

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17498

研究課題名(和文) B細胞応答を司る濾胞ヘルパーT細胞と濾胞制御性T細胞の大腸癌への影響に関する研究

研究課題名(英文) The influence of T follicular helper and T follicular regulatory cells on colorectal cancer

研究代表者

平川 昌宏 (Hirakawa, Masahiro)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：50561023

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)：近年B細胞応答を司るCD4TcellのサブセットとしてTFHが、更にはTFHを制御性に調節するCD4TregのサブセットとしてTFRの存在が提唱され注目を集めているが、腫瘍免疫におけるTFH、TFRに関する研究は十分とはいえない。本研究ではこれらのサブセットと大腸癌における関連性を明らかにすることで、新規予後予測因子などの臨床応用への基盤となる研究を行った。大腸癌患者では、健常人と比べTFH、TFRの増加傾向がみられ、更に大腸癌が進行するにつれTFH、TFRの発現が増加する傾向にあり、予後との関連性がある可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年自己免疫性疾患などの分野において、B細胞応答を調節するCD4TcellやCD4TregのサブセットとしてTFHやTFRが注目されてきている。しかしながら腫瘍免疫の分野では、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)におけるTFHの発現と予後が相関するとの報告が散見されてきているものの未だ十分とはいえず、TFRに関しては腫瘍との関連に関する報告はなされていない。本研究は大腸癌患者の末梢血中やTILにおけるTFH、TFRの発現と予後との関連性を解析した貴重な研究であると考え、今後更なる検討を重ね、予後予測としての活用や治療標的としての可能性なども探索していく予定である。

研究成果の概要(英文)：T follicular helper (TFH) and T follicular regulatory (TFR) cells play important roles in the regulation of B-cell immunity. While TFH promote B cell functions in the germinal center (GC), TFR function as negative regulators of the GC response. However, the function of TFH and TFR has not fully been elucidated in the field of tumor immunity. In this research, we analyzed the expression of TFH and TFR in peripheral blood (PB) and tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in patients with colorectal cancer (CRC). We verified that the proportion of TFH and TFR in PB and TIL is increased in patients with CRC patients. Furthermore, the proportion of TFH and TFR increased as the stage of CRC progressed. These results suggest that TFH and TFR may be related to the prognosis in CRC patients.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸癌 TFH TFR

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は本邦において増加傾向にある癌の一つであり、分子標的薬などの発達により生存期間は向上しつつあるものの、更なる予後の改善が急務である。

近年免疫チェックポイント阻害剤が様々ながん種に臨床応用され良好な成績が報告されており、今後がん免疫療法はますます期待される治療法となっている。CD4 regulatory T cells (Treg)は、免疫応答の抑制的な制御、すなわち免疫寛容を司るCD4 T cellの一群であり、がん免疫においては抗腫瘍免疫を抑制し腫瘍の増殖を促進すると考えられている。実際、大腸癌を含む様々ながん種において、末梢血や腫瘍組織内のCD4Treg数は健常人と比べ増加していることが報告されており、CD4Tregの増加レベルと腫瘍の進行は相関することが分かってきている。このような背景から、がん免疫療法の効果を高めるためにはCD4Tregを抑制する必要があると考えられ、CD4Tregは新規がん免疫療法の重要なターゲットとなってきた。CD4Tregには、いくつかの機能的にHeterogeneousなサブセットがあると考えられており、様々なSurface markerや転写因子などのIntracellular markerがCD4Tregのサブセットを明らかにするために研究されてきている。申請者はこれまで、Ikars転写因子ファミリーの一つであるHeliosの発現に注目し、血液悪性腫瘍における造血幹細胞移植後、再発をきたした患者に対する抗CTLA-4抗体 (Ipilimumab)の安全性・有効性を検証する臨床試験において、Responderの末梢血単核球中のHelios+ memory CD4TregはNon-responderと比べ低下していることを示し、Ipilimumabの効果とCD4Tregの非活性化(すなわちHelios+CD4Tregの低下)との関連性につき報告した(Davids MS, Hirakawa M et al. N Engl J Med 2016)。また、IL-2はTregの増殖・活性化にとって必要不可欠なサイトカインとされているが、申請者は造血幹細胞移植後に慢性GVHDを発症した患者に対し、Low dose IL-2を投与した場合、患者末梢血中においてHelios-CD4Tregではなく、Helios+CD4Tregが選択的に増加し、慢性GVHDの改善がみられることも報告した(Hirakawa M et al. JCI insight 2016)。このように申請者は、Heliosの発現はCD4Tregの活性化、増殖能、抑制能と関連している可能性を示すなど、CD4Tregの機能的に異なるサブセットの役割と、それを臨床に応用するための研究を行ってきた。近年自己免疫性疾患やGVHDなどの分野においてB細胞応答を調節するCD4 T cellのサブセットとしてTFHが注目されてきており、更には抗体産生などの液性免疫の制御能を有する新たなCD4TregサブセットとしてTFRが提唱されてきている。申請者も慢性GVHD患者においてはTFRの減少や機能低下がみられることや、それらがLow dose IL-2 therapyにて改善することなどを、米国血液学会にて報告してきた(Kamihara Y, Hirakawa M et al. ASH 2017) (Forcade E, Hirakawa M et al. ASH 2017)。

