

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19580

研究課題名(和文) CD28分子集簇能による胃癌抗PD-1抗体療法における responder 群の同定

研究課題名(英文) Identification of responder of gastric cancer patients for anti-PD-1 antibody therapy by quantification the capacity of CD28 molecules on the surface of T cells.

研究代表者

掛地 吉弘 (Kakeji, Yoshihiro)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：80284488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：T細胞のCD28 IS形成率の生理的意義と癌との関連を明らかにすること目的として、研究を開始した。まず、IS形成率の測定系を確立し、癌患者と健常人のIS形成率の比較を行ったが、有意差はなかった。しかし、T細胞におけるCD28の発現に有意差があった。次に、癌患者のT細胞CD28 IS形成率及びCD28陽性率では、その病期との相関性はなかった。術前化学療法例において、組織学的奏効度とCD28 IS形成率の相関性が認められた。さらなる症例の集積中である。また、免疫チェックポイント阻害剤例に関しても、検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤の癌治療への導入以降、診断や診断や治療へのアプローチが注目されている。学術的には免疫シナプス事象が癌患者一般にどのような臨床的意義があるのかを検討した点は極めて独創性が高い。現段階では免疫チェックポイント阻害剤の効果や適応との関連は明らかでないが、明らかになることは、コスト削減のみならず、消化器癌治療への恩恵をもたらす社会的にも、有意義であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify the physiological significance of the CD28 IS formation rate of T cells and its relationship to cancer. First, we established a system to measure IS formation rate and compared IS formation rate between cancer patients and healthy subjects, but there was no significant difference. However, there was a significant difference in the expression of CD28 on T cells. Next, the T-cell CD28 IS formation rate and CD28 positivity rate in cancer patients did not correlate with their stage of the disease. In preoperative chemotherapy cases, there was a correlation between histological response and CD28 IS formation rate. More cases are being collected. In addition, immune checkpoint inhibitors are under investigation.

研究分野：消化器外科

キーワード：胃癌 CD28 T細胞 免疫シナプス PD-1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

T 細胞の補助刺激因子 CD28 分子は T 細胞表面に均一に存在するが、刺激後に免疫シナプス (Immunological synapse: IS) を形成するため、刺激の入った部分に集簇する性質が知られている。この状態を IS 形成として、これを定量化し、T 細胞の反応性のバイオマーカーとなりうるか、胃癌抗 PD-1 抗体療法の responder 群のバイオマーカーとなりうるかを検証する研究である。第一の目標は、T 細胞表面 CD28 分子の集簇能の定量化を行う検出系を確立することである。さらに、第二ステップとして、このため、この検出系が癌患者と非癌健常人とで反応性がどうかどうかを検討することである。第三に、すでに広く臨床で用いられる免疫チェックポイント阻害剤の responder 群の抽出を行うことを目的とする。PD-1 の標的が CD28 分子であるとの報告を基に PD-1 遮断の新たな作用点の検証とそのメカニズムの解明を目指す。

具体的には、本研究の基盤となるが、イメージングサイトメトリーを用いて、T 細胞表面に分布する CD28 分子の細胞表面での動態を単一細胞レベルで検出し、細胞集団としてその集簇度を定量化することを確立することである。この検出系を元に胃癌、食道癌の末梢血での評価を行い、その意義を検討する。また、チェックポイント阻害剤治療胃癌患者を対象として T 細胞分画の CD28 分子の発現と動態解析による抗 PD-1 抗体の responder 群の検出を目的として、解析を進める。抗 PD-1 抗体治療開始後肺癌患者末梢血の解析より、増殖能をもつ PD-1+CD8+T 細胞が増加し、これらは CD28+であることを示された。これは、PD-1 治療高反応性 T 細胞は CD28+であることが必要条件となることを示すため、これを更に進めて、PD-1 治療後に CD28+T 細胞の CD28 シグナルが保持(再活性化)されることが PD-1 免疫療法の反応性を反映するという仮説で研究を進める。

