

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791580

研究課題名：（和文） 肺癌の免疫逃避の解明とその克服法の検討

研究課題名（英文）：Analysis of immune response to overcome immune-escape of lung cancer

研究代表者：

重松 義紀（SHIGEMATSU YOSHIKI）

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：10546469

研究成果の概要（和文）：肺癌の免疫逃避機構の解明を行い、その機序の克服をすることで、有効な癌免疫療法を確立することを目的に研究を行っている。免疫逃避機構として、HLA 分子の発現異常と所属リンパ節の制御性 T 細胞について解析を行った。HLA 分子の発現異常は肺癌において高頻度に認められ、低発現群の予後が不良である事が示された。また、所属リンパ節において CD4 リンパ球における制御性 T 細胞の頻度が高いことは、予後不良因子であった。これらのことより、癌抗原を標的とした免疫療法を行う場合、HLA 発現異常例については、HLA 遺伝子の導入などによる HLA 分子の発現回復、さらに制御性 T 細胞を標的とした免疫治療などを考慮する必要がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to evaluate immune response in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) to overcome the tumor immune escape mechanism. The higher proportion of CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in the regional lymph node was a significant unfavorable prognostic factor, even in patients with node-negative NSCLC. The normal expression of HLA-class I was associated with a favorable prognosis in comparison with the heterogeneous expression group. It is necessary to evaluate the efficacy of adjuvant immunotherapy in consideration of clinical significance of the HLA expression pattern and the proportion of regulatory T cells.

交付決定額

（金額単位：円）

交付決定額	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺癌・腫瘍免疫・免疫逃避機構・制御性 T 細胞・HLA

1. 研究開始当初の背景

肺癌は我が国の癌死因の第一位であり、現在でも手術不能な進行肺癌や再発肺癌における治療法は限られている。肺癌の化学療法において有効性が証明されているのは 2 次治療までであり、2 次治療以降は癌の進行を抑えることは困難である。しかし、患者や家族は、どのような状態になっても

癌を克服する希望を持ち、新たな治療法の開発に期待を寄せている。

我々は、肺癌に対する新たな治療法を開発する試みで、癌に対する免疫療法の基礎的研究を継続して行なっている。近年では、国内外の施設と協力し、癌細胞に特異的な蛋白を標的とした癌ワクチン治療の臨床試験を行なっている。1991 年に

Boon 博士らが、メラノーマにおいて世界で初めて癌抗原遺伝子を発見し、癌に対する特異的免疫治療の期待は高まった。Small らはホルモン療法不応性前立腺癌に対する癌ワクチン療法 (sipuleucel-T) を行ない、生存期間の延長を報告した。また、肺癌治療の領域でも、Vansteenkiste らが肺癌の術後補助療法で癌ワクチン療法を行ない、癌の再発リスクが27%軽減したことを報告し、同様の癌ワクチンを用いた肺癌術後補助療法の Phase III 試験が行なわれている。これらの報告は特異的免疫療法が固形癌に対する新たな治療法の一つになりうることを示唆している。しかしながら、実際には癌免疫療法で効果がみられる症例は極限られており、その治療効果を抑えている原因の一つが、癌の免疫逃避機構と考えられている。この癌の免疫逃避機構を解明し克服することができれば、癌免疫療法の治療成績は確実に改善すると考えられる。

2. 研究の目的

固形癌に対する免疫療法は一部の症例では有効性が示されているが、一般的には効果が乏しいと考えられている。癌は免疫障害から逃避するため腫瘍免疫の効果が発揮できない。そこで、癌の免疫逃避メカニズムを解明し、その克服法を検討することで細胞性免疫療法の有効性を向上させたい。

3. 研究の方法

肺癌の免疫逃避機構の解明と克服について、(1) 肺癌患者の末梢血および癌所属リンパ節における局所免疫応答を解析する、(2) HLA の発現異常の解析と臨床背景との検討を行う。(1) については、肺癌患者の末梢血および癌所属リンパ節における制御性 T 細胞の頻度を、CD4 および Foxp3 をマーカーとして、フローサイトメトリーにて解析した。さらに、肺癌細胞に対する CTL 誘導と制御性 T 細胞の影響について報告した。(2) については、肺癌組織における HLA の発現異常を、抗 HLA class I 抗体 (EMR8-5) を用いて免疫組織化学染色にて評価し、その臨床的意義を解析した。また、

