

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591635

研究課題名(和文) 悪性黒色腫のセンチネルリンパ節における免疫病態構築機構の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the condition of construction mechanisms of immunity on sentinel lymph nodes of patients with melanoma and development of novel immunotherapy

研究代表者

桜井 敏晴 (SAKURAI, TOSHIHARU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20101933

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：がん患者のセンチネルリンパ節(Sentinel lymph nodes：SLNs)における免疫抑制病態が抗腫瘍T細胞誘導に重要であるが、その構築機構は不明である。本研究は、がん細胞産生TGF- $\beta$ 1(Transforming growth factor beta 1)のがん免疫病態形成における意義を検討した。その結果、がん微小環境でのTGF- $\beta$ 1増加は、DC機能低下や免疫抑制性細胞増加により腫瘍組織とSLNsに免疫抑制状態を形成し、最終的に抗腫瘍CD8<sup>+</sup>T細胞誘導や腫瘍浸潤の低下を起こす。従ってTGF- $\beta$ 1が、がん免疫抑制病態形成に強く関与し、がん治療効果増強の標的になることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In cancer patients, sentinel lymph nodes (SLNs) are crucial in the induction of antitumor T cells. However, in many cases, SLNs and tumors appear to be in immune-suppressive condition through mechanisms yet to be elucidated. In this study, the role of tumor-derived TGF- $\beta$ 1 in the generation of immunosuppressive microenvironments of tumors and SLNs was investigated. These results demonstrate that overproduction of TGF- $\beta$ 1 is critical for the generation of immunosuppressive microenvironments in both tumors and SLNs, which may result in suppression of spontaneous antitumor CD8<sup>+</sup> T-cell responses. Therefore, TGF- $\beta$ 1 is an attractive target for restoration of immunosuppressive condition in cancer patients.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：悪性黒色腫 センチネルリンパ節 免疫抑制機構 TGF- $\beta$ 1 がん免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は、化学療法による長期生存例が少なく、免疫療法が比較的奏効することから免疫療法の改良が期待されている。最近の培養抗腫瘍T細胞を投与する養子免疫療法では、多発転移巣をもつ進行悪性黒色腫に対しても、奏効率70%以上で、長期生存の期待できる完全寛解が20%以上の好成績が報告されており、適切な免疫制御により高い治療効果が得られることが判明している。しかし、養子免疫療法は特殊な施設が必要となり、標準治療にはなりにくい問題点を抱えている。研究分担者・河上は、T細胞が認識するヒト悪性黒色腫抗原の単離同定に先駆的に成功し、T細胞によるヒト悪性黒色腫細胞の認識機構の解明とともに、各種新しい悪性黒色腫免疫療法の開発に携わってきた。悪性黒色腫抗原の実体解明は、患者体内での抗腫瘍T細胞応答の測定を可能にし、臨床試験症例の免疫学的解析を行ってきた結果、単純な悪性黒色腫抗原ワクチンでの抗腫瘍効果は弱いこと、その原因として担がん生体の免疫抑制病態が重要であることを明らかにし、免疫病態の解明と改善法の開発が悪性黒色腫の免疫療法の標準治療化に重要であることを示してきた(Nature Med 1998, J Exp Med 2006, Cancer Cell 2009など)。

近年、悪性黒色腫や乳癌では、センチネルリンパ節(SLN)の転移状況の判定に基づいた診療が進められているが、本来、センチネルリンパ節は、がん組織からの腫瘍抗原や腫瘍抗原を取り込んだ樹状細胞が流入して腫瘍抗原特異的T細胞を誘導する重要なリンパ組織である。また、センチネルリンパ節では転移がないにもかかわらず、樹状細胞の障害や免疫抑制性の制御性T細胞(Treg)の増加などが報告されており、悪性黒色腫でもSLNにおけるTregの増加やIL10, COX2, ArginaseなどのmRNAの増加と予後不良との相関が認められている。しかし、がん組織から流入する何(分子や細胞)がSLNでの免疫抑制病態の形成にかかわるのか、どのようながん細胞、あるいはがん微小環境に存在するどのような細胞がSLNの免疫病態をきたす分子を産生するのか、また実際に機能的に免疫抑制環境となっているのかなど、SLNの免疫病態については十分に分かっていない。また、我々は、ヒト悪性黒色腫細胞におけるBRAFやSTAT3シグナルの異常が様々な免疫抑制分子の産生や樹状細胞の機能障害およびTregなどの免疫抑制性細胞の誘導を引き起こすこと、さらに悪性黒色腫細胞が産生するIL10, IL6, VEGFなどのサイトカインは樹状細胞やマクロファージのSTAT3を活性化させることにより免疫抑制病態を起こすことを示してきた(J Exp Med, 2006, J Immunol 2011, 基盤研究CH21-H23)。しかし、抗腫瘍免疫応答に重要なSLNにおける細胞分子病態の詳細は全く不明である。

