

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：85402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10573

研究課題名(和文) 癌免疫逃避機構における腫瘍血管内皮細胞の抑制性抗原提示細胞機能の解析

研究課題名(英文) A study for novel mechanism underlying tumor immune-evasion through tumor endothelial cells as immune suppressive antigen presenting cells

研究代表者

尾上 隆司 (Onoe, Takashi)

独立行政法人国立病院機構(呉医療センター臨床研究部)・その他部局等・その他

研究者番号：90549809

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)：本研究では癌微小環境における免疫逃避機構において、特に腫瘍血管内皮細胞の役割に注目し解析を行った。OVAタンパクを遺伝子導入したB16メラノーマ細胞を用いた担癌マウスモデルを用いて、腫瘍血管内皮が、抗原提示細胞であること、PD-L1分子を介して抗原特異的にCD8+T細胞を抑制すること、IL-10およびTGF- $\beta$ を介して抗原特異的抑制性CD4+T細胞を誘導すること、を証明した。またPD-L1ノックアウトマウスでの腫瘍増大試験において、腫瘍内皮細胞のPD-L1が腫瘍増大に大きく関わっていることをin vivoで証明した。これらの結果は腫瘍内皮細胞が癌免疫逃避に大きく寄与していることを示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、医学の進歩により癌も根治可能となってきたが治療に難渋する場合も多い。その背景には、癌の持つ免疫逃避機構が関与していると考えられる。この免疫逃避機構構築には、癌微小環境が大きく影響していると考えられる。本研究では、癌微小環境の一部である腫瘍血管内皮細胞の免疫学的側面に注目し解析を行い、腫瘍免疫細胞が癌微小環境の中で免疫抑制性を持ち、免疫チェックポイント分子であるPD-L1分子を介して癌免疫を抑制していることが明らかとなった。この結果は腫瘍内皮細胞そのものおよび癌とのクロストークの遮断が将来有望な新規癌治療戦略となりうることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Although a remarkable progress in anti-cancer therapies, cancer can be resistant to therapies in some situations, which could relate to immune-evasion of cancer. In this study, we evaluated an immunological feature of tumor endothelial cells (TEC) in immune evasion mechanism of tumor micro-environment. In vitro assay revealed that TECs from tumor of implanted B16 melanoma cells 1) are antigen presenting cell, 2) suppress CD8+ T cells proliferation and cytotoxicity through PD-1/PD-L1 pathway in antigen-specific manner and 3) induce immune-suppressive CD4+ T cells via IL-10 and TGF- $\beta$ . Further, in vivo mouse model using PD-L1 knock out mice revealed that PD-L1 on TECs largely contribute to tumor progression. These results suggest that TECs largely contribute to immune-evasion of cancer.

研究分野：癌免疫

キーワード：癌免疫 腫瘍血管内皮細胞 微小環境 免疫逃避 PD-L1

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 ( 共通 )

### 1 . 研究開始当初の背景

従来、癌の治療法として外科的手術、化学療法、放射線療法が三大療法として知られているが、2000 年代初頭に免疫による癌の排除 = 癌免疫監視システムが明らかとなって以降<sup>1)</sup>、癌免疫の分野は世界的に研究され、急速に発展・臨床応用されつつあり、近年では第四の治療法として癌ワクチンや遺伝子導入 T 細胞療法を始めとした免疫療法が注目されている。しかし著効する例もあるもののその効果は未だ限定的である。その背景には癌の持つ免疫逃避機構が関与していると考えられている。最近、腫瘍血管内皮細胞 ( Tumor Endothelial cells, TEC ) が腫瘍転移能の違いでフェノタイプも異なること<sup>2)</sup>、さらに種々の固形癌で内皮マーカーの一つである CD105 の腫瘍内陽性率が切除術後の再発・転移率と相関することが報告された<sup>3)</sup>。我々はこれまで、腫瘍細胞からの HMGB1 により血管内皮細胞が免疫抑制性を獲得し、液性因子により、免疫細胞を抑制することを見出した。この特徴は通常の血管内皮細胞には無いものであり、前述の報告と併せ、癌によって血管内皮細胞に免疫抑制能が誘導され、免疫バリアとして機能している可能性を示唆する。しかしながら、これら TEC の免疫細胞に対する直接的な抑制作用の詳細な検討は現在までなされていない。

( 参考文献 )

- 1) Shankaran, V., et al., Nature, 2001. 410:1107-1111.
- 2) Yang, L.Y., et al., BMC cancer, 2006. 6:110.
- 3) Saad, R.S., et al., Modern pathology 2004. 17(2):197-203.

### 2 . 研究の目的

本研究では TEC の免疫細胞、特に T 細胞に対する直接的免疫学的作用に注目し、マウスモデルを用いて TEC の免疫抑制能の検証を行った。また癌微小環境における癌および TEC のクロストーク機構を解明し、TEC をターゲットとした新しい治療に応用するための基盤研究を行うことを目的とした。

### 3 . 研究の方法

#### ( 1 ) 腫瘍内皮細胞の高純度分離法の開発と、免疫細胞学的特徴の解析

高腫瘍活性をもつ、B16F-10 マウスメラノーマ細胞を C57BL6 マウスの皮下に接種し、担癌マウスモデルを確立した。接種 2 週間後に腫瘍を切除し、コラゲナーゼ法を用いて腫瘍構成細胞を digestion し、その中から高純度の TEC を分離する方法を開発した。さらに分離した TEC の細胞表面分子フェノタイプをフローサイトメトリーで解析した。

#### ( 2 ) TEC の抗原取り込み能および抗原提示能の検討

TEC の癌抗原取り込み能およびその抗原提示能を、OVA タンパクを用いて in vitro で検証した。分離した高純度 TEC の抗原取り込み能を、endocytosis、分解されると蛍光を発する DQ-OVA タンパクを用いて検証した。また TEC の MHC クラス I 分子上への OVA タンパク提示を H-2Kb/SIINFEKL 複合体に特異的に結合する抗体を用いて検証した。

#### ( 3 ) TEC の抗原特異的 CD8 + T 細胞抑制能および機序の解明

OT-I マウスから分離した OVA 特異的 CD8 + T 細胞である OT-I 細胞を OVA ペプチドでパルスした骨髄由来樹状細胞で 5 日間刺激する共培養に、B16 または B16OVA 腫瘍から分離した TEC を添加する suppression assay を行い、TEC の抗原特異的抑制能を検討した。同時に同培養中の OT-I 細胞のサイトカイン産生能を細胞内サイトカイン染色にて評価した。さらに、同培養に CFSE 染色した B16-OVA をターゲットとして加え、4 時間共培養し、ターゲット細胞の視細胞およびアポトーシス細胞を定量する cytotoxic assay を行い、TEC の OT-I 細胞に対する細胞障害性抑制能を検討した。また suppression assay 中に transwell を用いた TEC 細胞添加を行った後に cytotoxic assay を行い、TEC の細胞接触の必要性を検討するとともに、抗 PD-L1 抗体を用いた blocking assay を行い、TEC の OT-I 細胞に対する細胞障害性抑制能における PD-L1 分子の必要性を検討した。

#### ( 4 ) TEC の抗原特異的 CD4 + T 細胞分化に対する効果の検討

OT-II マウスから分離した OVA 特異的 CD4 + T 細胞である OT-II 細胞を OVA ペプチドでパルスした骨髄由来樹状細胞で刺激する共培養に、B16 または B16OVA 腫瘍から分離した TEC を添加する suppression assay を行い、TEC の CD4 + T 細胞に対する抗原特異的抑制能を検討した。同時に培養中のサイトカイン濃度を測定・評価した。さらに同培養で得られた OT-II 細胞を、OT-I 細胞を OVA ペプチドでパルスした骨髄由来樹状細胞で刺激する共培養に添加し、TEC と接触した OT-II 細胞の CD8 + T 細胞抑制能を検討した。

