

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591887

研究課題名(和文) 消化器癌における腫瘍特異的メモリー細胞能動的誘導法の開発

研究課題名(英文) Induction of tumor-specific memory cells in gastrointestinal cancer

研究代表者

庄 雅之 (SHO, MASAYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50364063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、消化器癌に対する新たな癌治療法の開発を目的として、腫瘍免疫に関わるT細胞不活化経路のいくつかの候補分子の検討を行った。その結果、ETBR, HVEM, CD155, Nectin-4といった分子が、食道癌、大腸癌、肝癌、膵癌などにおいて、患者の生命予後や再発等と、有意な関係があることが初めて明らかとなった。また動物モデルでは、抗PD-1抗体と血管新生阻害が相乗的抗腫瘍効果をもたらすことが明らかとなった。これらの結果から、上記の分子を標的とする治療や新たな集学的癌治療が、特に腫瘍特異的メモリーT細胞の能動的誘導を起し得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have evaluated several new molecules targeting T cell negative pathways in tumor immunity. As a result, we found that several molecules, including ETBR, HVEM, CD155, and Nectin-4, play important roles in patient prognosis and postoperative recurrence in some human gastrointestinal malignancies such as esophageal, colorectal, hepatocellular carcinoma, and pancreatic cancer. In addition, in animal model, simultaneous blockade of PD-1 and anti-angiogenesis induced a synergistic in-vivo anti-tumour effect. This unique therapeutic strategy may hold significant promise for future clinical application. Our findings suggested that such molecules might have therapeutic potentials through the induction of tumor-specific memory T cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腫瘍免疫 消化器癌 T細胞

1. 研究開始当初の背景

最近の新規化学療法の導入により、消化器癌においても予後の向上がみられている。一方、未だに消化器癌に対する外科切除は、癌治療の根幹をなしていることも事実である。しかしながら、今なお全ての消化器癌に切除不能症例や進行症例がみられ、それらの予後は不良である。特に、膵癌、食道癌などの難治性消化器癌は、根治手術後であっても転移および再発の頻度が高く、再発後の治療は困難である。したがって、さらなる予後向上のためには、新たな観点からの癌治療法の開発、特に集学的治療戦略の確立が必須である。研究代表者らは、これまで消化器癌に関する基礎的・臨床的研究とともに、腫瘍免疫に関する研究を精力的に行い、論文発表を行ってきた。特に、T細胞の不活化・抑制経路であるPD-L/PD-1経路やB7-3経路に関する新たな知見を見だし、臨床的意義および新規免疫療法の可能性につき報告してきた。これらPD-1やCTLA-4といったT細胞上の負の受容体の存在は、T細胞を機能不全に陥らせ、ワクチンや細胞療法などの既存免疫治療によっても、腫瘍抗原応答性T細胞が十分に活性化されずに、腫瘍が宿主免疫を回避する機序の一つとして考えられる。したがって、これら分子・経路を標的とした新たな免疫療法は、これまでない抗腫瘍効果をもたらす可能性がある。また最近の免疫学の進歩は、調節T細胞やメモリーT細胞といったT細胞サブセットが、生体の様々な生理・病態にとって極めて重要な役割を担っていることを示している。しかし、これらの腫瘍における役割、機能については未だ十分には明らかとはなっていない。また、腫瘍内浸潤メモリーT細胞が、大腸癌において従来のTNM分類によるStageとは無関係に、患者の予後や再発を規定するとの画期的な報告がなされ、非常に興味深い。しかし、機序の詳細は不明である。上記の研究報告と我々がこれまで蓄積してきた研究成果から鑑みると、(1)メモリーT細胞誘導にも、腫瘍とT細胞とに間に介在する不活化・抑制経路が重要な関与を果たしている可能性、(2)抗体治療等によって、メモリーT細胞を能動的に誘導できれば、革新的な術後再発抑制効果および予後の改善がもたらされる可能性があるのではないかとこの着想に至った。さらに免疫抑制の機能をもつことが、基礎研究により報告されつつあるいくつかの新たな分子を、今後の治療標的分子の候補と考え、それらの臨床病理学的意義を明らかとし、また外科治療との融合による新たな治療戦略が予後の向上につながるのではないかと考えられた。また一方、2010年には、転移性メラノーマに対して、抗CTLA-4抗体が予後延長効果を有することが、大規模臨床試験で初めて証明され、注目されている。これにより、より一層Immune checkpoint制御の重要性が認識されるようになった。