2. 研究の目的

T 細胞リンパ球の機能とその IS 形成量を評価し、予後や治療効果との関係を明らかにする。健常人及び消化器癌患者の末梢血を用いて、イメージングサイトメトリーにて刺激後の T 細胞の免疫シナプス (immunological synapse: IS) に関連する変化の解析を行う。IS による変化はその細胞に入る刺激の強さを示す。これは細胞そのものの機能や分化状態を反映している。同時に表面抗原の解析や *in vitro* での機能解析を行うことで、IS 形成と T 細胞の分化状態と機能の関連を明らかにする。さらに、免疫チェックポイント阻害剤の治療患者にたいして、免疫シナプスの評価で、治療効果予測が可能となるか否かを検証する。

3. 研究の方法

1. イメージングサイトメトリーを用いた CD28 の IS 形成率の測定

末梢血由来 T 細胞を用いた *in vitro* での刺激前後の CD28IS 形成の測定の変化は、イメージングサイトメトリー (Image Stream) にて行った。従来のサイトメトリー機能を有し、表面抗原による分画ごとの CD28IS 形成率の測定系の確立を行う。

2. 健常人 CD28IS 形成に関する日間較差 健常人の CD28IS 形成率を複数回採取することにより、IS 形成測定値の変動性、再現性の評価を行う。

3. 胃癌、食道癌患者の末梢血中 T 細胞における CD28IS 形成を定量し、癌の進行度毎の評価、及び健常人との比較を行う。また、CD28 発現状態の比較を行う。

4. 胃癌、食道癌術前化学療法例における治療前後の CD28IS 形成の変化を比較して、効果予測となり得るか否かを検証する。

5. 胃癌、食道癌における免疫チェックポイント阻害剤投与例における末梢血中 T 細胞 CD28MC 形成率の測定を行い、治療効果との相関性を検討する。

4. 研究成果

1. イメージングサイトメトリーを用いた末梢血由来 T 細胞 CD28IS 形成率の測定系の確立

ヒト T 細胞株を用いた、*in vitro* での受容体刺激後の IS 形成の測定をイメージングサイトメトリー (シスメックス社 Image Stream (Amnis)) にて行った。末梢血より全血のまま、T 細胞を収集し、 α CD3 刺激、 α CD28 刺激による IS 形成の変化を捉える方法を確立した。さらに分画毎に CD28IS 形成の程度を定量化することに成功した (図 1)。イメージングサイトメトリーは、従来のフローサイトメトリー機能に加えて、各細胞形態の画像情報

が取得でき、細胞の表面抗原と同時に IS 形成の程度を捉えることが確認できた。これを蛍光面積と蛍光強度により定量化し、表面抗原による分画毎の IS 形成の測定が可能となった。

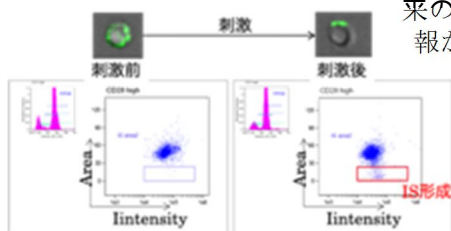


図 1. イメージングサイトメトリーを用いた CD28 の IS 形成率の測定

2. 健常人末梢血 T 細胞における IS 形成の日間較差に関する検証 IS 形成細胞率の日間変動を解析した。健常人 6 検体について、3 日以上測定を実施し、IS 形成細胞率の平均値、標準偏差 (SD) および変動係数 (CV) を算出した (図 2)。健常人末梢血 T 細胞における IS 形成細胞率における変動係数 (CV) は 8.03% から 25.52% であった。以上より、健常人において IS 形成

