

令和元年5月20日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09292

研究課題名(和文) GISTにおける免疫チェックポイント機構を介した抗腫瘍免疫誘導に関する検討

研究課題名(英文) anti tumor immunology against GIST through immunecheckpoint mechanism

研究代表者

込田 英夫 (KOMITA, HIDEO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：90534561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胃の消化管間質腫瘍(以下GIST)における免疫チェックポイント機構につき検討した。腫瘍組織内にはGIST細胞を傷害するNK細胞が存在するが、その抗腫瘍効果はTim-3/galectin-9をaxisとした免疫チェックポイント機構により抑制されている可能性が示された。GIST治療薬であるimatinibはGIST細胞の免疫チェックポイント分子の発現抑制のように抗腫瘍免疫に促進的にも作用するが、prostaglandin E2の産生増加や腫瘍抗原WT1の発現低下など抑制的にも作用した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GISTに対する免疫チェックポイント機構に関連した研究は現在まで極めて少数に限られていたが、本研究によりGISTの免疫チェックポイント機構はTim-3/galectin-9によるNK細胞の抑制であることを示す成果が初めて得られた。このことから、進行したGIST症例に対してはTim-3抗体を用いた免疫チェックポイント阻害療法が有効である可能性が示された

研究成果の概要(英文)：Abundant mononuclear cells were migrated from the tumor tissue fragments of human gastric gastrointestinal stromal tumor (GIST) in primary culture. Addition of interleukin-2 into the culture provided vigorous tumor cell killing by the mononuclear cells in vitro, indicating that cytotoxic immune cells were infiltrated in the GIST tissue. Immuno-histochemical analysis of human gastric GIST tissue demonstrated that Tim-3/galectin-9 axis might be the immune checkpoint mechanism that suppresses NK cell activity. Imatinib treatment of GIST-T1 cells showed downregulation of galectin-9 protein expression. Imatinib also suppressed interferon-gamma-induced upregulation of PD-L1. However, imatinib treatment enhanced prostaglandin E2 production and suppressed WT1 expression in GIST-T1 cells. Imatinib treatment may elicit both promotive and suppressive effects on antitumor immune activity against GIST.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：GIST Tim-3 Galectin-9 Imatinib WT1 NK cell CD8+T cell 免疫チェックポイント阻害剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

研究成果の概要(和文)

1. 研究開始当初の背景

消化管間質腫瘍 (Gastrointestinal stromal tumor、以下 GIST) は胃を中心とする消化管に発生する非上皮性腫瘍であり、消化管筋層に存在するカハール介在細胞が起源と考えられているが、その病因は未だ不明な点が多い。摘出後の再発リスクの高い例や遠隔転移を有する例はイマチニブなどの KIT チロシンキナーゼ阻害剤による治療が有効性を示すが、悪性度の高い症例ではその効果は限られている。GIST に対する治療効果を高める上で、GIST の病態解明や新たな診断法、治療法の確立が望まれる。

GIST は T 細胞に認識される腫瘍抗原である Wilms' Tumor 1 (以下 WT1) を高頻度に発現することから、その病態に生体の抗腫瘍免疫が関与することが推察されてきた。実際、GIST の腫瘍組織内には種々の免疫細胞の浸潤が認められ、GIST の発生と進展に免疫反応が関与することが示唆されている。近年の腫瘍免疫学の急速な進歩は、腫瘍細胞に対する免疫細胞の反応を負に制御する免疫チェックポイント機構が抗腫瘍免疫の発動の有無に深く関与していることを示している。しかし、GIST 領域における免疫学的側面からの研究は乏しく、その知見は集積されていない。

2. 研究の目的

- GIST に対する生体の免疫反応を免疫チェックポイント機構の観点から明らかにする。
- GIST の標準治療薬であるイマチニブが GIST に対する生体の免疫反応をどのように修飾するかを明らかにする。

