

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06880

研究課題名(和文) 抗腫瘍免疫応答を抑制する制御性T細胞の新規特異的分子の同定

研究課題名(英文) Identification of new molecule for regulatory T cells in an anti-tumor immunity

研究代表者

杉山 大介 (Sugiyama, Daisuke)

名古屋大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：90759375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)： がんに対する治療方法として、体内に備わっている免疫機能を利用したがん免疫療法が注目されている。本研究では、胃癌患者体内の免疫応答を解析し、新規がん免疫療法の開発につながる知見を得ることを目的とした。

胃癌患者の血液あるいは腫瘍組織中の免疫細胞を解析したところ、血液に比べ腫瘍組織中では免疫応答を抑制する制御性T細胞の割合が多く、それらがICOSまたはCTLA-4といった細胞表面分子を強く発現していた。これらの結果から、ICOSやCTLA-4を標的とした制御性T細胞の除去によるがん免疫応答の向上効果が期待できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： A cancer immunotherapy using the immune systems attracts attention as a therapeutic method to novel cancer therapy. In this study, we analyzed immune responses of the stomach-cancer patient and was intended that we got knowledge to be connected for development of the new cancer immunotherapy.

After analyzing the immune cells in a blood or tumor tissue of the stomach cancer patients, there were more ratios of regulatory T cells which suppressed anti-tumor immune responses in the tumor tissues than blood, and they highly expressed cell surface molecules such as ICOS or CTLA-4. From these results, we suggested that expect an improvement effect of the anti-tumor immune responses by the removal of the regulatory T cells by ICOS and CTLA-4 marker.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：制御性T細胞 Human immunology 腫瘍浸潤リンパ球

1. 研究開始当初の背景

現在、本邦では生涯のうちに半数ががんを発症し、30%ががんにより死亡する状況である。近年、がんの治療法としてがん免疫療法が注目を浴びている。中でも、免疫応答を抑制する免疫チェックポイント分子の阻害による抗腫瘍免疫応答の増強により、治療抵抗性の悪性腫瘍患者において腫瘍退縮効果があることが報告されている。一方で、これらのがん免疫療法による治療効果は限定的であり、新規がん免疫療法の開発は急務である。

がん局所では、がん細胞あるいは免疫抑制細胞による免疫抑制ネットワークが構築され、がんに対する免疫応答が抑制されている。中でも、CD4 陽性制御性 T 細胞 (Tregs) が免疫抑制ネットワークの中心的役割を担い、がん免疫応答の活性化を阻害している。ヒトでは様々ながん腫で Tregs の腫瘍局所浸潤ががん患者の予後不良因子であることが多数報告されている (Nishikawa H. et al. *Curr Opin Immunol.* 2014)。

これまでの研究で、悪性黒色腫患者の腫瘍局所において effector-Tregs (CD4 陽性 FOXP3 強陽性 CD45RA 陰性 T 細胞) が多く浸潤しており、それらがケモカイン受容体 CCR4 を高発現していることを見出した (Sugiyama D. et al. *PNAS.* 2013)。また、抗 CCR4 抗体を用い、effector-Tregs を選択的に除去することで、がん抗原特異的 CD8 陽性 T 細胞の機能が向上することを示した。

これらの結果より、腫瘍浸潤 effector-Tregs を選択的に除去することで、がん免疫療法の効果を増強させることが可能となり、この effector-Tregs の選択的分子マーカを見出すことが重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではがん患者の生体試料を用い、腫瘍組織に浸潤する Tregs の動態解析を実施するとともに、その腫瘍局所浸潤 Tregs の選択

的分子マーカの探索を試みた。これまでに報告した CCR4 は悪性黒色腫患者における腫瘍局所浸潤 effector-Tregs に対する有効な標的分子の一つとして考えられるが、一方で全てのがん腫において腫瘍局所に浸潤している effector-Tregs が CCR4 を高発現しているかは不明である。よって、本研究では悪性黒色腫以外のがん腫として消化器がんに着目し、抗腫瘍免疫応答を抑制する Tregs の詳細な解析を実施した。本研究を実施し、腫瘍局所に浸潤する Tregs の新規選択的分子の同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 胃がん患者検体を用いた制御性 T 細胞解析

