

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07277

研究課題名(和文) がん免疫抑制環境の改善に基づく新たながん免疫療法の開発に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research for development of novel cancer immunotherapy based on improvement of the cancer immunosuppressive microenvironment

研究代表者

鈴木 進 (Suzuki, Susumu)

愛知医科大学・公立大学の部局等・准教授

研究者番号：70518422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞(Treg)と呼ばれるリンパ球は、免疫に対して抑制的な働きを持ち、過度な炎症や、自己免疫反応から体を守っている。しかしながら、Tregの機能が強くなりすぎると、がん免疫を抑制し、がんの発症や進展の原因になるとされている。今回我々は、頭頸部がんを対象として、がん組織内免疫抑制におけるTregの関わりについて検討し、Tregが、頭頸部がんにおける免疫抑制に強く関わり、新たながん治療標的となりうることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん免疫治療は、外科的治療、放射線治療、抗がん剤治療に次ぐ、第4の治療法として認知されるに至ったが、その奏効率は20-30%であり、さらなる研究開発が必要とされている。オプジーボ、キイトルーダ等の免疫チェックポイント阻害剤が、現在、がん免疫治療の中心となっているが、近年、制御性T細胞(Treg)が新たな免疫治療薬開発における標的として注目されている。今回の研究において、免疫チェックポイント阻害剤と、Tregの制御による複合免疫療法が、頭頸部がんに対する新たな免疫療法として有効であることが示唆された。今後、更なる研究により、奏効率の向上が期待される。

研究成果の概要(英文)：Lymphocytes called regulatory T cells (Tregs), have a suppressive effect on immunity and protect the body from excessive inflammation and autoimmune reactions. However, if the function of Treg becomes too strong, it suppresses cancer immunity and cause the onset and progression of cancer. In this study, we investigated the involvement of Tregs in cancer immunosuppression in cancer tissues for head and neck cancer, and we revealed Tregs are strongly involved in immunosuppression in head and neck cancer and become new cancer treatment targets.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：制御性T細胞 免疫チェックポイント阻害剤 オプジーボ キイトルーダ がん免疫治療 がん複合免疫療法

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多くの癌種において免疫チェックポイント阻害剤(ICI)の治療効果が明らかとなり、がんに対する免疫治療法は、外科的治療、放射線治療、化学療法に次ぐ第4のがん治療法として認知されるに至った。しかしながらその治療効果は、20-30%の症例に限られていることから、世界中でさらなる免疫治療法の開発、改良が継続されている。

これまでの諸家の研究により、がん組織内においては、がんに対する免疫環境が強く抑制されており、がんの発症、進展に強く関わっていることが明らかとされてきた。免疫抑制環境を形成する原因として、1) 免疫チェックポイント分子(ICM)の発現、2) 走化分子の発現、3) 免疫抑制細胞[制御性T細胞(Treg), ミエロイド由来抑制細胞(MDSC), M2マクロファージ, がん関連繊維芽細胞(CAF)]の浸潤などが知られている。従って、がん免疫治療開発においては、これらの要因を取り除き、がん組織内免疫抑制環境を改善することに主眼が置かれている。ICIはICM(PD-1, PD-L1, CTLA-4など)を標的とした抗体医薬で、がん組織内で発現しているICMの相互作用を阻害し、がん免疫を活性化することにより、がんを縮小させると考えられている。しかしながら、ICMの発現は、がん免疫抑制環境形成要因の一部に過ぎず、ICIの奏効率が限定的となる原因と思われる。そこで、がん組織内免疫環境の詳細な解析により、個々の癌種において、抑制環境に応じた、新たながん免疫治療法の開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

頭頸部がんを対象として、フローサイトメトリー、多重免疫組織染色によりがん組織内における免疫環境を詳細に解析し、頭頸部がんにおけるがん免疫抑制要因を明らかとすること。また、これにより、がん免疫治療における新たな標的について考察すること。

### 3. 研究の方法

1) サンプル; 頭頸部扁平上皮がん(HNSCC)の手術を受けた30例から、末梢血、がん組織、郭清リンパ節を採取し、それぞれから、末梢血リンパ球(PBL)、がん浸潤リンパ球(TIL)、リンパ節リンパ球(LNL)を単離した。また、各症例についてがん組織のパラフィン薄切標本を作成した。

