

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591894

研究課題名(和文)新規Treg細胞マーカー(VEGFR2)を標的としたTreg細胞制御療法の開発

研究課題名(英文)Development of immunotherapy against regulatory T cells targeting a new biomarker, VEGFR2

研究代表者

大西 秀哉(Onishi, Hideya)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30553276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌治療切除症例における腫瘍局所VEGFR2+の制御性T(Treg)細胞数と予後との関連の解析を行い、大腸癌組織局所のVEGFR2+FOXP3+Treg細胞数は単独で大腸癌患者の予後予測因子であるという結果を得た。これにより、VEGFR2+Treg細胞が治療標的となり得る妥当性が得られた。この結果を受け、In vitroの解析を行い、蛋白多糖体PSK、basiliximab、Cox-2阻害剤およびbevacizumabがTreg細胞数を有意に抑制し、またbasiliximabでTreg細胞数を減少させた後で誘導した活性化リンパ球では細胞障害活性が亢進することを確認した。

研究成果の概要(英文)：Relation between the number of tumor-infiltrated VEGFR2+ regulatory T (Treg) cells and prognosis in colorectal cancer patients with curative surgical resection was analyzed. The number of tumor-infiltrated VEGFR2+FOXP3+Treg cells was an independent prognostic factor for colorectal cancer. These results indicate the validity that VEGFR2+ Treg could be a therapeutic target. In vitro experiment, protein-bound polysaccharide, basiliximab, Cox-2 inhibitor and bevacizumab significantly reduced Treg number. Activate T lymphocytes induced after the depletion of Treg using basiliximab showed the increase of cytotoxicity against cancer cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：制御性T細胞 VEGFR2 FOXP3 細胞障害性T細胞 抗腫瘍効果

1. 研究開始当初の背景

制御性T細胞 (Regulatory T cells : Treg 細胞) は、CD4+ T細胞の一亜系であり、自己抗原に対する反応を負に制御している。したがって、1) Treg 細胞増加法開発は、自己免疫疾患あるいは移植医療への応用が期待される。一方、2) Treg 細胞減少法開発は、自己抗原である腫瘍関連抗原に対する抗腫瘍免疫の増強をもたらす、癌ワクチン療法への応用が期待される。すなわち、Treg 細胞の数および機能をコントロールする手法の開発は、種々の病態に対する新たな治療法を提供しうる。

2. 研究の目的

Treg 細胞は、様々な病態 (自己免疫疾患や癌など) に対する新規治療標的として注目されている。我々は、Vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR2) が Treg 細胞に特異的に発現していることを見出した。したがって、「VEGFR2 を標的とした Treg 細胞制御療法を開発する」ことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 正常組織、自己免疫疾患組織および癌組織における VEGFR2 発現プロファイル作成: VEGFR2 の治療標的としての特異性および安全性を確認するために、手術時摘出組織 (正常組織、自己免疫疾患関連組織) における遺伝子および蛋白レベルでの VEGFR2 発現を RT-PCR、蛍光免疫組織染色および western blot 法にて詳細に解析し、VEGFR2 発現プロファイルを作成する。特に、蛋白レベルでの発現を高感度で定量的に検証するために、現在、我々が開発中の「半定量的蛍光免疫組織染色法」(Kai M et al, Cancer Sci, 2011) を応用する。

(2) 癌と VEGFR2+ Treg 細胞: 我々は、腫瘍局所の CD8+ T 細胞/Treg 細胞 (従来の FOXP3+ Treg 細胞) 比が大腸癌の独立予後予測因子であることを明らかにした (Suzuki H et al, Cancer Immunol Immunother, 2010)。VEGFR2+ Treg 細胞が予後を含めいかなる臨床的意義を有するのか上記コホート (大腸癌組織) を用いて統計解析する。

(3) 既存の薬剤による制御: 既存の抗癌剤、抗体、シグナル経路阻害剤の VEGFR2+ Treg 細胞の増殖に及ぼす影響を末梢血 VEGFR2+ Treg 細胞を標的とし、FACS 解析にて網羅的に解析し、増殖制御に関与する薬剤を検出する。

