLA-DQB1遺伝子座にアミノ酸53, 56, 70, 84, 85, 89, 140, 181, 182, 203, 220, 221番目の12か所において(P<0.05),

また、DPB1遺伝子座にアミノ酸35, 55, 84, 85, 86, 87, 96, 170, 205番目の9か所において(P<0.05),

ICI-T1DMとICI-controlsに有意差を認めた。

図4 HLA-DRB1 およびDPB1 遺伝子 アミノ酸多型のロジスティクス回帰解析

表4 HLA-class II分子のアミノ酸多型におけるステップワイズ法および重回帰解析

Amino acid position	HLA-chain	Amino acid	Compared amino acid	Predicted score	Test statistics by Wald method	P-value	Selection	Standard error	Odds ratio	95%CI
9	HLA-DRβ1	K and E	W	0	0.044	0.833				
9	HLA-DRβ1	K	E	0	0.070	0.965				
57	HLA-DRβ1	A and S	V and D	0	1.369	0.242				
57	HLA-DRβ1	A	S	0	2.479	0.290				
57	HLA-DRβ1	V	D	0	0.109	0.947				
86	HLA-DRβ1	G	V	0.556	2.499	0.114	Selected	0.352	3.039	0.765--12.061
96	HLA-DRβ1	Y and H	Q and E	0.924	2.919	0.088	Selected	0.541	2.519	0.873--7.269
96	HLA-DRβ1	Y	H	0	1.219	0.270				
96	HLA-DRβ1	Q	E	0	0.485	0.486				
53-84-85-89-140-181-182-220-221	HLA-DQβ1	L-Q-L-T-T-Q-N-H-H	Q-E-V-G-A-Q-S-R-Q	0	0.213	0.644				
56	HLA-DQβ1	L	P	0	0.415	0.519				
70	HLA-DQβ1	E	R and G	0	0.415	0.519				
70	HLA-DQβ1	R	G	0	0.002	0.999				
203	HLA-DQβ1	I	V	0	0.445	0.505				
35	HLA-DPβ1	L	F and Y	0	2.348	0.125				
35	HLA-DPβ1	F	Y	0	0.019	0.991				
55	HLA-DPβ1	E	D and A	0	1.440	0.230				
55	HLA-DPβ1	D	A	0	2.583	0.275				
84-85-86-87-96-170	HLA-DPβ1	D-E-A-V-K-I	G-G-P-M-R-T	0	0.709	0.400				
205	HLA-DPβ1	M	V	0.69	6.001	0.014*	Selected	0.282	3.976	1.318--11.998

注釈:

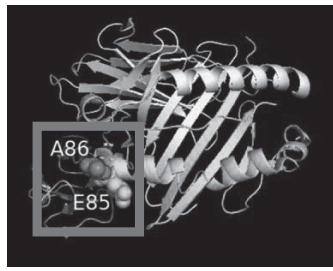
K, Lysine; E, Glutamic acid; A, Alanine; S, Serine; V, Valine; G, Glycine; Y, Tyrosine; H, Histidine; Q, Glutamine; L, Leucine; R, Arginine;

I, Isoleucine; F, Phenylalanine; D, Aspartic acid; M, Methionine; W, Tryptophan; P, Proline; T, Threonine; N, Asparagine; C, Cysteine

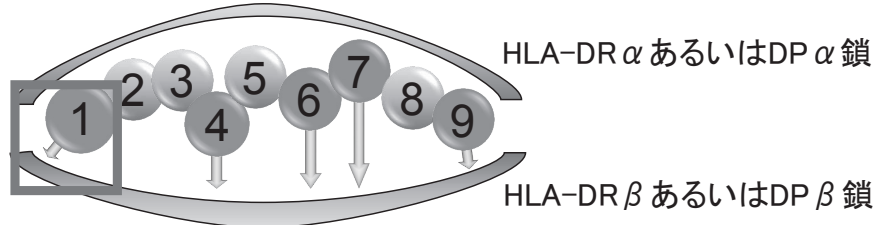
95%CI: 95% 信頼区間

HLA-DR, DQ, およびDP分子の結合溝は、9個のアミノ酸から成り立ち、その1, 4, 6, 7, 9番目のアミノ酸がHLA分子に強く結合する(図5)。このため、本研究においては、HLA遺伝子のアミノ酸多型がインスリン抗原等の提示に関与し、ICI-T1DM発症の際の自己免疫反応において重要な役割を有すると考えられた。

プロインスリンはインスリンの前駆体であり、N末端からシグナルペプチド、インスリンB鎖、Cペプチド、およびインスリンA鎖から構成される(図6)。その後、Cペプチドが切断されることで、A鎖とB鎖によるインスリン分子が生成される。今回我々は、抗インスリン抗体が陽転化した1名を確認し、既報からも同様の症例を複数認めたことから、膵β細胞から分泌されるインスリン分子を抗原と考えた。ゆえに、その前駆体であるプロインスリンをICIによる1型糖尿病の自己抗原と推測し、in silicoおよびin vitroにおけるHLA分子との結合アッセイを行った。本研究において精製された34種類のプロインスリンペプチドを(表5)に示した。



HLA-DP5
(HLA-DPA1*02:02,
HLA-DPB1*05:01)



HLA-DP5分子を例にとって、HLA-class II分子(HLA-DR, CQ, DP)のペプチド結合溝における9個のアミノ酸配列を示した。このうち、1, 4, 6, 7, 9番目はHLA分子に強く結合する。このため、HLA遺伝子のアミノ酸多型がインスリン抗原等の提示に関与し、ICI-T1DM発症の際の自己免疫反応において重要な役割を有すると考えられる。

図5 HLA-class II 結合溝とHLA分子

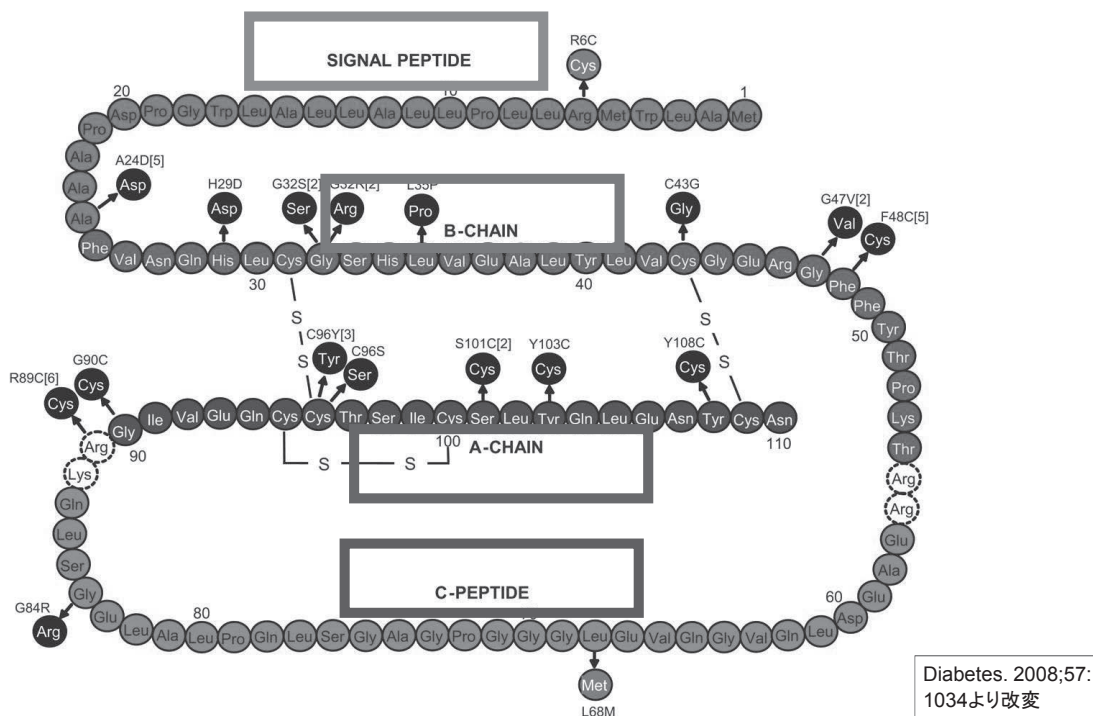
表5 ヒトプロインスリンペプチドとHLA-DP5およびHLA-DP15との結合アッセイ

ID	Position	Amino acid sequences of synthesized peptides	in silico結合予測 スコア(%RANK)		In vitro結合試験結 果(REVEAL score)		DP5
			DP15	DP5	DP15	DP5	
1	*1-15	M A L W M R L L P L L A L L A	22.17	76.22	16.1	6.1	
2	*7-21	L L P L L A L L A L W G P D P	73.14	92.69	0.4	0.4	
3	*13-27	L L A L W G P D P A A A F V N	44.91	62.68	0.1	0.2	
4	*19-33	P D P A A A F V N Q H L C G S	41.54	63.13	0	0	
5	*25-39	F V N Q H L C G S H L V E A L	82.17	87.5	0.3	0.2	
6	*29-43	H L C G S H L V E A L Y L V C	63.42	95	14.2	4.6	Cluster 1
7	*33-47	S H L V E A L Y L V C G E R G	33.96	80.96	9.1	3.6	
8	*37-51	E A L Y L V C G E R G F F Y T	67.91	75.54	17.3	8.9	
9	*42-56	V C G E R G F F Y T P K T R R	32.28	20.09	37.4	26.8	
10	*43-57	C G E R G F F Y T P K T R R E	10.81	4.24	17.2	9.5	
11	*44-58	G E R G F F Y T P K T R R E A	4.62	1.43	0.4	0.2	
12	*45-59	E R G F F Y T P K T R R E A E	3.37	0.71	0	0	
13	*46-60	R G F F Y T P K T R R E A E D	5.96	3.74	0	0	
14	*47-61	G F F Y T P K T R R E A E D L	16.23	15.52	0	0	
15	*48-62	F Y T P K T R R E A E D L Q	50.27	49.79	0	0	
16	*49-63	F Y T P K T R R E A E D L Q V	59.35	51.18	0	0	
17	*50-64	Y T P K T R R E A E D L Q V G	55.66	26.85	0	0	
18	*51-65	T P K T R R E A E D L Q V G Q	42.39	7.81	0	0.3	
19	*52-66	P K T R R E A E D L Q V G Q V	38.06	5.25	0	0.1	
20	*53-67	K T R R E A E D L Q V G Q V E	35.72	4.26	0	0	
21	*54-68	T R R E A E D L Q V G Q V E L	55.52	23.95	0	0	
22	*59-73	E D L Q V G Q V E L G G G P G	45.97	70.3	0	0	
23	*64-78	G Q V E L G G G P G A G S L Q	94.37	95	0	0	
24	*69-83	G G G P G A G S L Q P L A L E	77.82	84.31	0	0	
25	*74-88	A G S L Q P L A L E G S L Q K	36.67	29.36	0	0	
26	*75-89	G S L Q P L A L E G S L Q K R	35.2	10.52	0	0.1	
27	*76-90	S L Q P L A L E G S L Q K R G	24.48	5.07	0	0	
28	*77-91	L Q P L A L E G S L Q K R G I	26.62	5.24	0	0	
29	*78-92	Q P L A L E G S L Q K R G I V	43.33	9.38	0	0.1	
30	*79-93	P L A L E G S L Q K R G I V E	65.94	37.94	0	0	
31	*84-98	G S L Q K R G I V E Q C C T S	91.03	86.88	1.1	0.5	Cluster 2
32	*88-102	K R G I V E Q C C T S I C S L	94.91	91.7	16.3	9.9	
33	*92-106	V E Q C C T S I C S L Y Q L E	95	95	1.5	0.5	
34	*96-110	C T S I C S L Y Q L E N Y C N	95	94.28	10.1	2.6	

注釈:

HLA-DP5との結合予測におけるコアの9アミノ酸を太字で示した。

K, Lysine; E, Glutamic acid; A, Alanine; S, Serine; V, Valine; G, Glycine; Y, Tyrosine; H, Histidine; Q, Glutamine; L, Leucine; R, Arginine; I, Isoleucine; F, Phenylalanine; D, Aspartic acid; M, Methionine; W, Tryptophan; P, Proline; T, Threonine; N, Asparagine; C, Cysteine



Diabetes. 2008;57: 1034より改変

図6 プロインスリン分子の構造

今回の実験では、ICI-T1DMの危険因子として最も重要であると思われたHLA-DP5およびコントロールとしてHLA-DP15を用いて、in silicoでのプロインスリンとの結合予測およびin vitroでの結合アッセイを行ったところ、in vitro結合アッセイにてHLA-DP5およびHLA-DP15に対してinsulin β鎖（AA25-54）およびα鎖（AA90-110）にepitope clusterを認め（図7）、プロインスリンがICI-T1DMの抗原であることが示唆され、がん抗原との共通の免疫機構が示唆された。

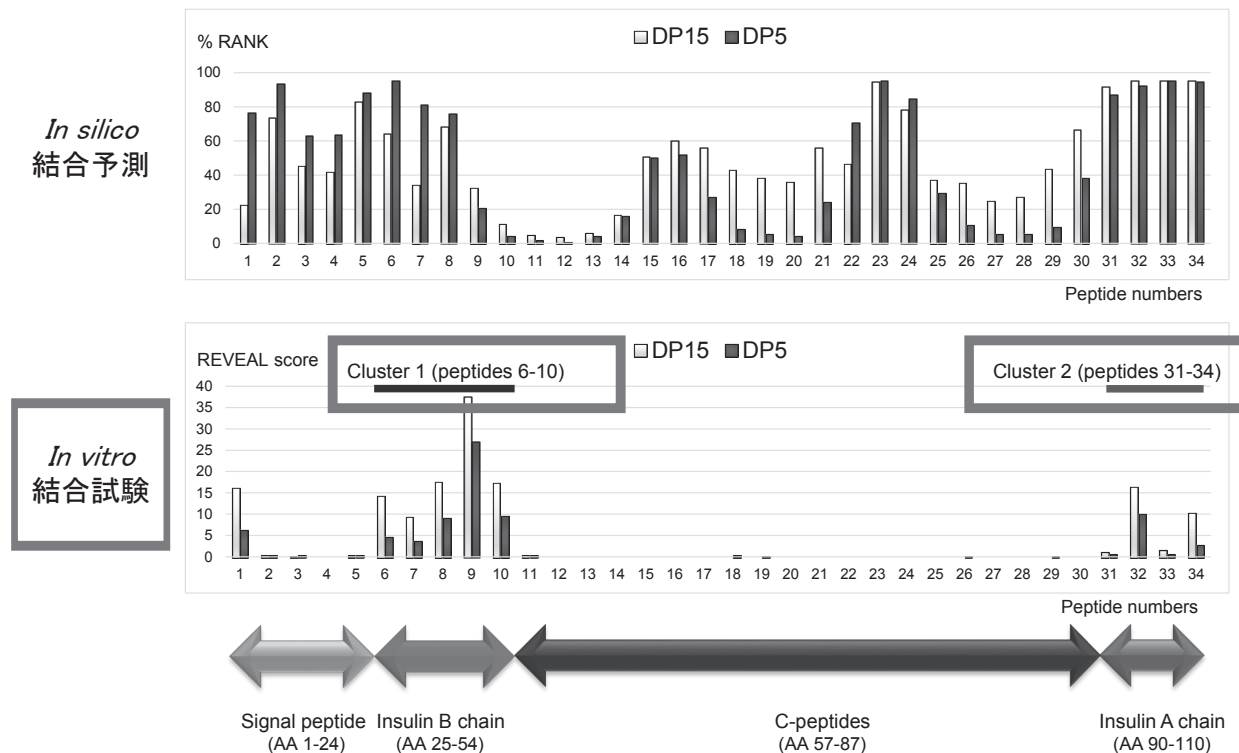


図7 プロインスリン抗原とHLA-DP分子との結合試験

本研究のまとめ

1. ICI-T1DM患者全員が短期間における急激な血糖悪化とインスリン分泌枯渇のため強化インスリン療法を導入された。
2. 患者 8/12 名=75%にICIの抗腫瘍効果を認めたことは、通常はICIの奏効率が20-30%であることから、ICI-T1DMでは抗腫瘍免疫の活性化が示唆された。
3. ICI-T1DM患者においてHLA-DR4 およびHLA-DP5 の遺伝子頻度が有意に増加し、さらに、HLA-DR, HLA-DQ, およびHLA-DP 遺伝子座アミノ酸多型がICI-T1DMの発症に影響する可能性が考えられた。
4. また、HLA-DP5 との結合試験においてinsulin β および α 鎖にepitope clusterを認めた。

おわりに

申請者は、がん抗原と内分泌腺抗原の共通免疫機構であるHLAを標的とする臨床および基礎研究を行ってきた。本研究の将来的な臨床応用として、内分泌腺/がん抗原の有効性の検討を考えている。すなわち、ICI使用患者に内分泌腺/がん抗原を用い、内分泌腺irAEの発症予測と早期治療を行なうとともに、ICI治療における新規バイオマーカーとして活用することを計画している。

謝 辞

本研究は、公益財団法人がん集学的治療研究財団 第43回一般研究助成によるご支援を頂き、実施することができました。心より御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Inaba H, Martin W, De Groot AS, et al: Thyrotropin receptor epitopes and their relation to histocompatibility leukocyte antigen-DR molecules in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab.* **91**: 2286-94, 2006.
- 2) Inaba H, Pan D, Shin YH, et al: Immune response of mice transgenic for human histocompatibility leukocyte Antigen-DR to human thyrotropin receptor-extracellular domain. *Thyroid.* **19**: 1271-80, 2009.
- 3) Inaba H, Martin W, Ardito M, et al: The role of glutamic or aspartic acid in position four of the epitope binding motif and TSH receptor-extracellular domain epitope selection in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab.* **95**: 2909-16, 2010.
- 4) Inaba H(責任著者), Moise L, Martin W, et al: Epitope recognition in HLA-DR3 transgenic mice immunized to TSH-R protein or peptides. *Endocrinology.* **154**: 2234-43, 2013.
- 5) Inaba H(責任著者), De Groot LJ, Akamizu T: Thyrotropin Receptor Epitope and Human Leukocyte Antigen in Graves'Disease. *Front Endocrinol* **23**: 7: 120-8, 2016.
- 6) Inaba H(責任著者), Ariyasu H, Iwakura H, Kurimoto C, et al: Distinct clinical features and prognosis between persistent and temporary thyroid dysfunctions by immune-checkpoint inhibitors. *Endocr J* **68**: 231-41, 2021.
- 7) Kurimoto C, Inaba H(責任著者), Ariyasu H, et al: Predictive and sensitive biomarkers for thyroid dysfunctions during treatment with immune-checkpoint inhibitors. *Cancer Sci* **111**: 1468-77, 2020.
- 8) Inaba H(責任著者), Ariyasu H, Takeshima K, et al: Comprehensive research on thyroid diseases associated with autoimmunity: autoimmune thyroid diseases, thyroid diseases during immune-

- checkpoint inhibitors therapy, and immunoglobulin-G4-associated thyroid diseases. *Endocr J* **66**: 843-52, 2019.
- 9) Inaba H(責任著者), Ariyasu H, Iwakura H, et al: Comparative analysis of human leucocyte antigen between idiopathic and anti-PD-1 antibody induced isolated adrenocorticotrophic hormone deficiency: A pilot study. *Clin Endocrinol (Oxf)* **91**: 786-92, 2019.
- 10) Inaba H(責任著者), Morita S, Kosugi D, et al: Amino acid polymorphisms in human histocompatibility leukocyte antigen class II and proinsulin epitope have impacts on type 1 diabetes mellitus induced by immune-checkpoint inhibitors. *Front Immunol.* **14**: 1165004. doi: 10.3389/fimmu.2023.1165004. 2023.

慢性骨髄性白血病 (CML) の無治療寛解維持達成のための CML 幹細胞制御免疫機構の解明：HLA 拘束性 T 細胞が 規定する CML 関連エピトープの同定及び 細胞障害性 T 細胞の果たす役割の解明

嬉野 博志*

要旨 慢性骨髄性白血病 (CML) において無治療寛解維持を達成することが治療目標の一つとなってきた。これを達成するために有効に機能する CML 特異的免疫機構を解明することが本研究の要旨である。

はじめに

慢性骨髄性白血病 (CML) は BCR-ABL による異常なチロシンキナーゼ活性による血液悪性腫瘍である。ABL チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) の登場により著明にその予後は改善し、現在ではほぼ健常人に近い長期予後が得られるようになってきた。しかしながら長期的な TKI の投与に伴う晩期毒性や高額な医療費の問題がでてきた。このようなことから良好な寛解が得られた症例の中で、TKI 投与を中止できる可能性について検討がなされ、良好な寛解を得た約半数の症例で無治療寛解維持 (TFR) が得られることが分かってきた¹⁾⁻³⁾。一方でその成功予測因子というもののはっきりしたものが分かってない。

以前より CML には同種造血幹細胞移植やインターフェロン治療が奏功するように CML の制御に免疫学的な関与が重要とされていた。その中でも特に NK 細胞免疫が重要とされる。我々は NK 細胞活性の制御分子である Killer immunoglobulin-like receptor (KIR) の遺伝子多型と CML の TKI 治療効果に相関性があることを以前報告した⁴⁾。また KIR のリガンドである Human leukocyte antigen (HLA) も多数遺伝子多型を有しその多型が TFR へ及ぼす意義についても報告した⁵⁾。特に HLA 拘束性 T 細胞において重要とされる HLA-A*24:02 などのいくつかの HLA を持つことが重要とこの報告で分かったため、HLA 拘束性 T 細胞が TFR における免疫調整を担っていると我々は仮説を立てた。

T 細胞、B 細胞はそれぞれの受容体 (TCR/BCR) の多様性によりその機能的多様性を獲得している。次世代シーケンサーを用いた TCR/BCR の解析はそれぞれの多様性と優位クローンの同定について同時に解析が可能である。また HLA と TCR/BCR を組み合わせた解析を行うことで抗原提示された分子 (エピトープ) を推定できる可能性がある。CML 特異的なエピトープが分かればそれを認識した T 細胞クローンを惹起する新たな治療戦略構築が可能と考える。

方 法

3 つのチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) stop study (DOMEST, DADI, First DADI) にエントリーされた CML 患者計 230 例中、同意の得られた 76 例から末梢血を採取し、KIR/HLA のタイピングを行い KIR/HLA の多型が CML の TFR に及ぼす影響について検討を行った。次に HLA-A*24:02 を有する患者にお

*広島大学 原爆放射線医科学研究所 共同研究講座

いてT細胞受容体/B細胞受容体（TCR/BCR）のレパトアについて解析を行いTFR達成症例と分子遺伝学的再発症例での各レパトアの多様性、有意クローンの違いを解析することとした。最後にTFR達成症例において共通かつ優勢に認められるTCRクローン及びそのエピトープを同定し、それらのエピトープ候補からELISPOTアッセイで、T細胞の応答性が高いものをCML関連エピトープとして同定する。

結 果

TKI治療期間が長い患者でより高率にTFRを達成する。

患者76例について患者背景についてTFR成功因子について単変量解析を行うと、長期間のTKI内服期間（55ヶ月以上）というものが予後因子として抽出された。これはこれまでの臨床試験で報告のある因子であり、本試験がこれまでの他の臨床試験と比較し偏りなどが無いことが示された（表1, 2）。

表1 患者背景

患者背景 (n=76)			
年齢	63	IQR (49-70)	
性別			
	男性	41	53.90%
	女性	35	46.10%
Sokal risk score			
	low	50	65.80%
	intermediate	18	23.70%
	high	6	7.90%
	missing	2	2.60%
IFN 治療歴			
	あり	9	11.80%
	なし	67	88.20%
臨床試験			
	DADI	15	19.70%
	DOMEST	28	36.80%
	First-line DADI	33	43.40%
中止前 TKIs			
	imatinib	28	36.80%
	dasatinib	48	63.20%

表2 TFR達成の患者背景因子

	Variable	HR	95% CI	P value
年齢	63歳以上	0.99	0.967-1.013	P=0.389
性別	男性	1.207	0.618-2.359	P=0.581
IFN 治療歴	あり	0.406	0.097-1.691	P=0.215
DMR 期間	28ヶ月以上	0.984	0.507-1.910	P=0.962
TKI 期間	55ヶ月以上	0.476	0.239-0.947	P=0.034
中止 TKI	Imatinib	0.812	0.403-1.633	P=0.559

KIR3DL1 と強い相互作用のある HLA-Bw4 は分子遺伝学的再発のハイリスクである

KIR3DL1 は多様なアレル多型を持ち、またそのリガンドである HLA-Bw4 についても 80 番目のアミノ酸の違いにより HLA-Bw4-80Ile/HLA-Bw4-80Thr と遺伝子多型を持つ。その組み合わせにより遺伝的に NK 細胞の活性の違いがあり、急性骨髄性白血病⁶⁾ や HIV 感染患者⁷⁾ の予後に影響を与えるとされる。まず HLA-Bw の多型による TFR について解析を行うと KIR3DL1 のリガントとならない HLA-Bw6 で TFR が高い傾向にあり、一方で HLA-Bw4-80Thr で再発のリスクが高い傾向にあった。興味深いことに

HLA-Bw4-80Ileをエピトープとして持つのはHLA-B座のみならずHLA-A*24:02をはじめとしたHLA-A座にもあり、HLA-A座とHLA-B座で同じHLA-Bw4-80Ileとしてのエピトープとなるにも関わらず、その予後が異なる可能性が分かった。(図1A) このため我々はKIR3DL1とHLA-Bwの組み合わせを①Non-interaction group; KIR3DL1を有さない/HLA-Bw6 ②Weak interaction group; KIR3DL1/HLA-Bw4-80I (HLA-A座) ③Strong interaction group; KIR3DL1/HLA-Bw4 (HLA-B座) と3群に分けたところStrong interaction groupで有意に再発リスクの高いことが分かった(図1B)。これについては多変量解析においてもHR 2.206 (1.112-4.376; p=0.024) と有意な因子であった。

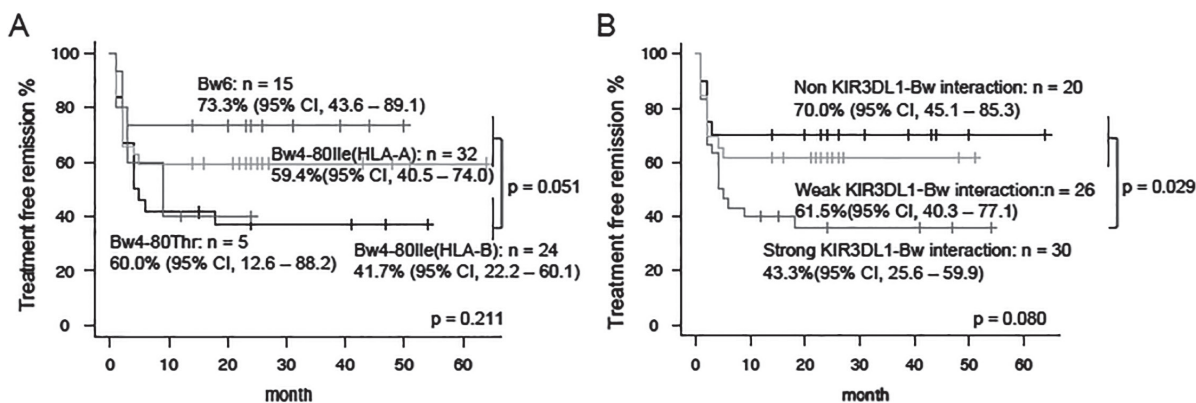


図1 HLA-Bw別のTFR (A), KIR3DL1/HLA-Bwの相互作用別のTFR (B)

再発のハイリスクであるStrong interaction groupではTKI中止前のNK細胞分画が少ない

各患者のTKI中止前のNK細胞分画 (CD3/CD56, CD16/56) やT細胞分画 (CD3/8) とKIR3DL1/HLA-Bw多型について解析を行うと、先ほどの分子遺伝学的再発のハイリスクであるStrong interaction groupではNK細胞分画が他のNon, weak interaction groupと比較し有意に少ないことが分かった。(表3) このことからKIR3DL1/HLA-Bw多型の解析はNK細胞活性を反映し、CML患者におけるTFRを予測することができることが分かった。

表3 KIR3DL1/HLA-Bw別T/NK細胞分画

Median (IQR)	Non or Weak interaction	Strong interaction	p-value
CD3+/CD8+ (/mL)	444.08 (335.05-898.14)	389.03 (251.80-637.37)	0.227
CD3-/CD56+ (/mL)	679.93 (484.87-1755.35)	494.04 (332.24-680.76)	0.048
CD3+/CD57+ (/mL)	378.18 (216.79-723.29)	267.56 (70.54-406.70)	0.142
CD16+/CD56+ (/mL)	629.17 (495.55-1645.73)	499.63 (324.16-673.62)	0.049
CD56+/CD57+ (/mL)	615.71 (437.74-1486.91)	384.03 (276.53-618.24)	0.052

おわりに

TCR/BCR レパトアの血液腫瘍における治療効果との関連

予後良好とされるKIR3DL1/HLA-Bw Weak interaction groupにはHLA-A*24:02を持つ患者が含まれ、先に報告していた論文と矛盾ないものであり、HLA-A*24:02を持つ患者についてHLA拘束性T細胞の存在について解析を進めることとしたが、現在解析途中であり、十分なデータが出せない。先に同様の解析を進めた多発性骨髄腫患者における免疫調整剤 (レナリドミド) 使用におけるTCR/BCR解析の結果を以下にお示しする。多発性骨髄腫患者2症例について解析を行ったが、レナリドミドによる治療が奏功するとBCRレパトアの多様性の回復を認める (Indexの上昇; 図2A)。一方その際にTCRレパトアの多

様性は減少 (Indexの低下; 図2B, C) することが分かった。これはTCRにおけるクローン性の増強を示唆し、がんエピトープを認識した特異的T細胞の増加を示唆するものと考えられた。CMLにおいても現在、解析中である。

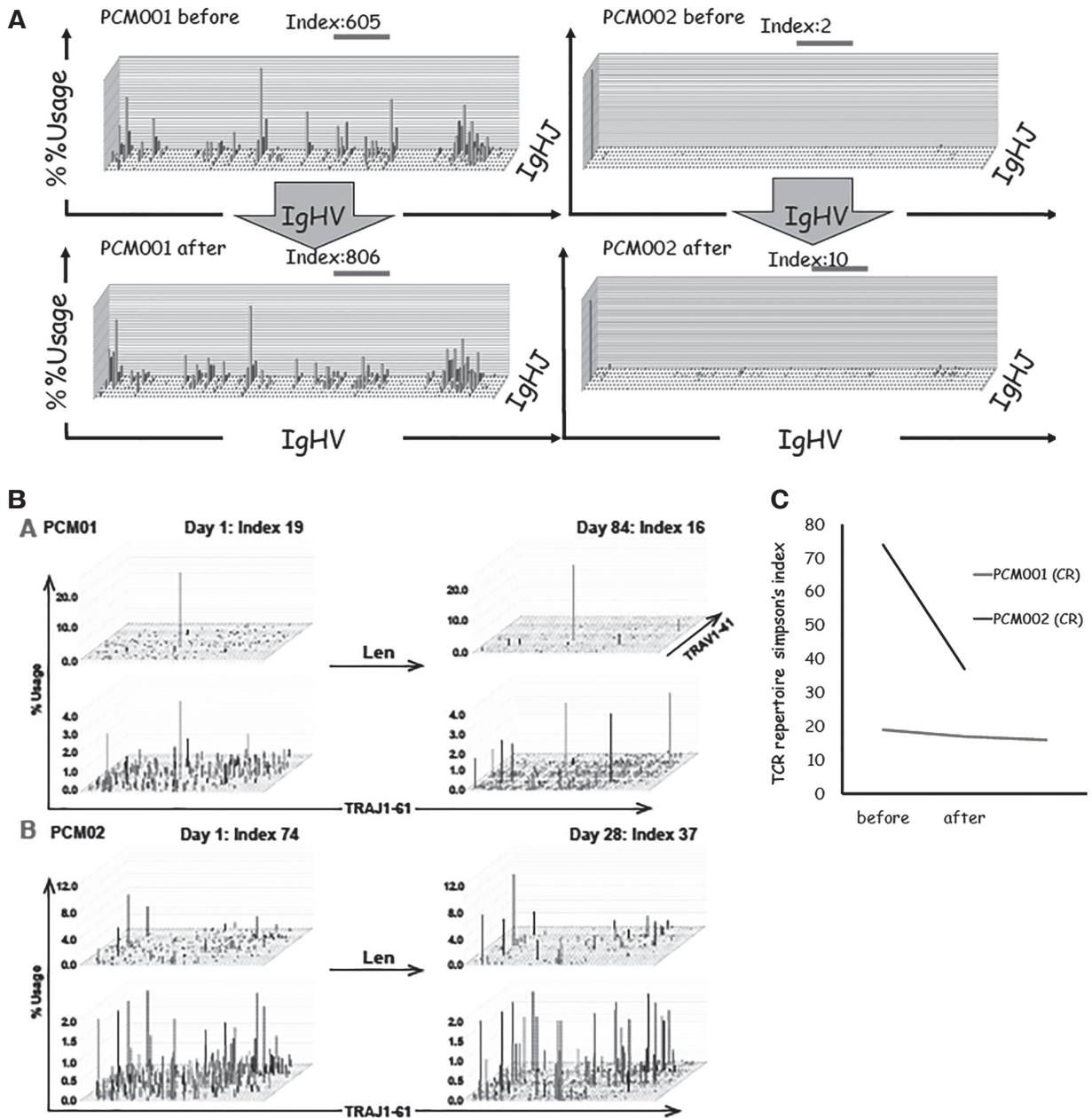


図2 多発性骨髄腫患者におけるBCRレパトアの前・後での変化

最後に

CML患者において高率にTFR達成する症例を予測し安全にTFR達成すること、分子遺伝学的再発のハイリスク患者においては何らかのTKIに加えた追加治療を行うことでTFRを達成するための治療工夫を行い、より多くの患者さんをTFRに導きたい。DNAメチル化阻害剤を加えた治療はCML幹細胞枯渇をすることを我々は報告しており、分子遺伝学的再発のハイリスク患者において効果が期待される⁸⁾。本研究結果は米国血液学会機関誌であるBLOOD neoplasiaにおいて受理された。(BLOOD neoplasia, in press)。

文 献

- 1) Mahon F-X, Réa D, Guilhot J, et al. Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet. Oncol.* **11**(11): 1029-35, 2010.
- 2) Kimura S, Imagawa J, Murai K, et al. Treatment-free remission after first-line dasatinib discontinuation in patients with chronic myeloid leukaemia (first-line DADI trial): a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet. Haematol.* **7**(3): e218-25, 2020.
- 3) Saussele S, Richter J, Guilhot J, et al. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. *Lancet Oncol.* **19**(6): 747-57, 2018.
- 4) Ureshino H, Shindo T, Kojima H, et al. Allelic Polymorphisms of KIR s and HLA s Predict Favorable Responses to Tyrosine Kinase Inhibitors in CML. *Cancer Immunol. Res.* **6**(6): 745-54, 2018.
- 5) Ureshino H, Shindo T, Tanaka H, Saji H, Kimura S. HLA polymorphisms are associated with treatment-free remission following discontinuation of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Mol. Cancer Ther.* **20**(1): 2021.
- 6) Boudreau JE, Giglio F, Gooley TA, et al. KIR3DL1/ HLA-B Subtypes Govern Acute Myelogenous Leukemia Relapse After Hematopoietic Cell Transplantation. *J. Clin. Oncol.* **35**(20): 2268-78, 2017.
- 7) Martin MP, Qi Y, Gao X, et al. Innate partnership of HLA-B and KIR3DL1 subtypes against HIV-1. *Nat. Genet.* **39**(6): 733-40, 2007.
- 8) Kamachi K, Ureshino H, Watanabe T, et al. Targeting DNMT1 by demethylating agent OR-2100 increases tyrosine kinase inhibitors-sensitivity and depletes leukemic stem cells in chronic myeloid leukemia. *Cancer Lett.* **526**(December 2021): 273-83, 2022.
- 9) Ureshino H, Ueda Y, Fujisawa S, et al. KIR3DL1-HLA-Bw status in CML is associated with achievement of TFR: the POKSTIC Trial, a Multicentre Observational Study. *BLOOD neoplasia.* 2024, in press.

Interleukin (IL)-36 Family の 肺癌微小環境における役割の解明

木下 郁彦*

要旨 炎症性サイトカインのInterleukin (IL)-36 Familyに属するIL-38に関して、我々はこれまでにIL-38が悪性腫瘍へのCD8陽性リンパ球浸潤を抑制することを報告した。一方で、IL-38と腫瘍関連好中球(TANs)や腫瘍随伴マクロファージ(TAMs)との関係は明らかではない。肺腺癌切除症例209例を対象に免疫組織化学染色にてIL-38発現とTANs, TAMsを評価した。また、動物実験ではIL-38強制発現肺癌細胞株を用いてマウス皮下腫瘍モデルを作成し、腫瘍内のTANs, TAMsを評価した。肺腺癌切除症例においてIL-38高発現は有意にTANs及びTAMs高浸潤と関連していた。動物実験においても、IL-38強制発現によってTANsとTAMsの浸潤が増加していた。IL-38によってTANs, TAMsの浸潤が誘導され、腫瘍形成に関わっている可能性が示された。

はじめに

Interleukin (IL)-36 FamilyはIL-36 Receptor (IL-36R)を介して、マクロファージ、T細胞、ケラチノサイト、上皮細胞などの幅広い免疫・非免疫細胞を活性化し、皮膚、肺、腎臓、肝臓、腸などの様々な炎症、発癌を制御することが知られている¹⁾。IL-36には、IL-36 α 、IL-36 β 、IL-36 γ の3つのサブフォームがある。また、2001年に新たに発見されたIL-38もIL-36 Familyに属する²⁾。

我々の過去の研究では、動物実験を用いてIL-38が腫瘍へのCD8陽性リンパ球浸潤を抑制することで、腫瘍の形成を促進することを報告した³⁾。また、肺腺癌切除検体を用いて腫瘍細胞のIL-38高発現が予後不良因子であることや、免疫チェックポイント分子であるProgramed cell death ligand 1 (PD-L1)の発現と相関することを報告した⁴⁾。

一方で、IL-36 Familyは好中球やマクロファージなどの自然免疫系の誘導や活性化に関与することが報告されているが^{5) 6)}、IL-38と好中球やマクロファージなどの自然免疫系との関係に関する報告はほとんどない。腫瘍関連好中球(TANs)や腫瘍随伴マクロファージ(TAMs)は抗腫瘍免疫応答を抑制し、腫瘍形成を促進することが知られており^{7) 8)}、本研究によってIL-38とTANsやTAMsの関連が明らかになれば、IL-38の治療応用への可能性をさらに探究できると考えられる。

対象と方法

臨床検体を用いた実験

2003年から2012年12月に九州大学病院 消化器・総合外科にて手術を行った肺腺癌209症例を対象とした。免疫組織化学染色によって腫瘍細胞のIL-38発現とTANs及びTAMsの評価を行った。

IL-38の免疫組織化学染色にはMouse Monoclonal抗IL-38抗体(0.5 μ g/ml, #H127C; 久留米大学星野先生よりご提供)を使用し、IL-38発現の評価は腫瘍細胞の細胞質と細胞膜に弱く染色した症例を低発現、中等度から強く染色した症例を高発現と判断した。TANs及びTAMsの免疫組織化学染色はそれぞれRabbit Polyclonal抗CD66b抗体(Abcam, ab197678)、Mouse Monoclonal抗CD163抗体(Leica, NCL-

* 国立病院機構九州がんセンター 呼吸器腫瘍科 九州大学病院 呼吸器外科

L-CD163) を用いて行った。TANs及びTAMsの評価は腫瘍内の部位の5カ所にて高倍率で陽性細胞をカウントし、中央値をカットオフとして高浸潤と低浸潤に分類を行った。

TANs低浸潤と高浸潤、TAMs低浸潤と高浸潤の症例で臨床病理学的因子及びIL-38発現との関連を解析した。

動物実験

ルイス肺癌細胞株(LLC; LL/2, RRCID: CVCL_4358)にIL-38プラスミド(NM_153077; Origene)をjetPRIME kit (Polyplus Transfection)を用いて導入した。コントロールとして、空のベクター(pCMV6-Entry Vector; Origene)も同様にLLC細胞へ導入した(LLC-vector細胞)。遺伝子導入から48時間後、遺伝子導入細胞をG418(500 μ g/ml)にてセレクションした。限界希釈法を用いて、遺伝子導入細胞からシングルセルクローンを分離した。セレクションを行った遺伝子導入細胞を各ウェルに1細胞となるように蒔き、単一細胞から形成されたクローン集団を培養し、回収した。2種類のクローンのIL-38強制発現LLC細胞株(LLC-IL38細胞)を作成した。

6週齢のC57BL/6Jマウス(CLEA Japan)に十分な麻酔の後、 5×10^6 個のLLC-IL38細胞またはLLC-vector細胞を100 μ lのPBSに希釈し、マウス背部の皮下へ投与した。皮下投与21日後に腫瘍を回収し、腫瘍組織の免疫組織化学染色によってTANsとTAMsの評価を行った。

TANs及びTAMsの免疫組織化学染色はそれぞれRabbit Monoclonal抗Ly6g抗体(Abcam, ab238132), Rabbit Monoclonal抗F4/80抗体(Abcam, ab111101)を用いて行った。TANs及びTAMsの評価は腫瘍内の部位の5カ所にて高倍率で陽性細胞をカウントし、平均値をカットオフとして高浸潤と低浸潤に分類を行った。

LLC-IL38由来腫瘍とLLC-vector由来腫瘍でのTANs及びTAMsの比較を行った。

結 果

臨床検体を用いた実験

CD66bの免疫組織化学染色の典型画像を図1に示す。CD66b陽性TANsの中央値は2.2個/視野であり、TANs高浸潤は106例、低浸潤は103例であった。CD66b陽性TANsと臨床病理学的因子、IL-38発現との関係を表1に示す。TANs高浸潤の症例では有意にpT2以上、pN1以上、pStage II以上、胸膜浸潤陽性、Micropapillary/Solid predominantの症例が多く、IL-38高発現の症例も多かった。

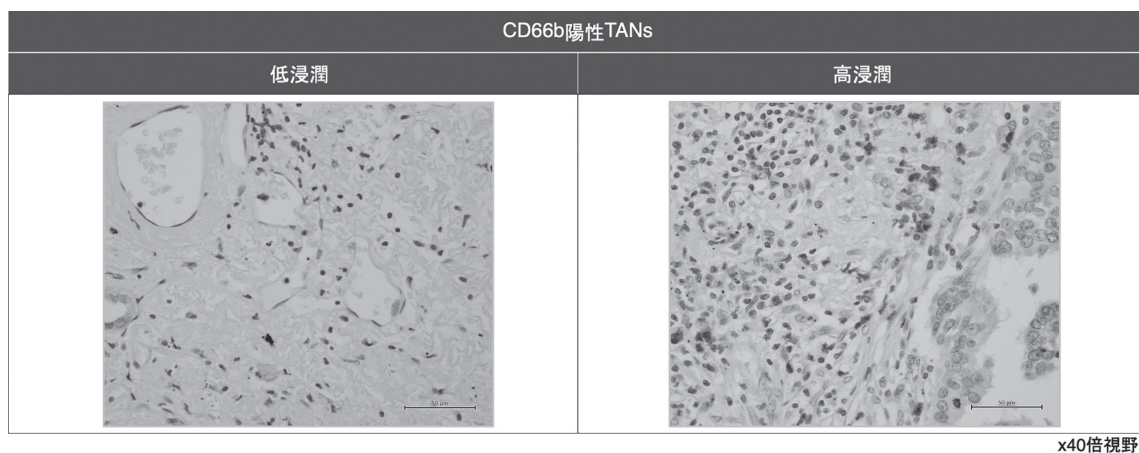


図1 肺腺癌切除検体におけるCD66b陽性TANsの免疫組織化学染色の典型画像

表1 CD66b陽性TANsと臨床病理学的因子、IL-38発現との関係

Characteristics	CD66b ⁺ TANs		p value	
	Low (n=103)	High (n=106)		
Age	<70	61 (59.20%)	55 (51.90%)	0.3304
	≥70	42 (40.80%)	51 (48.10%)	
Sex	Male	43 (41.70%)	53 (50.00%)	0.2674
	Female	60 (58.30%)	53 (50.00%)	
Smoking	Never smoker	55 (53.40%)	58 (54.70%)	0.89
	Smoker	48 (46.60%)	48 (45.30%)	
Pack Year Index	mean and range	16.5 (0-150)	23.9 (0-165)	0.0744
BMI	mean and ±SD	22.3 (±3.0)	22.6 (±3.0)	0.4817
pT	T1	75 (72.80%)	50 (47.20%)	0.0002
	≥T2	28 (27.20%)	56 (52.80%)	
pN	N0	99 (96.10%)	91 (85.90%)	0.0144
	≥N1	4 (3.90%)	15 (14.10%)	
pStage	I	94 (91.30%)	72 (67.90%)	<0.001
	≥II	9 (8.70%)	34 (32.10%)	
Pleural invasion	Negative	91 (88.40%)	76 (71.70%)	0.0032
	Positive	12 (11.60%)	30 (28.30%)	
Vascular invasion	Negative	80 (77.70%)	72 (67.90%)	0.1229
	Positive	23 (22.30%)	34 (32.10%)	
Lymphatic invasion	Negative	91 (88.40%)	91 (85.90%)	0.6816
	Positive	12 (11.60%)	15 (14.10%)	
Histological subtype	Micropapillary/Solid	1 (1.00%)	10 (9.40%)	0.0098
	Others	102 (99.00%)	96 (90.60%)	
EGFR mutation*	Wild type	25 (43.10%)	37 (57.80%)	0.1466
	Mutant	33 (56.90%)	27 (42.20%)	
IL-38 expression	Low	60 (58.30%)	32 (30.20%)	<0.001
	High	43 (41.70%)	74 (69.80%)	

CD163の免疫組織化学染色の典型画像を図2に示す。CD163陽性TAMsの中央値は14.6個/視野であり、TAMs高浸潤は104例、低浸潤は105例であった。CD163陽性TAMsと臨床病理学的因子、IL-38発現との関係を表2に示す。TAMs高浸潤の症例では有意に高齢者、pT2以上、pStage II以上、胸膜浸潤陽性、血管侵襲陽性、Micropapillary/Solid predominantの症例が多く、IL-38高発現の症例も多かった。

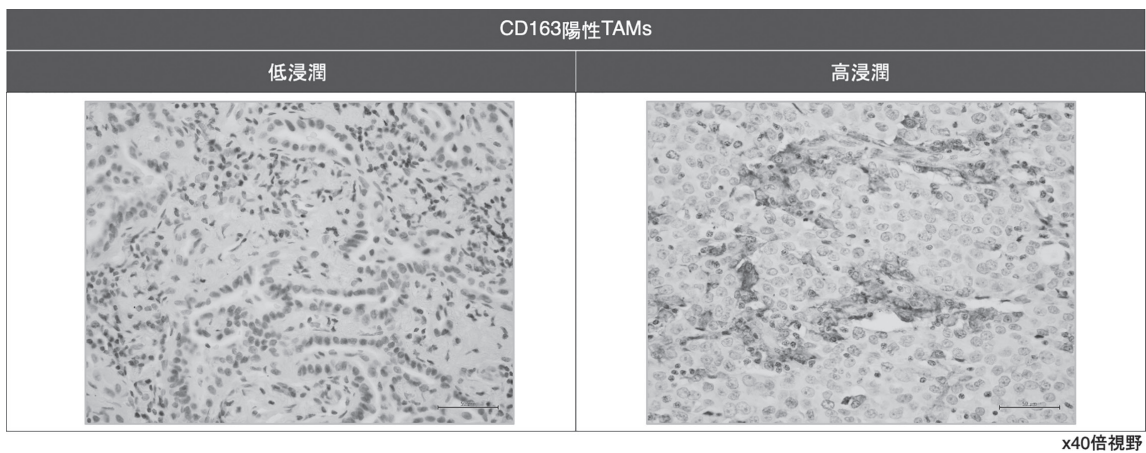


図2 肺腺癌切除検体におけるCD163陽性TAMsの免疫組織化学染色の典型画像

表 2 CD163 陽性 TAMs と臨床病理学的因子, IL-38 発現との関係

Characteristics	CD163 ⁺ TAMs		p value	
	Low (n=105)	High (n=104)		
Age	<70	66 (62.90%)	50 (48.10%)	0.0371
	≥ 70	39 (37.10%)	54 (51.90%)	
Sex	Male	48 (45.70%)	48 (46.10%)	1.0000
	Female	57 (54.30%)	56 (53.90%)	
Smoking	Never smoker	57 (54.30%)	56 (53.90%)	1.0000
	Smoker	48 (45.70%)	48 (46.10%)	
Pack Year Index	mean and range	17.3 (0-150)	23.3 (0-165)	0.1470
BMI	mean and ±SD	22.3 (±3.0)	22.6 (±3.0)	0.4817
pT	T1	70 (66.70%)	55 (52.90%)	0.0478
	≥ T2	35 (33.30%)	49 (47.10%)	
pN	N0	97 (92.40%)	93 (89.40%)	0.4815
	≥ N1	8 (7.60%)	11 (10.60%)	
pStage	I	91 (86.70%)	75 (72.10%)	0.0104
	≥ II	14 (13.30%)	29 (17.90%)	
Pleural invasion	Negative	92 (87.60%)	75 (72.10%)	0.0058
	Positive	13 (12.40%)	29 (17.90%)	
Vascular invasion	Negative	89 (84.80%)	63 (60.60%)	<0.001
	Positive	16 (15.20%)	41 (39.40%)	
Lymphatic invasion	Negative	93 (88.60%)	89 (85.60%)	0.5432
	Positive	12 (11.40%)	15 (14.40%)	
Histological subtype	Micropapillary/Solid	2 (1.90%)	9 (8.60%)	0.0333
	Others	99 (98.10%)	95 (91.40%)	
EGFR mutation*	Wild type	38 (56.70%)	24 (43.60%)	0.2026
	Mutant	29 (43.30%)	31 (54.40%)	
IL-38 expression	Low	56 (53.30%)	36 (34.60%)	0.0081
	High	49 (46.70%)	68 (65.40%)	

動物実験

Ly6g 陽性 TANs の免疫組織化学染色の典型画像を図 3 に示す。LLC-IL38 由来腫瘍と LLC-vector 由来腫瘍で比較を行うと、LLC-IL38 由来腫瘍で Ly6g 陽性 TANs の浸潤が多い傾向であった (11.0 個/視野 対 6.0 個/視野, $p=0.0719$, 図 4)。

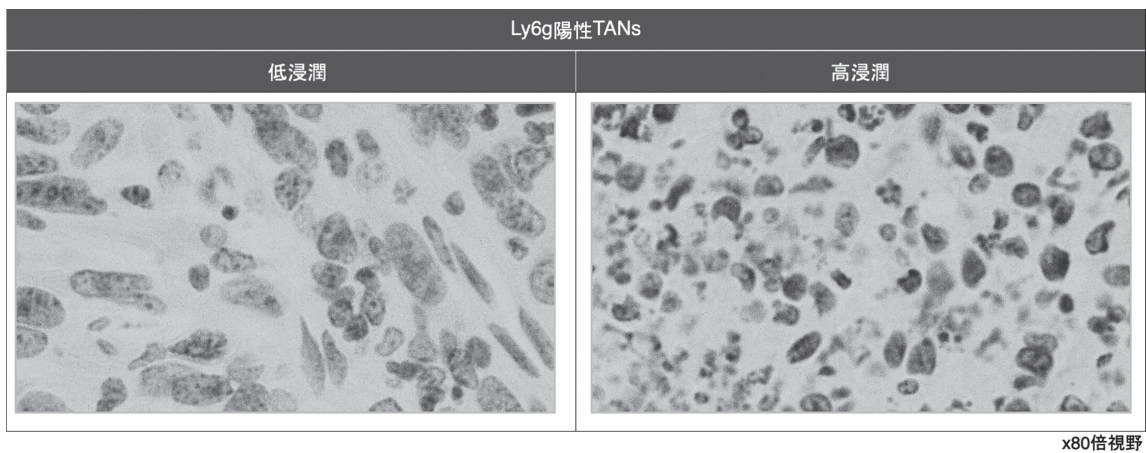


図 3 マウス腫瘍組織における Ly6g 陽性 TANs の免疫組織化学染色の典型画像

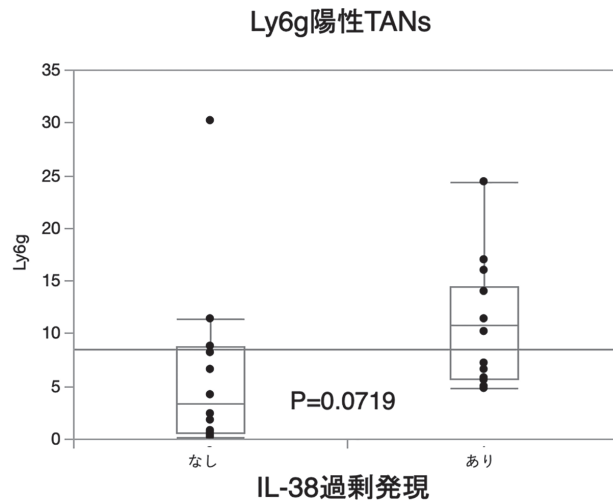


図4 IL-38 強制発現による腫瘍組織へのLy6g 陽性TAMs浸潤数の違い

F4/80 陽性 TAMs の免疫組織化学染色の典型画像を図5に示す。LLC-IL38 由来腫瘍と LLC-vector 由来腫瘍で比較を行うと、LLC-IL38 由来腫瘍で有意にF4/80 陽性 TAMs の浸潤が多かった（14.6 個/視野 対 9.7 個/視野, $p=0.0148$, 図6）。

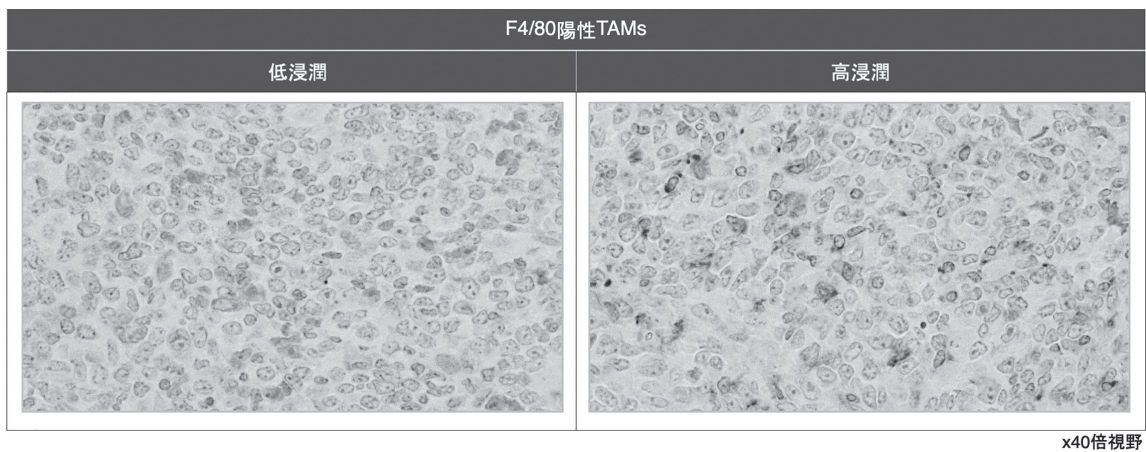


図5 マウス腫瘍組織におけるF4/80 陽性TAMsの免疫組織化学染色の典型画像

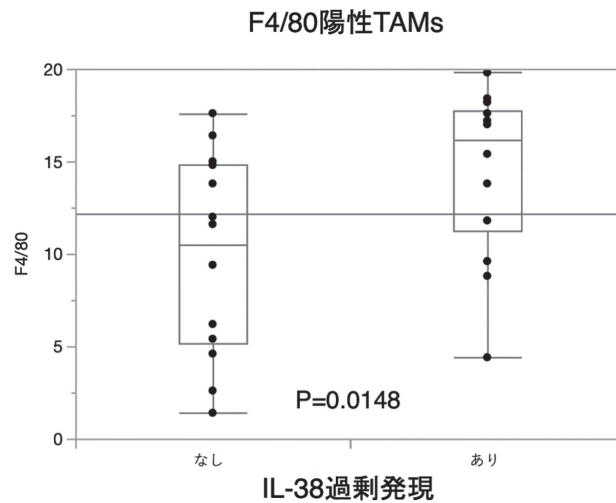


図6 IL-38 強制発現による腫瘍組織へのF4/80 陽性TAMs浸潤数の違い

考 按

本研究によって、肺腺癌切除症例においてIL-38 高発現がTANs及びTAMsの高浸潤と関連していること、マウス皮下腫瘍モデルにおいてIL-38 強制発現TANs及びTAMsの浸潤を誘導することが明らかとなった。

IL-38の受容体であるIL-36Rをノックアウトしたマウス(IL-36R KOマウス)を用いた創傷治癒モデルを用いた研究で、IL-36R KOマウスでは創傷治癒の際に好中球やマクロファージの浸潤が増加し、創傷治癒が遅延することが報告された。また、IL-36R KOマウスではIL-36 γ , C-X-Cモチーフケモカインリガンド1 (CXCL1), トランスフォーミング増殖因子 (TGF)- β などのサイトカインの発現の増加が認められたほか、Toll様受容体4 (TLR4) 阻害剤であるTAK-242を投与によってIL-36R KOマウスの創傷治癒が正常化し、創傷治癒の遅延が改善したことから、TLR4を介したシグナルやサイトカイン産生がIL-36R KOマウスにおける好中球やマクロファージの浸潤増加に関与したものと報告された⁵⁾。これは、IL-36Rのアンタゴニストとして作用するIL-38も好中球やマクロファージの浸潤を誘導する機序になりうると考えられる。

一方で、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の動物実験において、IL-36Rシグナル刺激によってCXCL1やCXCL8, 溶出性マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が放出されることで好中球による炎症反応が増幅されることが報告されている⁶⁾。IL-36Rシグナルを阻害することで好中球性の炎症が抑制されることや、IL-36シグナルがGM-CSFやウイルス模倣物質poly (I:C) を介して好中球やマクロファージの活性化を促進することが報告されており⁶⁾、IL-36シグナルの好中球やマクロファージに対する作用はコンセンサスが得られていない。

我々は今後、LLC-IL38由来腫瘍内のケモカインやサイトカイン、TLR4シグナルなどの解析をさらにを行い、IL-38と好中球、マクロファージとの関係をさらに明らかにしていく方針である。

おわりに

本研究はがん集学的治療研究財団から頂いた第43回一般研究助成によるご支援を頂き、実施することができました。この場をお借りして深謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Byrne J, Baker K, Houston A, et al. IL-36 cytokines in inflammatory and malignant diseases: not the new kid on the block anymore. *Cell Mol Life Sci.* **78**: 6215-27, 2021.
- 2) Bensen JT, Dawson PA, Mychaleckyj JC, et al. Identification of a novel human cytokine gene in the interleukin gene cluster on chromosome 2q12-14. *J Interferon Cytokine Res.* **21**: 899-904, 2001.
- 3) Kinoshita F, Tagawa T, Akamine T, et al. Interleukin-38 promotes tumor growth through regulation of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in lung cancer tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother.* **70**: 123-35, 2021.
- 4) Takada K, Okamoto T, Tominaga M, et al. Clinical implications of the novel cytokine IL-38 expressed in lung adenocarcinoma: Possible association with PD-L1 expression. *PLoS One.* **12**: 1-15, 2017.
- 5) Saito K, Iwata Y, Fukushima H, et al. IL-36 receptor antagonist deficiency resulted in delayed wound healing due to excessive recruitment of immune cells. *Sci Rep.* **10**: 1-12, 2020.
- 6) Baker JR, Fenwick PS, Koss CK, Owles HB, Elkin SL, Fine J, Thomas M, El Kasmī KC, Barnes PJ, Donnelly LE. IL-36 receptor agonist and antagonist imbalance drives neutrophilic inflammation in

COPD. *JCI Insight*. **7**: e155581, 2022.

