

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19892

研究課題名(和文) 胃癌バイオマーカーとしての胃癌組織内浸潤ICOS+CD4T細胞の解析

研究課題名(英文) ICOS+ Foxp3+ TILs in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory T cells

研究代表者

加藤 亮 (KATO, Ryo)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：80745422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌新鮮組織から抽出した免疫細胞をフローサイトメトリー(FACS)で解析すると、ICOS+ Foxp3+ CD4T細胞(ICOS+ Treg)頻度は、pStageに正の相関を示し、ICOS+ Treg高値群は予後不良であった。またICOS+ Tregは、強い免疫抑制機能を有していた。ICOS+ Tregの誘導メカニズムとして、FACSおよび多重免疫染色の結果では、胃癌に特徴的であるピロリ菌感染、樹状細胞の一種であるpDCが関連していた。以上、ICOS+ Tregがバイオマーカーとして有用であること、ICOS+ Tregを標的とした治療として、ピロリ菌やpDCが標的となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tissue-infiltrating mononuclear cells extracted from fresh gastric cancer tissues were analyzed by flow cytometry. ICOS+ Foxp3+ CD4T cell(ICOS+ Treg) TILs was higher in the late stages, and patients with higher ICOS+ Treg showed shorter relapse-free survival in gastric cancer. Moreover, ICOS+ Treg had highly immunosuppressive function. In multicolor immunohistochemistry and flow cytometry, the expression of ICOS in Treg was closely related to Helicobacter pylori infection and plasmacytoid dendritic cells (pDCs). Our results indicated the potential of ICOS+ Treg as prognostic markers and that of direct and indirect immunotherapy targeting for ICOS, pDC or Helicobacter pylori.

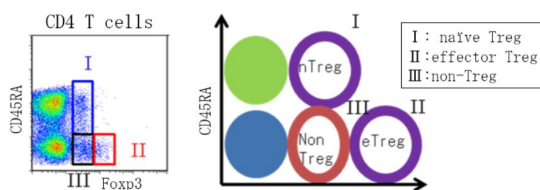
研究分野：Treg

キーワード：胃癌 ICOS 活性化Treg ピロリ菌 pDC

1. 研究開始当初の背景

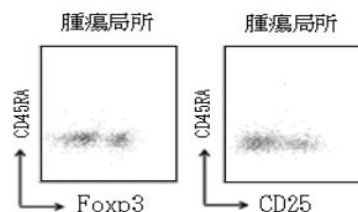
制御性 T 細胞 (regulatory T cell : Treg) は生体内の過剰な免疫反応を抑制し、免疫寛容を維持するために重要な役割を担っている。一方で、がん微小環境においては細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) を抑制し、抗腫瘍効果を妨げているとされている。Treg は CD4⁺ T 細胞の中で、CD25⁺ 細胞やマスター遺伝子とされる Foxp3⁺ 細胞分画が Treg と定義されてきたが、強い抑制機能を持つ「活性化 Treg」はさらにその一部であることが明らかとなった。Miyara らは、ナイーブ T 細胞のマーカーの 1 つである CD45RA を併用することで、Foxp3 強陽性 CD45RA 陰性で示される細胞分画 (分画 I) のみが強い抑制能をもつ活性化 Treg であり、Foxp3 弱陽性細胞分画 (分画 II, III) は非活性化 Treg や Treg 以外の細胞群であることを報告した⁽¹⁾ (図 1)。

(図 1) 末梢血中リンパ球における活性化 Treg



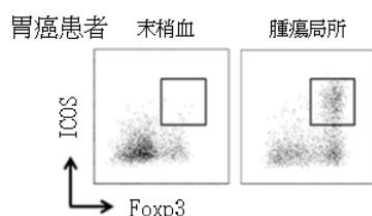
しかし、この評価方法は末梢血中リンパ球でのみ可能であり、腫瘍組織内浸潤リンパ球においては、CD25 や Foxp3 陽性細胞は図 2 のように一塊となり、活性化 Treg を腫瘍組織内で同定することは困難である。