細胞率は 20%前後の日間変動を示すことが明らかとなった。

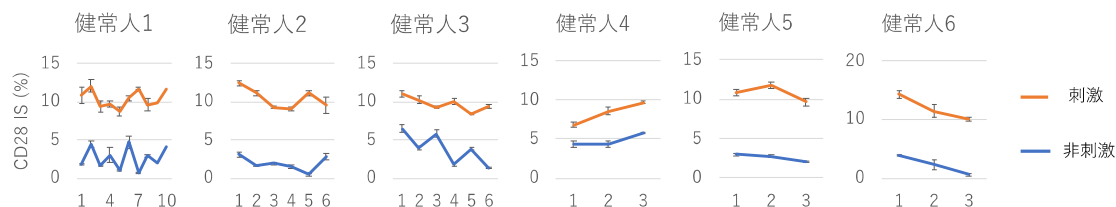


図 2 . 健常人における末梢血 T 細胞の日間較差の検討

3.新鮮血全血を試料として用いた。また、IS 形成細胞の解析は、CD3+ (もしくは CD4+および CD8+細胞) かつ CD28+陽性の細胞を対象として、CD28 の IS 形成細胞率を算出した。IS 形成細胞は、抗 CD28 抗体に由来する蛍光の面積値を指標に判定した。また、各検体における IS 形成細胞率の評価には、刺激条件における IS 形成細胞率から非刺激条件の IS 形成細胞率を差し引いた値を IS 形成細胞率として用いた。健常人および消化器癌患者における IS 形成細胞率を比較した結果、両者に有意な差は認められなかった($P = 0.78$) (図 3.右)。

次に、CD28 IS 形成細胞率では、健常人検体(11 検体)、胃癌・食道癌患者(24 検体)における各測定値を示している。各プロットは $n=3$ の平均値を示している (図 3.左)。CD28 陽性細胞率を比較すると、消化器癌患者において有意に低下していた($P = 0.03$)。

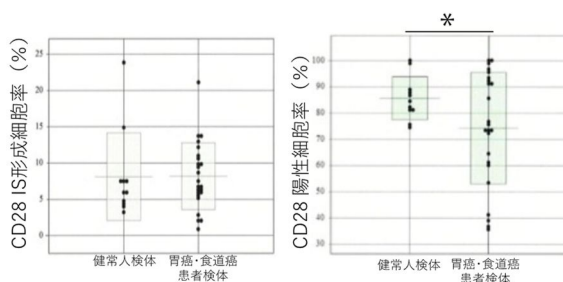


図 3 . 健常人検体および消化器癌患者検体における IS 形成細胞率/ CD28 陽性 T 細胞率の比較

また、癌患者において、ステージ分類と IS 形成細胞率および CD28 陽性細胞率に関連性は認められなかった (図 4)。

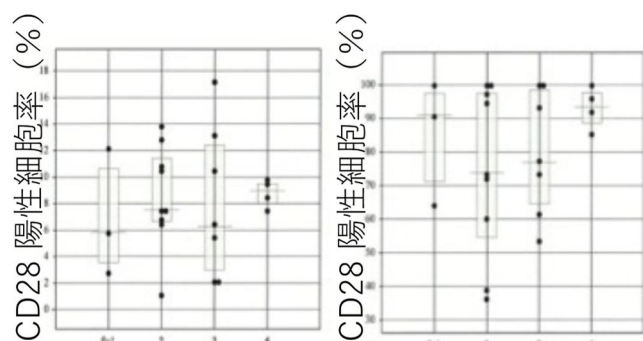
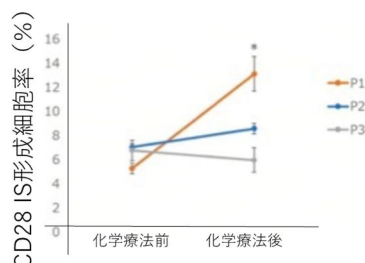


図 4 . 消化器癌患者検体におけるステージ毎の IS 形成細胞率/ CD28 陽性 T 細胞率の比較

5. 食道癌、胃癌 化学療法前後の CD28IS 形成率と化学療法例の奏効度とその相関性
術前化学療法における組織学的に治療効果が Grade3 と判定された患者において、治療後の IS 形成細胞率は約 2.5 倍増加し、健常人検体における日間変動よりも大きい変動を示した。



6 . 免疫チェックポイント阻害剤治療患者に関しては、現在、症例の集積中である。

図 5.術前化学療法例での IS 形成率の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 TAKAI RYO, FUNAKOSHI YOHEI, SUTO HIROTAKA, NAGATANI YOSHIKI, IMAMURA YOSHINORI, TOYODA MASANORI, YAKUSHIJIN KIMIKAZU, KIYOTA NAOMI, HARADA KEN-ICHI, YAMASHITA KIMIHIRO, KAKEJI YOSHIHIRO, MINAMI HIRONOBU	4. 巻 41
2. 論文標題 Serum Soluble Interleukin-2 Receptor as a Potential Biomarker for Immune-related Adverse Events	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1021 ~ 1026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.14857	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 FUKUOKA EIJI, YAMASHITA KIMIHIRO, TANAKA TOMOKO, SAWADA RYUICHIRO, SUGITA YUTAKA, ARIMOTO AKIRA, FUJITA MITSUGU, TAKIGUCHI GOSUKE, MATSUDA TAKERU, OSHIKIRI TARO, NAKAMURA TETSU, SUZUKI SATOSHI, KAKEJI YOSHIHIRO	4. 巻 39
2. 論文標題 Neoadjuvant Chemotherapy Increases PD-L1 Expression and CD8+ Tumor-infiltrating Lymphocytes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4539 ~ 4548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.13631	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 Suzuki Satoshi, Kanaji Shingo, Yamamoto Masashi, Oshikiri Taro, Nakamura Tetsu, Kakeji Yoshihiro	4. 巻 43
2. 論文標題 Controlling Nutritional Status (CONUT) Score Predicts Outcomes of Curative Resection for Gastric Cancer in the Elderly	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 World Journal of Surgery	6. 最初と最後の頁 1076 ~ 1084
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00268-018-04889-6	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 Saito Masafumi, Inoue Shigeaki, Yamashita Kimihiro, Kakeji Yoshihiro, Fukumoto Takumi, Kotani Joji	4. 巻 53
2. 論文標題 IL-15 Improves Aging-Induced Persistent T Cell Exhaustion in Mouse Models of Repeated Sepsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 228 ~ 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000001352	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. 発表者名 山下 公大、田中 智子、杉田 裕、福岡 英志、有本 聡、山本 将士、押切 太郎、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 消化器癌患者におけるT細胞表面分子集簇による機能評価
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 智子、山下 公大、岡 祐馬、柳田 匡俊、杉田 裕、福岡 英志、有本 聡、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、押切 太郎、松田 武、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 消化器癌患者におけるT細胞の刺激応答性の評価方法の検討
3. 学会等名 第22回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 掛地 吉弘
2. 発表標題 Symposia on Specific Tumors 消化管がん治療の新展開
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下 公大、田中 智子、杉田 裕、福岡 英志、有本 聡、松田 武、押切 太郎、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 食道癌患者におけるT細胞表面分子集簇による機能評価
3. 学会等名 第29回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下 公大、田中 智子、杉田 裕、渡部 晃大、福岡 英志、有本 聡、瀧口 豪介、高瀬 信尚、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、松田 武、押切 太郎、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 末梢T細胞のIS形成能の測定法の確立
3. 学会等名 第22回バイオ治療法研究会
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	山下 公大 (Yamashigta Kimihiro) (80535427)	神戸大学・医学部附属病院・特命准教授 (14501)	
研究分担者	坂本 明美 (Sakamoto Akemi) (90359597)	千葉大学・バイオメディカル研究センター・准教授 (12501)	
研究分担者	船越 洋平 (Funakoshi Yohei) (50566966)	神戸大学・医学部附属病院・助教 (14501)	
研究分担者	南 博信 (Minami Hironobu) (60450574)	神戸大学・医学研究科・教授 (14501)	

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
---------	---------