2) フローサイトメトリーによるリンパ球サブセット解析; CD4, CD8, CD45RA, FOXP3, CD25, CCR4, CCR7, ICM(4-1BB, ICOS, OX40, GITR, PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG3)に対するモノクローナル抗体を用いCD4+T細胞中エフェクターTreg(eTreg; CD4+CD8-CD45RA-FOXP3hi)の比率、Treg及び、CD8+T細胞上のCD25, CCR4, ICMの発現について解析した。Tregの検出は、Miyaraらの報告に準じ、CD4, CD8, CD45RA, FOXP3を用いて行った。CD4+CD45RA+FOXP3loをnaïve Treg, CD4+CD45RA-FOXP3hiをeTreg, CD4+CD45RA-FOXP3loをnonTregとした(図1)。

3) ICM(PD-L1, Galectin-9, CEACAM-1, PD-1), CD8, CD3, FOXP3に対するモノクローナル抗体とパラフィン薄切標本を用いた多重免疫染色によりがん組織内におけるICMの発現、T細胞及びTregの浸潤について解析した。

### 4. 研究成果

1) がん組織内浸潤Tregの頻度; PBL, TILの間でCD4+T細胞中Tregの頻度をフローサイトメトリーで比較した。TIL中eTreg頻度(n=24; average 36.63%; SD, 12.53)は、PBL(n=28; average, 4.28%; SD; 3.72)に比べて9倍高く、eTregにおけるCD25, FOXP3の発現量もPBL eTregより高値を示した(図2)。また、ICMの発現も顕著であった(図3)。これらのことから、HNSCC組織内においては、高頻度にeTregが浸潤し、強く活性化していることが示され、免疫抑制環境の形成に強く関与しているものと考えられた。これまで様々な癌種でTregの浸潤が高いことが報告されているが、今回の結果は、これまでの報告と比べても高値を示しており、HNSCCにおいては特にTregの関与が強いものと思われる。

さらに多重免疫染色により、がん組織内Tregの浸潤について検討した。免疫染色においてはCD3+CD8-FOXP3+細胞をCD4+Tregとして解析した。CD4+(CD3+CD8-)T細胞中のTregの浸潤頻度は、フローサイトメトリーでの結果と概ね類似しており、保存サンプルを用いた免疫染色による解析は新鮮材料を用いたフローサイトメトリーによる解析を反映できるものと思われた。

2) TILにおけるICMの発現; CD4+Tconv, CD8+Tconvともに、PBLに比べTILにおいて高発現し

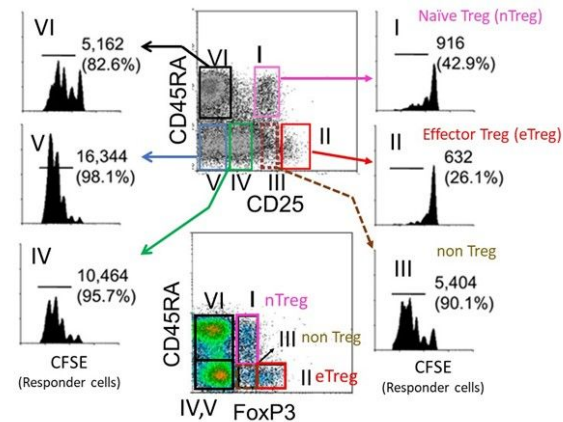


図1; CD45RA/FOXP3によるTregの分類 末梢血リンパ球をCD45RAとCD25で展開し、I~VIの分画をソーターで単離し、抑制活性をCFSEで検討すると、II(eTreg)において最も強い活性がみられた。CD45RAとFOXP3で展開したときの位置関係を上下のサイトグラムで示している。 Immunity 30, 899-911, June 19, 2009 Figure 1. (改変)