癌精巢抗原 (KK-LC-1, MAGE-A3, MAGE-A4) の発現を RT-PCR 法にて解析した。

4. 研究成果

まず、肺癌の免疫逃避機構の解明を行うため、肺癌患者における腫瘍内、所属リンパ節や、末梢血リンパ球の制御性 T 細胞の発現を検出する系を確立することを目的に研究を行った。非小細胞肺癌患者における、手術検体 (176 例) の所属リンパ節および末梢血リンパ球を用いて、細胞内 FACS にて制御性 T 細胞を検出した。この中で、術前治療の行われていない、また免疫抑制剤の使用のない症例を除き、残りの 158 例を解析の対象とした。男性 103 例、女性 55 例、平均年齢 69 歳であった。組織型は、腺癌 110 例、扁平上皮癌 33 例、大細胞癌 11 例、その他 4 例であった。CD4 陽性細胞の中の Treg の比率は、リンパ節および末梢血リンパ球では、それぞれ 1.26% と 0.86% であり、制御性 T 細胞の比率は、リンパ節において、末梢血リンパ球よりも有意に高頻度であった。組織型別のリンパ節リンパ球の Treg の割合は、腺癌で 1.24% 扁平上皮癌 1.42% であった。病理病期別のリンパ節リンパ球では、IA 期 1.29%、IB 期 1.15%、II 期 1.31%、III 期 1.37% であった。リンパ節リンパ球において CD4 陽性細胞の中の制御性 T 細胞の割合が、1% より低い群を低値群、1% 以上を高値群とした場合、5 年生存率は低値群で 84.4%、高値群 63.5% であり、有意に高値群の予後が不良であった (図 1)。病理病期 I 期においても、5 年生存率は低値群で 91.4%、高値群 84.8% であり、高値群の予後が有意に不良であることを明らかとした。

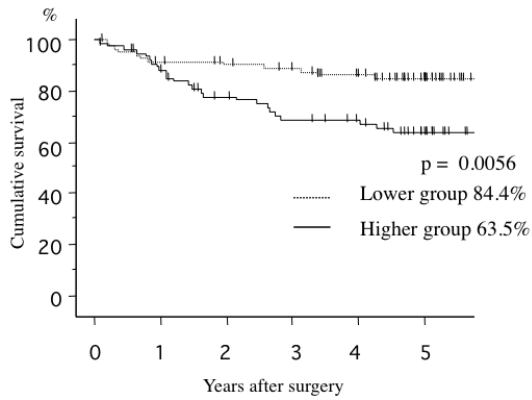


図1. 肺癌所属リンパ節における制御性 T 細胞の多寡による予後の比較

また、*in vitro* の実験系において、CTL 誘導時に TGF- β を添加すると、CTL 誘導が阻害され、制御性 T 細胞の増加を認めた。CTL 誘導時に制御性 T 細胞を除去することで、CTL の誘導効率が上がることを示した。制御性 T 細胞による、CTL 誘導の抑制には TGF- β が関与しており、制御性 T 細胞を除去することで、腫瘍特異的 CTL の誘導効率が改善することを報告した。

次に、非小細胞肺癌 403 例を対象とし、抗 HLA class I 抗体を用いて HLA class I 分子の発現を免疫組織化学染色にて解析した (図 2)。HLA class I 分子の発現率が 80%を超える症例を正常発現、30%以上 80%以下を低発現、30%未満を重度低発現と分類した。症例の内訳は、男性 264 名、女性 139 名であり、平均年齢は、69.3 歳であった。組織型は腺癌 261 例、扁平上皮癌 107 例、その他 35 例であった。正常発現 124 例、低発現 181 例、重度低発現 98 例であった。病理病期では、I 期では正常発現 81 例 (30.9%)、低発現 119 例 (45.4%)、重度低発現 62 例 (23.6%) であり、II-IV 期では正常発現 43 例 (30.4%)、低発現 62 例 (44.0%)、重度低発現 36 例 (25.5%) であった。