(図 2) 腫瘍局所における Treg (縦軸 CD45RA)



ICOS (inducible T-cell co-stimulator : CD278) は CD28 共刺激分子 family に属し、活性化した T 細胞全般に発現する。我々が行った先行実験においては、同一胃癌患者より採取した末梢血中 Foxp3⁺ 細胞には ICOS 発現をほぼ認めないのに対し、胃癌腫瘍組織内浸潤 Foxp3⁺ 細胞には ICOS 発現を高頻度に認めた (図 3)。先述したように ICOS は活性化した T 細胞にのみ発現を認めるため、ICOS⁺ Foxp3⁺ T 細胞こそが活性化 Treg ではないかという仮説をたてた。

(図 3) 胃癌における Treg (縦軸 ICOS)



2. 研究の目的

胃癌組織浸潤リンパ球を用いて、T 細胞の活性化分子の 1 つである ICOS に着目し、腫瘍浸潤 Treg の ICOS 発現解析、ICOS⁺ Treg の抑制機能解析、胃癌バイオマーカーとしての ICOS の有用性、を検討する。

3. 研究の方法

(1) 【胃癌腫瘍浸潤 Foxp3⁺ T 細胞の ICOS 発現と臨床的意義】

胃癌新鮮組織 40 例から抽出した腫瘍浸潤リンパ球をフローサイトメトリー (FACS) で解析し、臨床病理学的因子との関連性を検討した。

(2) 【ICOS⁺ Treg の機能解析】

サイトカイン産生解析: ICOS⁺ Foxp3⁺ T 細胞や ICOS⁻ Foxp3⁺ T 細胞より産生されるサイトカイン (IL-10、IL-17、TNF、IFN- γ 及び IL-2 等) を細胞内染色し、FACS 解析した。

抑制機能解析: 腫瘍浸潤 ICOS⁺ CD25⁻ T 細胞を精製し、CFSE をラベルした効果細胞と共培養する Suppression assay を行った

(3) 【ICOS⁺ Treg の発現メカニズム】

ICOS を刺激する主体は抗原提示細胞の中でも形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell : pDC) と報告されている。また ICOS⁺ Treg 誘導のメカニズムとして、胃癌に特徴的であるピロリ菌感染にも着目し、pDC に発現する ICOS-L 発現と Treg 上の ICOS 発現との関係を同一組織内において FACS 解析した。また胃癌摘出検体を用いた多重免疫染色での解析も加えた。pDC のマーカーとしては、CD303 を用いている。

(4) 【バイオマーカーとしての ICOS⁺ Treg】

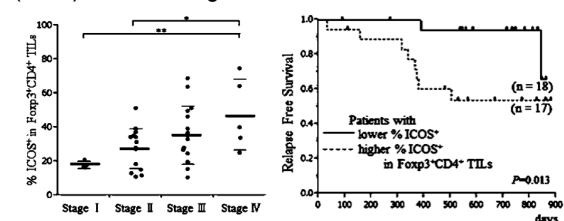
胃癌腫瘍組織内浸潤 ICOS⁺ Treg と末梢血中 ICOS⁺ Treg との関連性を解析し、バイオマーカーとしての有用性を検討した。

4. 研究成果

(1) 【胃癌腫瘍浸潤 Foxp3⁺ T 細胞の ICOS 発現と臨床的意義】

Foxp3⁺ 細胞分画は、ICOS を用いて ICOS⁺ Foxp3⁺ CD4⁺ 細胞 (ICOS⁺ Treg) と ICOS⁻ Foxp3⁺ CD4⁺ 細胞 (ICOS⁻ Treg) の 2 分画に区別することが可能であった。Foxp3⁺ CD4⁺ 細胞中の ICOS⁺ 細胞頻度は、pStage に正の相関を示し、ICOS⁺ 細胞頻度の高値群では、RFS において予後不良となった (図 4)。