- 7) Shaul ME, Fridlender ZG. Tumour-associated neutrophils in patients with cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. **16**: 601-20, 2019.
- 8) Cassetta L, Fragkogianni S, Sims AH, et al. Human Tumor-Associated Macrophage and Monocyte Transcriptional Landscapes Reveal Cancer-Specific Reprogramming, Biomarkers, and Therapeutic Targets. *Cancer Cell*. **35**: 588-602, 2019.

全身性炎症と癌免疫微小環境に着目した肝細胞癌に対する 免疫チェックポイント阻害剤の感受性に関わる バイオマーカーの探索

美馬 浩介*

要旨 【背景】肝細胞癌においても切除不能例に対する薬物療法の一次治療として、抗PD-L1抗体アテゾリズマブと抗VEGF抗体ベバシズマブによる併用療法における全生存期間と無増悪生存期間の有意な延長が報告された。しかし、肝細胞癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の効果と全身性炎症や癌免疫微小環境の関係は不明である。今回、肝細胞癌の腫瘍微小環境におけるPDCD1 (PD-1)、CD274 (PD-L1) の発現と臨床病理学的因子や予後の関連を検討した。

【方法】肝細胞癌組織中の、CD8、PDCD1、CD274発現を免疫組織化学染色とデジタルイメージング解析装置 (BZ-X700; Keyence) により測定した。腫瘍微小環境におけるCD274の発現とPDCD1陽性CD8陽性T細胞数、臨床病理学的因子や予後の関連を解析した。

【結果】現在までに解析した肝細胞癌120例中、26例(22%)の腫瘍微小環境にCD274の発現を認めた。腫瘍微小環境にCD274を発現する症例は、PDCD1陽性CD8陽性T細胞数が有意に少なかった ($P < 0.001$)。多変量解析で、術前フレイルあり (odds ratio [OR], 5.24)、好中球/リンパ球比 ≥ 2 (OR, 4.31)、DCP >100 mAU/mL (OR, 5.35)、PDCD1陽性CD8+T細胞の腫瘍内低浸潤 (OR, 11.95) が、腫瘍微小環境におけるCD274発現に関連する因子として同定された。肝細胞癌腫瘍微小環境にCD274発現を認めた症例は切除後の無再発生存率が有意に不良であった (log-rank $P < 0.001$)。

【結語】肝細胞癌において患者脆弱性、腫瘍悪性度、全身性炎症が癌免疫微小環境に関与していることが示唆され、免疫チェックポイント阻害剤を含めた補助化学療法による切除後の再発抑制や予後向上が期待される。今後、免疫チェックポイント阻害剤の効果と全身性炎症や癌免疫微小環境の関係を検討していく予定である。

はじめに

近年、PD-1/PD-L1分子やCTLA-4分子を標的として、癌反応性T細胞への抑制シグナルを解除する免疫チェックポイント阻害薬が様々ながん腫に実用化され、がん集学的治療の新たな柱として用いられるようになってきた。肝細胞癌においても切除不能例に対する薬物療法の一次治療として、抗PD-L1抗体アテゾリズマブと抗VEGF抗体ベバシズマブによる併用療法とソラフェニブを比較した第Ⅲ相試験 (IMbrave150) が行われ、アテゾリズマブとベバシズマブによる併用療法における全生存期間と無増悪生存期間の有意な延長、高い奏効割合、高い忍容性が報告された (Finn RS et al. *N Engl J Med* 2020)。本邦においても2020年9月に承認され、切除不能肝細胞癌に対する薬物療法の一次治療として実臨床で使用されている。約3分の1の症例で腫瘍縮小効果が得られる一方で、約20%の症例は無効で、さらに約10%にHyperprogressive diseaseと呼ばれる急速悪化を認めることから、肝細胞癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の効果予測のためのバイオマーカーの開発が望まれている。

悪性黒色腫や肺癌に対する免疫チェックポイント阻害薬の有効例と無効例を比較したリバーストランスレーショナル研究によって、制御性T細胞、骨髄由来抑制細胞、マクロファージによる癌反応性T細胞の腫瘍内浸潤の抑制や腫瘍内に浸潤したT細胞の疲弊状態など複雑な癌免疫微小環境が明らかとなっていった。しかし、肝細胞癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の効果と全身性炎症や癌免疫微小環境の関係

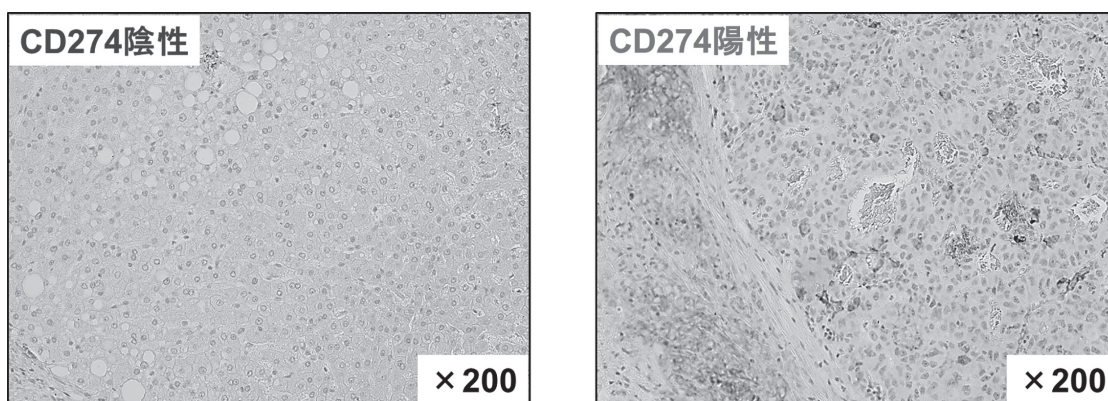
* 熊本大学病院 消化器癌先端治療開発学寄附講座

は不明である。

以上の背景から、肝細胞癌患者における癌組織内のT細胞や免疫チェックポイント分子の発現を解析し、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果と癌免疫微小環境との関連を明らかにすることを目的とした。

対象と方法

当院において切除した肝細胞癌組織中の、CD8, CD274 発現を免疫組織化学染色とデジタルイメージング解析装置 (BZ-X700; Keyence) により測定し、CD274 発現に関しては腫瘍細胞の細胞膜染色陽性率 1%以上を陽性とした (図1)。



- 抗PD-L1抗体: Cell Signaling Technology Inc., clone E1L3N
- 腫瘍細胞の細胞膜染色陽性率 1%以上を陽性

図1 肝細胞癌組織におけるCD274 発現

術前におけるFrailの有無を7段階のClinical Frailty Scaleを用いて評価し、4以上をフレイルとした (図2)。

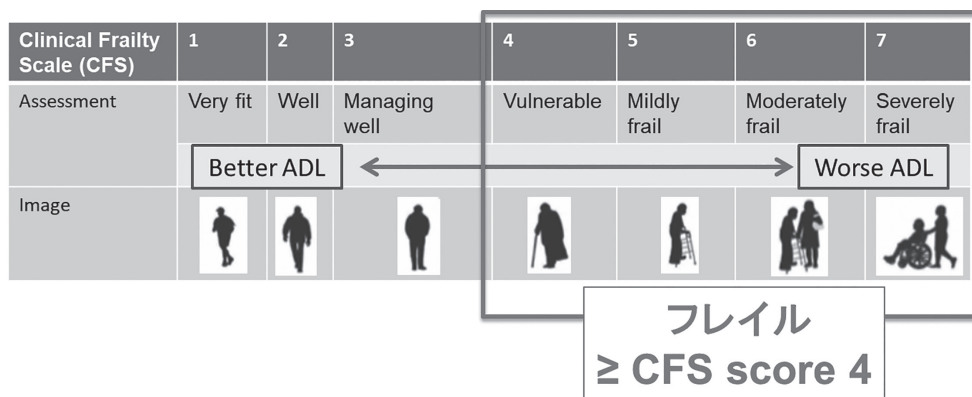


図2 Clinical Frailty Scale

腫瘍微小環境におけるCD274の発現とPDCD1陽性CD8陽性T細胞数、臨床病理学的因子、フレイルの有無や予後の関連を解析した。

結 果

現在までに解析した肝細胞癌 120 例中、26 例 (22%) の腫瘍微小環境にCD274の発現を認め、CD274発現陽性症例は、CFS4以上のフレイル、炎症指標のNLR高値、栄養指標のPNI低下と有意な関連を認めた。さらに腫瘍因子ではPIVKA-II高値、PD1陽性CD8陽性T細胞の浸潤低下と関連を認めた (表1)。

表1 CD274 発現と臨床病理学的因子の関連

	CD274 (PD-L1) 発現		P value
	陰性 (n=94)	陽性 (n=26)	
男性	72%	73%	0.94
年齢 ≥75	35%	46%	0.30
BMI (kg/m ²) ≥ 25	37%	35%	0.81
フレイルあり	12%	31%	0.018
HCV/HBV/nonviral	42%/16%/42%	50%/15%/35%	0.74
Albumin ≤ 3.5 g/dL	7.5%	3.9%	0.51
ICG-R15 ≥ 15%	30%	23%	0.50
Child-Pugh A	96%	92%	0.48
NLR	1.9 (1.3-2.4)	3.1 (2.1-3.3)	<0.001
PNI	50 (47-54)	47 (44-50)	0.009
腫瘍個数 ≥2	24%	23%	0.88
腫瘍径 >3 cm	29%	31%	0.84
脈管浸潤あり	18%	12%	0.43
AFP > 20 ng/mL	28%	27%	0.94
DCP > 100 mAU/mL	24%	54%	0.004
Disease stage III or IVA	9.6%	19%	0.17
低分化	9.6%	3.9%	0.35
PDCD1*CD8*T細胞(%)	15%	3.2%	<0.001

多変量解析で、術前フレイルあり (odds ratio [OR], 5.24; 95% confidence interval [CI], 1.09 to 28.36), 好中球/リンパ球比 ≥ 2 (OR, 4.31; 95% CI, 1.33 to 15.92), DCP>100mAU/mL (OR, 5.35; 95% CI, 1.63 to 19.69), PDCD1 陽性CD8+T細胞の腫瘍内低浸潤 (OR, 11.95; 95% CI, 3.38 to 58.92) が、腫瘍微小環境におけるCD274発現に関連する因子として同定された (表2)。

表2 CD274 発現に関する多変量解析

CD274 (PD-L1) 発現陽性	Univariable P value	Multivariable OR (95% CI)	P value
フレイルあり	0.027	5.24 (1.09-28.36)	0.039
NLR ≥ 2	<0.001	4.31 (1.33-15.92)	0.015
PNI <50	0.009	2.45 (0.76-8.41)	0.13
DCP>100	0.005	5.35 (1.63-19.69)	0.005
PDCD1*CD8*T細胞低浸潤	<0.001	11.95 (3.38-58.92)	<0.001

肝細胞癌腫瘍微小環境にCD274発現を認めた症例は切除後の無再発生存率が有意に不良であった (log-rank P<0.001: 図3)。

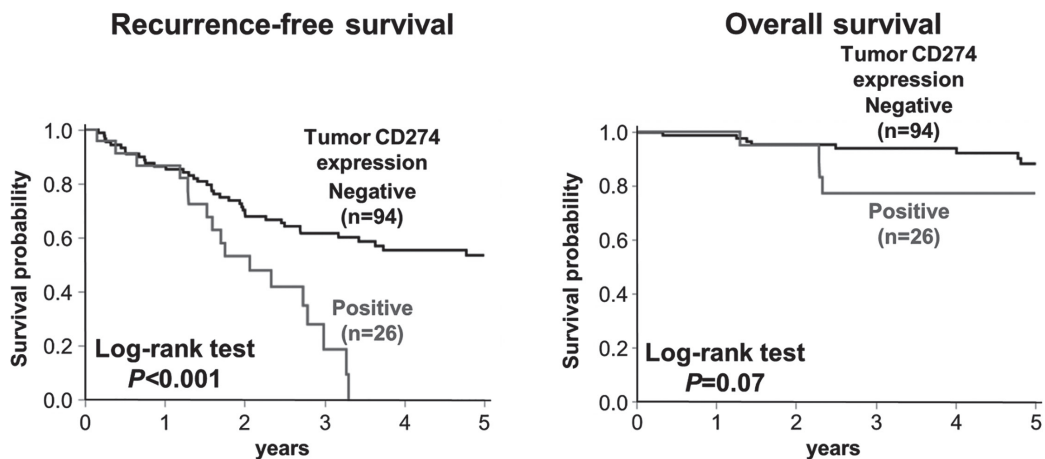


図3 CD274 発現と肝細胞癌切除後の予後

考 察

本研究により、肝細胞癌においてCD274 (PD-L1) 発現陽性症例は切除後の再発リスクが有意に高く、CD274 (PD-L1) の発現に患者脆弱性、腫瘍悪性度、全身性炎症が関与していることが示唆された。

肝細胞癌におけるCD274 (PD-L1) 発現のメカニズムは不明である。フレイルの発症進行には慢性炎症、低栄養、サルコペニアなどの要因が複合的に関与することが示唆されている¹⁾。またTNF- α , TGF- β , IL-6などの炎症性サイトカインが腫瘍細胞におけるPD-L1の発現を誘導することが報告されている²⁾。肝細胞癌において、慢性炎症に伴う炎症性サイトカインが癌微小環境におけるCD274 (PD-L1) 発現に関与している可能性がある。消化器癌、非小細胞肺癌、悪性黒色腫など進行固形癌において、パフォーマンスステータスが不良な患者では免疫チェックポイント阻害剤の抗腫瘍効果が減弱することが報告されている³⁾。今後免疫チェックポイント阻害剤の効果と全身性炎症や癌免疫微小環境中のCD274 (PD-L1) 発現の関連を検討する予定としている。また肝細胞癌患者における癌組織内の詳細なT細胞サブセット (CD3, CD4, CD8, CD45RO, FOXP3), NK細胞, マクロファージ, 骨髄由来抑制細胞, 免疫チェックポイント分子の発現を解析し, 免疫チェックポイント阻害剤の治療効果と癌免疫微小環境との関連を明らかにし, さらに血清サンプルを用いたサイトカインアレイを行い, 免疫チェックポイント阻害剤の治療効果と関連する炎症性シグナルの同定を試みる予定である。

おわりに

肝細胞癌において患者脆弱性、腫瘍悪性度、全身性炎症が癌免疫微小環境に関与していることが示唆され、免疫チェックポイント阻害剤を含めた補助化学療法による切除後の再発抑制や予後向上が期待される。今後、免疫チェックポイント阻害剤の効果と全身性炎症や癌免疫微小環境の関係を検討していく予定である。本研究から得られた知見を基盤として、全身性炎症や癌免疫微小環境に基づくがん免疫療法の効果予測法の開発につながることを期待される。

文 献

- 1) Xue QL, Bandeen-Roche K, Varadhan R et al. Initial Manifestations of Frailty Criteria and the Development of Frailty Phenotype in the Women's Health and Aging Study II. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **63**: 984-90, 2008.
- 2) Cha JH, Chan LC, Li CW et al. Mechanisms Controlling PD-L1 Expression in Cancer. *Mol Cell* **76**: 359-70, 2019.
- 3) Krishnan M, Kasinath P, High R et al. Impact of Performance Status on Response and Survival Among Patients Receiving Checkpoint Inhibitors for Advanced Solid Tumors. *JCO Oncol Pract* **18**: e175-82, 2022.

悪性神経膠腫に対するインドシアニンググリーン (ICG) および近赤外線を用いた術中リアルタイム蛍光診断確立と 治療法の開発

武藤 淳*, 佐谷 秀行**, 樺山 一哉***, 廣瀬 雄一*

要旨 【目的】 インドシアニンググリーン (ICG) による脳脊髄腫瘍に対する術中蛍光診断法のプロトコールをそれぞれの病理型に応じて確立した。

【方法】 手術 24 時間前に 5.0mg/kg を静脈注射投与し、腫瘍に残存する ICG を近赤線照射下で観察する Second Window ICG テクニック (SWIG) で悪性神経膠腫 15 人、転移性脳腫瘍 15 人を行った。SWIG を改良し、観察 1 時間以上前に 0.5-1.5mg/kg を投与する Delayed Window ICG テクニック (DWIG) に開発した。悪性神経膠腫 14 人、転移性脳腫瘍 14 人、下垂体腺腫 16 人、髄膜腫 15 人、頭蓋内神経鞘腫 11 人を行った。

【結果】 転移性脳腫瘍と悪性神経膠腫にておいて SWIG と DWIG で有意差は示されなかった。つまり、改良した簡便な観察 1 時間前に 0.5-1.5mg/kg 投与する DWIG が、手術 24 時間前に 5.0mg/kg の大量投与する方法に蛍光値に差がないことが示され、DWIG で十分であることが示された。また、MRI のガドリニウムの造影強度により ICG の蛍光発光が予想可能であることが示され、MRI でガドリニウムで造影される脳脊髄腫瘍では、ICG 術中蛍光造影が有用である可能性が示された。さらに、Dynamic Contrast Enhanced Perfusion MRI 解析によって、ICG が貯留する機構として、脳血管門の透過性 (Permeability) は、MRI の Gd 増強、ICG の保持、近赤外線による腫瘍蛍光に寄与する可能性を示した。

【結論】 腫瘍型に応じた ICG 術中蛍光造影法を、転移性脳腫瘍、悪性神経膠腫、髄膜腫、神経鞘腫、下垂体腺腫などについて確立した。ICG が脳脊髄腫瘍に貯留する原因として、permeability が寄与している可能性が示唆された。

はじめに

脳腫瘍は腫瘍組織と正常脳組織との境界が不明瞭なことがしばしばある。悪性脳腫瘍は外科手術により可能な限り摘出し、化学療法、放射線療法を行うことにより、生命予後を延長することが示されている。摘出すればするほど生命予後 (全生存期間) は延長するが、手術による正常部分の損傷で機能障害をきたす可能性が高くなる。患者の生命予後と機能予後の両者を高めるため、脳腫瘍と正常組織を術中に判別し得る新しい手技や技術の開発は急務である。

近年ジアグノグリン® (Indocyanine green 以下 ICG 第一三共株式会社) を使用した、脳腫瘍手術における術中蛍光造影の方法が報告された³⁾。不明瞭な腫瘍の診断と摘出を補助する方法の一つに「術中蛍光診断 (photodynamic diagnosis, PDD)」がある。腫瘍細胞に取り込まれた試薬を術中の近赤外線照射により励起して、蛍光発光する腫瘍組織を摘出する方法である。悪性脳腫瘍であるグリオーマに対しては 5-アミノレブリン酸 (5-aminolvalulinic acid, 5-ALA) が用いられるが、費用、管理、必要機器などの実用的問題がある。