3. 研究の方法

免疫組織化学的解析：東京慈恵会医大倫理委員会の承認を得て、これまで採取された胃 GIST の病理標本に対して免疫組織化学的解析を行った。

GIST 細胞の初代培養：GIST 細胞に対する生体の免疫反応を解析する目的で、東京慈恵会医大倫理委員会の承認を得て、GIST の新鮮摘出組織を酵素処理し GIST 細胞の培養を試みた。

GIST 細胞株を用いた解析：ヒト GIST 細胞株は GIST-T1 細胞を用いた。

Flow cytometry による解析：GIST 細胞、または免疫細胞の表面マーカーの発現解析は flow cytometry を用いた。

Tetramer 解析：ヒト T 細胞の腫瘍抗原特異的 T 細胞受容体 (TCR) の発現解析は tetramer 法を用いた。

RT-PCR 解析：GIST-T1 細胞の WT1, galectin-9 mRNA の発現解析は RT-PCR 法を用いて行った。

4. 研究成果

GIST に対する生体の免疫反応の解析

治療目的で内視鏡的に切除された胃 GIST 組織の一部から GIST 細胞の初代培養を試みた。7 例の胃 GIST 初代培養において腫瘍組織細片から活発な付着細胞の遊走・増殖が認められ、confluent に達すると類上皮細胞様の形態を示した。この細胞を flow cytometry で解析すると GIST マーカーである c-kit, CD34 の発現が認められ、GIST 細胞が培養されていると考えられた。しかし、初代培養で活発な増殖を示しても継代により GIST 細胞は失われ、細胞株としての樹立は不可能であった。

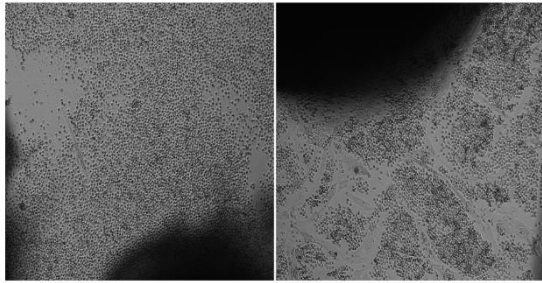


Fig.1: Abundant migration of the mononuclear cells from the GIST tissue fragment in primary culture of human gastric GIST

興味深い点は、初代培養において腫瘍組織片から GIST 細胞とともに浸潤単核球細胞が活発に遊走・増殖する点であり、この現象は 7 例全ての初代培養において認められた (図 1)。この単核球を flow cytometry で解析すると約 6 割の細胞が CD8⁺T 細胞、残りの 4 割は CD56⁺ natural killer (NK) 細胞であった。GIST は代表的な腫瘍抗原である WT1 の発現がほぼ全例で認められるため、tetramer 解析を用いて CD8⁺細胞

の HLA-A24 拘束性 WT1 特異的 TCR の発現の有無を解析した。解析可能であった 6 例において 2 例に WT1 特異的 TCR の発現が見られたが、その頻度は 0.28-0.67%であった。さらに興味深いことに、この GIST 初代培養に interleukin-2 (IL-2) を添加すると、腫瘍内浸潤単核球が GIST 細胞と考えられる大型の付着細胞を活発に傷害した (図 2)。この観察より、GIST 腫瘍組織内には GIST 細胞を傷害するポテンシャルを有した免疫細胞が浸潤しているが、その機能は *in vivo* においては抑制的に制御されている可能性が示された。

上記の結果を基に、19 例の胃 GIST 症例の腫瘍組織を免疫組織化学により解析し、免疫細胞

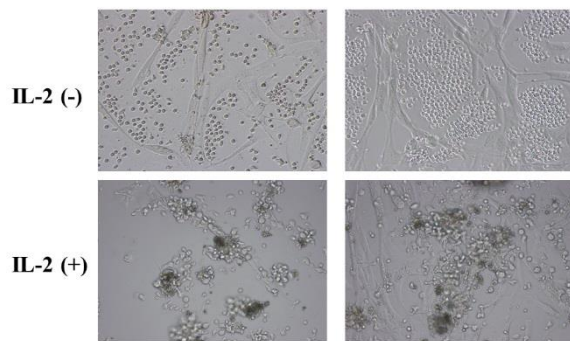


Fig.2: GIST-like cells were killed by TILs when IL-2 (50U/ml) was added to the culture (Lower), while TILs did not respond to GIST-like cells without IL-2 (Upper).