そこで、本研究では、マウス・ヒト悪性黒色腫移植マウスモデルを用いた解析、および悪性黒色腫患者SLNの免疫染色解析から、悪性黒色腫により誘導されるSLNの免疫病態の誘導機構と免疫病態の解明、および病態改善のための治療標的の探索と改善法の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究は、悪性黒色腫患者のセンチネルリンパ節(Sentinel lymph node:SLN)における免疫病態の細胞分子機構を解明することにより、その改善法の開発を目指す。具体的には、各種免疫調節分子(サイトカインなど)やシグナル分子の高発現・低発現のマウスやヒトの悪性黒色腫細胞株を作製し、マウス移植後、最初のがん組織からのリンパ液が流入するセンチネルリンパ節(SLN)の解析モデルを作成する。そのSLNにおける自然免疫系(マクロファージや樹状細胞など)と獲得免疫系(T細胞やB細胞)免疫細胞の動態解析、さらに悪性黒色腫患者SLN検体の免疫染色による解析結果との比較により、病態改善のための治療標的の探索と改善法を提案する。

## 3. 研究の方法

本研究では、特にがん細胞が産生するTGF- $\beta$ 1(Transforming growth factor beta 1)のがん免疫病態形成における意義を検討した。また、がん細胞は、マウス悪性黒色腫が使用できず、代わりにマウス大腸癌株CT26細胞を用いた。

TGF- $\beta$ 1を増加させるため、マウス大腸癌細胞株CT26にTGF- $\beta$ 1-cDNAを導入したTGF- $\beta$ 1高産生がん細胞株(CT26-TGF- $\beta$ 1)を、コントロールとして空ベクターを導入したがん細胞株(CT26-Mock)を作製した。そして、それぞれのがん細胞株をBalb/cマウスの臀部に皮下移植し腫瘍を作成した。移植後10日目に腫瘍組織周囲にインジゴカルミンを注射し、染色されたリンパ節をセンチネルリンパ節(Sentinel lymph nodes:SLNs)として同定した。同時に腫瘍組織内及びSLNs内の免疫動態をFlow Cytometerを用いて樹状細胞(DC)、抑制性T細胞(Treg)、骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)などの頻度数や発現分子を解析した。さらにそれぞれの細胞の機能を産生サイトカインのELISA法により解析した。

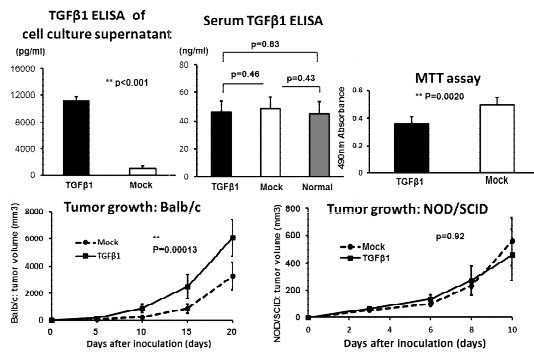
## 4. 研究成果

(1)腫瘍産生TGF- $\beta$ 1は免疫機構を通じて*in vivo*での腫瘍増殖を助長する。

CT26-TGF- $\beta$ 1はCT26-MOCKに対して30倍以上TGF- $\beta$ 1を培養上清中に産生した。これらの細胞株をBalb/cマウスの臀部に移植したところ、移植後10-14日後の血清中のTGF- $\beta$ 1濃度は、両者間で有意な差を認めなかった。このことより、このマウスモデルはSLNや腫瘍内などの局所ではTGF- $\beta$ 1が高濃度になるが、

全身的には影響を及ぼさないモデルであることが示唆された。In vitro での増殖は CT26-TGF- $\beta$  は CT26-MOCK に比べ 80% 程度に抑制されたが、Balb/c マウスに移植すると 14 日目以降に有意な差を持って増殖亢進が認められた。この増殖亢進は、免疫不全マウス NOD/SCID に移植した時には認められなかったため、がん細胞の産生する TGF- $\beta$  は免疫学的機序で特に T 細胞を介し腫瘍の増殖を助長していることが示唆された。(図 1)

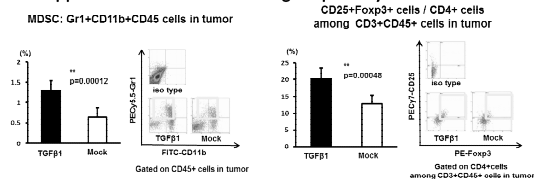
図1 TGF- $\beta$ 1 produced by tumor cells might enhance *in vivo* growth of CT26 tumor cells through immunological mechanisms



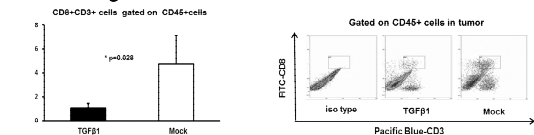
## (2) 腫瘍産生 TGF- $\beta$ 1 による腫瘍組織内の免疫抑制

(1) の機序の解明のため、まず腫瘍組織内の免疫細胞の解析を行ったところ、CT26-TGF- $\beta$  1 移植群では、樹状細胞 (dendritic cells : DCs) の数、MHC クラス II と副刺激分子 CD80 の発現が抑制され、免疫抑制活性をもつ制御性 T 細胞 (regulatory T cells : Tregs) や骨髄由来免疫抑制細胞 (myeloid derived suppressor cells : MDSCs) が増加し、CD8 + T 細胞の浸潤は有意に減少していた。(図 2)

図2 (1) Tumor-derived TGF- $\beta$ 1 increases the number of immunosuppressive MDSC and CD4+Tregs in primary tumor tissues



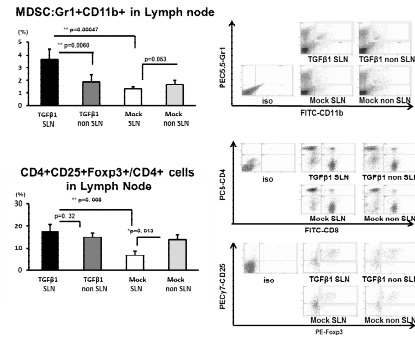
## (2) Tumor-derived TGF- $\beta$ 1 decreases the number of tumor-infiltrating CD8+T cells.



## (3) 腫瘍産生 TGF- $\beta$ 1 による SLN s 内の免疫抑制

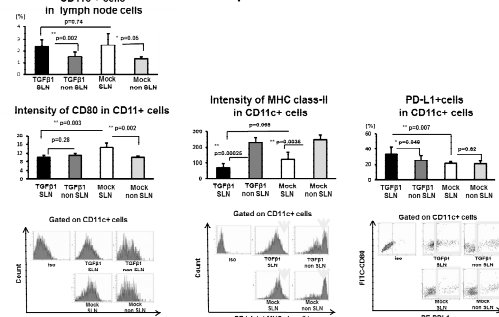
次に、がん組織からリンパ管を介して様々な影響を受ける SLNs の免疫細胞を解析したところ、CT26-TGF- $\beta$ 1 移植群では MDSCs や Tregs が有意に増加していた。(図 3)

図3 TGF- $\beta$ 1 overproduction in tumor increases MDSCs and Tregs in SLNs



また、CT26-TGF- $\beta$ 1 移植群の SLNs の DCs は PD-L1 (Programmed cell death 1 ligand 1) を発現し、CD80 発現や TNF $\alpha$  産生能は低下し、機能的に T 細胞刺激能が減弱していた。(図 4)

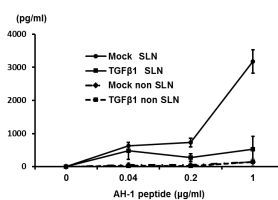
図4 Tumor-derived TGF- $\beta$ 1 induces DCs with low CD80 and high PD-L1 expression



