

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17685

研究課題名(和文) ヒト胃癌リンパ節における免疫抑制機構の解明

研究課題名(英文) The analysis for the suppressive mechanism of antitumor immunity in lymph nodes of gastric cancer

研究代表者

西塔 拓郎 (Saito, Takuro)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20646468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌における腫瘍、転移リンパ節、非転移リンパ節の組織浸潤リンパ球の活性化状態をFACSにて解析した。腫瘍>転移リンパ節>非転移近位リンパ節>非転移遠位リンパ節の順に免疫チェックポイント分子発現が高値であり、非転移リンパ節の中でも腫瘍進行に伴い組織浸潤リンパ球の疲弊化が観察された。以上より非転移リンパ節でも周囲のリンパ節転移が多くなる状況になるとリンパ球が疲弊化し、転移リンパ節になるとより腫瘍内のリンパ球の疲弊化状態に近づくことが判明した。FACS解析を用いたリンパ節中エクソソーム同定が未であり、今後エクソソーム上の免疫チェックポイント分子発現とリンパ球の抑制化機構の解明を進める予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌のリンパ節において、リンパ球活性化が近位リンパ節で起こっており、リンパ節転移が抗腫瘍免疫を抑制することが確認された。さらに、転移のないリンパ節においても腫瘍進行に伴い抗腫瘍免疫が抑制されてくることが判明した。転移のないリンパ節においても免疫抑制性機構が働いており、液性の免疫抑制性機構の存在が推測される。その中でもエクソソームに注目し、エクソソーム上抑制因子が免疫抑制に働く機序を明らかにすることは、抗腫瘍リンパ球誘導に対する免疫抑制機能の解明に繋がり、エクソソームやその内包因子を介した治療法の開発に寄与すると考えられる。今後も本研究を継続したい。

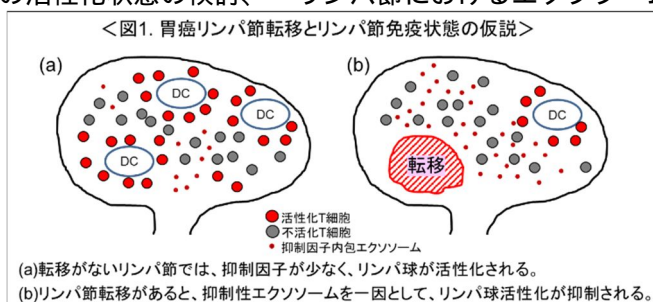
研究成果の概要(英文)：The activation status of tissue-infiltrating lymphocytes in tumor, metastatic, and non-metastatic lymph nodes in gastric cancer was analyzed by FACS. The expression of immune checkpoint molecules was higher in the order of tumor > metastatic lymph node > non-metastatic proximal lymph node > non-metastatic distal lymph node. Among non-metastatic lymph nodes, the tissue-infiltrating lymphocytes became exhausted as the stage of lymph node involvement increased. The exosomes in the lymph nodes have not yet been identified by FACS analysis. Further analysis has been conducted to address the suppression mechanism of lymphocytes in lymph nodes of gastric cancer by the molecular expression of immune checkpoints on exosomes expressed by tumor or tumor infiltrating lymph nodes.

研究分野：抗腫瘍免疫

キーワード：胃癌 リンパ節 T細胞疲弊化 エクソソーム 免疫チェックポイント分子 PD-1 PD-L1

1. 研究開始当初の背景

抗腫瘍免疫は、リンパ組織において癌抗原に対する抗原特異的リンパ球が誘導され、このリンパ球が腫瘍局所に遊走し活性化するとされる。リンパ節が抗原特異的免疫応答の場であるが、ヒト腫瘍のリンパ節における免疫抑制機序や、リンパ節転移の免疫応答への影響については、不明な部分が多い。今回の研究においては、ヒト胃癌の胃周囲リンパ節におけるリンパ球活性化状態をリンパ節転移の有無で評価すると共に、免疫抑制因子としてエクソソーム上抑制因子に注目し、リンパ節転移とリンパ節中リンパ球の活性化状態の検討、リンパ節におけるエクソソーム上抑制因子の免疫抑制機構の探索(図1)を目的として当研究を計画する。エクソソーム上の抑制因子が免疫抑制に働く場所が解明されることは、腫瘍免疫学における抗原特異的リンパ球誘導に対する免疫抑制機能の解明に繋がるのみでなく、エクソソームやその内包因子に対する治療法に大きな示唆を与える事が出来る。