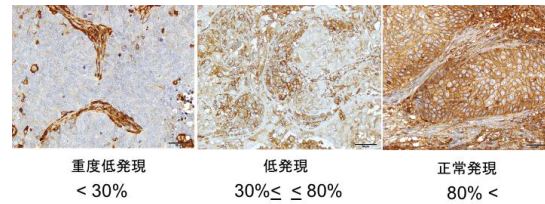


図 2. 肺癌における HLA に対する免疫組織化学染色

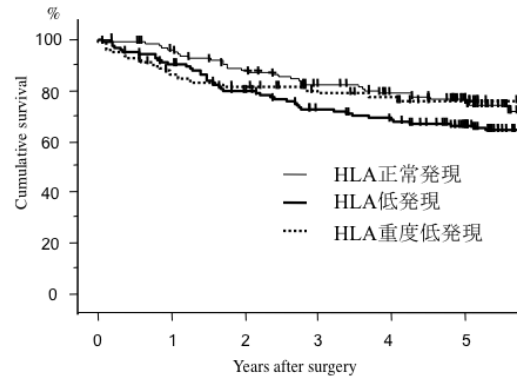


図 3. 肺癌における HLA 発現の違いによる予後の比較

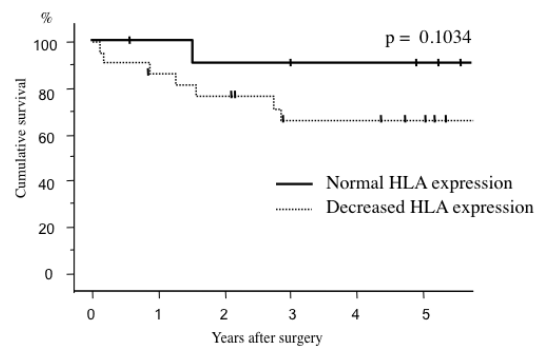


図 4. 癌精巢抗原陽性である肺癌症例における HLA 発現の違いによる予後の比較

5 年生存率は、正常発現 76.6%、低発現 65.9%、重度低発現 76.1%であり、正常発現に比べ、低発現では有意に予後不良であった (図 3)。腺癌では 5 年生存率は、正常発現 77.3%、低発現 72.7%、重度低発現 86.2%であり、重度低発現が最も予後が良好であった。扁平上皮癌では 5 年生存率は、正常発現 73.3%、低発現 47.6%、重度低発現 64.6%であり、正常発現群で最も予後良好であった。さらに、癌精巢抗原 (KK-LC-1, MAGE-A3, MAGE-A4) の

発現を RT-PCR 法にて解析し、その臨床病理学的関係を明らかにした。癌精巢抗原の発現率は、それぞれ KK-LC-1、MAGE-A3、MAGE-A4 において 32.6%、23.8%、20.1%であった。癌精巢抗原の陽性例において、HLA class I 正常発現例よりも、低発現症例は有意に予後不良であった(図4)。

結論

非小細胞肺癌における HLA class I 分子の発現異常は予後不良因子であり、癌特異的免疫療法を行う上で、重要な課題である。さらに癌精巢抗原の陽性例に限ってみても、HLA class I 正常発現例よりも、低発現症例は予後不良であり、この事実は癌抗原を標的とした免疫療法を行う場合、HLA 発現異常例については、HLA 遺伝子の導入などによる HLA 分子の発現回復などを考慮する必要がある。

また、転移性メラノーマの臨床において Ipilimumab が用いられ、第3相試験の結果、Ipilimumab と標準的な化学療法 (dacarbazine) の併用療法が化学療法単独に比較して全生存率が改善することが示されている。Ipilimumab は、制御性 T 細胞の発現する CTLA-4 による抑制シグナルを特異的に遮断し、T 細胞の活性化状態を維持する作用を待つ抗体である。このように制御性 T 細胞を標的とした免疫治療などが、新たな局面を切り開く可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

①Cancer/testis antigen expression as a predictor for epidermal growth factor receptor mutation and prognosis in lung adenocarcinoma. Baba T, Shiota H, Kuroda K, Shigematsu Y, Ichiki Y, Uramoto H, Hanagiri T, Tanaka F. Eur J Cardiothorac Surg. 2013 Apr;43(4):759-64. (査読有)

②Clinical significance of human leukocyte antigen loss and melanoma-associated antigen 4 expression in smokers of non-small cell lung cancer patients.