一方で腫瘍免疫の分野では、腫瘍浸潤リンパ球におけるTFHと癌との関連についての研究報告は、乳癌において一報(Gu-Trantien C, et al. J Clin Invest 2013)、大腸癌において一報(Bindea G, et al. Immunity 2013)のみであり、いずれもTIL中のTFHの存在は良好な予後に関連しているとの結果であった。このようにTIL中のTFHに関する限られた報告はあるものの、いまだその役割は十分に解明されたとは言えない。また末梢血中を循環するcirculating TFHと癌の関連については、これまで報告は限られている。またTFRに関しては、自己免疫性疾患やGVHDの分野にて研究が進んでいるが、腫瘍内浸潤TFRや末梢血を循環するcirculating TFRと癌に関する関連を研究した報告もこれまでなされていない。このような背景を鑑み、大腸癌患者の末梢血中や腫瘍浸潤リンパ球(TIL)におけるTFH、TFHの発現とその役割を解明することは、予後の予測や場合によってはTFR、TFH自体ががん免疫療法の新たなターゲットとなる可能

性も秘めている。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究においては大腸癌患者におけるTIL中のTFH, TFRの発現, および末梢血中を循環するcirculating TFH, TFRの発現を解析しその役割を明らかにすることで、発癌や進行, 予後との相関, 治療効果との関連性を探ることのみならず, TFH, TFRの分化にかかわる原因などを明らかにし, 新規治療ターゲットとなる可能性についても検討し臨床応用に展開するための基盤となる研究を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 大腸癌患者の末梢血, 腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の解析を行いTFH, TFR の発現を解析  
健常人末梢血におけるTHR, TFH, 大腸がん患者における末梢血におけるTHR, TFH, TIL や正常大腸粘膜内におけるTHR, TFH 発現の解析を行い, 大腸癌患者における, 末梢血やTIL中のTFHやTFRの発現を確認する。方法としては, 末梢血中のTFH, TFR の解析については, ヘルシードナーもしくは当院で診断された大腸癌患者から採取した血液からDensity gradient centrifugation 法によって末梢血単核球 (PBMCs) を分離し, Flow cytometryにてTFH, TFR の発現を解析する。TIL に関しては, 同様に当院にて診断・治療を受ける大腸癌患者の手術検体もしくは生検検体をGentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec)にて単細胞化し, PBMCs 同様にFlow cytometry にてTFH, TFRの発現を解析する。