2. 研究の目的

ヒト胃癌において、

リンパ節領域毎のリンパ球活性化を評価し、リンパ節転移の影響を評価する。

腫瘍内・リンパ節内エクソソーム上 PD-L1 の検出を試み、各部位のリンパ球活性化と比較検討し、腫瘍局所・リンパ節におけるエクソソーム上 PD-L1 の免疫抑制機序を解明する。

免疫抑制因子として、PD-L1 以外の副刺激分子も同様にエクソソーム上に発現することが考えられ、他の分子(CTLA-4, TIM-3, ICOS, LAG-3, OX-40 等)についても検討する。

本研究は、以下の点で独創的である。

腫瘍よりの距離を考慮したリンパ節領域毎のリンパ球活性化を評価した報告は稀有であり、腫瘍免疫学的なリンパ節の重要性を再考する事が可能となる。

新鮮腫瘍組織・リンパ節を用いたエクソソーム解析の例は稀有であり、エクソソームやその内包因子を介した治療法の開発に大きな影響を与える可能性を秘める。

3. 研究の方法

ヒト胃癌の末梢血・新鮮腫瘍組織・リンパ節サンプルを採取し、各サンプルにおけるリンパ球ポピュレーションや活性化状態を評価する。同時に血中・腫瘍内・リンパ節内エクソソーム上 PD-L1 の検出を行い、リンパ球活性化状態への影響を検討する。腫瘍より距離に近いリンパ節において、また転移を有するリンパ節において、エクソソーム上 PD-L1 の免疫抑制効果が高い事を仮説として考えている(図1)。

胃癌患者切除標本および末梢血の採取

患者本人・家族から同意を取得のうえ、手術時に胃癌切除標本および末梢血 20mL を採取する。リンパ節においては、胃小弯側・大弯側・脾上縁の各領域で各 1 個適切な大きさのリンパ節検体を採取する。リンパ節転移の有無については、通常の病理組織学的検査で判定する。

腫瘍組織内・リンパ節内リンパ球の抽出および末梢血中リンパ球の分離・凍結保存

切除標本サンプルは Gentle MACS (Miltenyi Biotec) を用いて細分化し、cell strainer (BD Bioscience) で精製しリンパ球を抽出する。末梢血サンプルは FicolI-Paque (GE ヘルスケア・ジャパン株式会社) を用いた比重遠心法でリンパ球を抽出する。それぞれ抽出したリンパ球は凍結保存する。

腫瘍内・リンパ節内エクソソーム上 PD-L1 検出および末梢血中エクソソーム上 PD-L1 検出

保存した腫瘍・リンパ節サンプルで、FACS を用いてエクソソーム上 PD-L1 の評価を行う。使用する蛍光抗体は CD9, CD63, CD81, PD-L1, CTLA-4, TIM-3 等を予定する。末梢血エクソソームは末梢血サンプルを超遠心法で精製する。FACS・ウェスタンブロッティング法による PD-L1 発現解析を行う。

腫瘍組織の mRNA の抽出および cDNA への逆転写と凍結保存

切除標本サンプルの一部(2-3mm 角)を Gentle MACS (Miltenyi Biotec) を用いて細分化し、RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を用いて mRNA を抽出する。mRNA は Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用いて逆転写を行い、cDNA を作成し凍結保存する。

FACS による T 細胞の活性化状態の解析

保存した検体において、FACS を用いて T 細胞の活性化状態を評価する。使用する蛍光抗体は CD3, CD4, CD8, PD-L1, CTLA-4, TIM3, Granzyme, Ki-67 等を予定する。TIL においては腫瘍組織や死細胞が混入する頻度が高く、Fixable Viability Dye (FVD) を用いる。TIL・リンパ節中 T 細胞と末梢血 T 細胞との間で染色比較を行う。TIL 染色の実際を示す(図3)。