免疫解析研究に同意が得られた胃がん患者から、末梢血および腫瘍組織を採取し、それぞれからリンパ球を回収した。末梢血は Ficoll を用いた密度勾配遠心法により、腫瘍組織は機械的破碎方法によりリンパ球を回収した。回収したリンパ球を用い、蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリー法により、各種免疫細胞解析を行い、とりわけ Treg 解析に着目した。この Treg 解析において、これまでに報告したヒト Treg 分類法を採用した。すなわち、CD3 陽性 CD4 陽性 T 細胞画分において CD45RA 陽性 FOXP3 弱陽性 Tregs (naïve-Tregs)、CD45RA 陰性 FOXP3 強陽性 Tregs (effector-Tregs)、CD45RA 陰性 FOXP3 弱陽性 Tregs (non-Tregs) の 3 つに分類することで、より詳細にがん患者の Treg 解析が可能となる。このうちの effector-Tregs において末梢血と比較し腫瘍組織において高発現する分子を探索した。

(2) Effector-Tregs の選択的分子マーカの発現機序の解明

(1) にて腫瘍浸潤 effector-Tregs の選択的分子マーカを見出し、その分子が発現する

機序の解明を試みた。患者検体のうち、腫瘍組織から RNA を抽出し、アレイカードによるリアルタイム PCR 解析を実施した。アレイカードには免疫関連遺伝子に対するプライマー/プローブセットが含まれており、アレイカードに RNA 溶液を充填することで一度に 96 種類の遺伝子発現を解析することが可能である。これらの遺伝子発現において、effector-Tregs に選択的発現する分子マーカーを発現制御する因子を検討した。

4. 研究成果

(1) 胃がん腫瘍局所において effector-Tregs が多く浸潤している

本研究に同意が得られた胃がん患者数名より採取した手術検体および末梢血を用い、それぞれに存在するリンパ球を回収した。リンパ球の回収方法として、末梢血は Ficol(GEヘルスケア社)を用いた密度勾配遠心法を採用し、腫瘍組織は機械的破砕法を採用した。それぞれ回収したリンパ球を用い、蛍光標識された抗体を使用し、目的の免疫細胞を検出するための抗体染色を行い、その後フローサイトメーターにて免疫細胞解析を行った。それぞれのリンパ球に存在する免疫細胞動態を比較したところ、リンパ球集団における CD3 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞の存在率に差異は見られなかったが、末梢血中の CD4 陽性 T 細胞集団のうち effector-Tregs の割合が 1~2%であったのに対し、腫瘍局所における effector-Tregs の割合は 10%~30%であり、多くの effector-Tregs が腫瘍局所に浸潤していた(図 1)。また、これらの免疫細胞解析時に、CD3、CD4、CD8 といった細胞画分マーカー以外の細胞表面分子の解析をおこなった。その結果、免疫抑制シグナルを有する CTLA-4 と、T 細胞の共刺激分子である ICOS が腫瘍局所の effector-Tregs において強発現していた。これらの細胞表面分子は末梢血の免疫細胞においては発現強

度が低く、また腫瘍局所の CD8 陽性 T 細胞および FOXP3 陰性 CD4 陽性 T 細胞においても発現が低かった(図 2)。この結果は、悪性黒色腫患者の末梢血または腫瘍浸潤リンパ球を用いた同様の解析結果とは異なり、胃がん患者に特徴的な腫瘍局所浸潤 Treg フェノタイプを示していると考えられた。

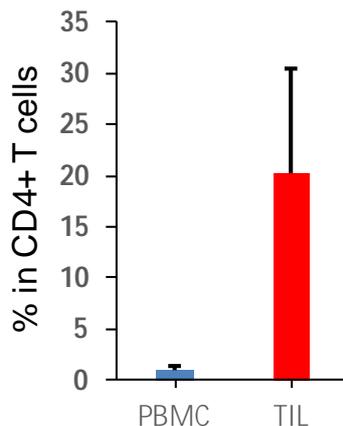


図 1. 胃がん患者検体を用いた Tregs 解析

フローサイトメトリー法を用い、胃がん患者の末梢血 (PBMC) および腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) に存在する effector-Tregs の割合を示した。