さらに、SLNs の腫瘍抗原特異的な T 細胞の誘導も有意に抑制されていた。(図 5)

図5 Suppressed induction of tumor antigen-specific T cell in SLNs by tumor-derived TGF- $\beta$ 1

## IFN $\gamma$ production by AH-1 specific T cells



これらの結果から、がん微小環境における TGF- $\beta$  1 の増加は、DC の機能低下や免疫抑制性細胞の増加により腫瘍組織と SLNs に免疫抑制状態を形成し、結果的に抗腫瘍 CD8 陽性 T 細胞誘導の減弱や CD8+T 細胞の腫瘍浸潤が低下することが判明した。よって、TGF- $\beta$  1 はがん免疫病態の形成に与する可能性が示され、がん治療の効果増強のための標的となり得ることが明らかになった。

## (4) ヒト悪性黒色腫患者の SLNs 組織における免疫学的解析

最後に、ヒト悪性黒色腫患者のセンチネルリンパ(SLN)節の免疫状態を評価した。転移陽性 SLN、転移陰性 SLN、転移陰性の non-SLN(対照群)の三種のリンパ節において、

T細胞、樹状細胞、マクロファージのマーカーについて免疫染色を行った。その結果、転移陰性 SLN、及び転移陽性 SLN では、対照群に比べて、Foxp3/CD3 比が高く、CD86 が低い傾向があった。このことより、転移前でも SLN は、Treg の増加、マクロファージ、樹状細胞の抑制などの、免疫抑制が既に働いている可能性が示唆された。

#### 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 6 件)

1) Nakamura S, Yaguchi T, Kawamura N, Kobayashi A, Sakurai T, Higuchi H, Takaishi H, Hibi T, and Kawakami Y. TGF- $\beta$ 1 in tumor microenvironments induces immunosuppression in the tumors and sentinel lymph nodes and promotes tumor progression. J Immunother. 査読有り 2014 Feb-Mar;37(2):63-72.

doi: 10.1097/CJI.000000000000011.

2) Yaguchi T, Goto Y, Kido K, Mochimaru H, Sakurai T, Tsukamoto N, Kudo-Saito C, Fujita T, Sumimoto H, Kawakami Y. Immune suppression and resistance mediated by constitutive activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in human melanoma cells. J Immunol. 査読有り 2012 Sep 1;189(5):2110-7.

doi: 10.4049/jimmunol.1102282.

3) Kawakami Y, Kawase Y, Ohizumi A, Noji S, Sakurai T, Fujita T. Biomarkers for cancer immunotherapy. Nihon Rinsho. 査読なし 2012 May;70(5):759-66. PMID: 22619998

4) [がん免疫学と免疫療法の新展開] がん免疫病態と免疫動態の評価 河上裕、谷口智憲、中村公子、川瀬芳恵、野路しのぶ、大泉梓、南雲 春菜、長谷川 舞、徐 明利、岡本 正人、桜井 敏晴、藤田 知信 血液フロンティア 査読なし(1344-6940)22巻8号 Page 1183-1190 (2012.07)

[学会発表](計 11 件)

1) 中村謙太、谷口智憲、大村学、小林明日香、川村直、杉山重里、桜井敏晴、木庭幸子、奥山隆平、河上裕、局所性 Renin-Angiotensin system の阻害による、がん関連線維芽細胞や骨髄系免疫細胞の制御を介した PD-1/PD-L1 免疫チェックポイント阻害療法の効果増強、第 42 回日本臨床免疫学会、京王プラザホテル(東京都新宿区)、2014/9/25、

2) 藤田 知信、徐 明利、ポピバノバ ボリヤナ、岡本 正人、桜井 敏晴、鳥越 俊彦、古畑 智久、杉浦 史哲、奥野 清隆、碓 彰一、岡 正朗、河上 裕、腫瘍浸潤 T 細胞は大腸癌の予後マーカーとなる、第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜

市)、2014/9/27

3) Kawakami Y, Popivanova B, Nagumo H, Muramatsu R, Shinobu Noji, Xu M, Fujita T, Okamoto M, Sakurai T, Sugiyama J, Hayakawa T, Satomi R, Nishio H, Yaguchi T. Cancer-induced differential immune-status among patients and it's modification for effective cancer treatment., Cold Spring Harbor Asia, Frontiers of Immunology in Health and Diseases, Suzhou, China, 2014/9/4

