

主論文の要旨

**Meflin-positive cancer-associated fibroblasts enhance  
tumor response to immune checkpoint blockade**

（メフリン陽性がん関連線維芽細胞は免疫チェック  
ポイント阻害の抗腫瘍効果を増強する）

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
臨床医薬学講座 化学療法学分野

（指導：安藤 雄一 教授）

宮井 雄基

## 【緒言】

がん関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast、以下 CAF) は、腫瘍微小環境 (tumor microenvironment、以下 TME) の主要な構成要素であり、様々ながんの間質でその増生をみる。最近の単一細胞シーケンス解析により、CAF はそのトランスクリプトームに基づいていくつかのクラスターに分別できることが明らかになっている。現在、CAF の総体としては TME における主要な免疫抑制因子であると理解されている。しかし、腫瘍免疫および免疫チェックポイント阻害 (immune checkpoint blockade、以下 ICB) に対する応答における多様な CAF が果たす役割の全体像は、まだ明らかではない。また、ICB 療法の有効性を高める特定の CAF サブセットの有無についても不明である。

我々は最近、膵がんおよび大腸がんにおいてメフリン (遺伝子名 *ISLR*) の発現によって特徴づけられる新規 CAF サブセットを同定した。組織学的および単一細胞解析により、メフリン陽性 CAF は  $\alpha$  平滑筋アクチン弱陽性あるいは陰性であり、従来の腫瘍免疫を抑制する方向に働くと報告されてきた  $\alpha$  平滑筋アクチン強陽性 CAF とは異なることが示された。しかし、このメフリン陽性 CAF が ICB 療法に対する腫瘍応答において果たす役割は依然不明であった。

## 【対象及び方法】

本研究はヘルシンキ宣言に基づき実施し、名古屋大学大学院医学系研究科及び名古屋大学医学部附属病院の生命倫理審査委員会による承認 (承認番号: 2017-0127) を得た。名古屋大学医学部附属病院において、抗 PD-1 抗体または抗 PD-L1 抗体による ICB 単剤療法を受けた進行・再発の非小細胞肺癌 (non-small cell lung carcinoma、以下 NSCLC) 患者を後方視的に登録した (n=132)。このコホートのうち、腫瘍組織サンプルが評価可能な 98 人について RNA in situ hybridization 法を用いて腫瘍間質におけるメフリンの発現を評価し、明らかな免疫細胞・血管内皮細胞を除く全間質細胞における陽性率 20% を基準として、各患者をメフリン高発現・低発現の 2 群に分類した。この 2 群において、客観的奏効割合、全生存期間、無増悪生存期間を比較した。

また、野生型及びメフリン欠損マウスへ MC-38 大腸がん細胞株あるいは EO771 乳がん細胞株を移植し、抗マウス PD-1 抗体あるいはアイソタイプコントロール抗体で治療した。MC-38 皮下移植モデルにおいては腫瘍増殖曲線および生存期間を野生型とメフリン欠損マウスとの間で比較し、EO771 同所移植モデルにおいては腫瘍サイズを比較した。さらに、ドキシサイクリン投与下でメフリン系譜細胞にメフリンを発現誘導可能なマウスを作出し、メフリン発現誘導の効果を確認した。

## 【結果】

**メフリン陽性 CAF の増生が多い NSCLC 患者は、ICB に対して良好な反応を示す**

ICB 治療に対する腫瘍の反応性にメフリン陽性 CAF が関与していることを検討したところ、メフリン高発現群 (40.3%、62 人中 25 人) の客観的奏効割合は、メフリン低発現群 (0%、32 人中 0 人) より有意に高いことが示された。

メフリン高発現群はメフリン低発現群に比べ、全生存期間、無増悪生存期間ともに有意に良好であった。多変量 Cox 比例ハザード回帰モデルを用いた解析においても、メフリン陽性 CAF が多いことは有意に予後を延長した。これらのデータは、CAF におけるメフリンの発現が、NSCLC 患者における ICB への効果予測マーカーであることを示している。

### メフリン欠損マウスにおける ICB 療法に対する腫瘍の反応性の欠損

C57BL/6J 野生型マウスとメフリン欠損マウスを用いて、CAF におけるメフリンの発現が ICB に対する腫瘍の反応に重要であるかどうかを検討した。MC-38 大腸がん細胞株を、野生型マウスとメフリン欠損マウスに皮下移植し、抗マウス PD-1 抗体またはアイソタイプコントロール抗体を腹腔内投与した。抗マウス PD-1 抗体を投与した野生型マウスは、メフリン欠損マウスに比べ有意に良好な予後を示した。メフリン欠損の影響を、制限最尤推定による一般化線形混合効果モデルを用いて評価したところ、抗マウス PD-1 抗体の腫瘍増殖抑制効果は、メフリン欠損によって有意に減弱するも、メフリンの欠損自体は腫瘍増殖に影響しないことが判明した。

同様に、EO771 乳がん細胞株を野生型マウスおよびメフリン欠損マウスの右第 4 乳腺に同所的に移植し、抗マウス PD-1 抗体またはアイソタイプコントロール抗体を腹腔内投与した。19 日目には、抗マウス PD-1 抗体の腫瘍体積に対する抑制効果が観察されたが、その効果はメフリン欠損マウスでは有意に減弱していた。以上から、CAF におけるメフリンの発現は、抗マウス PD-1 抗体の抗腫瘍効果を促進させることが示唆された。

### メフリン系譜細胞におけるメフリンの発現誘導は、抗マウス PD-1 抗体療法の抗腫瘍効果を高める

これまでの知見から、CAF におけるメフリン発現誘導は ICB 療法の効果を高める治療戦略となり得ることが示唆された。これを証明するために、我々はメフリン系譜細胞においてドキシサイクリン存在下でメフリンを誘導発現するマウス(以下、メフリン TO マウス)を作出した。同腹のメフリン TO マウス及びドキシサイクリン存在下でメフリンを誘導発現しない対照マウスにドキシサイクリンを投与し、MC-38 細胞を皮下移植し抗マウス PD-1 抗体を腹腔内投与した。その結果、ドキシサイクリンと抗マウス PD-1 抗体を投与したメフリン TO マウスは、対照マウスよりも良好な予後と抗腫瘍反応を示した。これらのデータは、メフリンが ICB 療法の抗腫瘍効果を促進する CAF のサブセットに機能的に寄与しているという考えを支持した。

### 【考察】

本研究では、ヒト NSCLC サンプルおよび同種腫瘍マウスモデルの解析を通じて、メフリンの ICB 療法に対する抗腫瘍反応における役割に注目した。我々のデータは、CAF におけるメフリンの発現が ICB 療法に対する良好な腫瘍反応と相関することを

示唆しており、メフリン陽性 CAF が宿主の抗腫瘍免疫反応を促進するという仮説を導いている。これまでの研究で、 $\alpha$  平滑筋アクチン陽性の免疫抑制性 CAF は、抗腫瘍免疫を抑制し、ICB 療法の失敗と関連することが示されている。我々は、免疫抑制性 CAF とメフリン陽性 CAF の間のバランスが、ICB 療法に対する反応を決定するために重要であると考えている。

本研究のもう 1 つの興味深い知見は、当院で CAF のメフリン発現が低かった NSCLC 患者のうち、ICB 療法に反応した人がいなかった (0%) ことである。これらのデータは、メフリン陽性 CAF の多寡が、ICB 療法が有効でない患者を特定するためのマーカーとなり得ることを示唆している。また、本研究ではトランスジェニックマウスモデルにおいて、CAF におけるメフリンの発現誘導が抗マウス PD-1 抗体の抗腫瘍効果を高めることを明らかにした。このデータは、CAF におけるメフリンの発現増強が、ICB 療法の効果を高める治療戦略となり得ることを示唆している。

#### **【結語】**

我々は、メフリンの発現が顕著な CAF サブセットを同定し、その多寡が NSCLC 患者および同種腫瘍マウスモデルにおける ICB 治療の良好な反応と関連することを発見した。CAF におけるメフリン発現の誘導は、マウスにおける ICB 治療に対する腫瘍反応を増大させた。抗腫瘍免疫を抑制し、ICB 療法の失敗と関連する CAF サブセットを同定した他の研究とともに、CAF の不均一性が ICB 療法に対する腫瘍の反応性を決定することを提唱している。