4. 研究成果

(1) VEGFR2+ Treg 細胞の生体内における分布を蛍光免疫染色を行い、確認した。FOXP3+VEGFR2+ Treg 細胞の蛍光免疫組織像を示す (業績、図1)。腫瘍組織に浸潤した

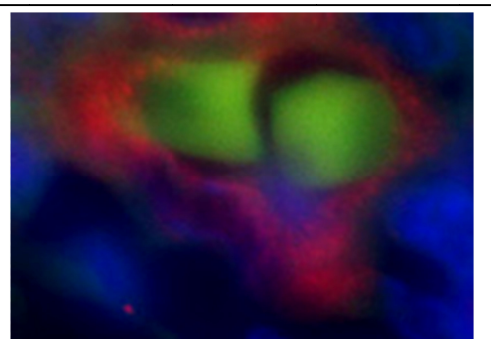


図1. FOXP3+VEGFR2+ Treg 細胞の蛍光免疫組織像。FOXP3 (緑)、VEGFR2(赤)を示す。オリジナルの倍率は630倍である。

FOXP3+ Treg 細胞の57%が VEGFR2+であり、FOXP3-VEGFR2+細胞はほとんど存在しなかった

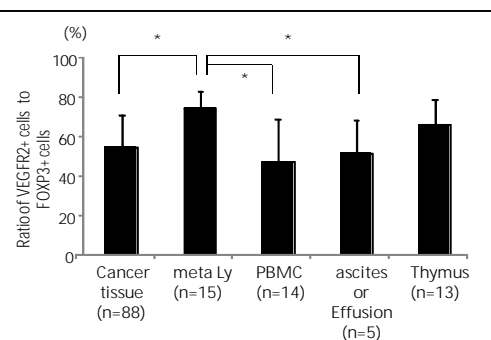


図2. VEGFR2+ Treg 細胞の生体内における分布。 (*, p<0.05)

た。転移リンパ節においては、FOXP3+ Treg 細胞の約75%が VEGFR2+であった。胸腺では、FOXP3+ Treg 細胞の約70%が VEGFR2+であった。転移リンパ節における FOXP3+Treg 細胞に対する VEGFR2+Treg 細胞の割合は、大腸癌組織、PBMC および癌性胸腹水中の浸潤リンパ球におけるものより有意に高かった (業績、図2)。

(2) 大腸癌組織に浸潤した FOXP3+VEGFR2+細胞数が独立した大腸癌の無病再発および全生存の予後規定因子であった (業績、図

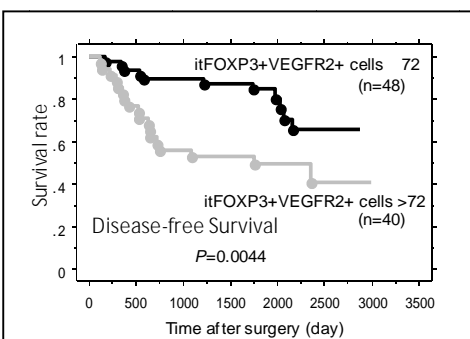


図3. 大腸癌組織に浸潤した FOXP3+VEGFR2+細胞数と無病再発との相関 (単変量解析)

3および図4)

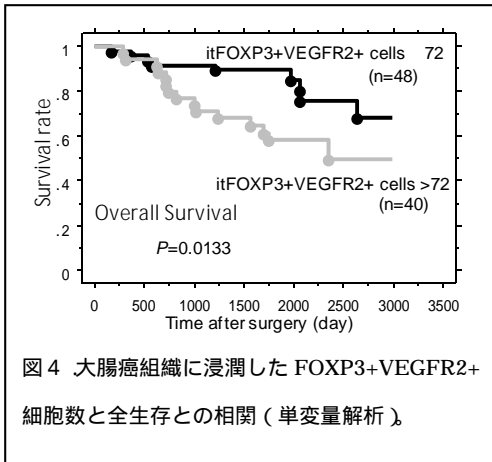


図4 大腸癌組織に浸潤した FOXP3+VEGFR2+細胞数と全生存との相関 (単変量解析)