### (2) 各ステージにおける TFH, TFR の発現

大腸癌患者をStage I ~ IVにわけ, 各ステージにおけるTFH, TFRの発現をフローサイトメトリーにて確認する。

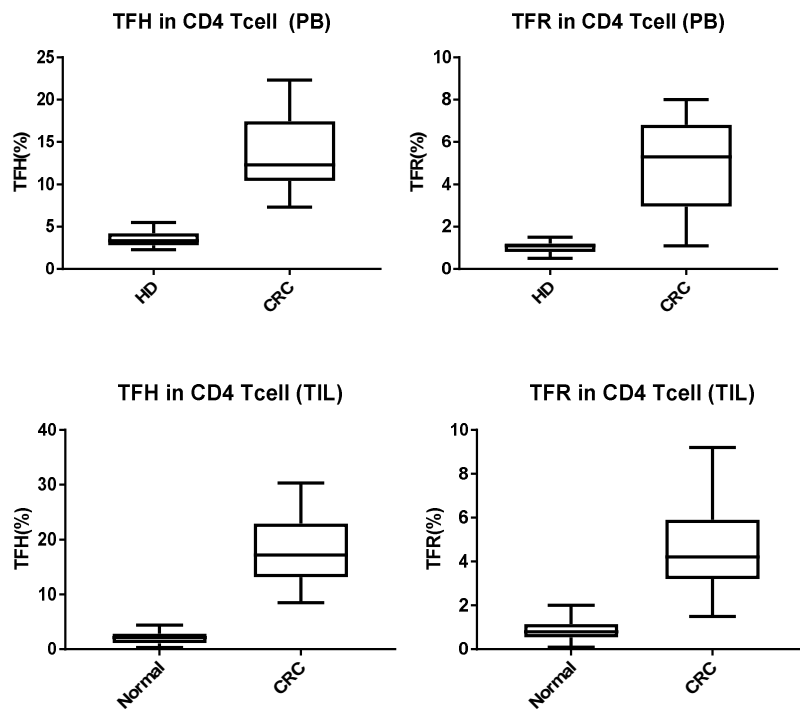
### (3) TFH, TFR の発現による大腸癌の予後解析

大腸癌患者の末梢血およびTIL中のTFH, TFRの発現によって, PFSを解析し予後との相関を確認する。

## 4. 研究成果

(1) 大腸癌患者の末梢血, 腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の解析を行いTFH, TFR の発現を解析  
末梢血中のTFH, TFRの解析については, ヘルシードナーもしくは当院で診断された大腸癌患者から採取した血液から末梢血単核球 (PBMCs) を分離し, Flowcytometry にて CD4TceII 中のTFH, TFRの発現を解析した。TILに関しては, 同様に当院にて診断・治療を受ける大腸癌患者の手術検体もしくは生検検体を単細胞化し, PBMCs 同様に Flowcytometry にて CD4TceII 中のTFH, TFRの発現を解析した。

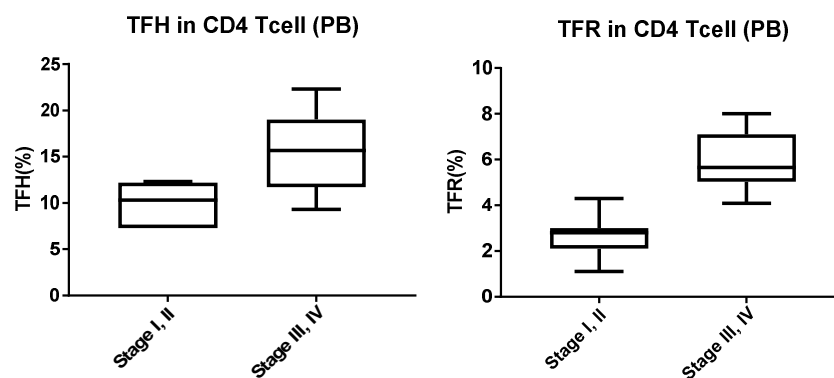
PBMCsの解析では, ヘルシードナーに比べ大腸癌患者において, 著明にTFH, TFRの増加を確認した (TFH; 3.35% VS 12.3%, TFR; 1.1% VS 5.3%)。TILに関しても, 正常粘膜と比べ腫瘍において著明にTFH, TFRの増加が確認された (TFH; 2.1% VS 17.2%, TFR; 0.8% VS 4.2%)。



## (2) 各ステージにおける TFH, TFR の発現

大腸癌患者を Stage I ~ IV に分け、各ステージにおける末梢血中の TFH, TFR の発現を解析してみると、末梢血中の TFH については Stage I, II; 10.3%, Stage III, IV; 15.7%と、ステージが進むにつれて TFH の割合が増加する傾向がみられた。TFR についても同様に Stage I, II; 2.8%, Stage III, IV; 5.7%と、癌が進行するにつれ発現の増加がみられた。

TIL においても同様の解析を行うと、TFH については Stage I, II; 12.0%, Stage III, IV; 21.0%, TFR については Stage I, II; 3.2%, Stage III, IV; 5.2%と、末梢血同様にステージの進行に伴い TFH, TFR の発現割合が増加する傾向が確認された。



## (3) TFH, TFR の発現による大腸癌の予後解析

解析対象となっている大腸癌患者を、各ステージ毎に TFH, TFR の発現に応じて 4 群 (Group1: TFH high, TFR low, Group2: TFH low, TFR high, Group3: TFH high, TFR high, Group4: TFH low, TFR low) に分け、PFS, OSなどを解析中である。現時点では症例数も少なく、観察期間も短いことから、明らかな傾向は見いだせていないが、今後更に症例を蓄積し解析を継続予定である。

#### (4) 追加解析予定

大腸癌患者間でのTHR, TFH の発現差の原因についての検討

・大腸癌患者の原発組織のmicroarray

前述の通り大腸癌患者を4つのGroupに分け、各Groupの大腸癌組織からmicroarrayを行い各群の遺伝子発現解析を行う予定である。また、microarrayにて各Groupの間で差の見られた遺伝子に関して、quantitative RT-PCRでも定量的にその差を確認する予定である。

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 (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
--	---------------------------	-----------------------	----

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