エクソソーム上分子発現・T細胞活性化と臨床病理学的因子の相関の解析

各サンプルにおけるエクソソーム上 PD-L1 発現と T 細胞の活性化状態の相関を検討する。これらのパラメーターと臨床病理学的因子との相関を検討する。臨床病理学的因子は、年齢、性別、TNM stage、組織型、腫瘍径、予後などの因子を考慮する。これにより今後、エクソソームを標的とした免疫療法などの対象癌種を判断する一助となることが期待できる。

腫瘍組織の遺伝子プロファイル

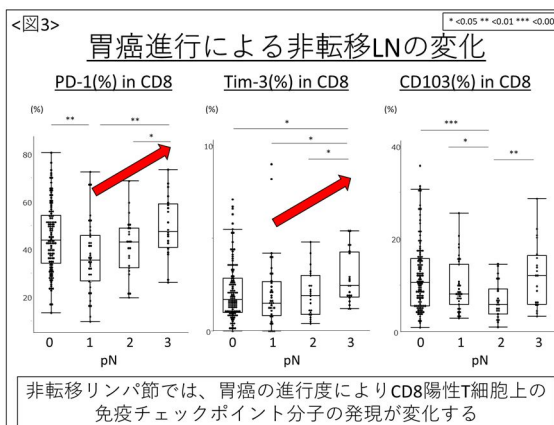
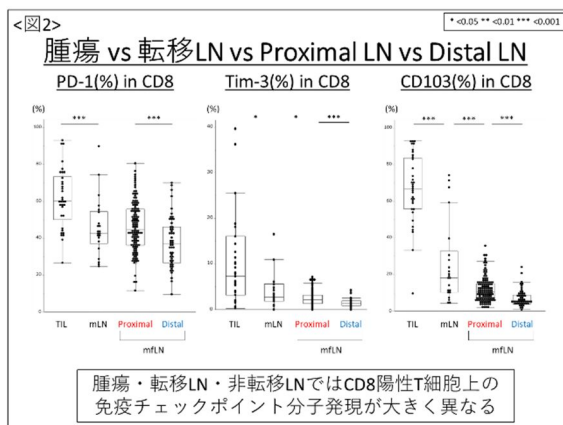
腫瘍内・リンパ節内エクソソーム(その内包因子)は、腫瘍組織または腫瘍周辺組織に発現する因子、産生されるサイトカインなどの因子により影響されることが予想される。保存した cDNA を使用し、PCR 法で、IFN γ 、IL-1、IL-2、IL-6、IL-12、IL-17 などのサイトカイン、CXCL-10、CCL-20 などのケモカイン等の mRNA の定量を行い、エクソソーム上分子の発現量、T 細胞活性化状態と腫瘍遺伝子プロファイルを比較検討する。

In vitro におけるエクソソーム内 PD-L1 のリンパ球抑制実験

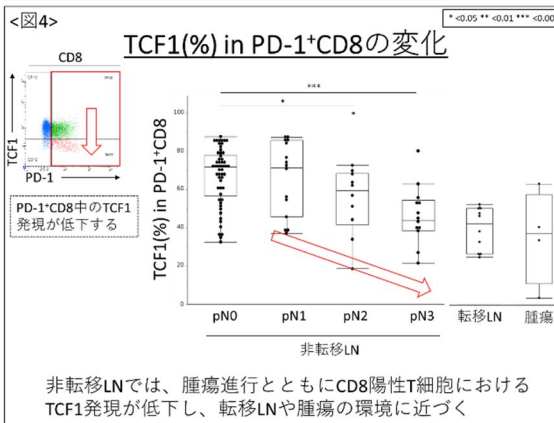
臨床腫瘍サンプルを初代培養し上清を採取する。上清中のエクソソーム上 PD-L1 発現を評価し、保存した末梢血リンパ球サンプルを用いて、これらの上清の T 細胞活性化状態への影響を in vitro で検討する。検討する項目は PD-1、CTLA-4、TIM3、ICOS、Ki-67 等のリンパ球活性化状態、granzyme、IFN γ 、TNF、IL-2 などのサイトカイン産生能を評価する。

4. 研究成果

<目的> 胃癌症例 55 例より、腫瘍(n=38)、転移リンパ節 (mLN, n=24)、非転移近位リンパ節 (Proximal, n=137) 非転移遠位リンパ節 (Distal, n=56) のサンプルを集積し、組織浸潤リンパ球を抽出した。組織浸潤リンパ球の FACS 解析を行ったところ、腫瘍、mLN、Proximal、Distal における CD8 陽性 T 細胞上の PD-1 発現は 60/44/46/36%、Tim-3 発現は 7.8/3.1/2.1/1.4%、CD103 発現は 68/18/11/5.8%と、腫瘍>mLN> Proximal>Distal の順に免疫チェックポイント分子発現が高値であった(図2)。また非転移リンパ節中でも pN stage が高いほど、PD-1 や Tim-3 発現は上昇し、サイトカイン産生能が低下し、樹状細胞の CD86 発現が低下していた(図3)。



メモリーT細胞への分化に必須の転写因子である TCF1 に注目し、抗腫瘍免疫に重要と考えられる TCF1+PD-1+CD8 陽性 T 細胞を評価したところ、PD1+CD8 陽性 T 細胞における TCF1 発現は腫瘍、mLN、Proximal、Distal で 33/48/70/54%であった(図4)。以上より腫瘍より近位の非転移リンパ節は早期癌でもリンパ球活性化が確認され、周囲のリンパ節転移が多くなるにつれリンパ節中のリンパ球が疲弊化し、転移リンパ節になるとより腫瘍内のリンパ球の疲弊化状態に近づくことが判明した。



<目的> 腫瘍とリンパ節サンプルを DMEM メディウムに留置し、上清より超遠心法を用いてエクソソームを抽出し、Bioanalyzer においてはエクソソームの存在を確認した。この上清を用いて FACS 解析で CD9、CD63、CD81 抗体によるエクソソーム同定と、エクソソーム上の PD-L1、CTLA-4、TIM-3 の評価を試みた。現在までのところ CD9、CD63、CD81 抗体によるエクソソーム同定が出来ていない状況である。今後、ウエスタンブロッティング法によりエクソソーム上の PD-L1 分子や他の分子(CTLA-4、TIM-3、ICOS、LAG-3、OX-40 等)を評価し、各リンパ節におけるリンパ球活性化状態とエクソソーム上の分子発現の相関を検討する予定である。

<総括> 胃癌のリンパ節において、リンパ球活性化が近位リンパ節で起こっており、リンパ節転移が抗腫瘍免疫を抑制することが確認された。さらに、転移のないリンパ節においても腫瘍進行に伴い抗腫瘍免疫が抑制されてくることが判明した。転移のないリンパ節においても免疫抑制

性機構が働いており、液性の免疫抑制性機構の存在が推測される。その中でもエクソソームに注目し、エクソソーム上抑制因子が免疫抑制に働く機序を明らかにすることは、抗腫瘍リンパ球誘導に対する免疫抑制機能の解明に繋がり、エクソソームやその内包因子を介した治療法の開発に寄与すると考えられる。今までのところ FACS 解析によるエクソソーム同定が行えておらず、エクソソーム上の抑制因子の評価まで到達していない。リンパ節毎のリンパ球活性化は評価可能となったため、今後も本研究を継続し、エクソソーム上の抑制因子を介した抗腫瘍免疫抑制化機構の解明と、同機構を介した新規治療薬開発に取り組みたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Koh Masahiro, Takahashi Tsuyoshi, Kurokawa Yukinori, Kobayashi Teruyuki, Saito Takuro, Ishida Tomo, Serada Satoshi, Fujimoto Minoru, Naka Tetsuji, Wada Noriko, Yamashita Kotaro, Tanaka Koji, Miyazaki Yasuhiro, Makino Tomoki, Nakajima Kiyokazu, Yamasaki Makoto, Eguchi Hidetoshi, Doki Yuichiro	4. 巻 24
2. 論文標題 Propranolol suppresses gastric cancer cell growth by regulating proliferation and apoptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 1037 ~ 1049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-021-01184-7	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 該当する

1. 著者名 Hagi Takaomi, Kurokawa Yukinori, Takahashi Tsuyoshi, Saito Takuro, Yamashita Kotaro, Tanaka Koji, Makino Tomoki, Yamasaki Makoto, Motoori Masaaki, Kimura Yutaka, Nakajima Kiyokazu, Eguchi Hidetoshi, Doki Yuichiro	4. 巻 51
2. 論文標題 Taste alteration after gastrectomy in patients with gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 777 ~ 784
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-020-02194-1	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 該当する

〔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
---------	---------