脳神経外科領域では、脳血管手術中の血流観察方法として ICG を用いた術中蛍光診断が日常的に行われ

* 藤田医科大学 医学部 脳神経外科

** 藤田医科大学 医学部 がん医療研究センター

*** 大阪大学大学院 理学研究科

ている。市中病院の脳神経外科で扱う疾患は圧倒的に血管障害と外傷疾患が多く、手術用顕微鏡には脳血流観察目的でICG用の蛍光装置が導入されている。ゆえに、ICG蛍光造影を脳腫瘍に使用することができれば汎用性が高く実用的である。

ICGは分子量 775 の水溶性色素でそれ自体は発光しないが、静脈投与すると生体内で血漿蛋白 (Beta-Lipoprotein) と結合し、近赤外線照射により励起され発光する¹⁾。760nm-780nmの近赤外線を照射すると、血管内のICG試薬が励起され、800nm-850nmの波長の近赤外域蛍光を放出する。表面より約10mm深部の病変、血管、リンパ管など生体深部構造を励起、発光させ可視化が可能である。

上述した脳腫瘍に対する術中蛍光診断は、現在保険適用である1回25mgの静注投与に対して、手術24時間前に5.0mg/kgを静脈注射投与し、腫瘍に残存するICGを近赤外線照射下で観察する方法である。“Second Window ICG technique (SWIG)”と呼ばれ、腫瘍細胞の存在を術中に確認可能である⁵⁾。ICGのsecond window効果は、EPR効果 (Enhanced permeability and retention effect) を利用したもので、ガン特有の血管構造を利用した高分子のdrug delivery systemを応用したものである。そのメカニズムは、EPR効果により腫瘍による血管構造の破綻やリンパドレナージシステムの損傷などによって血管透過性が増大し、静脈投与24時間後のがん組織にICGが集積するというものである⁵⁾。動物実験では、Madajewskiらが7.5mg/kgを手術24時間前に投与することで様々な悪性腫瘍に集積し、残存腫瘍を摘出できることをマウスの脇腹モデルで報告した⁴⁾。肝臓癌、肺癌、頭頸部癌でも腫瘍の取り込みが報告されている。一方、脳腫瘍細胞のICG取込みに関する基礎研究はHuglandらによりラットと脳腫瘍患者で報告されている²⁾。しかし、脳腫瘍に関する報告はUniversity of PennsylvaniaのLeeらのチームからのみであり、再現性は未だ示されていない。またVisionsense社の外視鏡のみを使用した経験で、ごく一般的な顕微鏡による近赤外線照射使用の報告はされていない。また、報告はアメリカ人患者のdataであるために、日本人に最適な投与量、投与のタイミングなどの検討が必要である。正常脳組織と腫瘍組織をリアルタイムかつ肉眼的に識別可能な術中蛍光診断はより一層注目されており、安価かつ簡便で、確実に腫瘍細胞を標識する蛍光発光物質が求められている。本研究では、最適な投与量、観察時期を脳脊髄腫瘍型別に、特に悪性神経膠腫に対するprotocolを決定することを目的とした。

対象—方法—成績

<対象方法>

脳脊髄腫瘍を対象に2019年11月より特定臨床研究として研究を行っている (jRCTs041190064)。藤田医科大学IRB (CRB4180003) と社会福祉法人 恩賜財団 済生会支部 済生会横浜市東部病院のIRBの承認 (2020056) を得て研究を開始している。2023年8月までに240症例に行った。その中で、Dynamic Contrast Enhanced Perfusion MRI解析を行った100人を対象に解析を行った。詳細は、悪性神経膠腫29人、転移性脳腫瘍29人、下垂体腺腫16人、髄膜腫15人、頭蓋内神経鞘腫11人の合計100人である。手術24時間前に5.0mg/kgを静脈注射投与し、腫瘍に残存するICGを近赤外線照射下で観察するSecond Window ICGテクニック (SWIG) で悪性神経膠腫15人、転移性脳腫瘍15人を行った。SWIGを改良し、観察1時間以上前に0.5-1.5mg/kgを投与するDelayed Window ICGテクニック (DWIG) に開発した。悪性神経膠腫14人、転移性脳腫瘍14人、下垂体腺腫16人、髄膜腫15人、頭蓋内神経鞘腫11人を行った。使用した近赤外線装置は、顕微鏡はKINEVO microscope (KINEVO 900, Carl Zeiss Meditec AG, Jena Germany) Iridium camera system (VisionSense, Philadelphia, Pennsylvania USA), 内視鏡はCLV-S200IR (infrared light source) CH-S200-XZ-EA (3 CMOS camera head) (Olympus, Carl Zeiss Co., Ltd., Japan) を使用した。励起光には、805nmの近赤外線光源を用い、カメラには、820-860nmのフィルターを使用した。MRI検査は32チャンネルヘッドコイル付き3T MRI装置 (Vantage Titan 3T; キヤノンメディカルシステムズ株式会社) を用いて実施した。造影剤静脈内投与後、脳腫瘍全体をカバーする

3D Fast Field Echo Quick シーケンスを用いて行った。造影剤ガドブトロール (Gadovist; Bayer, Osaka, Japan, 0.05mL/kg 体重) は、駆動式自動注入器 (ソニックショットGX; ネモト, 日本) により 1mL/s の速度でボラス静注し、その後、生理食塩水 30mL を 1mL/s の速度でボラス静注した。

画像解析は、Image J (NIH Image, Bethesda, MD, USA) を用いて行った。蛍光発光や造影MRIの輝度を測定は、region of interest (ROI) を5箇所設定し、輝度の測定値の平均値を使用した。蛍光発光値は相対値である、正常脳の発光値を基準として、腫瘍の発光値を Signal to Background Ratio (SBR) と定義した。またMRIもガドリニウム (Gd) 造影にて、正常脳白質の値を基準として、Gd 造影の輝度値を Ratio of Gadolinium-enhanced T1 Tumor Signal to Normal Brain (T1BR) と定義して、解析を行った。

また、Toftsらによって導入された薬物動態モデルを用いて、血管内から血管外への体積移動定数 K_{trans} (/min), 血管外から血管内への K_{ep} ($=K_{trans}/V_e$) (/min), 血管外細胞外空間の容積 V_e (mL/100mL of tissue) および分画血漿量 V_p (mL/100mL of tissue) を算出できる。Toftsら拡張モデル⁶⁾で提案された2コンパートメント薬物動態モデルは、血管と組織を独立したコンパートメントと見なすことを主張している。この2コンパートメントモデルに基づき、造影剤の組織移行速度定数 (K_{trans}), 血管外の細胞外空間の体積比 (V_e), 血管内成分の体積比 (V_p) をパラメータとして、目的部位と参照部位での造影剤濃度の関係から各パラメータを算出した。このDCE perfusion-MRIの2コンパートメント薬物動態モデルに基づいて、perfusion analysis法を用いて、Permeability parameter⁷⁾を算出することにした。

統計解析はJMP 14.1.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。一変量解析はカテゴリカル変数の比較にはカイ二乗またはフィッシャーの正確検定を、連続変数にはunpaired t検定またはMann-Whitney 順位和検定および単回帰分析を適用した。統計的有意性は $p < 0.05$ とした。

<結果>

転移性脳腫瘍はSWIGで正常脳実質よりも 3.5 ± 1.5 倍の蛍光であった。一方、DWIGでは 3.3 ± 2.0 倍の蛍光であり、有意差は示せなかった。 $(P=0.13)$ また、悪性神経膠腫では、SWIGでは 2.7 ± 1.5 倍の蛍光であった一方、DWIGでは 4.0 ± 1.7 倍の蛍光で、有意差は示せなかった。 $(P=0.84)$ DWIGで行った、髄膜腫 3.3 ± 2.6 倍、神経鞘腫 4.1 ± 0.9 倍と腫瘍蛍光発光効果を確認した。さらには、100例の腫瘍の蛍光発光SBRは、 3.5 ± 1.8 , MRI T1 強調画像のガドリニウム増強腫瘍信号比T1BRは 2.0 ± 1.0 にて比例関係にあることが示された。(図1) $(P=0.0009)$ つまりMRIのガドリニウムの造影強度によりICGの蛍光発光が予想可能であることが示された。具体的として悪性神経膠腫の症例を示す。(図2) 術前の造影MRIで右前頭葉にring-enhancedを示す腫瘍を認めた。後端は一次運動野に接していた。(図A) 水平断, B) 矢状断, C) 冠状断)。硬膜を翻転すると、腫瘍は脳表に露出されておらず、正常の脳表が確認できた。(図D) 画像上、腫瘍は、脳表より5mm以深にあるため、5ALAにてうっすらと脳内の腫瘍を確認でき(図E), ICGにはしっかり蛍光を確認できた。(図F) ICGの820nmの波長は、水やヘモグロビンの波長とずれており、干渉されにくいため、正常脳や脊髄を透過するという特徴がある。腫瘍を摘出中に、明視野では、(図G), 5ALAと、(図H白矢印) ICGでも(図I白矢印) 蛍光発光をしっかり確認できた。腫瘍摘出後に、肉眼的には全摘出をできたように見えたが、(図J) 蛍光で確認すると5ALAではわずかに発光が見られた。(図K) 腫瘍は脳室周囲まで浸潤しており、摘出により側脳室が開放されている。脳室周囲壁も5ALAで蛍光発光するために、脳室壁からの発光か、残存腫瘍の発光か分別がつかない。ICGでの蛍光発光を確認しわずかに残存が見られた。(図L) しかし、神経刺激で、運動線維の反応が出たために、これ以上の摘出は、麻痺の悪化を来すために、ここで摘出を終了した。術後MRIにて後端部に一部造影領域を認め、腫瘍の残存を確認した。(図M) 水平断 (白矢印), N) 矢状断 (白矢印), O) 冠状断)

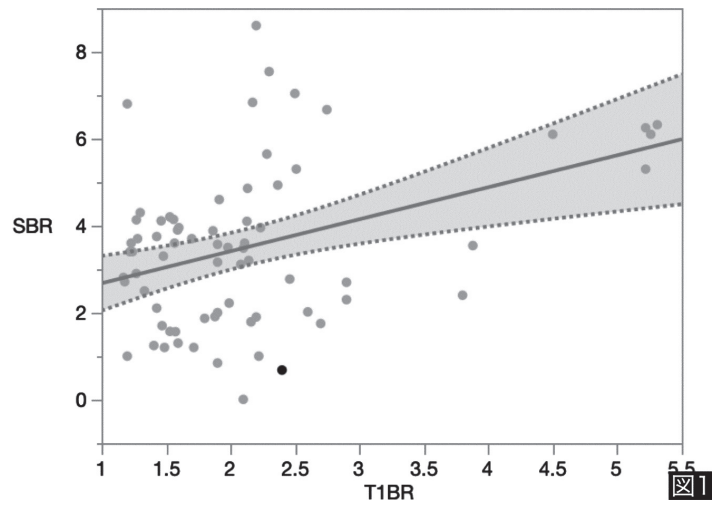


図1 SBR（正常脳に対する腫瘍のICGの蛍光比）とT1BR（正常脳に対する腫瘍のMRI ガドリニウムの比）

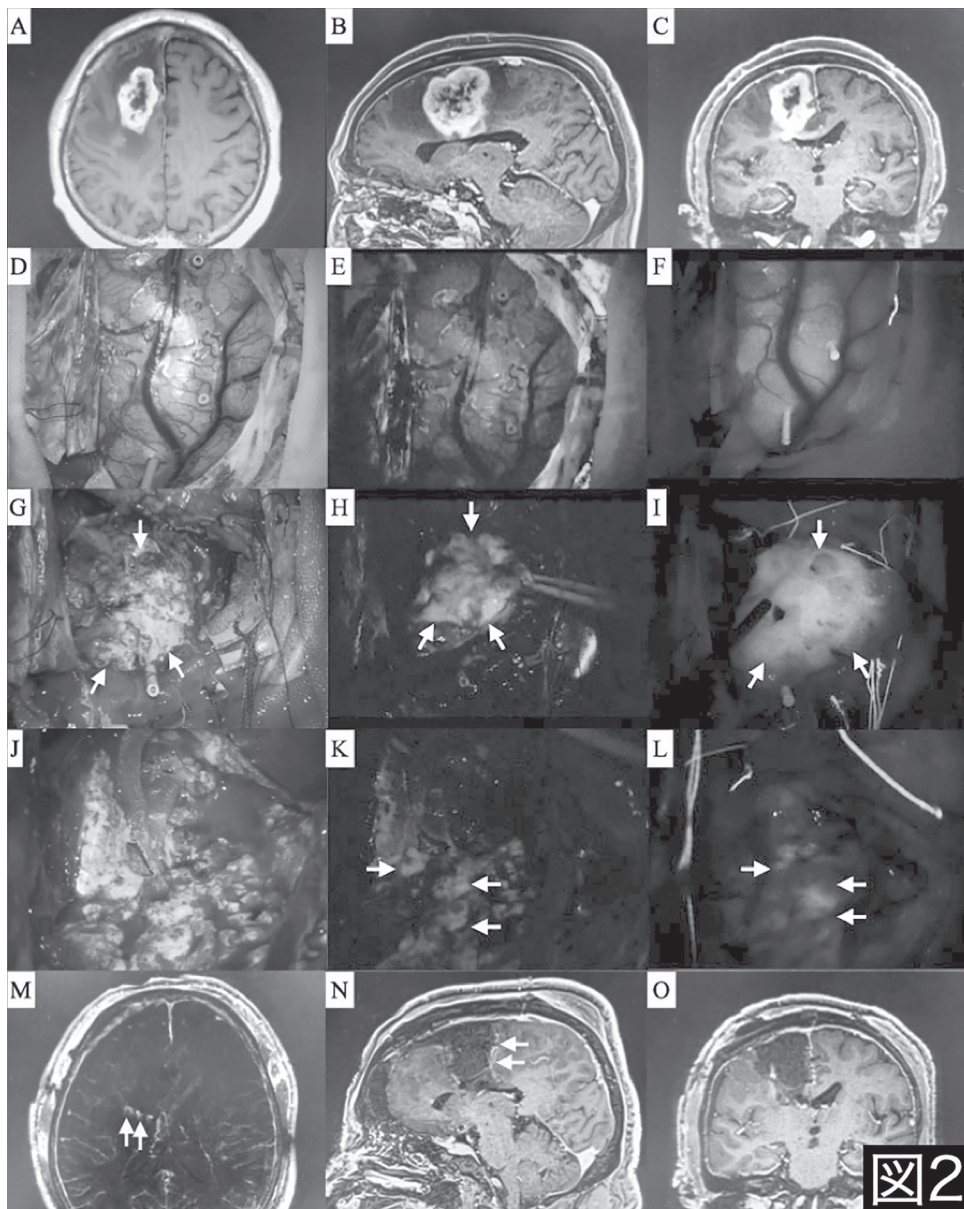


図2 具体的症例：悪性神経膠腫

考 按

Dynamic Contrast Enhanced Perfusion MRI解析によって、いくつかのパラメーターを解析したところ、permeabilityを示すKtransとの相関関係が、SBRとKtrans ($P=0.03$) (図3)、T1BRとKtrans ($P=0.012$) (図4) で示された。つまり、ICGが貯留する機構として、脳血管門の透過性 (Permeability) は、MRIのGd増強、ICGの保持、近赤外線による腫瘍蛍光に寄与する可能性を示した。

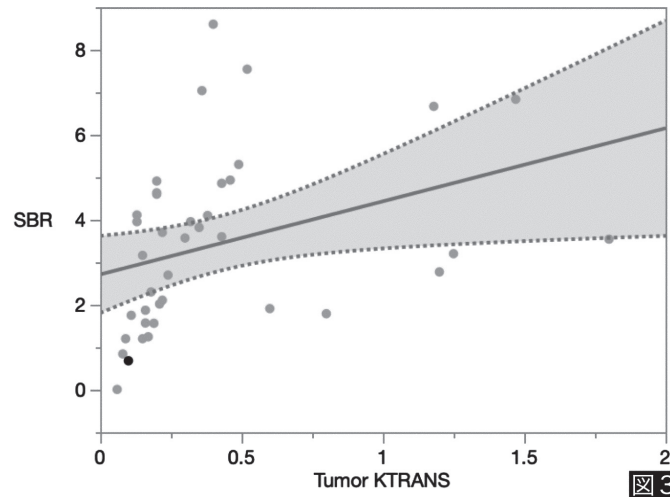


図3 SBR (正常脳に対する腫瘍のICGの蛍光比) とKtrans (Permeability) の相関図

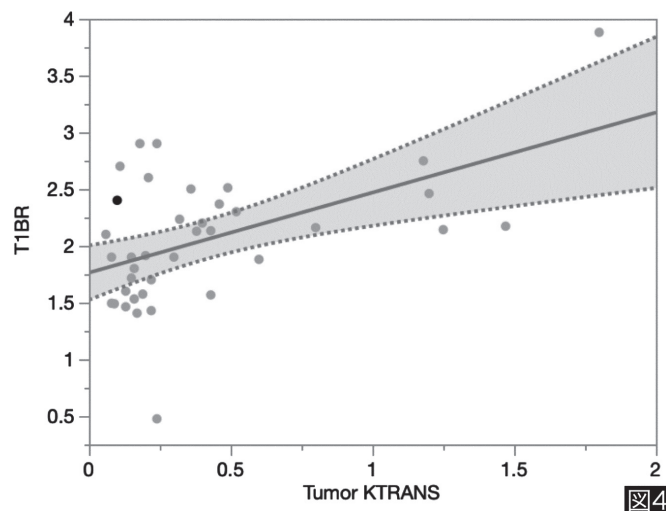


図4 T1BR (正常脳に対する腫瘍のMRIガドリニウムの比) とKtrans (Permeability) の相関図

おわりに

本研究によって、悪性神経膠腫を含む、悪性腫瘍のみならず良性腫瘍も含む、様々な脳腫瘍において、インドシアニンググリーンを用いた術中蛍光造影が有用であることを示した。MRIのガドリニウム造影剤が貯留する脳腫瘍に有用であった。そのメカニズムとして、血管からの造影剤の漏れ出し、permeabilityが関与している可能性があることをDynamic Contrast Enhanced Perfusion MRIの解析によって明らかにすることができた。この技術は特殊な装置も特殊な薬も不要である。この技術が汎用化され手術における腫瘍の摘出率が改善向上し、脳腫瘍患者さん達の生命予後と機能予後改善に寄与することを心から願っている。

謝 辞

本研究にご支援を賜りました公益財団法人がん集学的治療研究財団には、心より感謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、多大なるご指導、ご支援をいただきました独立行政法人国立病院機構 東京医療センター脳神経外科 峯裕先生、藤田医科大学 脳神経外科 安達一英先生、大場茂生先生、井上辰志先生、上甲眞宏先生、西山悠也先生、藤田医科大学 岡崎医療センター脳神経外科 早川基治先生、放射線診断科 村山和宏先生、病理診断科 山田勢至先生、NP 齋藤史明様に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Benson RC, Kues HA, et al. Fluorescence properties of indocyanine green as related to angiography. *Phys Med Biol* **23**: 159-63, 1978.
- 2) Haglund MM, Hochman DW, Spence AM, Berger MS, et al. Enhanced optical imaging of rat gliomas and tumor margins. *Neurosurgery* **35**: 930-940; discussion 940-931, 1994.
- 3) Lee JYK, Thawani JP, Pierce J, Zeh R, Martinez-Lage M, Chanin M, Venegas O, Nims S, Learned K, Keating J, Singhal S, et al. Intraoperative Near-Infrared Optical Imaging Can Localize Gadolinium-Enhancing Gliomas During Surgery. *Neurosurgery* **79**: 856-71, 2016.
- 4) Madajewski B, Judy BF, Mouchli A, Kapoor V, Holt D, Wang MD, Nie S, Singhal S, et al. Intraoperative near-infrared imaging of surgical wounds after tumor resections can detect residual disease. *Clin Cancer Res* **18**: 5741-51, 2012.
- 5) Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K, et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release* **65**: 271-84, 2000.
- 6) Tofts PS, Brix G, Buckley DL, Evelhoch JL, Henderson E, Knopp MV, Larsson HB, Lee TY, Mayr NA, Parker GJ, Port RE, Taylor J, Weisskoff RM, et al. Estimating kinetic parameters from dynamic contrast-enhanced T(1)-weighted MRI of a diffusible tracer: standardized quantities and symbols. *J Magn Reson Imaging* **10**: 223-32, 1999.
- 7) Tofts PS, Kermode AG, et al. Measurement of the blood-brain barrier permeability and leakage space using dynamic MR imaging. 1. Fundamental concepts. *Magn Reson Med* **17**: 357-67, 1991.