(3) 蛋白多糖体 (PSK)、Cox-2 阻害剤、bevacizumab、basiliximab 投与により、Treg 細胞の割合が減少した (図5、図6および図7)。さらに、basiliximab 投与で Treg 細胞

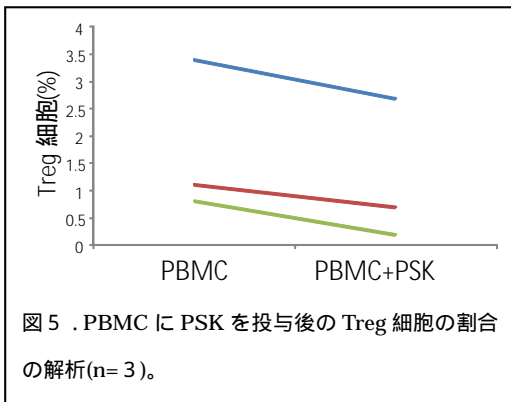


図5 .PBMC に PSK を投与後の Treg 細胞の割合の解析(n=3)。

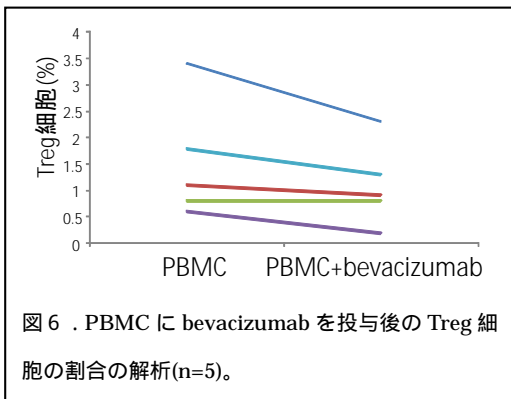


図6 .PBMC に bevacizumab を投与後の Treg 細胞の割合の解析(n=5)。

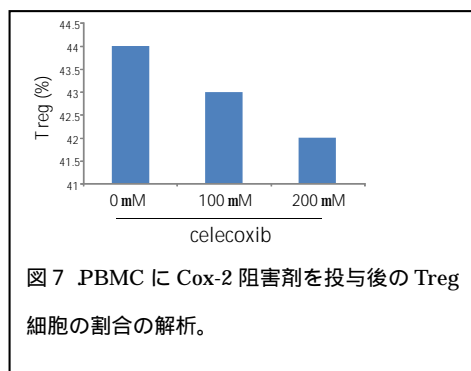


図7 PBMC に Cox-2 阻害剤を投与後の Treg 細胞の割合の解析。

を減少させた後に誘導した活性化リンパ球

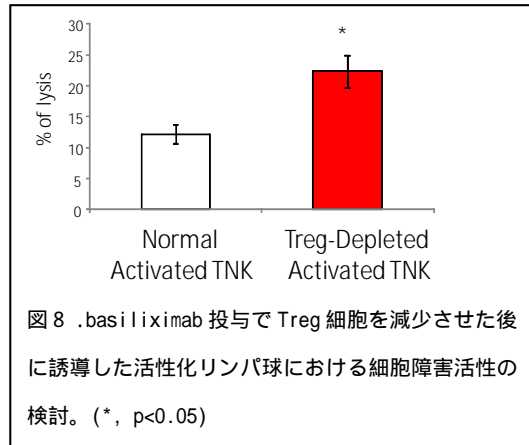


図8 .basiliximab 投与で Treg 細胞を減少させた後に誘導した活性化リンパ球における細胞障害活性の検討。 (*, p<0.05)

では、細胞障害活性が有意に亢進した (図8)。

(4) 現在、VEGFR2 抗原を認識した CTL を作成中であり、CTL が誘導出来次第、マウスへの VEGFR2+細胞移植系を用い、作成した CTL の障害活性を解析する予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

Suzuki H, Onishi H, Morisaki T, Tanaka M, Katano M, Intratumoral FOXP3+VEGFR2+ regulatory T cells are predictive markers for recurrence and survival in patients with colorectal cancer, *Clin Immunol*, 査読有, 146(1), 2013, 26-33.