4) 中村謙太、谷口智憲、大村学、小林明日香、川村直、杉山重里、桜井敏晴、木庭幸子、奥山隆平、河上裕、局所性 Renin-Angiotensin system の阻害による、がん関連線維芽細胞や骨髄系免疫細胞の制御を介した PD-1/PD-L1 免疫チェックポイント阻害療法の効果増強、第 18 回日本がん免疫学会総会、ひめぎんホール、愛媛県松山市、2014/8/1

5) Xu Mingli, Noji Shinobu, Okamoto Masato, Sakurai Toshiharu, Fujita Tomonobu, Torigoe Toshihiko, Sato Noriyuki, Sugiura Fumiaki, Okuno Kiyotaka, Hazama Shoichi, Oka Masaaki, Kawakami Yutaka Strong correlation of tumor-infiltrating CD8+ and Foxp3+ T cells with favorable prognosis of patients with colon cancer 日本免疫学会総会・学術集会記録(0919-1984)42巻 Page114(2013.11.13) 幕張メッセ、千葉県千葉市

6) Fujita Tomonobu, Noji Shinobu, Nagumo Haruna, Okamoto Masato, Sakurai Toshiharu, Noguchi Masanori, Matsueda Satoko, Itoh Kyogo, Hazama Shoichi, Oka Masaaki, Kawakami Yutaka The high plasma IL6 and IL8 are biomarkers for predicting poor clinical outcome of cancer patients treated with peptide cancer vaccines 日本免疫学会総会・学術集会記録(0919-1984)42巻 Page114(2013.11.12) 幕張メッセ、千葉県千葉市

7) Kawakami Yutaka, Xu Mingli, Nagumo Haruna, Fujita Tomonobu, Okamoto Masato, Sakurai Toshiharu, Noji Shinobu, Sugiyama Juri, Hayakawa Taeko, Nishio Hiroshi, Yaguchi Tomonori Tumor immunology Different tumor immunoenvironments among patients: Biomarkers and their modification for cancer treatments 日本免疫学会総会・学術集会記録(0919-1984)42巻 Page13(2013.11.11) 幕張メッセ 千葉県千葉市

8) Nakamura Kenta, Tomonori Yaguchi, Gaku Ohmura, Asuka Kobayashi, Naosi Kawamura, Juri Sugiyama, Toshiharu Sakurai, Yukiko Kuniwa, Ryuhei Okuyama, Yutaka Kawakami Immunosuppressive roles of local renin angiotensin system (RAS) in cancer microenvironments. 第 72 回日本癌学会総会 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市 2013. 10.

3-5

9) 谷口智憲、栗原智樹、後藤康文、伊藤有毅、守井賢二、小林明日香、西尾浩、住本秀敏、河上裕、悪性黒色腫で亢進する Wnt/-catenin シグナルは免疫抑制的で腫瘍を促進する微小環境を誘導する，第 71 回日本癌学会，ロイトン札幌(北海道札幌市)，2012 . 9 . 19

10) 川瀬芳恵、藤田知信、大泉梓、野路しのぶ、桜井敏晴、南雲春菜、徐明利、中山睿一、垣見和宏、鳥越俊彦、池田裕明、珠玖洋、岡本正人、河上裕、能動免疫療法における免疫誘導・抗腫瘍効果を規定するバイオマーカーの検索，第 16 回日本がん免疫学会，北海道大学学術交流会館（北海道札幌市），2012 . 7 . 28

11) 谷口智憲、栗原智樹、後藤康文、伊藤有毅、守井賢二、小林明日香、西尾浩、住本秀敏、河上裕、悪性黒色腫に異所性に発現する Histatin-1 は in vivo で細胞運動能と免疫抑制能を亢進させる，第 16 回日本がん免疫学会，北海道大学学術交流会館（北海道札幌市），2012 . 7 . 28

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://keiocancer.com/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

桜井 敏晴 (Sakurai Toshiharu)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20101933

### (2)研究分担者

谷口 智憲 (Yaguchi Tomonori)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40424163

河上 裕 (Kawakami Yutaka)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：50161287

### (3)連携研究者

なし

### (4)研究協力者

中村 公子 (Nakamura Shoko)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：20528228