#### ( 5 ) マウス in vivo モデルでの TEC の免疫抑制作用の検討

TEC 特異的に PD-L1 を欠損するモデルを作成するため、同系の wild マウスより PD-L1 ノックアウトマウスに骨髄移植を行い、骨髄由来免疫細胞には PD-L1 が表出され、組織由来の血管内皮細胞は PD-L1 を欠損するモデルを作成した。この同系骨髄移植マウスに B16-OVA メラノ

マ腫瘍株を皮下移植し、1 週後に OVA 特異的 OT-I CD8+T 細胞を移入し、腫瘍増大に対する効果を検討した。また OT-I 細胞を移入し 2 週後に腫瘍を摘出し、腫瘍浸潤リンパ球における移入 OT-I 細胞の割合およびアポトーシスの程度を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 腫瘍内皮細胞の高純度分離法の開発と、免疫細胞学的特徴の解析

腫瘍中の TEC は組織免疫染色上 CD31 と CD146 を表出しており、CD31/CD146+ 細胞を TEC として分離を行った。腫瘍中に 0.2%程度しか存在せず、比重遠心法後の磁気ビーズによるソーティング (MACS) または FACS セルソーター単独の分離では purity が十分ではなかった。そこで MACS による CD31+ 細胞の濃縮後にセルソーターを用いて CD31/CD146+ 細胞を分離したところ、再現性をもって 95%以上の純度での分離が可能となった。この分離した CD31/CD146+ 細胞は培養にて敷石状の形態をとり、形態学的にも内皮細胞であることが確認でき、TEC と考えられた。細胞表面分子フェノタイプ解析では、TEC は MHC クラス I/II および CD40 を表出しており、抗原提示細胞 (APC) としての性格を持つことが予想された。また同時に免疫チェックポイント分子である PD-L1 を表出しており、免疫抑制能をもつことが示唆された (図 1)。

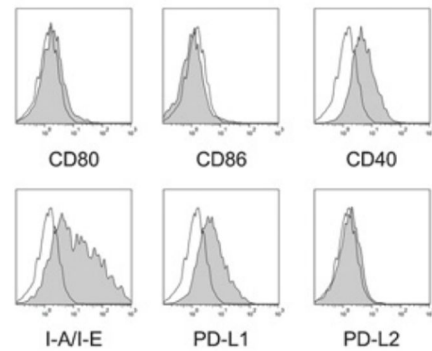


図 1 .CD31+CD146+ TEC の細胞表面分子フェノタイプ

##### (2) TEC の抗原取り込み能および抗原提示能の検討

TEC が APC としての表面分子フェノタイプを示すことから、外来抗原の取り込み能を検証した。TEC に、細胞に取り込まれると FITC 蛍光を発する DQ を結合した OVA タンパクである DQ-OVA を添加し、in vitro での TEC の OVA 取り込み能をフローサイトメトリーによる FITC 蛍光強度測定により経時的に評価したところ、ネガティブコントロールとしての 4 培養では OVA の取り込みを認めなかったのに対し、37 °C では、TEC の蛍光強度が経時的に強くなっており、OVA を細胞内に取り込むことを確認した。(図 2)

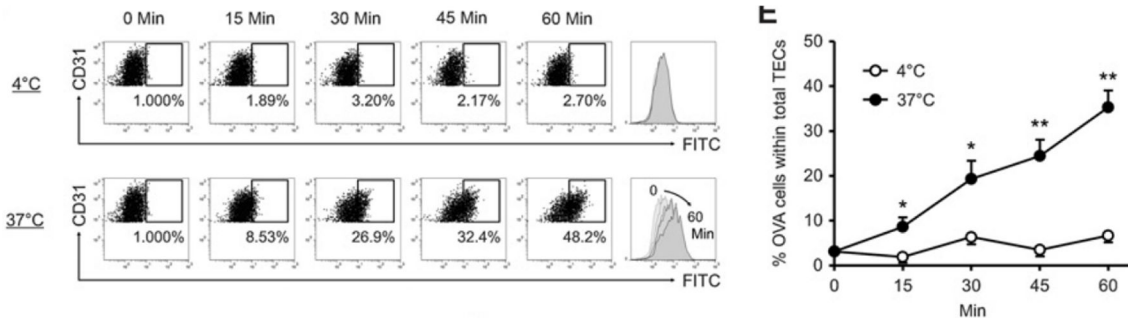


図 2 . TEC の DQ-OVA 取り込み能

(左) TEC 内 FITC 輝度の経時変化のドットプロット  
(右) OVA を取り込んだ TEC 割合の経時的割合変化

続いて、B16 メラノーマ由来の TEC の解析に加えて、B16 細胞に OVA を transfection した B16OVA メラノーマを C57BL6 マウスの皮下に接種し、2 週間後に腫瘍を切除、TEC を分離した。B16OVA 腫瘍由来 TEC を OVA ペプチド/クラス I 複合体 (H-2Kb/SIINFEKL) 特異的抗体で染色したところ、B16 腫瘍由来 TEC と比較して B16OVA 腫瘍由来 TEC で上記複合体の表出率が有意に高かった。(図 3)この結果より、TEC は腫瘍抗原取り込み能抗原提示能を有することが示唆された。

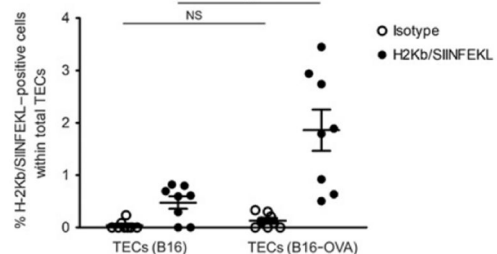


図 3 . OVA ペプチド/クラス I 複合体 (H-2Kb/SIINFEKL) 陽性 TEC の割合

### (3) TECの抗原特異的 CD8 + T 細胞抑制能および機序の解明

Suppression assay において、OVA 非導入 B16 腫瘍由来 TEC 添加群では、OT-I 細胞の有意な増殖抑制は認めなかったが、B16OVA 腫瘍由来 TEC 添加群では、容量依存性の OT-I 細胞の有意な増殖抑制を認めた。Cytotoxic assay では OVA 非導入 B16 腫瘍由来 TEC と共培養された CD8 + OT-I 細胞のターゲットに対する細胞傷害性の抑制は認めず、B16OVA 腫瘍由来 TEC と共培養された CD8 + OT-I 細胞のターゲットに対する細胞傷害性が有意に抑制された。(図4) これらの結果より、TEC は CD8 + T 細胞に対して抗原特異的に細胞増殖および細胞障害性抑制能を有することが示された。

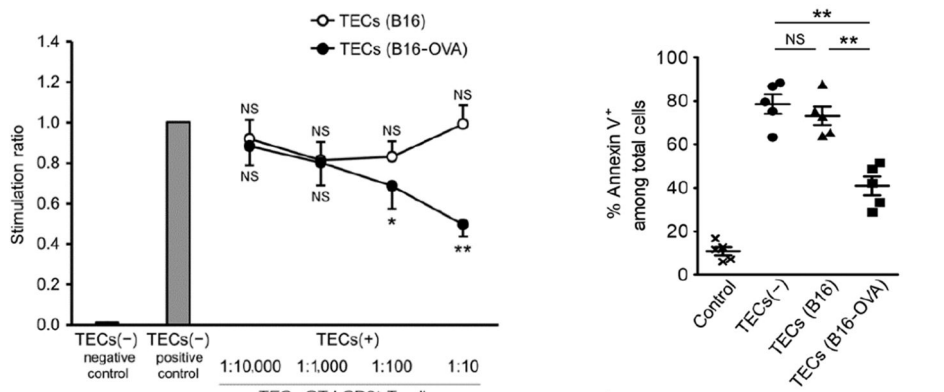


図4 . TEC の抗原特異的 CD8 + T 細胞抑制能  
(左) suppression assay における OT-I 細胞の増殖(陽性コントロールに対する割合)  
(右) cytotoxicity assay における細胞障害性

また suppression assay 中の transwell による TEC と OT-I 細胞の細胞接触阻害または抗 PD-L1 抗体によるブロッキングにより、続く cytotoxic assay において、TEC の CD8 + T 細胞に対する細胞障害性抑制能の消失を認めた。(図5)

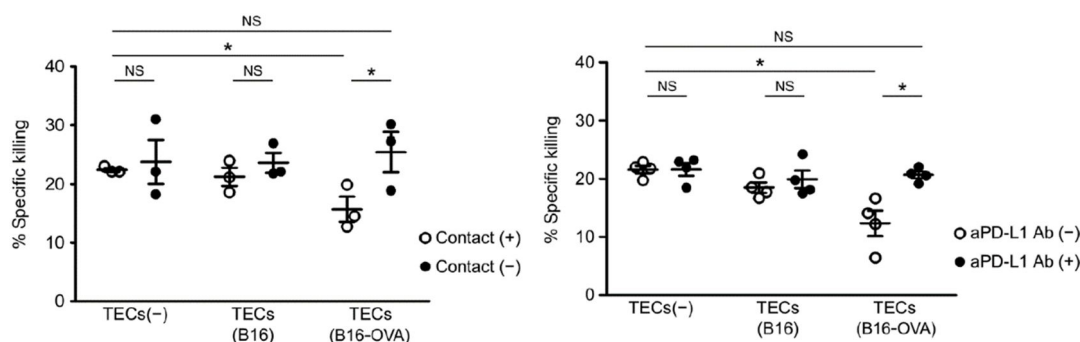


図5 . TEC の抗原特異的 CD8 + T 細胞抑制能における機能解析  
(左) cytotoxicity assay における細胞接触の有無  
(右) cytotoxicity assay における PD-L1 ブロッキング

なお、細胞内サイトカイン染色解析では TEC 添加により CD8 + OT-I 細胞の IL-2, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  産生能低下を認めたが、抗原特異性は認めなかった。これらの結果より、TEC は細胞接触による PD-1/PD-L1 経路を介して、CD8 + T 細胞の増殖と細胞障害性を抑制することが示された。

### (4) TECの抗原特異的 CD4+T 細胞分化に対する効果の検討

OT-II CD4 + 細胞をレスポンドーとした suppression assay では、OT-ICD8 + T 細胞の場合と異なり、TEC の添加による OT-II CD4 + 細胞の増殖抑制は認めなかった。しかしながら、同培養で得られた OT-II 細胞を、OT-I 細胞を OVA ペプチドでパルスした骨髄由来樹状細胞で刺激する共培養に添加する suppression assay では、B16-OVA 腫瘍由来 TEC と共培養した OT-II CD4 + T 細胞を加えた系で、OT-I 細胞の増殖抑制効果が認められた。OVA 非導入 B16 腫瘍由来 TEC と共培養した OT-II CD4 + T 細胞を加えた系では有意な OT-I 増殖抑制効果を認めなかったことから、TEC により抗原特異的免疫抑制性 CD4 + T 細胞が誘導されることが示唆された。(図6左) OVA-TEC と OT-II CD4 + 細胞との共培養中の上清では IL-10 および TGF- $\beta$  の濃度が上昇していた。さらに TEC との共培養中に抗 IL-10 または抗 TGF- $\beta$  抗体によるブロッキングした OT-II CD4 + 細胞は、OT-I 細胞を OVA ペプチドでパルスした骨髄由来樹状細胞で刺激する共培養に添加する suppression assay において、先に認められていた増殖抑制能を消失していた。

( 図 6 右 )

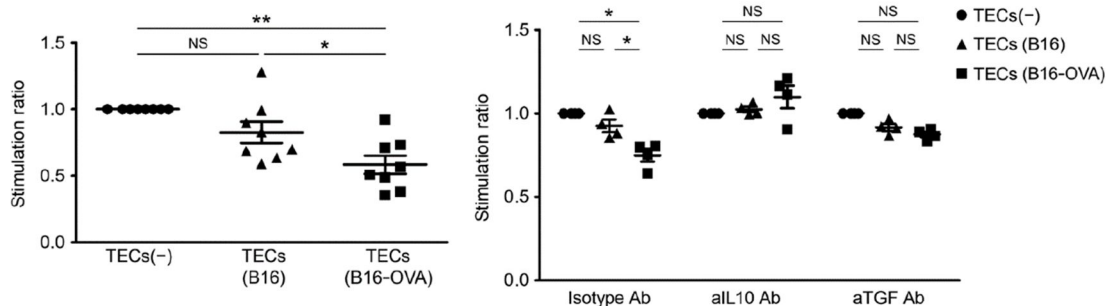


図 6 . TEC の抗原特異的抑制性 CD4 + T 細胞誘導能  
 ( 左 ) TEC 共培養後の OT-II 細胞を用いた suppression assay における OT-I 細胞の増殖 ( 陽性コントロールに対する割合 )  
 ( 右 ) TEC - OT-II 細胞共培養時のサイトカインブロックによる、OT-II の CD8 + T 細胞増殖抑制能の変化の比較

これらの結果より、TEC は IL-10 や TGF-b を介した刺激により抗原特異的免疫抑制性 CD4 + T 細胞を誘導することが示唆された。

( 5 ) マウス in vivo モデルでの TEC の免疫抑制作用の検討

TEC 特異的に PD-L1 を欠損したモデルである同系骨髄移植 PD-L1 ノックアウトマウスでは、TEC も PD-L1 を表出するコントロールである同系骨髄移植 wild マウスに比べ、腫瘍の成長抑制を認めた。( 図 7 左 )

さらに同系骨髄移植 wild マウスの腫瘍内浸潤 T 細胞では抗原特異的にアポトーシスが誘導されていたのに対して、同系骨髄移植 PD-L1 ノックアウトマウスでは腫瘍内浸潤 T 細胞のアポトーシスが有意に抑制されていた。( 図 7 中・右 ) これらの結果より、TEC が vivo モデルにおいても腫瘍特異的 T 細胞を抑制し、腫瘍成長を促進していることが強く示唆された。

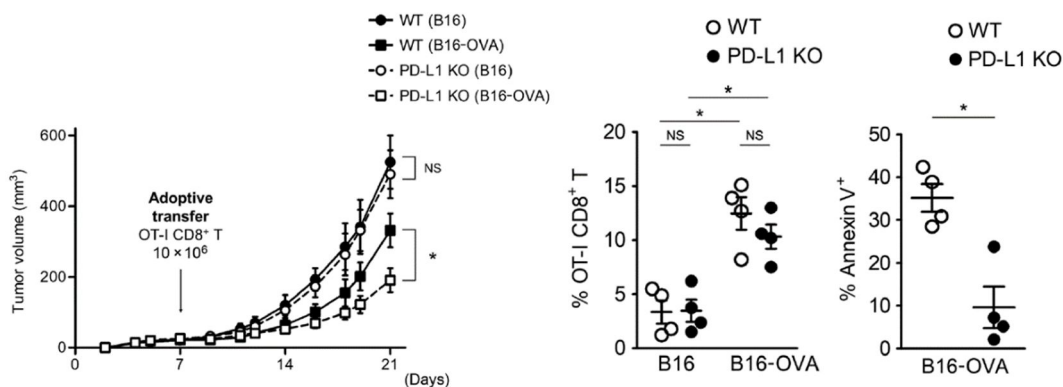


図 7 . 同系骨髄移植 PD-L1 ノックアウトマウスを用いた in vivo モデルにおける  
 ( 左 ) B16 および B16-OVA 腫瘍の成長曲線  
 ( 中 ) 腫瘍浸潤リンパ球中の OT-I CD8 + T 細胞の割合  
 ( 右 ) 腫瘍浸潤 OT-I 細胞中の Annexin V 陽性 ( アポトーシス ) 細胞割合

以上、これまでの研究結果から、TEC が免疫抑制能を有し、癌抗原特異的に IL-10 および TGF-b を介した免疫抑制性 CD4 + T 細胞の誘導、および PD-1/PD-L1 経路を介した直接的 CD8 + T 細胞抑制を行うことで、癌に対する免疫逃避機構に寄与している可能性が示唆された。この結果は TEC の免疫抑制性を減弱することで、免疫逃避をブレークし抗腫瘍効果が得られる可能性を示唆している。しかしながら、TEC が PD-L1 を表出するメカニズムは依然不明であり、今後の検討を有する。また本結果は B16 メラノーマを用いた実験系から得られたものであり、各種癌に適応できるような普遍的なメカニズムであるかは、引き続き異なる癌腫を用いての検討を要する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Taguchi Kazuhiro, Onoe Takashi, Yoshida Tomoaki, Yamashita Yoshinori, Taniyama Kiyomi, Ohdan Hideki	4. 巻 464
2. 論文標題 Isolation of tumor endothelial cells from murine cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Immunological Methods	6. 最初と最後の頁 105 ~ 113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jim.2018.11.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taguchi Kazuhiro, Onoe Takashi, Yoshida Tomoaki, Yamashita Yoshinori, Tanaka Yuka, Ohdan Hideki	4. 巻 -
2. 論文標題 Tumor Endothelial Cell-Mediated Antigen-Specific T-cell Suppression via the PD-1/PD-L1 Pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-19-0897">https://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-19-0897</a>	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Onoe Takashi, Yamaguchi Megumi, Irei Toshimitsu, Ishiyama Kohei, Sudo Takeshi, Hadano Naoto, Kojima Masato, Kubota Haruna, Ide Ryuta, Tazawa Hirofumi, Shimizu Wataru, Suzuki Takahisa, Shimizu Yosuke, Hinoi Takao, Tashiro Hirotaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Feasibility and efficacy of repeat laparoscopic liver resection for recurrent hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgical Endoscopy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1007/s00464-019-07246-3">https://doi.org/10.1007/s00464-019-07246-3</a>	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Masateru, Kobayashi Tsuyoshi, Oshita Akihiko, Abe Tomoyuki, Kohashi Toshihiko, Onoe Takashi, Fukuda Saburo, Omori Ichiro, Imaoka Yasuhiro, Honmyo Naruhiko, Ohdan Hideki	4. 巻 -
2. 論文標題 Laparoscopic versus open limited liver resection for hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis: a propensity score matching study with the Hiroshima Surgical study group of Clinical Oncology (HiSCO)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgical Endoscopy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1007/s00464-019-07302-y">https://doi.org/10.1007/s00464-019-07302-y</a>	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Shinji、Onoe Takashi、Banshodani Masataka、Taguchi Kazuhiro、Tanaka Yuka、Ohdan Hideki	4. 巻 203
2. 論文標題 Postoperative Portal Hypertension Enhances Alloimmune Responses after Living-Donor Liver Transplantation in Patients and in a Mouse Model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1392 ~ 1403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701147">https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701147</a>	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Taguchi Kazuhiro、Onoe Takashi
2. 発表標題 Novel mechanism underlying tumor immune-evasion across through tumor endothelial cells
3. 学会等名 AACR(American Association of Cancer Research) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田口 和弘
2. 発表標題 Novel mechanism underlying tumor immune evasion through tumor endothelial cells
3. 学会等名 American Association for Cancer Research 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田口 和弘
2. 発表標題 腫瘍血管内皮細胞を介した腫瘍の免疫逃避機構の解明
3. 学会等名 2017年 癌免疫学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	大段 秀樹  (Ohdan Hideki)  (10363061)	広島大学大学院医歯薬保健学研究院・消化器・移植外科学・教授   (15401)	