

令和 4 年 9 月 12 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16797

研究課題名(和文) 非活性型TGF (LAP) 陽性免疫細胞に着目した尿路上皮癌免疫治療の新規開発

研究課題名(英文) Immunotherapy for urothelial cancer focusing on inactive TGFb (LAP) positive immune cells

研究代表者

村井 亮介 (Murai, Ryosuke)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80748583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：尿路上皮癌患者検体を用いたLAP(TGF )陽性細胞の検討では、尿路上皮癌者におけるLAP陽性細胞の検討のため検体収集をすすめた。末梢血で尿路上皮癌患者の血液を抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗LAP抗体で染色しT細胞におけるLAP陽性細胞の割合を検討した。LAP陽性細胞の割合は1%から10%と幅があり、一定しないと考えられた。

腫瘍周囲LAP(TGF )陽性細胞の活性化評価では、まず臨床検体において活性化の有無を問わずLAP陽性細胞の存在を調べるため、抗LAP抗体にて膀胱癌組織のパラフィン包埋切片の組織免疫染色を施行した。しかしながら染色率が低く有効な免疫染色が得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、尿路上皮癌に対する癌免疫治療が期待されているが、治療効果は限定的であり、その要因として癌の複雑な免疫逃避機構があげられる。本研究では免疫抑制性サイトカインであるTGF が免疫細胞表面でLatency associated peptide(LAP)が結合した特徴的な非活性構造(LAP(TGF )陽性細胞)をとることに着目した。尿路上皮癌患者の末梢血中および腫瘍組織内のLAP(TGF )陽性免疫細胞を詳しく調べ、バイオマーカーとしての意義を検討した。臨床検体を用いたLAP, TGFbの検討を進めることで癌における新たな免疫抑制性システムが解明できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Examination of LAP (TGF ) -positive cells using urothelial carcinoma patient specimens: Sample collection was recommended for the examination of LAP-positive cells in urothelial carcinoma patients. Peripheral blood cells on urothelial cancer patients were stained with anti-CD3, anti-CD4, and anti-LAP antibody, and the proportion of LAP-positive cells in T cells was examined. The proportion of LAP-positive cells ranged from 1% to 10% and was considered to be variable.

Evaluation of activation of peritumor LAP (TGF ) -positive cells: In order to investigate the presence of LAP-positive cells in clinical specimens, tissue immunostaining of paraffin-embedded sections of bladder cancer tissue was performed with anti-LAP antibody. However, the staining rate was low and effective immunostaining could not be obtained.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：尿路上皮癌 免疫抑制細胞 LAP陽性細胞 TGFb

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、尿路上皮癌に対する癌免疫治療が期待されているが、治療効果は限定的であり、その要因として癌の複雑な免疫逃避機構があげられる。申請者は免疫抑制性細胞である Treg が筋層非浸潤膀胱癌の増悪因子である可能性を見出した際に、In vitro で Treg が TGF $\beta$  により誘導されることから尿路上皮癌における TGF $\beta$  の病的意義に着目した。本研究では TGF $\beta$  が免疫細胞表面で Latency associated peptide (LAP) が結合した特徴的な非活性構造 (LAP(TGF $\beta$ ) 陽性細胞) をとることに着目した。癌の臨床研究で LAP(TGF $\beta$ ) 陽性細胞を検討したものは少なく、大腸癌において患者末梢血および腫瘍組織中の LAP 陽性 T 細胞が多い (Mahalingam, Clin Cancer Res, 2012) といった報告が少数あるのみで、尿路上皮癌領域での検討はない。LAP 吸着カラムの論文は我々の共同研究者である滋賀医科大学病理学講座の寺本特任講師が報告したラット肝癌モデルに対する治療効果 (Yamamoto, Oncol Rep, 2006) が唯一であり、同グループは継続して研究成果を発信している (日本透析医学会, 2016)。尿路上皮癌で LAP(TGF $\beta$ ) の関与機構を解明し、LAP 陽性細胞が腫瘍増殖を助長あるいは Treg を誘導していることを示し、LAP 吸着カラムによる LAP 陽性細胞除去治療の効果を示すことができれば、尿路上皮癌治療の発展に寄与できるだけでなく、腫瘍免疫領域全体にも重要な貢献ができると考えた。