の浸潤の有無と程度、代表的な免疫チェックポイント分子の発現につき検討を行った。19 例全例に CD8⁺T 細胞の浸潤、19 例中 8 例に CD56⁺NK 細胞の浸潤が認められ、CD8⁺T 細胞と NK 細胞の浸潤程度には強い相関が見られた。しかし、浸潤した CD8⁺T 細胞, NK 細胞はいずれも CD69 陰性、programmed cell death-1 (PD-1) 陰性で活性化状態ではなかった。T cell immunoglobulin and mucine protein 3

(Tim-3) は 8 例中 6 例の NK 細胞に陽性であったが、CD8⁺T 細胞では全例で陰性であった。一方、Tim-3 の ligand である galectin-9 の胃 GIST 腫瘍における発現を検討すると、19 例中 13 例が galectin-9 陽性であった。NK 細胞の浸潤は GIST の galectin-9 の発現が強い例に多く認められる傾向があった。NK 細胞の Tim-3 発現と腫瘍組織の galectin-9 発現の相関を検討すると、8 例の Tim-3⁺NK 細胞浸潤陽性例のうち 6 例に腫瘍組織の galectin-9 の発現が認められた (表 1)。

以上より、胃 GIST 腫瘍組織においては、免疫チェックポイント機構として Tim-3/Galectin-9 を介した NK 細胞の活性化抑制状態が存在することが示唆された。一方、CD8⁺T 細胞や NK 細胞に PD-1 の発現を認めないことから、PD-1/PD-L1 を axis とした免疫チェックポイント機構が胃 GIST における免疫抑制に関与している可能性は低いと思われた。

以上の解析から、胃 GIST 腫瘍組織内には GIST 細胞を傷害する NK 細胞が存在するが、その抗腫瘍効果は Tim-3/Galectin-9 を axis とした免疫チェックポイント機構により抑制さ

Case	1	2	5	7	8	9	10	11
Galectin-9	+	+	++	++	+	++	++	+
Tim-3	+	+	-	+	+	-	+	+

表 1 : Expression of Galectin-9 on GIST tumor cells and of Tim-3 on infiltrating NK cells from 8 GIST tissues with Significant NK cell infiltration.

れている可能性が示された。胃 GIST に対する Tim-3 抗体を用いた治療の意義が示された。

イマチニブによる GIST に対する免疫反応の修飾効果

免疫組織化学的研究により、ヒト胃 GIST においては NK 細胞をエフェクターとして Tim-3/Galectin-9 を axis とした免疫チェックポイント機構が作用している可能性が示唆された。GIST-T1 細胞のイマチニブ 0-0.1 μM , 48 時間処理では量依存的に galectin-9 蛋白の発現低下が認められたが、RT-PCR 解析では、イマチニブ 1.0 μM 処理で galectin-

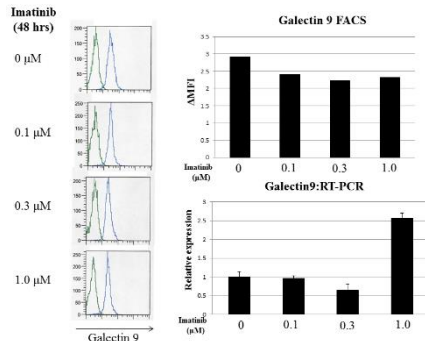


Fig.3: Effect of Imatinib on Galectin 9 expression of GIST-T1 cells

9 mRNA 発現の顕著な増加が認められた(図3)。チロシンキナーゼ阻害剤が galectin-9 の発現をどのように制御するか、今後の研究で明らかにする必要がある。