Doi: 10.1016/j.clim.2012.10.007

Onishi H, Morisaki T, Kiyota A, Koya N, Tanaka H, Umebayashi M, Katano M, The Hedgehog inhibitor cyclopamine impairs the benefits of immunotherapy with activated T and NK lymphocytes derived from patients with advanced cancer, *Cancer Immunol Immunother*, 査読有, 62(6), 2013, 1029-1039.

Doi: 10.1007/s00262-013-1419-5

Onishi H, Morisaki T, Kiyota A, Koya N, Tanaka H, Umebayashi M, Katano M, The Hedgehog inhibitor suppresses the function of monocyte-derived dendritic cells from patients with advanced cancer under hypoxia, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 436(1), 2013, 53-59.

Doi: 10.1016/j.bbrc.2013.05.057

Onishi H, Morisaki T, Katano M, Immunotherapy approaches targeting regulatory T-cells, *Anticancer Res* 査読有, 32(3), 2012, 997-1003.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2399623>

Ogino T, Onishi H, Suzuki H, Morisaki T, Katano M, Inclusive estimation of complex antigen presentation functions of monocyte-derived

dendritic cells differentiated under normoxia and hypoxia conditions, *Cancer Immunol Immunother* 査読有, 61(3), 2012, 409-424.
Doi: 10.1007/s00262-011-1112-5
Onishi H, Koya N, Kiyota A, Tanaka H, Umebayashi M, Katano M, Morisaki T, A new method for rapid cytotoxic T-lymphocyte induction using a multiple cytokine cocktail, *Anticancer Res*, 査読有, 32(6), 2012, 2385-2390.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22641679>
Onishi H, Morisaki T, Baba E, Nakamura M, Inaba S, Kuroki H, Matsumoto K, Katano M, Long-term vaccine therapy with autologous whole tumor cell-pulsed dendritic cells for a patient with recurrent rectal carcinoma, *Anticancer Res* 査読有, 31(11), 2011, 3995-4005.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22110233>

〔学会発表〕(計5件)

大西 秀哉、制御性T細胞を標的としたテラーメード消化器癌免疫療法、2013年7月19日、第68回日本消化器外科学会総会、サンホテルフェニックス(宮崎市)

大西 秀哉、免疫細胞療法テラーメード化確立への試み、2013年6月6日、第38回日本外科系連合学会、ハイアットリージェンシー東京(東京都新宿区)

大西 秀哉、低酸素環境で分化した樹状細胞(DCs)による制御性T細胞誘導にIDOが関与する、2012年6月15日、第22回日本樹状細胞研究会、福島ビューホテル(福島市)

大西 秀哉、VEGFR2+ 制御性T細胞は大腸癌における再発および予後予測因子となり得る、2011年10月29日、第49回日本癌治療学会学術集会、名古屋国際会議場(名古屋市)

荻野 利達、癌微小環境を考慮した樹状細胞の機能解析：低酸素の影響、2011年7月1日、第21回日本樹状細胞研究会、福岡国際会議場(福岡市)

〔その他〕

ホームページ等
九州大学大学院医学研究院 先端医療医学部門 腫瘍制御学分野
<http://www.tumor.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大西 秀哉 (ONISHI, Hideya)
九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30553276

(2)研究分担者

片野 光男 (KATANO, Mitsuo)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：10145203

中野 賢二 (NAKANO, Kenji)
九州大学・先端融合医療レドックスナビ
研究拠点・教授
研究者番号：00315061

中村 勝也 (NAKAMURA, Katsuya)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：60585743