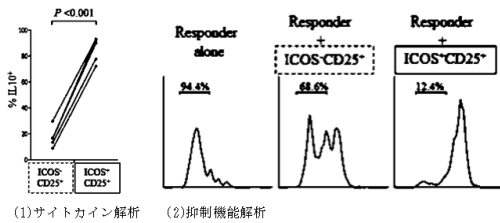
(図 4) ICOS⁺ Treg と病期・予後との関連性



(2) 【ICOS⁺Treg の機能解析】

ICOS⁺Treg は、ICOS⁻Treg と比較して抑制性サイトカイン(IL-10)をより多く分泌し、効果細胞(CFSE ラベル下)の増殖を強く抑制した(図5)。この結果より、ICOS⁺Treg 強い免疫抑制機能を有した活性化 Treg であると考えられた。

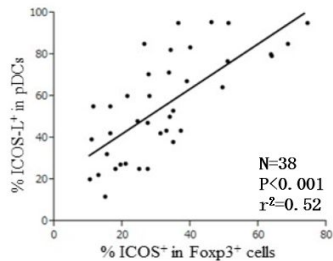
(図5) サイトカイン解析および抑制機能解析



(3) 【ICOS⁺Treg の発現メカニズム解析】

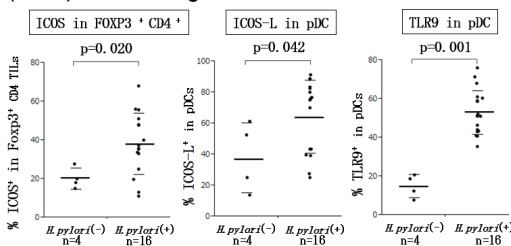
pDC 上の ICOSL 発現量は、Treg 上の ICOS 発現量と相関関係にあった(図6)。

(図6) ICOS⁺Treg と ICOSL との関連



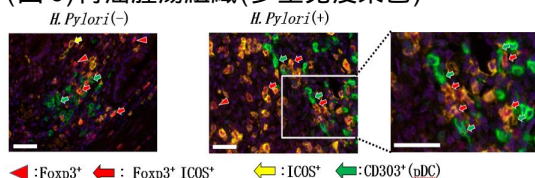
またピロリ菌感染の有無の2群間の比較では、前述のTreg上のICOS発現量およびpDCのICOSL発現量・TLR9発現量は、ピロリ菌感染群で有意に高い結果となった(図7)。

(図7) ICOS⁺Treg とピロリ菌感染との関連



胃癌摘出検体を用いた多重免疫染色(Foxp3、ICOS、CD303)においても、同様の結果であることを確認した(図8)。

(図8) 胃癌腫瘍組織(多重免疫染色)



(4) 【バイオマーカーとしての ICOS⁺Treg】

末梢血中 ICOS⁺Treg 細胞頻度と腫瘍組織内 ICOS⁺Treg 細胞頻度が相関関係を示した。こちらに関しては症例数が少ないため、今後症例集積が必要であるが、ICOS⁺Treg に関しては、末梢血免疫環境が腫瘍組織内免疫環境を反映している可能性が示唆された。

<引用文献>

Miyara M, Yoshioka Y, et al. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 30: 899-911. 2009

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1件)

長瀬博次、ICOS⁺Foxp3⁺TILs in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory T cells associated with *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer*. 査読有、140(3)、2017年、686-695

〔学会発表〕(計3件)

浦川真哉、The influence of *Helicobacter pylori* on regulatory T cells in gastric cancer. *Society of Surgical Oncology*. 2018年、Chicago

浦川真哉、胃癌組織浸潤活性化 Treg と *H. pylori* 感染との関連性、がん免疫学会、2017年、幕張

長瀬博次、腫瘍局所に浸潤する制御性T細胞の活性化マーカーとして ICOS の有用性の検討、日本外科学会定期学術集会、2016年、大阪

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 亮 (KATO, Ryo)
大阪大学医学部附属病院 消化器外科
医員
研究者番号：80745422

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()