無処理 GIST-T1 細胞は PD-L1 をほとんど発現しないが、interferon- γ (IFN- γ) 処理によりその発現は著しく上昇する。GIST-T1 細胞を IFN- γ とイマチニブで同時処理すると PD-L1 の発現誘導は有意に抑制されたが、イマチニブに量依存性はなく 0.1 μM と 1 μM での効果は同等であった。また、興味深いことに、GIST-T1 細胞をイマチニブで 24 時間前処理し、その後 IFN-

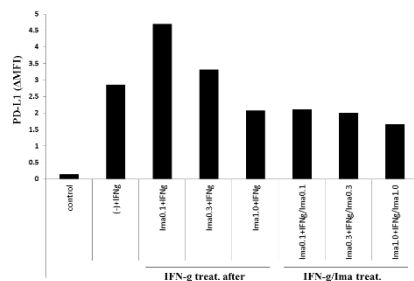


Fig.4: Effect of Imatinib on IFN-gamma-induced PD-L1 expression

g 処理を行うと、前処理のない GIST 細胞に比較してより高い PD-L1 の発現誘導が認められた(図4)。しかし、イマチニブ前処理後、IFN- γ とイマチニブの同時処理を行うと、PD-L1 の発現上昇は抑制された(図4)。IFN- γ 誘導性は PD-L1 の発現上昇もチロシンキナーゼ阻害剤処理により影響を受けることが示された。

Prostaglandin E2 は腫瘍細胞の産生する代表的な免疫抑制分子であり、免疫細胞機能に抑制的に作用する。GIST-T1 細胞を 0-3 μM のイマチニブで 72 時間処理すると、有意な細胞数の低下にもかかわらず培地中への prostaglandin E2 の分泌量は増加した(図5)。この増加の機序は細胞の破壊による逸脱か産生増強であるか現時点では不明であるが、この事実はイマチニブ処理が GIST に対する抗腫瘍免疫活性に抑制的に作用する可能性を示している。

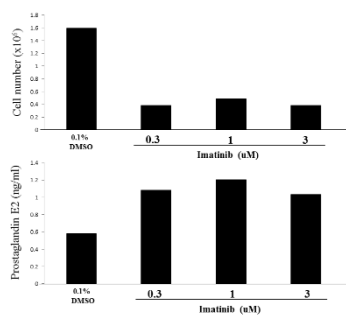


Fig.5: Effect of Imatinib on Prostaglandin E2 production in GIST-T1 cells

WT1 は T 細胞に認識される代表的な腫瘍抗原であり、GIST は高頻度に WT1 を発現する。GIST-T1 細胞における WT1 の発現は、イマチニブ処理により著明に抑制された(図6)。このことは GIST に対するイマチニブ治療により、GIST の T 細胞免疫反応の抗原性が低下する可能性を示している。

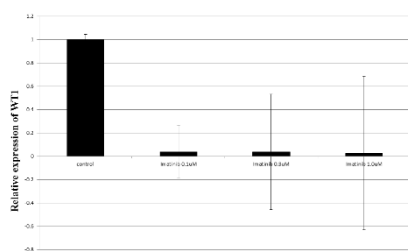


Fig.6: Imatinib suppresses WT1 expression in GIST-T1 cells

以上の解析から、GIST に対するイマチニブ治療は GIST 細胞の免疫チェックポイント分子の発現抑制のよ

うに抗腫瘍免疫に促進的に作用する面と同時に、prostaglandin E2 の産生増加や腫瘍抗原

WT1 の発現低下など抑制的にも作用する二面性を有していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

なし。

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：本間 定

ローマ字氏名： Homma Sadamu

所属研究機関名：東京慈恵会医科大学総合医学研究センター

部局名：悪性腫瘍治療研究部

職名：教授

研究者番号（8桁）：50192323

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。