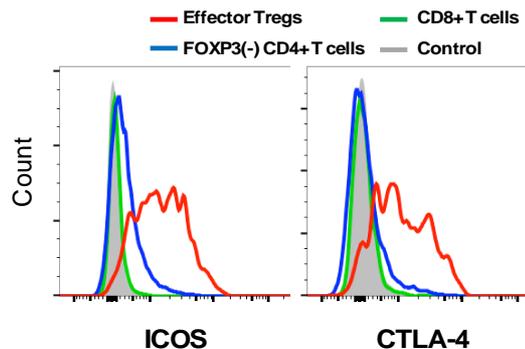


図 2. 腫瘍浸潤 Tregs の分子発現解析

胃がん患者の腫瘍組織に存在する effector-Tregs の各種分子発現をフローサイトメトリー法により解析した。

(2) 腫瘍浸潤 effector-Tregs の選択的分子マーカーの発現にはインターフェロンが関与している

免疫細胞解析の結果、胃がん患者における腫瘍局所浸潤 effector-Tregs に特徴的な細胞表面分子発現がみられた。これらの分子発現を

詳細に解析するため、免疫解析をおこなった患者ごとの CTLA-4 および ICOS 発現強度を解析した。その結果、ICOS 発現において強発現を示す患者と低発現を示す患者に分類できることがわかった。この結果を踏まえ、腫瘍局所浸潤 effector-Tregs の ICOS 発現に起因する分子機序の解明を試みた。まずはじめに、これらの ICOS 発現に差異が生じる対象患者由来の腫瘍組織から RNA を抽出し、random primer と superscript (ThermoFisher scientific 社) を使用した逆転写酵素反応により cDNA を合成した。次にこの cDNA を用い、Taqman array cards(ThermoFisher scientific 社) を使用したりリアルタイム PCR 法によりそれぞれの遺伝子発現を検討した。使用した array cards には約 90 種類の免疫関連遺伝子の primer および probe 充填されており、ICOS 発現を制御する免疫関連遺伝子を網羅的に探索することが可能である。解析の結果、ICOS 強発現 effector-Tregs を示す腫瘍組織において IL-22 や IL-8 といったインターフェロン遺伝子の発現が上昇していた。これらのインターフェロンと ICOS 強発現 effector-Tregs との関連性を見出すため、対象患者のピロリ菌感染を調査した。これまでにピロリ菌の感染により IL-8 の産生が誘導されることが報告されている。調査の結果、ICOS 強発現患者においてピロリ菌の感染率が高い傾向にあることがわかった。これらの結果より、胃癌患者ではピロリ菌の感染により IL-8 の産生が促進されることで、腫瘍局所において ICOS 強発現 effector-Tregs が誘導され、腫瘍局所の免疫抑制機構を構築している可能性が示唆された。今後は、ピロリ菌と ICOS 強発現腫瘍局所浸潤 effector-Tregs との関連性を明確にするとともに、細胞表面 ICOS 分子を標的とする腫瘍局所浸潤 effector-Treg 除去法の確立を検討する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Saito T, Nishikawa H, Wada H, Nagano Y, Sugiyama D, Atarashi K, Maeda Y, Hamaguchi M, Ohkura N, Sato E, Nagase H, Nishimura J, Yamamoto H, Takiguchi S, Tanoue T, Suda W, Morita H, Hattori M, Honda K, Mori M, Doki Y and Sakaguchi S.: Two FOXP3⁺CD4⁺ T-cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nat Med.* 2016, 3 (査読あり) DOI:[10.1038/nm.4086](https://doi.org/10.1038/nm.4086)

2. Kakihana K, Fujioka Y, Suda W, Najima Y, Kuwata G, Sasajima S, Mimura I, Morita H, Sugiyama D, Nishikawa H, Hattori M, Hino Y, Ikegawa S, Yamamoto K, Toya T, Doki N, Koizumi K, Honda K, Ohashi K.: Fecal microbiota transplantation for patients with steroid-resistant/dependent acute graft-versus-host disease of the gut. *Blood.* 2016, 7 (査読あり) DOI:[10.1182/blood-2016-05-717652](https://doi.org/10.1182/blood-2016-05-717652)

〔学会発表〕(計 1 件)

Danbee Ha, Hiroyoshi Nishikawa, Daisuke Sugiyama, Yuka Maeda, Dennis Adeegbe, Eich Sato, Atsushi Tanemura, Ichiro Katayama, Shimon Sakaguchi. : Regulatory T-cell induced anergic CD8⁺ T cells with suppressive function are novel targets of anti-CTLA-4 mAb. 第 75 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2016 年 10 月 7 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者：杉山 大介 (Sugiyama Daisuke)

名古屋大学・大学院医学系研究科・分子細胞免疫学・研究員
研究者番号：90759375

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし

(4) 研究協力者：

1. 西川 博嘉 (Nishikawa Hiroyoshi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・分子細胞免疫学・教授
国立がん研究センター先端医療開発センター免疫 TR 分野・分野長
研究者番号：10444431

2. 土井 俊彦 (Doi Toshihiko)
国立がん研究センター先端医療開発センター免疫 TR 分野・先端医療科長
研究者番号：20522907