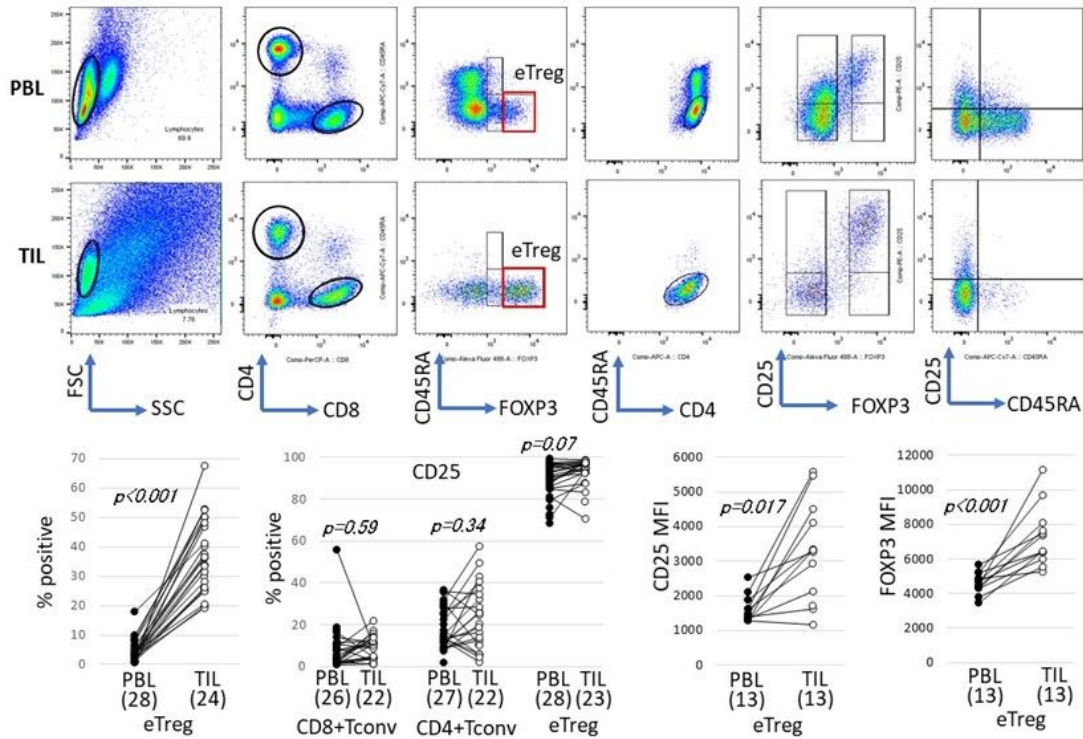


図2; HNSCC PBL, TIL におけるTreg 陽性率の比較 PBLと比較してTILにおいてはeTreg の頻度が 顕著に高く、 eTregにおけるCD25, FOXP3の発現量も高かった。

Cancer Sci. 2020 111, 6, p1943 Fig.1 引用

ており、強く抗原刺激にさらさ されていることが示唆された(図 3)。特に PD-1 の発現は高く、 PD-L1 との相互作用により機 能抑制がかかりやすい状況に あるものと思われた。また、 TIM-3 の発現が PD-1 に次いで 高く、ICI の候補となる可能性 が考えられた。CTLA-4 の発現 は非常に低く、ICI であるイピ リムマブ(抗 CTLA-4 抗体)の標 的とはなりにくく、むしろ、 eTreg を標的としている可能 性があると思われる。

3) がん組織内 ICM の発現およ びリンパ球の浸潤;がん組織内 の免疫活性状態を Tumor immune-microenvironment (TIME)分類 (図 4)を指標と して検討した。解析可能であった 25 症例のうち、4 例が inflamed, 18例がexcluded, 3 例が desert と判定された。検 討できた症例が少なく、臨床像 との関係を考察するには至ら なかったが、リンパ球浸潤が強 い癌種であることが示された。

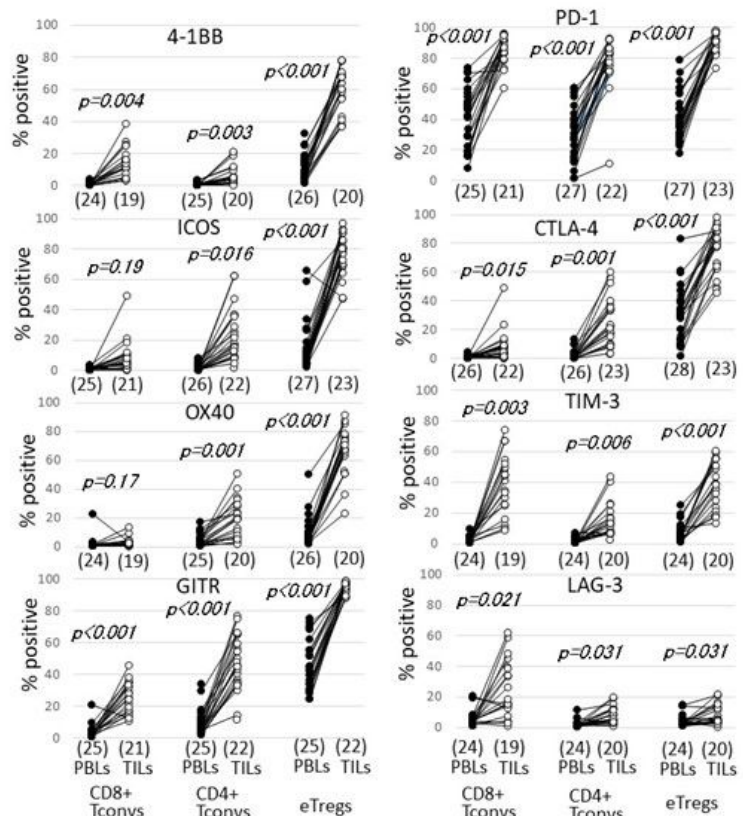


図3; HNSCC PBL, TIL におけるICM発現の比較

Cancer Sci. 2020 111, 6, p1943 Fig.2,3 改変

PD-L1 のがん細胞上における 発現(5%以上)は 25 例中 15 例(60%) にみられ、inflamed 症例で発現が高く、免疫の活性化と、 PD-L1 の発現の間に関連性が認められた。Galectin-9 CEACAM-1 はそれぞれ、12 例、5 例におい て陽性で、Galectin-9 は inflamed 症例に発現しやすい傾向がみられた。PD-L1 の発現は、がん 細胞よりも胞巣辺縁部のマクロファ-ジに強くみられた。PD-L1 の受容体である PD-1 は 50-70% の浸潤 T 細胞上に発現がみられた。PD-L1 発現細胞上で PD-1 陽性 T 細胞が接触している像が数

## Immune response

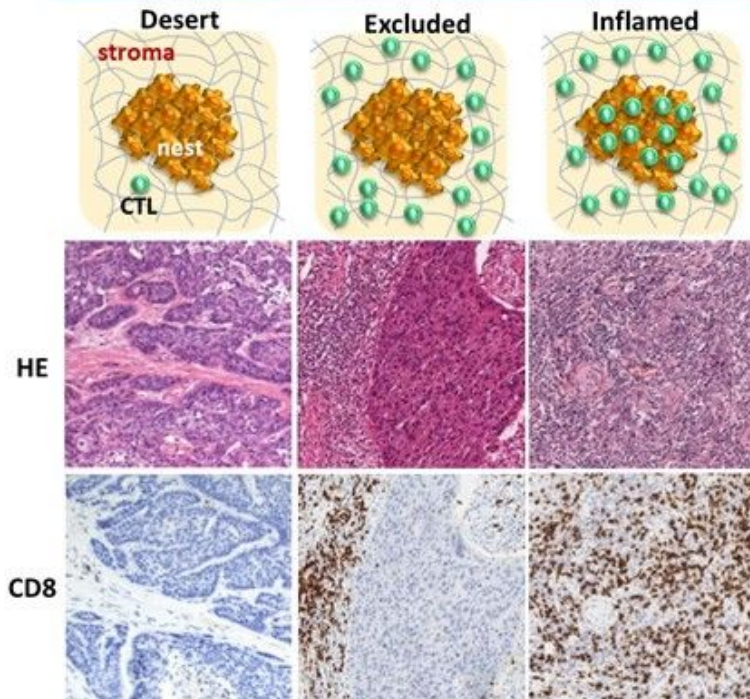


図4 TIME分類代表例

HE染色、CD8免疫染色を行った頭頸部がん症例から、代表例を示した。

**Desert**：腫瘍組織内へのリンパ球の浸潤は、間質内、胞巣内共に限られる。

**Excluded**：腫瘍組織内にリンパ球の浸潤がみられるが、その浸潤は、間質にとどまり、CD8+T細胞の胞巣内への浸潤は限定される。

**Inflamed**：腫瘍組織内にリンパ球の著しい浸潤がみられ、さらに、CD8+T細胞の浸潤が、胞巣内にも及ぶ。

Desert, Excluded, Inflamedの順に免疫応答が高くなると考えられる。

多く確認でき、がん組織内で、PD-L1/PD-1の相互作用による、免疫抑制が生じているものと思われた(図5)。

CD3+CD8-FOXP3+細胞をTregとして組織内Tregの浸潤を評価した。上述のようにCD4+(CD3+CD4-)T細胞中の陽性率はフローサイトメトリーで結果と概ね一致しており、30-50%程度であった。浸潤Tregは組織全体にみられるが、特に、胞巣辺縁部に多い傾向にあった。Inflamed症例においては、胞巣内にも強い浸潤が観察された。

4) リンパ節内Tregの浸潤；HNSCC手術で得られた郭清リンパ節中のTregについてフローサイトメトリーで検討した。触診で転移のあるリンパ節から得られたリンパ球(MLNL)と転移のないリンパ球(NMLNL)の間でTreg陽性率を比較すると、有意にMLNLで高かった。転移リンパ節では、Tregによる免疫抑制が強くなっていることが推測された。

### 5) 結語

HNSCCにおける免疫抑制環境の形成には、ICMによる免疫抑制の他に、Tregによる免疫抑制が強く関与していると考えられ、今後、Tregを標的とした免疫治療法の併用が重要と考えられる。HNSCC TIL eTregにはCTLA-4が強く発現しており、イピリムマブによるTregのtargetingは興味深い。

PD-L1はがん細胞の他にマクロファージ上に強く発現しており、PD-L1陽性のマクロファージががん免疫系に及ぼしている影響を及ぼしているのか、また、治療標的としての意義について明らかにすることは興味深い。

TIL CD8+Tconvには、PD-1の他にTIM-3の発現が高く、ICI併用療法の候補分子と考えられた。

MLNLにおいて、Tregの浸潤の亢進がみられた。がん免疫応答の起こっている可能性のあるリンパ節内におけるがん免疫の活性化は、がん免疫治療を成功させる上で重要な課題であり、今後さらなる検討が必要と考えられた。

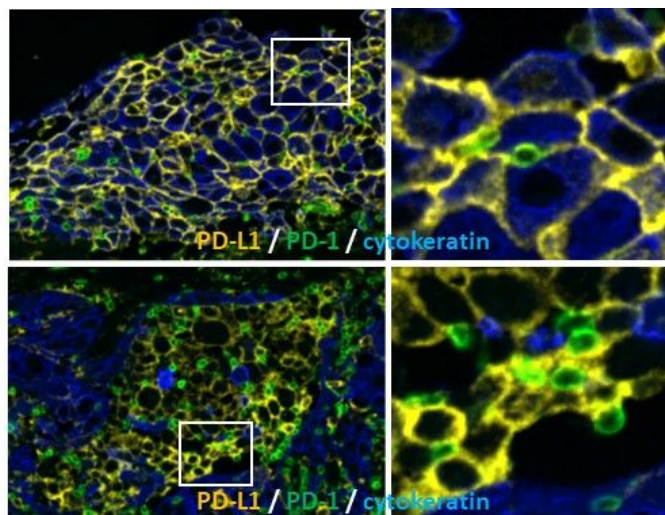


図5; HNSCC組織内におけるPD-L1/PD-1相互作用 PD-1+T細胞と、PD-L1+癌細胞(上段)、PD-L1+マクロファージ(下段)との結合が見られる。

Cancer Sci. 2020 111, 6, p1943 Fig.5 改変

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Suzuki S, Ogawa T, Sano R, Takahara T, Inukai D, Satou A, Tsuchida H, Yoshikawa K, Ueda R, Tsuzuki T	4. 巻 in press
2. 論文標題 Immune-checkpoint molecules on regulatory T-cells as potential therapeutic target in head and neck squamous cell cancers.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14422.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Watanabe M, Kanao K, Suzuki S, Muramatsu H, Morinaga S, Kajikawa K, Kobayashi I, Nishikawa G, Kato Y, Zannami K, Nakamura K, Tsuzuki T, Yoshikawa K, Ueda R, Sumitomo M	4. 巻 79
2. 論文標題 Increased infiltration of CCR4-positive regulatory T cells in prostate cancer tissue is associated with a poor prognosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Prostate	6. 最初と最後の頁 1658-1665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pros.23890.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Suzuki Y, Saito M, Ishii T, Urakawa I, Matsumoto A, Masaki A, Ito A, Kusumoto S, Suzuki S, Hiura M, Takahashi T, Morita A, Inagaki H, Iida S, Ishida T	4. 巻 25
2. 論文標題 Mogamulizumab Treatment Elicits Autoantibodies Attacking the Skin in Patients with Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical cancer research	6. 最初と最後の頁 4388-4399
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-18-2575	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nakagami Y, Suzuki S, Espinoza JL, Vu Quang L, Enomoto M, Takasugi S, Nakamura A, Nakayama T, Tani H, Hanamura I, Takami A	4. 巻 11
2. 論文標題 Immunomodulatory and Metabolic Changes after Gnetin-C Supplementation in Humans.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 pii: E1403.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu11061403.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Asai N, Kubo A, Suzuki S, Murotani K, Numanami H, Yoshikawa K, Ueda R, Yamaguchi E.	4. 巻 37
2. 論文標題 CCR4 Expression in Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells in Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Lung: A Prognostic Factor for Relapse and Survival.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Investigation	6. 最初と最後の頁 163-173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/07357907.2019.1582848.	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 Kato R, Yamasaki M, Urakawa S, Nishida K, Makino T, Morimoto-Okazawa A, Kawashima A, Iwahori K, Suzuki S, Ueda R, Mori M, Satoh T, Doki Y, Wada H.	4. 巻 67
2. 論文標題 Increased Tim-3+ T cells in PBMCs during nivolumab therapy correlate with responses and prognosis of advanced esophageal squamous cell carcinoma patients.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Immunother.	6. 最初と最後の頁 1673-1683
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-018-2225-x.	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 Masaki A, Ishida T, Suzuki S, Ito A, Narita T, Kinoshita S, Ri M, Kusumoto S, Komatsu H, Inagaki H, Ueda R, Iida S.	4. 巻 109
2. 論文標題 Human T-cell lymphotropic/leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax-specific T-cell exhaustion in HTLV-1-infected individuals.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 2383-2390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13654.	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Ayano Nakamura, Susumu Suzuki, Masao Seto, Souichi Takasugi, Jo Kanasugi, Ichiro Hanamura, Ryuzo Ueda, Akiyoshi Takami
2. 発表標題 Synergistic Effect of Venetoclax for Antibody Dependent Cell Cytotoxicity By Daratumumab
3. 学会等名 62nd ASH annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kondo Y, Suzuki S, Goto M, Ono Syoya, Ogawa T, Yoshikawa K, Tuzuki T, Ueda R
2. 発表標題 PD-L1 expression mechanisms are heterogeneous in oral cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ogawa T, Suzuki S, Sano R, Inukai D, Okamoto H, Takahara T, Yoshikawa K, Ueda R, Tsuzuki T
2. 発表標題 Comparison of eTreg frequency status between metastatic and non-metastatic lymphnodes in head and neck cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Suzuki S, Ogawa T, Sano R, Inukai D, Okamoto H, Takahara T, Sito M, Ishii T, Yoshikawa K, Ueda R, Tsuzuki T
2. 発表標題 Analysis of frequency and TCR repertoires of regulatory T-cell (Treg) of drain lymph node in head and neck cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ogawa T, Okamoto H, Inukai D, Sano R, Yamanaka S, Ueda H, Takahara T, Tsuzuki T, Yoshikawa K, Suzuki S, Ueda R
2. 発表標題 Development New Strategy for Head and Neck Immunotherapy from the Perspective of Translational and Reverse Translational Research
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki S, Ogawa T, Inukai D, Okamoto H, Sano R, Takahara T, Satou A, Yoshikawa K, Tsuzuki T, Ueda R
2. 発表標題 New strategy of immunotherapy for head and neck squamous cell cancers (HNSCCs) combined with IC and Treg inhibitors.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okamoto H, Suzuki S, Ogawa T, Inukai D, Sano R, Takahara T, Satou A, Yoshikawa K, Tsuzuki T, Ueda R
2. 発表標題 Characterization of tumor immune-microenvironmen (TIME) in papillary thyroid cancer (PTC).
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 1.Sano R, Suzuki S, Ogawa T, Inukai D, Okamoto H, Takahara T, Sato A, Yoshikawa K, Tsuzuki T, Ueda R.
2. 発表標題 Characterization of immune-suppressive microenvironment in head & neck cancer.
3. 学会等名 第77回 日本癌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 2.Suzuki S, Tsuzuki T, Ishida T, Kojima T, Kakimi K, Iida S, Oka M, Doki Y, Nishikawa H, Ueda R, and Wada H.
2. 発表標題 Interim immunostaining results from phase I study of pre-operative combination therapy with mogamulizumab and nivolumab.
3. 学会等名 第77回 日本癌学会総会
4. 発表年 2018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
研究分担者	小川 徹也 (Ogawa Tesuya)  (40334940)	愛知医科大学・医学部・教授  (33920)	
研究分担者	花村 一郎 (Hanamura Ichiro)  (70440740)	愛知医科大学・医学部・教授  (33920)	
研究分担者	佐野 隼 (Sano Rui)  (50813846)	愛知医科大学・医学部・講師  (33920)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------