大腸癌に対する、青色LED光を用いた 新たな光治療法の開発

良元 俊昭*, 西 正暁*, 島田 光生*

要旨 近年、青色発光ダイオード (light emitting diode: LED) 光による種々の腫瘍細胞に対する抑制効果が示され、可視光によるがん治療の可能性が示唆されている。我々もこれまでに青色LED光が大腸癌細胞に発現している青色光受容体オプシン3 (opsin3: Opn3) を介してオートファジーを誘導し、増殖を抑制することを報告した。しかし腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage: TAM) を含む腫瘍微小環境に対する青色光照射の影響は不明である。今回HCT-116細胞のconditioned medium (CM) を用いてTAMを作成し、青色LED光照射がTAMに及ぼす影響を調べた。結果としてM2マクロファージマーカーのCD163およびCD206発現レベルはLED光照射により有意に低下した。TAM-CMはHCT-116細胞の遊走能を促進したが、LED光照射TAMのCMではその効果が打ち消された。またLED光照射TAMで血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の分泌やプログラム細胞死リガンド1 (programmed death-ligand 1: PD-L1) 発現が抑制された。In vivoモデルでもCD163の発現はLED光照射群で低下した。これらの結果から、青色LED光はTAMに対する抑制効果を示した。

はじめに

LEDを用いて特定の波長の光を細胞や生体に照射することで、様々な効果が得られることが報告されてきている。光線と光増感剤を組み合わせた光線力学的療法 (photodynamic therapy: PDT) は、化学放射線療法に代わる新たな低侵襲療法として注目され、食道癌、肺癌、脳腫瘍、その他の癌の治療に臨床応用されている。いくつかのin vitroおよびin vivoの報告では、大腸癌に対するPDTの有効性も示されている¹⁾²⁾。一方で最近の研究では、青色光を単独で使うことが、ある種のがん細胞の増殖抑制に有効であることが示されている。青色光の光毒性および増殖抑制作用の具体的なメカニズムとしては、オートファジーの誘導³⁾、ネクロトーシス⁴⁾、アポトーシス⁵⁾、細胞周期の停止⁶⁾などが報告されている。また、青色光照射は、大腸がん細胞における活性酸素種の産生やDNA損傷を引き起こす⁷⁾。我々のこれまでの報告では、465nmの青色LED光照射 (30mW/cm², 30分) が、オートファジー誘導を介して大腸癌細胞の増殖を抑制することを示し、大腸癌細胞に発現する青色光受容体Opn3が、青色LED光の細胞毒性作用を促進することを明らかにした⁸⁾。

オプシンファミリーのタンパク質は、網膜の視細胞などに発現するGタンパク質共役型受容体 (G protein-coupled receptor: GPCR) で構成されている。Opn3は波長460~470nmの青色光の受容体として働き、Gタンパク質のGi/oサブタイプを活性化し、アデニル酸シクラーゼを阻害し、環状アデノシンリン酸 (cAMP) を減少させるというGPCRシグナル伝達を制御している⁹⁾¹⁰⁾。最近の研究では、Opn3は呼吸器上皮、肝臓、腎臓、心臓など、視覚とは関係のない器官にも広く発現していることが示されており、非視覚型オプシンとも呼ばれている¹¹⁾¹²⁾。またOpn3が悪性黒色腫において光受容体として働き、光線療法に寄与していることが示され¹³⁾、我々の知見はOpn3が大腸癌細胞の光受容体として光線療法の標的となりうることを示している⁸⁾。

* 徳島大学 消化器・移植外科

がん治療において、線維芽細胞、免疫細胞、腫瘍細胞など様々な細胞から構成される腫瘍微小環境 (tumor microenvironment: TME) の制御が極めて重要であることが明らかとなってきた。われわれは最近、がん関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast: CAF) に青色LED光を照射すると、CAF活性とCAFからのインターロイキン (IL)-6の分泌が低下し、大腸癌細胞の腫瘍悪性度を低下させることを報告した¹⁴⁾。しかしながら、TAMに対する青色光の影響は不明である。

本研究では、PD-L1などを介して腫瘍増殖や転移に関与する、M2マクロファージを中心としたTAMに着目した。青色LED光照射がTAMに与える影響を検討し、TMEへの影響を検討した。

方 法

細胞培養

ヒト大腸癌細胞株HCT-116及びマウス大腸癌細胞株CT-26を用いた。これらの細胞株はマイコプラズマ陰性であることが確認され、適切な細胞培養のための国際的ガイドラインに従って培養した。細胞は、10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS), 100U/mLペニシリン, 100 μ g/mLストレプトマイシンを添加したRPMI1640培地で、5% CO₂, 37°Cの加湿インキュベーターで培養した。

LED照射装置

光源には波長465nmの青色LED (NCSB119, 日亜化学工業株式会社)を用いた。照射実験にはLED光照射装置 (徳島大学工学部電気電子工学科作成)を用いた。

CMとTAMの調製

癌細胞のCMを得るために、HCT-116細胞を100mmデッシュで80%コンフルエントになるまで培養した。細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline: PBS) で2回洗浄し、FBSを含まない新しい培地で培養した。37°Cで48時間培養後、上清を回収し、800xg, 22°Cで5分間遠心分離し、0.2 μ mの滅菌フィルターで濾過した。

TAMを誘導するために、M0マクロファージをHCT-116細胞由来のCMで処理した。CMを培養液に1:1の割合で添加し、細胞を37°Cで48時間培養した。

TAMを青色LED光 (465nm, 30mW/cm², 30分) で処理した照射群と、照射しなかったコントロール群を作成し、培地を一度交換し上清 (TAM-CM) を回収した。これらのプロセスの概略図を図1に示す。

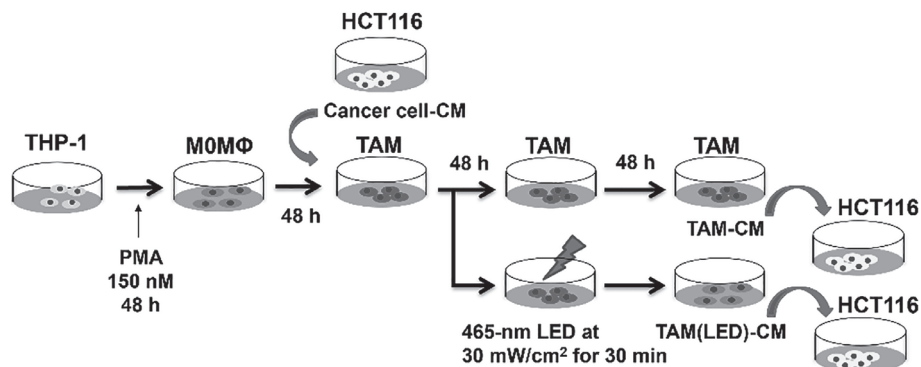


図1 腫瘍関連マクロファージ (TAM), コンディションドメディウム (CM) および光照射プロトコール

直腸癌同所性モデル

4週齢の雌性BALB/cマウスを用い、少なくとも7日前から水と標準的な実験用飼料が与えられた。手術の前後、マウスは水と餌を自由に摂取できた。CT-26細胞をPBS中1mMエチレンジアミン四酢酸で採

取し、PBSで3回洗浄した後、マトリゲル (Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, USA) 500mg/mLを含むPBSに 1×10^7 /mLの密度で再懸濁した。マウス (n=8) はイソフルランで麻酔された (導入には3%~4%, 維持には1%~2%)。直腸腫瘍の進行による腸閉塞を防ぐため、直腸前壁を7mm切開した。CT-26細胞 (1×10^6) を29ゲージの注射針を用いて直腸後壁の粘膜下層に注入した。

細胞移植7日後に、担癌状態となったマウスを2群 (各群n=4) に無作為に割り付け、以下の治療を行った: (i) LED光照射群 (465nm, 30mW/cm², 30分, 1回), (ii) 対照群 (無処置)。マウスは、大腸癌細胞移植後2週目に頸髓脱臼により犠死させた。人道的エンドポイントは、腫瘍の大きさがマウスの体重の10%以上増加した段階としたが、これはどのマウスにも当てはまらなかった。本研究における実験および手順は、徳島大学動物福祉利用委員会の承認を得た (承認番号T2021-42)。すべての動物実験は、U.K. Animals (Scientific Procedures) Act 1986 および関連ガイドライン、動物実験に関するEU指令2010/63/EU, および実験動物の飼育と使用に関する米国国立衛生研究所ガイド (National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978)) に従って行われた。

遊走およびスクラッチアッセイ

遊走アッセイには、孔径8 μ mのトランスウェルインサート (Corning, Corning, NY, USA) を用いた。HCT-116細胞 (2×10^4) を上部チャンバーに播種した。細胞接着後、培地を捨て、1% FBSを含む新鮮な培地を上部チャンバーに加えた。下部チャンバーには10% FBSを含むCMを加えた。24時間培養後、トランスウェルインサートの底の細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、0.2%クリスタルバイオレットで染色した。ランダムに3顕微鏡野 (100x) で染色した細胞をカウントした。

スクラッチアッセイのために、HCT-116細胞を6ウェルプレートに 2×10^4 /ウェルの密度で播種した。細胞が100%コンフルエントになった後、プラスチックのピペットチップでウェルの中央を擦過し1mm幅の創傷ギャップを作成した。培地を捨て、1% FBSを含むDMEMを加え、続いてCMを1:1の割合で加えた。最終的なFBS濃度は0.5%であった。その後、細胞を37°Cで24時間培養し、0時間後と24時間後に位相差顕微鏡 (倍率40倍) を用いて創傷ギャップの画像を撮影した。

結 果

1. M0マクロファージとTAMにおけるOpn3発現

HCT-116結腸癌細胞のCMでM0マクロファージを培養し、M0マクロファージとTAMとのOpn3 mRNA発現量を調べた。M0マクロファージにおいてもOpn3 mRNAの発現を認めたが、TAMはさらに高いOpn3発現レベルを示した (P<0.05; 図2)。

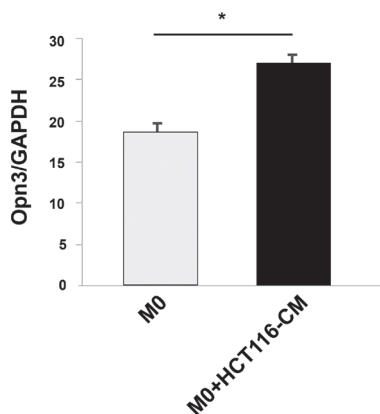


図2 M0マクロファージとTAMにおけるOpn3発現

2. 青色LED照射によるマクロファージの極性変化への影響

M2 マクロファージマーカーであるCD163 およびCD206 の mRNA 発現レベルは、M0 マクロファージと比較して、TAMで有意に上昇した ($P < 0.05$; 図3)。一方、青色LED光を照射したTAMでは、CD163とCD206 の mRNA 発現量が低下したことから、青色LED光はM2 マクロファージへの極性変化を抑制することが示唆された ($P < 0.05$; 図3)。

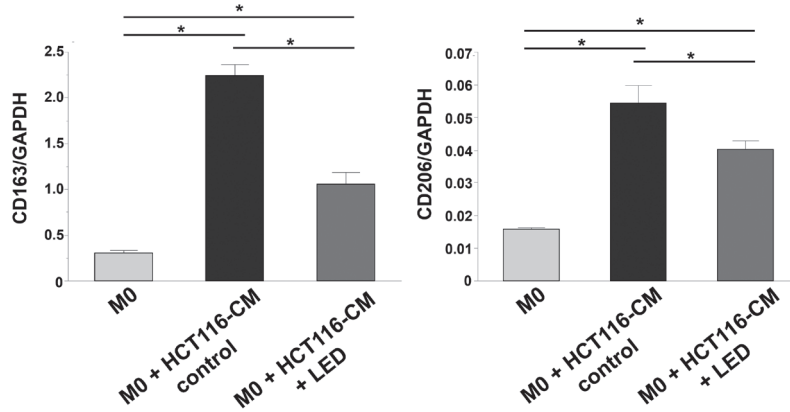


図3 青色LED光照射によるマクロファージの極性変化への影響

3. TAM-CMで培養したHCT-116細胞の遊走およびスクラッチアッセイ

HCT-116細胞をTAM-CMで培養し、遊走(図4A)およびスクラッチアッセイ(図4B)を行った。

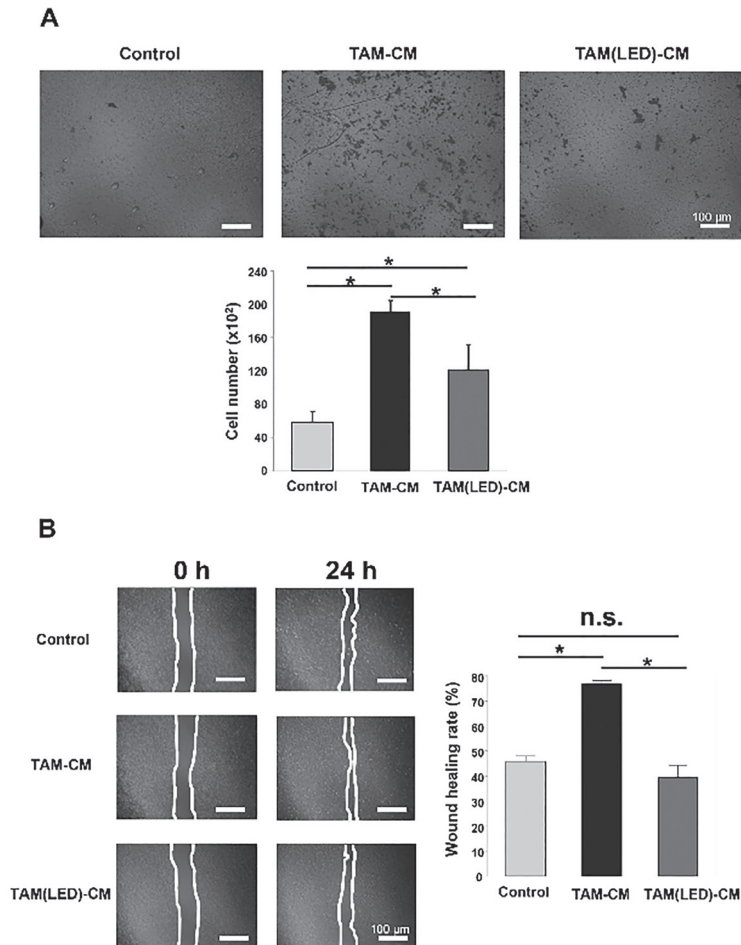


図4 TAM-CMで培養したHCT-116細胞の遊走およびスクラッチアッセイ

TAM-CMでの培養はHCT-116細胞の遊走を有意に促進した ($P < 0.05$)。しかし、青色光を照射したTAM由来のTAM-CMはHCT-116細胞の遊走を促進しなかった ($P < 0.05$)。

4. 青色LED照射がTAMからのVEGF分泌に与える影響

図5に示すように、VEGFの分泌濃度はM0マクロファージと比較してTAMで有意に上昇していた ($P < 0.05$)。しかし、LED光を照射したTAMでは、VEGFの分泌は有意に抑制された ($P < 0.05$)。

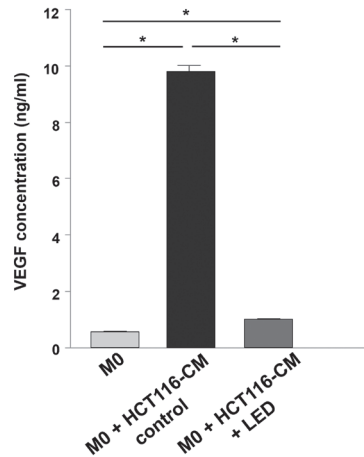


図5 青色LED光照射がTAMのVEGF分泌に与える影響

5. TAM-CMで培養したHCT-116細胞におけるPD-L1発現

TAM-CMで培養したHCT-116細胞では、コントロールのHCT-116細胞と比較してPD-L1のmRNA発現レベルが上昇した ($P < 0.05$; 図6)。しかし、青色LED光を照射したTAMのCMで培養したHCT-116細胞では、LED照射なしのTAM-CMで培養したHCT-116細胞と比較してPD-L1 mRNA発現上昇の程度は有意に抑制された ($P < 0.05$; 図6)。

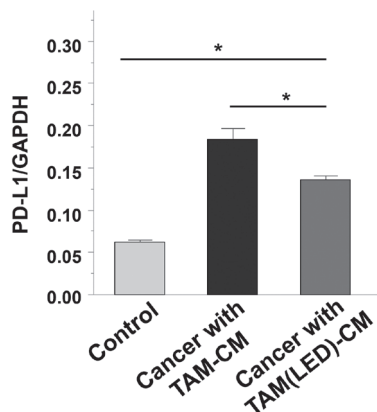


図6 TAM-CMで培養したHCT-116細胞におけるPD-L1発現

6. in vivoモデルにおける青色LED照射の効果

マウスモデルにおける大腸癌の腫瘍増殖は、青色LED光照射によって有意に抑制されることが腫瘍サイズの縮小によって示された ($P < 0.05$; 図7A)。免疫組織化学染色を行ったところ、青色LED光照射を受けた腫瘍では、PD-L1の発現レベルが抑制された (図7B)。さらに、青色LED光を照射した腫瘍では、F4/80およびCD163陽性細胞がコントロール群に比べて減少していた (図8)。無作為5視野のCD163陽性細胞領域を比較したところ、対照群と比較して照射群で有意な減少が観察された ($P < 0.05$)。

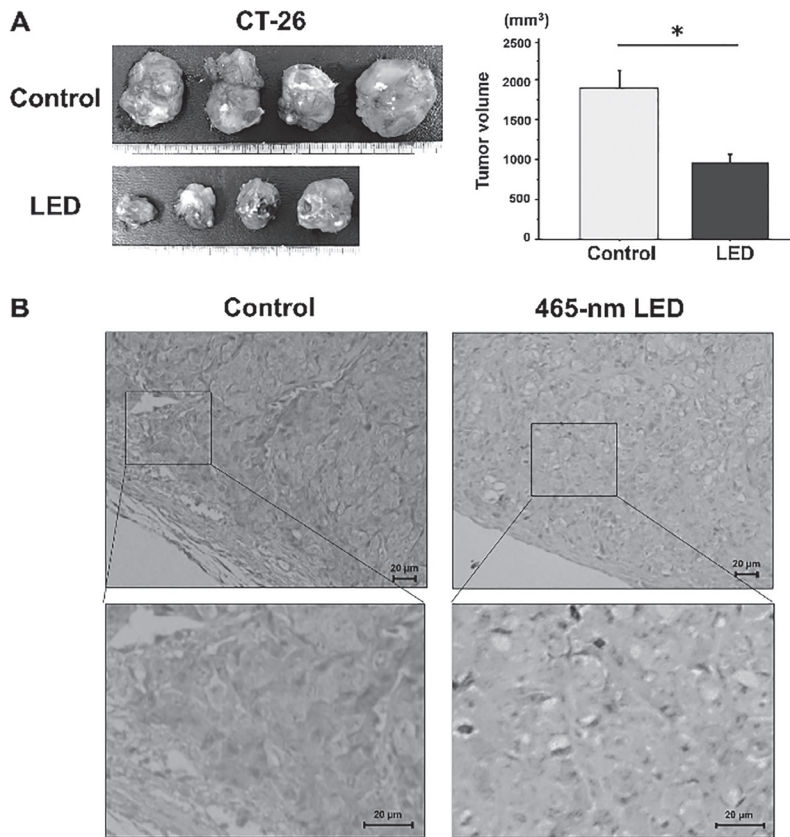


図7 in vivoモデルにおける青色LED光照射の効果

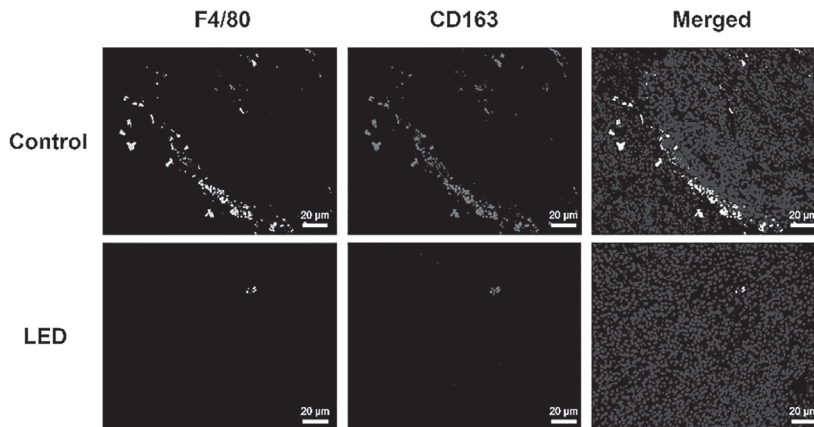


図8 LED光照射によるF4/80 およびCD163 陽性細胞の変化

考 察

最近の研究で、線維芽細胞や免疫細胞を含むTMEが、がん治療において極めて重要であることが示されている。我々は以前、青色LED光が腫瘍細胞だけでなくCAFにも抑制的に作用し、腫瘍の悪性度を低下させることを報告した¹⁴⁾。本研究では、青色LED光がTAMに及ぼす影響とさらにTMEに及ぼす影響について検討した。

その結果、青色LED光照射はM2マクロファージマーカーCD163とCD206の発現を低下させ、マクロファージのM2表現型への分極を抑制しうることが示された。さらに遊走アッセイにより、HCT-116細胞の遊走は、非LED光照射TAM由来のCMの存在下では促進されたが、LED光照射TAM由来のCMの存在下では有意に減少した。

我々は以前、TAMによるVEGF分泌が肝細胞癌の腫瘍悪性度上昇に重要な役割を果たしていることを報告した¹⁶⁾。本研究では、LED光を照射していないTAMではVEGFの分泌が観察されたが、LED光を照射したTAMでは有意に抑制された。さらに、TAM-CMで培養したHCT-116細胞はPD-L1の発現レベルの上昇を示したが、LED光を照射したTAM-CMで培養した細胞はPD-L1の発現誘導が抑制されていた。そのメカニズムとして、シグナル伝達兼転写活性化因子3 (signal transducer and activator of transcription 3: STAT3) は、M2マクロファージマーカーCD163とCD206の発現を制御することが報告されている¹⁷⁾。さらにSTAT3は、腫瘍細胞におけるVEGFを介した腫瘍の悪性度上昇とPD-L1発現に関与している¹⁸⁾。したがって、STAT3は、青色光がTAMと腫瘍細胞の両方に影響を与えるメカニズムにおいて重要な役割を果たしている可能性がある。

青色光を用いた治療の利点として、PDTや化学放射線療法と異なり光増感剤や抗体、抗癌剤の投与を必要とせず、放射線被曝もないことが挙げられる。また、がん治療においてTMEの制御が非常に重要であるが、最近TAMをターゲットとしたPDTについても報告されている¹⁹⁾。我々は、腫瘍のみならずCAFに対する青色LED光の効果も報告しており、TMEを標的とした青色光による光線療法の可能性を示唆している。さらに、Opn3はTAMにも発現しており、青色LED光が光受容体を介してTAMを抑制する可能性が示唆された。

腫瘍およびTMEに対する青色LED光照射の作用機序を完全に解明するには、今後マクロファージにおけるOpn3ノックダウンやOpn3ノックアウトマウスを用いた研究が必要であるが、本研究により青色LED光照射がTAMの分極化やVEGF分泌を抑制し、さらに腫瘍悪性度を低下させることが示された(図9)。

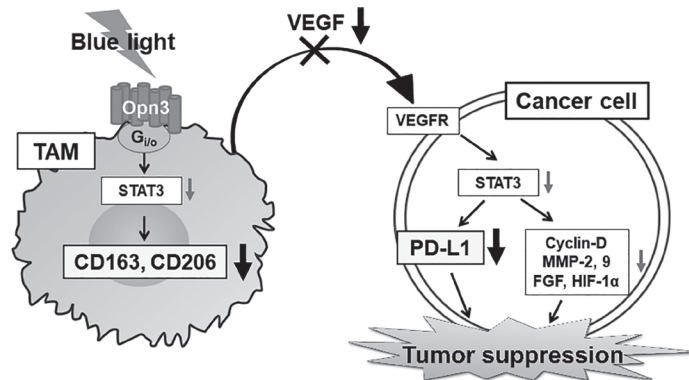


図9 青色LED光照射によるTAM制御のメカニズム

おわりに

本研究によって、増え続ける大腸癌に対する新たな低侵襲治療として、青色LED光による腫瘍及び腫瘍微小環境制御の可能性が示された。今後も研究を進め、光治療の臨床応用を目指したい。

本研究においてご指導いただきました島田教授をはじめ、教室の皆様にご心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Hatakeyama T, Murayama Y, Komatsu S, et al. Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colon cancer cells. *Oncology reports*. **29** (3): 911-6, 2013.
- 2) Hodgkinson N, Kruger CA, Abrahamse H. Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells. *Tumor Biology*. **39**(10): 1010428317734691, 2017.

- 3) Oh P-S, Hwang H, Jeong H-S, et al. Blue light emitting diode induces apoptosis in lymphoid cells by stimulating autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology*. **70**: 13-22, 2016.
- 4) del Olmo-Aguado S, Núñez-Álvarez C, Osborne NN. Blue light action on mitochondria leads to cell death by necroptosis. *Neurochemical research*. **41**(9): 2324-35, 2016.
- 5) Oh P-S, Na KS, Hwang H, et al. Effect of blue light emitting diodes on melanoma cells: involvement of apoptotic signaling. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. **142**: 197-203, 2015.
- 6) Sparsa A, Faucher K, Sol V, et al. Blue light is phototoxic for B16F10 murine melanoma and bovine endothelial cell lines by direct cytotoxic effect. *Anticancer research*. **30**(1): 143-7, 2010.
- 7) Yan G, Zhang L, Feng C, et al. Blue light emitting diodes irradiation causes cell death in colorectal cancer by inducing ROS production and DNA damage. *The international journal of biochemistry & cell biology*. **103**: 81-8, 2018.
- 8) Yoshimoto T, Morine Y, Takasu C, et al. Blue light - emitting diodes induce autophagy in colon cancer cells by Opsin 3. *Annals of gastroenterological surgery*. **2**(2): 154-61, 2018.
- 9) Koyanagi M, Takada E, Nagata T, et al. Homologs of vertebrate Opn3 potentially serve as a light sensor in nonphotoreceptive tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **110**(13): 4998-5003, 2013.
- 10) Terakita A, Nagata T. Functional properties of opsins and their contribution to light-sensing physiology. *Zoological science*. **31**(10): 653-9, 2014.
- 11) Koyanagi M, Takada E, Nagata T, et al. Homologs of vertebrate Opn3 potentially serve as a light sensor in nonphotoreceptive tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **110**(13): 4998-5003, 2013.
- 12) Jiao J, Hong S, Zhang J, et al. Opsin3 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to 5-fluorouracil treatment by regulating the apoptotic pathway. *Cancer letters*. **320**(1): 96-103, 2012.
- 13) de Assis L, Moraes M, da Silveira Cruz-Machado S, et al. The effect of white light on normal and malignant murine melanocytes: a link between opsins, clock genes, and melanogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. **1863**(6): 1119-33, 2016.
- 14) Yoshimoto T, Shimada M, Tokunaga T, et al. Blue light irradiation inhibits the growth of colon cancer and activation of cancer associated fibroblasts. *Oncology Reports*. **47**(5): 1-9, 2022 May 1.
- 15) Livak KJ and Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**: 402-8, 2001.
- 16) Okikawa S, Morine Y, Saito Y, et al. Inhibition of the VEGF signaling pathway attenuates tumor-associated macrophage activity in liver cancer. *Oncology reports*. **47**(4): 1-1, 2022 Apr 1.
- 17) Gharibi, T., Babaloo, Z., Hosseini, A., et al. Targeting STAT3 in cancer and autoimmune diseases. *European journal of pharmacology*, **878**: 173107, 2020.
- 18) De Beule, N., De Veirman, K., Maes, K., et al. Tumour-associated macrophage-mediated survival of myeloma cells through STAT3 activation. *The Journal of Pathology*, **241.4**: 534-46, 2017.
- 19) Soyama, T., Sakuragi, A., Oishi, D., et al. Photodynamic therapy exploiting the anti-tumor activity of mannose-conjugated chlorin e6 reduced M2-like tumor-associated macrophages. *Translational oncology*, **14.2**: 101005, 2021.

研究経過報告書執筆要項

- (1) 研究記録集出版のため、下記の基準で論文（日本文）を作成して下さい。

要 旨	400字 × 1枚
本 文	400字 × 10枚
写真・図表	10枚以内（写真はモノクロ、図表は Microsoft PowerPoint, Excel）
引用文献	10位

- (2) 標準形式（Microsoft Word, CSV, テキスト）または PDF 形式（文字の取り出しが可能な形式）で保存し、電子メール（soumu@jfmc.or.jp）に添付、または、メモリーカード等の外部メディアに記録してご提出ください。
- (3) 薬品の商品名（欧文）は大文字、学名、一般名は小文字で記載下さい。
- (4) 数字は算用数字を用い、度量衡単位は CGS 単位で m, cm, mm, cm², ml, l, dl, kg, g, mg などとして下さい。
- (5) 写真は手札型以上の大きさと鮮明であること、文字や矢印を記号する場合はトレーシングペーパーをかけた上に明記して下さい。
- (6) 原稿は原則として返却いたしません。写真、図などで返却を要するものにはその旨明記して下さい。
- (7) 文献は本文中に引用されたもののみをあげて下さい。本文中の引用個所には肩番号を付して下さい。
- (8) 文献の書き方は次のように統一して下さい。

引用文献、著者名は3人まで記し、それ以上は「他」「et al」として下さい。

外国文献の記載形式は Index Medicus 所載に準じて下さい。

雑誌の場合→引用番号) 著者名：論文題名、雑誌名、巻数、頁数（西暦年号）

単行本の場合→引用番号) 著者名：論文題名、書名（編者名）、版、頁、発行所名、発行地、（西暦年号）

- 例 1) 田口鐵男, 古江 尚, 塚越 茂, 他：胃癌の化学療法. 癌と化学療法 7(12) : 109-14, 1980.
- 2) 幕内雅敏, 長谷川博, 山崎 晋：肝細胞癌の早期診断法. ウィルス肝炎から肝細胞癌へ（服部 信編）, 第2版, 309-28, 癌と化学療法社, 東京, 1982.
- 3) Umezawa H, Aoyagi T, Suda H, et al: Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by Actinomycetes. *J. Antibiotics* 29: 97-9, 1976.
イタリック

- (9) 文頭は、はじめにではじまり、おわりにで結ぶ。
- (10) 論文は要旨－はじめに－（対象－方法－成績）－考按－おわりに－文献－表－図の説明－図の順に原稿を構成して下さい。図および表には文中に出る順番に番号を付して下さい。
- (11) 項目は次のような記号を用います。

I. …… 1. …… 1) …… a

- (12) 原稿には表紙を付し、表題、著者名、所属、機関名、原稿枚数、図表点数を明記して下さい。

一般研究助成者一覧(発刊年度)

- 1981 浅野長一郎 (九州大学理学部) 東 市郎 (北海道大学免疫科学研究所)
(1巻) 天木 一太 (日本大学医学部) 太田 和雄 (愛知県がんセンター)
加藤 哲郎 (秋田大学医学部) 須賀 昭二 (国立名古屋病院)
関口 守正 (東京大学医科学研究所) 高見沢裕吉 (千葉大学医学部)
寺尾 榮夫 (東京都立駒込病院) 西 満正 (鹿児島大学医学部)
野本亀久雄 (九州大学医学部) 棟久 龍夫 (長崎大学医学部)
母里 知之 (東海大学医学部) 森 武貞 (大阪大学医学部)
吉田 修 (京都大学医学部) 涌井 昭 (東北大学抗酸菌病研究所)
- 1982 浅野長一郎 (九州大学理学部) 井村 裕夫 (京都大学医学部)
(2巻) 海老名卓三郎 (東北大学医学部) 古賀 成昌 (鳥取大学医学部)
小山 博記 (大阪府立成人病センター) 志田 圭三 (群馬大学医学部)
友田 豊 (名古屋大学医学部) 中西 昌美 (北海道大学医学部)
新島 端夫 (東京大学医学部) 馬場 恒男 (九州大学生体防御医学研究所)
藤本 孟男 (愛知医科大学) 細川真澄男 (北海道大学医学部)
松澤 大樹 (東北大学抗酸菌病研究所) 松田 忠義 (東京都立駒込病院)
三好 勇夫 (高知医科大学)
- 1983 池田 恵一 (九州大学医学部) 石引 久弥 (慶應義塾大学医学部)
(3巻) 木村 郁郎 (岡山大学医学部) 桑野 信彦 (大分医科大学)
菅原 克彦 (山梨医科大学) 高久 史磨 (東京大学医学部)
橋 武彦 (東北大学抗酸菌病研究所) 螺良 英郎 (徳島大学医学部)
西平 哲郎 (東北大学医学部) 野村 雍夫 (国立病院九州がんセンター)
藤原 大美 (大阪大学医学部) 前田 浩 (熊本大学医学部)
三橋 重信 (久留米大学医学部) 谷内 昭 (札幌医科大学)
山本三毅夫 (九州大学生体防御医学研究所)
- 1984 大西 克尚 (九州大学医学部) 小野寺時夫 (東京都立駒込病院)
(4巻) 折田 薫三 (岡山大学医学部) 藏本 淳 (広島大学原爆放射能医学研究所)
小磯 謙吉 (筑波大学臨床医学系) 杉町 圭藏 (九州大学医学部)
関根 暉彬 (国立がんセンター研究所) 高月 清 (熊本大学医学部)
塚田 裕 (北海道大学医学部) 鶴尾 隆 (癌研・癌化学療法センター)
原 泰寛 (国立病院九州がんセンター) 福西 亮 (愛媛大学医学部)
前山 巖 (鳥取大学医学部) 水落 次男 (東京大学医科学研究所)
山田 一正 (名古屋大学医学部)
- 1985 犬山 征夫 (慶應義塾大学医学部) 北村 幸彦 (大阪大学医学部附属癌研究施設)
(5巻) 小玉 正智 (滋賀医科大学) 小林 利次 (産業医科大学)

- 1985 佐々木琢磨 (国立がんセンター)
(5巻) 田中 正夫 (国立名古屋病院血液病センター)
中村 徹 (福井医科大学)
原 耕平 (長崎大学医学部)
藤田 昌英 (大阪大学微生物病研究所)
松谷 雅生 (東京都立駒込病院)
吉田 孝人 (浜松医科大学)
- 1986 内野 治人 (京都大学医学部)
(6巻) 岡部 哲郎 (東京大学医学部)
狩野 恭一 (東京大学医科学研究所)
久保田哲朗 (慶應義塾大学医学部)
坂井 保信 (東京都立駒込病院)
曾根 三郎 (徳島大学医学部)
田中 敬正 (関西医科大学)
橋本 省三 (慶應義塾大学医学部)
浜岡 利之 (大阪大学医学部附属癌研究施設)
- 1987 市橋 秀仁 (藤田学園保健衛生大学医学部)
(7巻) 奥村 康 (順天堂大学医学部)
勝沼 信彦 (徳島大学酵素科学研究センター)
金沢 浩二 (新潟大学医学部)
佐藤 周子 (愛知県がんセンター)
高本 滋 (東京都立駒込病院)
中村 仁信 (大阪大学微生物病研究所)
松本 圭史 (大阪大学医学部)
山口 豊 (千葉大学医学部肺癌研究施設)
- 1988 秋山 伸一 (鹿児島大学医学部附属腫瘍研究施設)
(8巻) 阿部 達生 (京都府立医科大学)
上田 政和 (慶應義塾大学医学部)
小川 恭弘 (高知医科大学)
神奈木玲児 (京都大学医学部)
今 充 (弘前大学医学部)
笹月 健彦 (九州大学生体防御医学研究所)
徳永 徹 (国立予防衛生研究所)
馬場 正三 (浜松医科大学)
- 1989 阿曾 佳郎 (東京大学医学部)
(9巻) 今井 浩三 (札幌医科大学)
- 仙道富士郎 (山形大学医学部)
鳥巢 要道 (九州大学医学部)
新本 稔 (広島大学原爆放射能医学研究所)
原田 実根 (金沢大学医学部)
穂積 本男 (埼玉県立がんセンター研究所)
御厨 修一 (国立病院医療センター)
- 大野 竜三 (名古屋大学医学部)
片野 建之 (癌研・癌化学療法センター)
木村 元喜 (九州大学生体防御医学研究所)
熊本 悦明 (札幌医科大学)
珠玖 洋 (長崎大学医学部)
田中 信男 (東京大学応用微生物研究所)
西田 輝夫 (近畿大学医学部)
羽生富士夫 (東京女子医科大学消化器病センター)
前田 迪郎 (鳥取大学医学部)
大森 弘之 (岡山大学医学部)
小黒 昌夫 (千葉県がんセンター)
加藤 四郎 (大阪大学微生物病研究所)
坂本 純一 (愛知県がんセンター)
鈴木 磨郎 (東北大学抗酸菌病研究所)
峠 哲哉 (広島大学原爆放射能医学研究所)
正岡 徹 (大阪府立成人病センター)
宮崎 保 (北海道大学医学部)
吉田 奎介 (新潟大学医学部)
浅野 茂隆 (東京大学医科学研究所)
今岡 真義 (大阪府立成人病センター)
江藤 澄哉 (産業医科大学)
鎌田 七男 (広島大学原爆放射能医学研究所)
小山 研二 (秋田大学医学部)
斎藤 正男 (東京大学医学部)
谷川 允彦 (福井医科大学)
富永 健 (東京都立駒込病院)
平野 正美 (藤田学園保健衛生大学医学部)
石川 哮 (熊本大学医学部)
岩永 剛 (大阪府立成人病センター)

- 1989 上田 龍三 (愛知県がんセンター研究所) 太田 康幸 (愛媛大学医学部)
(9巻) 岡田 秀親 (名古屋市立大学医学部分子医学研究所) 小川 道雄 (大阪大学医学部)
掛川 暉夫 (久留米大学医学部) 加藤 知行 (愛知県がんセンター)
金子 明博 (国立がんセンター病院) 齊藤 博 (埼玉医科大学総合医療センター)
澤木 修二 (横浜市立大学医学部) 高上 洋一 (徳島大学医学部)
中村 治 (東京都立駒込病院) 藤本 重義 (高知医科大学)
町田喜久雄 (埼玉医科大学総合医療センター) 松野 正紀 (東北大学医学部)
- 1990 荒井 保明 (愛知県がんセンター) 宮本 幸男 (群馬大学医学部)
(10巻) 入野 昭三 (香川医科大学) 遠藤 光夫 (東京医科歯科大学医学部附属病院)
小倉 剛 (徳島大学医学部) 菅 典道 (京都大学医学部附属病院)
木谷 照夫 (大阪大学微生物病研究所) 池田 昌弘 (順天堂大学医学部)
島津 久明 (鹿児島大学医学部) 田中 隆一 (新潟大学脳研究所)
土橋 一慶 (帝京大学医学部) 中島 泉 (名古屋大学医学部)
新津洋司郎 (札幌医科大学) 西村 泰治 (九州大学生体防御医学研究所)
垣生 園子 (東海大学医学部) 原 信之 (国立病院九州がんセンター)
藤本 孟男 (愛知医科大学) 前原 喜彦 (九州大学医学部)
水谷 修紀 (国立小児医療研究センター)
- 1991 秋吉 毅 (九州大学生体防御医学研究所) 安藤 俊夫 (愛知県がんセンター研究所)
(11巻) 小川 秋實 (信州大学医学部) 小熊 信夫 (広島大学原爆放射能医学研究所)
小越 章平 (高知医科大学) 加藤 洋 (癌研・癌研究所)
木村幸三郎 (東京医科大学) 河野 公俊 (大分医科大学)
佐治 重豊 (岐阜大学医学部) 鈴木 敏 (山口大学医学部)
田中 良明 (東京都立駒込病院) 平井 久丸 (東京大学医学部)
藤永 蕙 (札幌医科大学附属がん研究所) 真崎 規江 (大阪府立成人病センター)
麦島 秀雄 (日本大学医学部) 山内 晶司 (名古屋大学医学部)
山口 俊晴 (京都府立医科大学) 由良 二郎 (名古屋市立大学医学部)
- 1992 赤沢 修吾 (埼玉県立がんセンター) 秋根 康之 (国立がんセンター中央病院)
(12巻) 貝原 信明 (鳥取大学医学部) 兼松 隆之 (長崎大学医学部)
河村 栄二 (北里研究所病院) 菊池 潔 (助慶應がんセンター)
木本 安彦 (大阪大学微生物病研究所附属病院) 葛巻 暹 (北海道大学医学部附属癌研究施設)
琴浦 良彦 (京都大学医学部) 斎藤 貴生 (大分医科大学)
澤武 紀雄 (金沢大学がん研究所) 設楽 信行 (東京都立駒込病院)
柴田 昭 (新潟大学医学部) 土井 修 (大阪府立成人病センター)
奈良 信雄 (東京医科歯科大学医学部) 西村 孝司 (東海大学医学部)
山下 純宏 (金沢大学医学部) 吉開 泰信 (名古屋大学医学部病態制御研究施設)
- 1993 阿部 力哉 (福島県立医科大学) 大熨 泰亮 (岡山大学医学部)

- 1993 片山 憲特 (聖マリアンナ医科大学)
(13卷) 栗原 稔 (昭和大学附属豊洲病院)
藪田 精昭 (京都府立医科大学)
武市 紀年 (北海道大学医学部附属癌研究施設)
土田 嘉昭 (東京大学医学部)
富田 幹夫 (埼玉県立がんセンター研究所)
濱田 洋文 (癌研・癌化学療法センター)
平岡 真寛 (京都大学医学部)
吉田 松年 (名古屋大学医学部病態制御研究施設)
- 1994 相羽 恵介 (癌研・癌化学療法センター)
(14卷) 今村 正之 (京都大学医学部)
折笠 精一 (東北大学医学部)
小柳 知彦 (北海道大学医学部)
清木 元治 (金沢大学がん研究所)
直江 知樹 (名古屋大学医学部附属病院)
浜口 道成 (名古屋大学医学部)
藤本 修一 (千葉県がんセンター)
山崎 俊樹 (島根医科大学)
- 1995 岡本 尚 (名古屋市立大学医学部分子医学研究所)
(15卷) 佐藤忠比古 (国立郡山病院)
嶋田 紘 (横浜市立大学医学部)
田中 公夫 (広島大学原爆放射能医学研究所)
花井 彩 (大阪府立成人病センター)
磨伊 正義 (金沢大学がん研究所)
森 茂郎 (東京大学医科学研究所)
和氣 徳夫 (九州大学生体防御医学研究所)
- 1996 有井 滋樹 (京都大学医学研究科)
(16卷) 伊東 恭悟 (久留米大学医学部)
小澤 敬也 (自治医科大学血液医学研究部門)
佐藤 靖史 (東北大学加齢医学研究所)
杉本 芳一 (癌研・癌化学療法センター)
多羅尾和郎 (神奈川県立がんセンター)
三角 順一 (大分医科大学医学部)
山脇 成人 (広島大学医学部)
- 1997 西條 長宏 (国立がんセンター研究所)
(17卷) 瀬戸 加大 (愛知県がんセンター研究所)
- 北島 政樹 (慶應義塾大学医学部)
小池 克郎 (癌研・癌研究所)
高見 博 (帝京大学医学部)
谷村 弘 (和歌山県立医科大学)
戸井 雅和 (東京都立駒込病院)
中村 恭一 (東京医科歯科大学医学部)
平岡 諦 (大阪府立成人病センター)
堀 勝義 (東北大学加齢医学研究所)
- 池田 恢 (国立がんセンター中央病院)
岡田 全司 (九州大学生体防御医学研究所)
菊地 浩吉 (札幌医科大学医学部)
杉本 徹 (宮崎医科大学)
田中 憲一 (新潟大学医学部)
新田 泰三 (順天堂大学医学部)
松崎 靖司 (筑波大学臨床医学系)
柳澤 昭夫 (癌研・癌研究所)
吉田 操 (東京都立駒込病院)
- 後藤 重則 (帝京大学生物工学研究センター)
佐藤 宏 (帝京大学医学部)
田崎 寛 (慶應義塾大学医学部)
中村 剛 (長崎大学医療技術短期大学部)
藤田 潤 (京都大学大学院医学研究科)
間野 博行 (自治医科大学医学部)
柳川 堯 (九州大学大学院数理学研究科)
- 石川 治 (大阪府立成人病センター)
大川 治夫 (筑波大学臨床医学系)
酒井 正彦 (関西電力病院)
執印 太郎 (高知医科大学)
谷 憲三朗 (東京大学医科学研究所)
松村 保広 (国立がんセンター中央病院)
宮崎 澄雄 (佐賀医科大学医学部)
吉村 昭彦 (久留米大学生命科学研究科)
神保 孝一 (札幌医科大学)
田中 雅夫 (九州大学医学部)

- 1997 丹後 俊郎 (国立公衆衛生院疫学部)
(17巻) 中川原 章 (千葉県がんセンター)
堀井 明 (東北大学大学院医学系研究科)
- 1998 小山 博史 (国立がんセンター中央病院)
(18巻) 高後 裕 (旭川医科大学)
巽 典之 (大阪市立大学医学部)
名川 弘一 (東京大学医学部)
萩原 正敏 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)
不破 信和 (愛知県がんセンター)
村井 勝 (慶應義塾大学医学部)
矢守 隆夫 (癌研・癌化学療法センター)
- 1999 井上 俊彦 (大阪大学大学院)
(19巻) 大瀧 慈 (広島大学原爆放射能医学研究所)
河上 裕 (慶應義塾大学医学部先端医科学研究所)
高山 哲治 (札幌医科大学)
土田 正則 (新潟大学医学部)
万代 昌紀 (京都大学医学部)
森脇 久隆 (岐阜大学医学部)
渡邊 武 (九州大学生体防御医学研究所)
- 2000 井上 正樹 (金沢大学医学部)
(20巻) 河野 文夫 (国立熊本病院)
久保 敦司 (慶應義塾大学医学部)
佐藤 博 (金沢大学がん研究所)
中野 修治 (九州大学大学院)
福本 学 (東北大学加齢医学研究所)
山口 佳之 (広島大学原爆放射能医学研究所)
吉田 知之 (東京医科大学)
- 2001 秋山 太 (癌研・癌研究所)
(21巻) 片野 光男 (九州大学大学院)
澤津橋基広 (佐賀医科大学)
田原 秀晃 (東京大学医科学研究所)
辻 晃仁 (高知県立中央病院)
野島 博 (大阪大学微生物病研究所)
村垣 善浩 (東京女子医科大学脳神経センター)
若杉 尋 (国立がんセンター研究所)
- 2002 秋田 弘俊 (北海道大学大学院)
- 手島 昭樹 (大阪大学医学部)
野田 哲生 (癌研・癌研究所)
松山 裕 (東京大学大学院医学系研究科)
烏野 隆博 (大阪府立成人病センター)
佐藤 昇志 (札幌医科大学医学部)
中島 秀彰 (国立病院九州がんセンター)
登 勉 (三重大学医学部)
島 清彦 (自治医科大学)
前谷 俊三 (天理よろず相談所医学研究所)
安元 公正 (産業医科大学医学部)
- 大上 研二 (東海大学医学部)
加賀谷有行 (広島大学医学部)
真貝 洋一 (京都大学ウイルス研究所)
田中 淳司 (北海道大学医学部)
野田 政樹 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)
向田 直史 (金沢大学がん研究所)
吉貴 達寛 (滋賀医科大学)
- 奥野 清隆 (近畿大学医学部)
神奈木真理 (東京医科歯科大学医歯学総合研究科)
小西 文雄 (自治医科大学大宮医療センター)
田中 紘一 (京都大学大学院)
樋野 興夫 (癌研・癌研究所)
松村 明 (筑波大学臨床医学系)
吉川 秀樹 (大阪大学大学院)
- 東 俊文 (慶應義塾大学医学部)
小林 国彦 (埼玉県立がんセンター)
高橋 宗春 (東京大学医学部附属病院)
玉木 長良 (北海道大学大学院)
中島 格 (久留米大学医学部)
松崎 彰信 (九州大学医療技術短期大学部)
山本 博幸 (札幌医科大学)
- 遠藤 善裕 (滋賀医科大学)

- 2002 鎌野 俊紀 (順天堂大学医学部)
 (22卷) 黄 政龍 (香川医科大学)
 高橋 豊 (金沢大学がん研究所)
 平塚 正弘 (大阪府立成人病センター)
- 2003 上本 伸二 (三重大学医学部)
 (23卷) 神田 善伸 (東京大学医学部)
 河野 浩二 (山梨大学医学部)
 檜原 啓之 (大阪府立成人病センター)
 堀口 裕 (慶應義塾大学医学部)
- 2004 魚住 公治 (鹿児島大学病院)
 (24卷) 清宮 啓之 (癌研・癌化学療法センター)
 田中 文啓 (京都大学医学部)
 古谷 和久 (愛知県がんセンター)
 森 正樹 (九州大学生体防御医学研究所)
- 2005 熊谷 昌明 (国立成育医療センター)
 (25卷) 國土 典宏 (東京大学医学部附属病院)
 並木 幹夫 (金沢大学医学部附属病院)
 長谷川好規 (名古屋大学医学部附属病院)
 林 慎一 (東北大学医学部)
- 2006 泉本 修一 (大阪大学大学院)
 (26卷) 太田 三徳 (近畿中央胸部疾患センター)
 小林 浩 (奈良県立医科大学)
 澤田 明久 (大阪府立母子保健総合医療センター)
 福岡 和也 (兵庫医科大学)
- 2007 磯本 一 (長崎大学医学部・歯学部附属病院)
 (27卷) 馬屋原健司 (癌研・有明病院)
 篠浦 伸禎 (東京都立駒込病院)
 高見 昭良 (金沢大学医学部附属病院)
- 2008 掛地 吉弘 (九州大学大学院)
 (28卷) 新地 洋之 (鹿児島大学大学院)
 松村 保広 (国立がんセンター東病院)
 吉崎 智一 (金沢大学大学院)
- 2009 出水みいる (九州大学病院)
 (29卷) 塚田 敬義 (岐阜大学大学院)
 長谷川 潔 (東京大学大学院)
 本田 五郎 (東京都立駒込病院)
- 小泉和三郎 (北里大学東病院)
 高橋 慶一 (東京都立駒込病院)
 戸田 正博 (慶應義塾大学医学部)
- 小野寺雅史 (筑波大学臨床医学系)
 弦間 昭彦 (日本医科大学)
 杉山 徹 (岩手医科大学医学部)
 平井 康夫 (癌研・癌研究所)
- 河野 嘉文 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)
 高山 浩一 (九州大学病院)
 中島 淳 (慶應義塾大学医学部)
 星 宣次 (山形県立中央病院)
 山本 昇 (国立がんセンター中央病院)
 甲能 直幸 (杏林大学医学部)
 土屋 弘行 (金沢大学大学院)
 萩原 弘一 (埼玉医科大学)
 羽生 大記 (大阪市立大学大学院)
 日野 雅之 (大阪市立大学大学院)
 井上 啓史 (高知大学医学部)
 大東 弘明 (大阪府立成人病センター)
 佐治 重衡 (東京都立駒込病院)
 竹内 聡 (神戸医療センター)
 藤井 正人 (東京医療センター)
 上野 清伸 (大阪府立成人病センター)
 椎名秀一朗 (東京大学医学部附属病院)
 新地 洋之 (鹿児島大学医学部・歯学部附属病院)
 細野 亜古 (国立がんセンター中央病院)
 粕谷 英樹 (名古屋大学医学部)
 竹島 信宏 (癌研・有明病院)
 元雄 良治 (金沢医科大学)
 渡邊 昌彦 (北里大学医学部)
 高野 晋吾 (筑波大学大学院)
 中森 正二 (大阪医療センター)
 服部 豊 (慶應義塾大学薬学部)
 宮田 博志 (大阪大学大学院)

- 2010 東 治人 (大阪医科大学)
(30卷) 庄 雅之 (奈良県立医科大学)
谷 眞至 (和歌山県立医科大学)
藤原 義之 (大阪大学大学院)
- 2011 江口 英利 (大阪大学大学院医学系研究科)
(31卷) 堤 莊一 (群馬大学大学院医学系研究科)
本告 正明 (大阪府立成人病センター)
宮田 義浩 (広島大学原爆放射線医学科学研究所)
山下 継史 (北里大学医学部)
- 2012 浦本 秀隆 (産業医科大学)
(32卷) 小西 毅 (がん研究会有明病院)
澤木 正孝 (愛知県がんセンター中央病院)
谷岡 真樹 (兵庫県立がんセンター)
松木 絵里 (慶應義塾大学病院)
- 2013 井上 啓史 (高知大学教育研究部)
(33卷) 河合 憲康 (名古屋市立大学大学院医学研究科)
黒川 幸典 (大阪大学大学院医学系研究科)
島崎 猛夫 (金沢医科大学総合医学研究所)
野尻 俊輔 (名古屋市立大学病院)
- 2014 木下 学 (大阪府立成人病センター)
(34卷) 小西 毅 (がん研究会有明病院)
高橋 信 (東北大学加齢医学研究所)
富田 直人 (横浜市立大学大学院医学研究科)
南谷 泰仁 (東京大学医学部附属病院)
- 2015 石山 博條 (北里大学医学部)
(35卷) 里井 壯平 (関西医科大学)
高張 大亮 (がん研究会有明病院)
西田 純幸 (大阪大学医学部附属病院)
水島 恒和 (大阪大学大学院医学系研究科)
- 2016 伊佐山浩通 (東京大学大学院医学系研究科)
(36卷) 佐伯 浩司 (九州大学大学院)
瀧口 修司 (大阪大学医学系研究科)
前田 亮 (藤田保健衛生大学)
- 2017 秋田 裕史 (大阪国際がんセンター)
(37卷) 神田 光郎 (名古屋大学医学部附属病院)
馬場 祥史 (熊本大学大学院生命科学研究部)
- 石川 剛 (京都府立医科大学)
楯 真一 (千葉大学大学院)
津田 浩史 (慶應義塾大学医学部)
山口 和也 (岐阜大学医学部)
菊地 栄次 (慶應義塾大学医学部)
藤谷 和正 (国立病院機構大阪医療センター)
宮田 康好 (長崎大学病院)
元井 冬彦 (東北大学病院)
葛西 和博 (岩手医科大学医学部)
佐藤 康史 (札幌医科大学)
高橋 秀典 (大阪府立成人病センター)
本間 尚子 (東京都健康長寿医療センター研究所)
村上 英樹 (金沢大学整形外科)
沖 英次 (九州大学病院)
北郷 実 (慶應義塾大学医学部)
笹田 哲朗 (久留米大学医学部)
種村 匡弘 (呉医療センター・中国がんセンター)
丸橋 繁 (大阪府立成人病センター)
小坂 威雄 (慶應義塾大学医学部)
末原 義之 (順天堂大学医学部)
谷内 恵介 (高知大学医学部附属病院)
中前 博久 (大阪市立大学大学院医学研究科)
長谷川大一郎 (兵庫県立こども病院)
板野 理 (慶應義塾大学医学部)
白石 治 (近畿大学医学部)
内藤 立暁 (静岡県立静岡がんセンター)
林 洋光 (熊本大学大学院生命科学研究部)
小沼 貴晶 (東京大学医科学研究所附属病院)
杉村啓二郎 (大阪府立成人病センター)
藤阪 保仁 (大阪医科大学附属病院)
若槻 尊 (がん研究会有明病院)
泉 浩二 (金沢大学大学院医薬保健学総合研究科)
野見 武男 (奈良県立医科大学)

- 2018 池上 徹 (九州大学病院)
 (38卷) 立石 健祐 (横浜市立大学大学院医学研究科)
 畠 達夫 (東北大学大学院医学系研究科)
- 2019 北郷 実 (慶應義塾大学医学部)
 (39卷) 杉町 圭史 (九州がんセンター)
 田辺 真彦 (東京大学医学部附属病院)
- 2020 岩槻 政晃 (熊本大学大学院)
 (40卷) 高森 信吉 (九州がんセンター)
 森根 裕二 (徳島大学大学院医歯薬学研究部)
〔がん薬物療法部門〕
- 2021 今井 克憲 (熊本大学大学院)
〔がん薬物療法部門〕
 (41卷) 富樫 庸介 (岡山大学学術研究院医歯薬学域)
〔がん薬物療法部門〕
 吉見 昭秀 (国立がん研究センター 研究所)
〔がん薬物療法部門〕
- 2022 熊谷 尚悟 (国立がん研究センター 先端医療開発センター)
〔がん薬物療法部門〕
 (42卷) 林 洋光 (熊本大学病院)
〔がん薬物療法部門〕
 山本 美穂 (東海大学医学部)
- 後藤太一郎 (山梨県立中央病院)
 谷口 浩二 (慶応義塾大学医学部)
 増田 隆明 (九州大学病院別府病院)
 佐藤 和秀 (名古屋大学高等研究院・名古屋大学大学院医学系研究科)
 高野 重紹 (千葉大学大学院医学研究院)
 宮本 裕士 (熊本大学病院)
 庄司 文裕 (九州医療センター)
 廣野 誠子 (和歌山県立医科大学)
- 〔がん薬物療法部門〕
 北沢 将人 (信州大学医学部附属病院)
〔がん薬物療法部門〕
 間野 洋平 (九州がんセンター)
〔医療機器部門〕
 豊川 剛二 (福岡病院)
〔がん薬物療法部門〕
 高見 浩数 (東京大学医学部附属病院)
〔がん薬物療法部門〕
 春木孝一郎 (東京慈恵会医科大学)
〔医療機器部門〕
 橋本 浩平 (がん研究会有明病院)

がん治療のあゆみ 第43巻

2024年3月31日 発行

非売品

発行人 公益財団法人
がん集学的治療研究財団
山岸久一

お問い合わせは下記にお願いいたします。
〒136-0071 東京都江東区亀戸1-38-4
朝日生命江東ビル3階
電話 (03)5627-7593

印刷所 (株)叡川印刷

本書の内容の一部あるいは全部を無断で、複写機器等いかなる方法によっても複写・複製することは、法律で認められた場合を除き、著作権および出版者の権利の侵害になりますので、予め小社の許諾を求めて下さい。