### 2. 研究の目的

TGF $\beta$  は癌治療標的として着目されているが、臨床研究では膀胱癌において患者血漿遊離 TGF $\beta$  濃度と予後の相関が示唆される (Milind, Plos One, 2014)、大腸癌において患者末梢血および腫瘍組織中の LAP 陽性 T 細胞が多い (Mahalingam, Clin Cancer Res, 2012) といった報告が少数あるのみで、使用可能な治療薬はもちろんバイオマーカーとしての地位も確立されていない。その理由として末梢血遊離 TGF $\beta$  では腫瘍局所の免疫状態を反映していない可能性や、LAP(TGF $\beta$ ) 構造の複雑性のため癌周囲環境での TGF $\beta$  の活性化が十分考慮されていないことが要因と考えられる。尿路上皮癌領域でも TGF $\beta$  をターゲットとした有意な報告はみられないが、我々はこれまでに膀胱癌における免疫抑制性細胞に着目し、筋層非浸潤膀胱癌組織を用いて Treg の組織免疫染色の検討を行い、臨床的悪性度の高い腫瘍では Treg 浸潤が多く、腫瘍周囲への Treg の浸潤が多い症例では膀胱内再発率が高いとの結果を報告した (図 2) (Murai R, PLoS One, 2018)。筋層浸潤膀胱癌では諸家からの報告でも Treg が再発進展のリスク因子になることが示されており、Treg をはじめとする免疫抑制性細胞は尿路上皮癌の増悪因子であることが強く示唆される。尿路上皮癌患者の末梢血中および腫瘍組織内の LAP(TGF $\beta$ ) 陽性免疫細胞を詳しく調べ、活性・非活性の解析をすることでバイオマーカーとしての意義を見出し新規治療に結びつけることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### ・尿路上皮癌患者検体を用いた LAP(TGF $\beta$ ) 陽性細胞の検討

尿路上皮癌患者の血液をマルチカラーフローサイトメトリーの手法で評価し、各種免疫細胞の詳細な分画および LAP 陽性細胞の割合を測定した。手術加療時に採取した腫瘍組織の固定標本を用いて免疫組織化学的手法で LAP(TGF $\beta$ ) 陽性細胞を染色し、免疫細胞中の割合を測定した。

#### ・LAP(TGF $\beta$ ) 陽性細胞と臨床因子の関連の検討

LAP 陽性細胞が腫瘍の悪性因子であるか否かを検討するため、検討で得られた LAP(TGF )陽性細胞の情報と腫瘍の臨床的悪性度、患者予後などを対比し、統計学的手法を用いて LAP(TGF )陽性細胞が予後増悪因子であるかどうかを検証した。

- ・ LAP 陽性細胞除去カラムによる抗腫瘍効果の検討

ラットを用いた膀胱癌発癌モデルを利用した検討を行った。MNU (N-メチル-N- ニトロソ尿素)の膀胱注入により発癌させた正所性膀胱癌モデルを作成し、BCG 膀胱注入治療を施行し、LAP 陽性細胞除去カラムを用いた体外循環治療を併用することで生存期間の延長および腫瘍サイズの縮小が得られるか、治療効果を検討した。

#### 4 . 研究成果

- ・ 尿路上皮癌患者検体を用いた LAP(TGF )陽性細胞の検討

- ・ LAP(TGF )陽性細胞と臨床因子の関連の検討

尿路上皮癌患者検体を用いた LAP(TGF )陽性細胞の検討では、LAP 陽性細胞の割合は 1%から 10%と幅があり、一定しないと考えられた。

腫瘍周囲 LAP(TGF )陽性細胞の活性化評価では、臨床検体において抗 LAP 抗体にて膀胱癌組織のパラフィン包埋切片の組織免疫染色を施行したが、染色率が低く有効な免疫染色が得られなかった。

今後の研究に必要となる臨床検体の収集を進め、末梢血単核球の保存を継続している。

- ・ LAP 陽性細胞除去カラムによる抗腫瘍効果の検討

MNU 膀胱注入により正所性膀胱癌発癌ラットを作成し、MNU 膀胱注入施行後 34,35 週目と 38,39 週目に BCG 膀胱注入治療を行い、体外循環治療群(N=3)、非体外循環治療群 (N=3)を比較した。体外循環治療群では MNU 膀胱注入施行後 36 週、40 週に LAP 陽性細胞除去カラムを用いた体外循環治療をおこなった。43 週目に解剖を行い、膀胱重量を比較したところ体外循環治療群の平均は 3.25g, 非治療群の平均は 5.35g であった。今回の検討では生存期間の差は検討できなかった。繰り返しの検討が必要となるため、同様の実験を繰り返す方針としている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|