Baba T, Shiota H, Kuroda K, Shigematsu Y, Ichiki Y, Uramoto H, Hanagiri T, Tanaka F. Int J Clin Oncol. 2012 Nov 3. [Epub ahead of print] (査読有)

③Immunosuppressive effect of regulatory T lymphocytes in lung cancer, with special reference to their effects on the induction of autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes.

Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Ichiki Y, Yasuda M, Uramoto H, Takenoyama M, Yasumoto K, Tanaka F. Oncol Lett. 2012 Oct;4(4):625-630. (査読有)

④Prognostic implications of human leukocyte antigen class I expression in patients who underwent surgical resection for non-small-cell lung cancer.

Hanagiri T, Shigematsu Y, Kuroda K, Baba T, Shiota H, Ichiki Y, Nagata Y, Yasuda M, Uramoto H, So T, Takenoyama M, Tanaka F. J Surg Res. 2012 Jul 31. [Epub ahead of print] (査読有)

[学会発表] (計5件)

①肺癌所属リンパ節における制御性 T 細胞および微小リンパ節転移の解析

花桐 武志, 重松 義紀, 竹中 賢, 岡 壮一, 近石 泰弘, 下川 秀彦, 中川 誠, 永田 好香, 浦本 秀隆, 宗 知子, 田中 文啓

第50回日本癌治療学会 2012年10月25日(木)~10月27日(土)開催場所:パシフィコ横浜

②肺癌所属リンパ節における制御性 T 細胞の臨床

病理学的意義

花桐 武志, 重松 義紀, 竹中 賢, 岡 壮一, 近石 泰弘, 下川 秀彦, 中川 誠, 永田 好香, 岩田 輝男, 浦本 秀隆, 宗 知子, 田中 文啓

第 53 回日本肺癌学会 2012 年 11 月 8 日(木)～11 月 9 日(金)開催場所: 岡山コンベンションセンター、ホテルグランヴィア岡山、岡山市デジタルミュージアム、岡山全日空ホテル

③非小細胞肺癌における癌精巢抗原発現とワクチン療法への応用

重松 義紀, 竹中 賢, 岡 壮一, 近石 泰弘, 馬場 哲郎, 下川 秀彦, 中川 誠, 浦本 秀隆, 宗 知子, 花桐 武志, 田中 文啓

第 112 回日本外科学会 2012 年 4 月 12 日(木)～4 月 14 日(土)開催場所: 幕張メッセ、ホテルニューオータニ幕張

④非小細胞肺癌における腫瘍抗原および HLA class I の発現; 癌特異的免疫療法への基盤的研究

花桐武志, 黒田耕志, 重松義紀, 永田好香, 馬場 哲郎, 浦本秀隆, 宗 知子, 竹之山光広, 田中文 啓

第 29 回日本呼吸器外科学会 2012 年 5 月 17 日(木)～5 月 18 日(金)開催場所: 秋田県民会館、秋田キャッスルホテル

⑤肺癌患者における制御性 T 細胞の発現と役割.

重松義紀, 黒田耕志, 馬場哲郎, 竹中賢, 近石泰弘, 岡壮一, 中川誠, 下川秀彦, 浦本秀隆, 宗知子, 花桐武志, 田中文啓 第 39 回日本臨床免疫学会 2011 年 9 月 15 日(木)～9 月 17 日(土)開催場所: 京王プラザホテル

6. 研究組織

(1) 研究代表者

重松 義紀 (SHIGEMATSU YOSHIKI)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号: 10546469

(2) 研究分担者 ()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: