

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16419

研究課題名(和文) 胸腺上皮性腫瘍の腫瘍内浸潤リンパ球に関する機能解析の研究

研究課題名(英文) Immunotherapeutic potential of CD4 and CD8 single-positive T cells in thymic epithelial tumors

研究代表者

山本 陽子 (Yamamoto, Yoko)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40814752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、胸腺上皮性腫瘍に対して免疫チェックポイント阻害剤の臨床試験が開始されているが、胸腺上皮性腫瘍の腫瘍内T細胞の腫瘍免疫応答に関する報告は認めない。胸腺上皮性腫瘍は胸腺上皮に由来し、様々な分化段階のT細胞が存在する。今回、胸腺上皮性腫瘍内のCD4、CD8 Single-Positive T(SPT)細胞に着目しT細胞機能を明らかにすることを目的とした。免疫プロファイリングのクラスター解析の結果、B3胸腺腫および胸腺癌Cは免疫チェックポイント分子の発現が高い群に分類された。サイトカイン産生能や癌細胞傷害能に関しても、B3胸腺腫および胸腺癌Cの腫瘍内T細胞で高い結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、胸腺上皮性腫瘍の組織型と腫瘍免疫活性とに関連性が認められた。胸腺腫B3および胸腺癌Cでは腫瘍免疫活性が高く、免疫治療が有効となる可能性が示唆された。胸腺上皮性腫瘍に対する免疫療法の基盤となる治験が得られる結果となった。

研究成果の概要(英文)：Indications for current immune checkpoint inhibitors are expanding and now include thymic epithelial tumors (TETs). Although clinical trials on immune checkpoint inhibitors for TETs are ongoing, a rationale has not yet been established for immunotherapy for TETs. Therefore, we herein performed phenotypic and functional analyses of T cells in surgically resected TET tissues.

By specifically focusing on CD4 and CD8 single-positive T cells, we demonstrated that T cells in B3 thymoma and thymic carcinoma tissues showed favorable characteristics for anti-tumor immunity, including anti-PD-1 therapy. Our current approach will lead to future applications for the establishment of precision medicine for cancer immunotherapy, including rare tumors such as TETs.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：胸腺上皮性腫瘍 T細胞 腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 胸腺腫・胸腺癌を含む胸腺上皮性腫瘍は、縦隔悪性腫瘍の中でも最も頻度の高い疾患群であり、病理学的には WHO 分類が広く用いられ、WHO Type A、AB、B1 では臨床的に完全切除により根治が得られることが多い。一方で、Type B2、B3、胸腺癌 C は浸潤性で発見時には進行期であることも多く切除後の再発率も高い。しかし、罹患患者数が多い疾患ではないこともあり浸潤性胸腺腫・胸腺癌の非切除および術後再発症例の標準治療の確立には至っていないのが現状である。

(2) 近年、癌免疫療法の発展により T 細胞抑制マーカーの中で現在 PD-1 に対する阻害抗体が、メラノーマ・非小細胞肺癌を初めとする様々な腫瘍に対して抗腫瘍効果を発揮し、臨床試験においては既存の化学療法治療より有意に長期成績の延長を示した。胸腺腫・胸腺癌に対する抗 PD-1 抗体の臨床試験が開始されているが、胸腺上皮性腫瘍における腫瘍内 T 細胞に対して抗 PD-1 抗体の有効性を示した報告はない。

(3) 胸腺上皮性腫瘍は T 細胞の分化・成熟に重要な役割を果たす胸腺上皮に由来し、正常胸腺と類似した機能を持つ functional tumor であり未分化な T 細胞、すなわち CD4+CD8+ Double-Positive T 細胞が多数存在する。胸腺上皮性腫瘍は病理組織学的に WHO 分類が広く用いられ、腫瘍細胞の形態と、腫瘍細胞と随伴する CD4+CD8+ Double-Positive T (DPT) 細胞の数の比率から組織型が決定される。しかし、癌免疫療法の領域では腫瘍細胞表面分子の MHC class I に提示された腫瘍抗原を細胞傷害性 T 細胞が T 細胞受容体 (TCR) を介して認識し腫瘍細胞を傷害するという過程が中心であり、癌免疫において CD4+CD8+ DPT 細胞の関与は認めない。そこで、腫瘍免疫について要である CD4, CD8 Single-Positive T (SPT) 細胞に着目し、T 細胞機能を明らかにする事とした。

2. 研究の目的

本研究は、完全切除不能または術後再発を認めた胸腺上皮性腫瘍に対する免疫療法を開発することを目的とする。胸腺上皮性腫瘍内の CD4, CD8 SPT 細胞に着目し、免疫療法の基盤的知見となる免疫プロファイルおよび腫瘍免疫活性を明らかにする。

3. 研究の方法

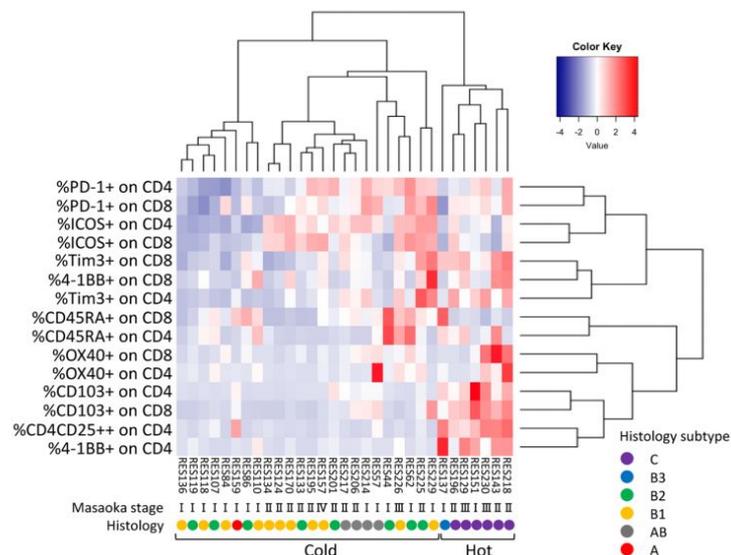
(1) 附属病院にて外科的切除を実施した胸腺上皮性腫瘍 31 例を対象に、採取した新鮮腫瘍組織より T 細胞を分離し、T 細胞表面分子 (CD45, CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD25, PD-1, Tim3, ICOS, 4-1BB, OX40, CD103) の発現率をフローサイトメトリーにて測定し、免疫プロファイリングを作成し、臨床病理学的因子との関連を検討した。

(2) T 細胞機能解析として、サイトカイン産生能および癌細胞傷害能を検証した。まず、Phorbol 12-Myristate 13 Acetate (PMA) / Ionomycin 刺激によるサイトカイン (IFN- γ , TNF- α , IL-2) 産生能をフローサイトメトリーにて測定した。

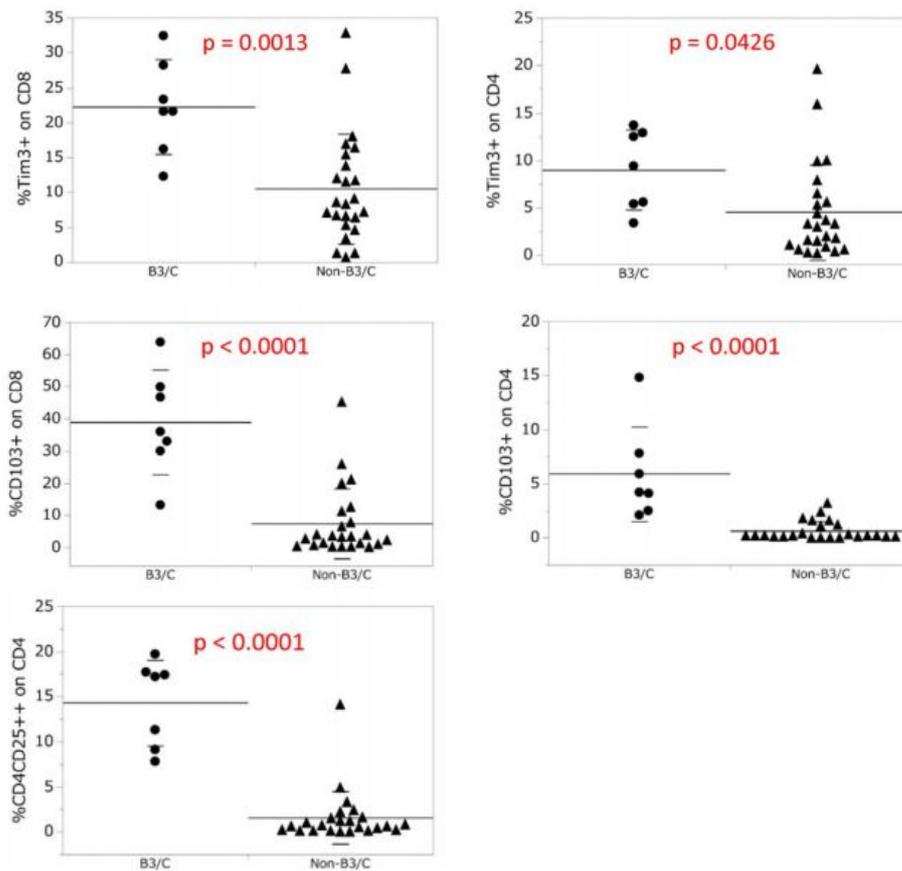
(3) 癌細胞傷害活性の評価法として T 細胞上の CD3 を認識する抗体と腫瘍細胞上の腫瘍抗原を認識する抗体の抗原認識部位を直列に繋げた二重特異性分子 (Bispecific T-cell Engager: BiTE) を用いて、T 細胞に TCR 依存的な癌細胞傷害活性を引き起こせるという腫瘍内微小環境における T 細胞性抗腫瘍免疫を擬似的に再現する評価を構築した。この癌細胞傷害活性の測定法に抗 PD-1 抗体投与の有無による癌細胞傷害活性、および活性の補助評価として IFN- γ を産生する CD8SPT 細胞の割合をフローサイトメトリーにて測定した。

4. 研究成果

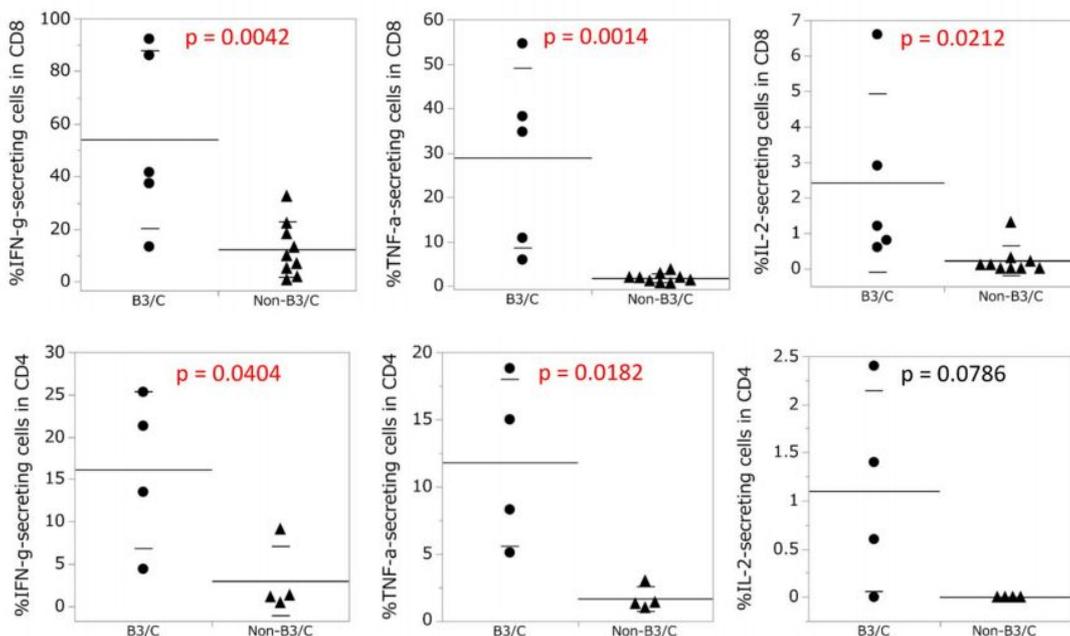
(1) 胸腺上皮性腫瘍の腫瘍 T 細胞の CD4SPT および CD8SPT 細胞における免疫チェックポイント分子の発現率のクラスター解析の結果、胸腺腫 B3 および胸腺癌 C (以下 B3/C, n=7) は、免疫チェックポイント分子の高発現群 (Hot cluster) に分類された (右図)。B3/C では、B3/C 以外の組織型 (non-B3/C, n=24) と比較すると Tim3 陽性、CD103 陽性および制御性 T 細胞 (CD4CD25++) の頻度が有意に高かった (下図)。したがって、免疫プロファイルと胸腺上皮性腫瘍の病理学的分類に強い関連を認めること



が示唆された。



(2) サイトカイン産生能の検討においては、B3/C では CD4SPT および CD8SPT 細胞の IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 を産生する細胞の割合は、それぞれ non-B3/C と比較すると有意に高値を示した (下図)



(3) 癌細胞傷害活性の検討では、B3/C の腫瘍内 T 細胞は、non-B3/C と比較すると抗 PD-1 抗体を投与することにより癌細胞傷害活性の有意な亢進が認められ、IFN- γ を産生する CD8SPT 細胞の割合は有意に亢進した。また、組織型毎に CD8SPT 細胞の割合が異なることから、腫瘍内 T 細胞から CD8SPT 細胞のみを分離し、同様の検討を行ったところ、non-B3/C と比較すると B3/C の CD8SPT では、抗 PD-1 抗体を投与することにより細胞傷害活性および IFN- γ を産生する CD8SPT の頻度が亢進した。以上の結果より、B3/C 腫瘍内 T 細胞では non-B3/C 腫瘍内 T 細胞に比して強い癌細胞傷害能を有し、抗 PD-1 抗体による免疫賦活効果が高いことが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Yoko Yamamoto, Kota Iwahori, Soichiro Funaki, Mitsunobu Matsumoto, Michinari Hirata, Tetsuya Yoshida, Ryu Kanzaki, Takashi Kanou, Naoko Ose, Masato Minami, Eiichi Sato, Atsushi Kumanogoh, Yasushi Shintani, Meinoshin Okumura, Hisashi Wada	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Immunotherapeutic potential of CD4 and CD8 single-positive T cells in thymic epithelial tumors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4064
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61053-8	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本 陽子
2. 発表標題 胸腺上皮性腫瘍についての免疫学的解析
3. 学会等名 癌免疫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本 陽子
2. 発表標題 胸腺上皮性腫瘍の免疫学的解析
3. 学会等名 肺癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本 陽子
2. 発表標題 Immune profiles of thymic epithelial tumors
3. 学会等名 胸部外科学会
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
--	---------------------------	-----------------------	----