2. 研究の目的

消化器癌の切除臨床標本を用いて、CD45RO染色による腫瘍内浸潤メモリーT細胞の発現の多寡と、術後予後、再発形式、臨床病理学的因子との相関を検討する。さらに、その機序の一端を明らかとするために、宿主免疫回避に関わると最近新たに報告されたEndothelin B receptor (ETBR), Herpesvirus entry mediator (HVEM), CD155, Nectin-4等の腫瘍発現、腫瘍局所免疫活性との相関についても検討し、さらに腫瘍内浸潤T細胞、CD4+, CD8+, CD45RO+T細胞との比較検討により、各消化器癌における獲得免疫機構を包括的に明らかとすることを目的とした。またマウス消化器癌モデルを用いて、新たな集学的治療戦略の可能性を検討した。

3. 研究の方法

■ 消化器における腫瘍内浸潤メモリーT細胞発現の臨床的意義

各種消化器癌の切除標本を用いて、メモリーT細胞のマーカーとしてCD45RO染色を行い、定量化を行う。メモリーT細胞腫瘍内浸潤と予後、再発形式、臨床病理学的因子との関連について解析し、統計学的有意性について検証する。各癌腫における生体内の獲得免疫機構を包括的に解明し得るものと思われた。

■ 消化器におけるT細胞Negative Signal分子発現の臨床的意義

新規T細胞Negative Signal分子と考えられるEndothelin B receptor (ETBR), Herpesvirus entry mediator (HVEM), CD155, Nectin-4についても切除標本を用いた上記と同様の検討を行う。腫瘍内T細胞の浸潤程度がこれらの分子の発現と逆相関するかを検証するとともに、予後因子となり得るか等の検討を詳細に行った。

■ 腫瘍内局所免疫活性との関連

凍結標本を用いてReal-time PCRを行い、Perforin, Granzyme B, IFN- γ 等の発現を解析する。上述の腫瘍内浸潤T細胞サブセットやT細胞Negative Signal分子とこれらの局所免疫活性との関連について検討した。

■ マウス消化器癌モデルにおけるT細胞抑制経路および血管新生同時阻害による抗腫瘍効果の検討

BALB/c由来大腸癌株CT26を同系マウスに生着させ、抗マウスPD-1抗体および抗マウスVEGFR2(KDR)抗体を同時投与し、コントロールおよび各抗体単独投与群との抗腫瘍効果を比較検討した。

4. 研究成果

■ 消化器における腫瘍内浸潤メモリーT細胞発

現の臨床的意義

胃癌の切除標本を用いて、CD45RO 陽性メモリーT細胞高発現群と低発現群の2群に分けて検討した結果、メモリーT細胞腫瘍内浸潤の多寡と予後、再発形式、臨床病理学的因子との間に有意な関連を認め、胃癌におけるメモリーT細胞の臨床的意義が明らかとなった。すなわち、腫瘍局所に浸潤したメモリーT細胞の多いものほど、術後の予後は良好であり、再発も有意に抑制されていることを示唆するデータが得られた。多変量解析にて、メモリーT細胞の多寡が独立予後因子となることも判明した。また腫瘍局所の免疫活性とも関連した。これまでに我々が報告してきた食道癌の結果とも同様であり、普遍的な事象であることが示唆された。

■ 消化器における新たな T 細胞 Negative Signal Pathway の臨床的意義

(1) 食道扁平上皮癌 103 例を対象として、HVEM 腫瘍発現の臨床的意義と検討した結果、HVEM 高発現群は低発現群と比して、T 因子、N 因子ともに進行症例が多かった。病期も同様に高発現群は低発現群より有意に進行症例が多かった。全生存率は高発現群で有意に不良であった。また、免疫組織染色で腫瘍内浸潤リンパ球数をカウントしたところ高発現群ではCD4⁺、CD8⁺、CD45RO⁺T細胞数が有意に少なかった。以上より、腫瘍上のHVEMは宿主の抗腫瘍免疫を抑制することで増殖・進展に関与しているものと考えられた。

(2) 肝細胞癌 150 例を対象として、HVEM 発現の臨床的意義を検討した。その結果、HVEM 発現が予後や術後再発と有意に関連していることが明らかとなった。HVEM 発現が、腫瘍内浸潤CD4⁺、CD8⁺、CD45RO⁺T細胞と有意な関連が認められ、腫瘍内局所免疫の活性化とも関連していることがわかった。肝細胞癌において、宿主免疫との関連を機序として、予後と関連するものと思われた。

(3) 大腸癌 234 例を対象として、HVEM 発現を検討した。HVEM 発現は、大腸正常上皮、過形成ポリープには認めないものの、24%の腺腫、大腸癌の半数以上にHVEM 高発現を認めたことから、大腸癌の発生に関連している可能性が示唆された。さらに大腸癌においては、HVEM 発現が有意な独立予後因子であることが判明し、宿主腫瘍免疫とも関連していることが明らかとなった。これら一連の結果から、HVEM 発現が多くの消化器癌において、普遍的に有意な関連をもつ可能性が示唆され、新たな治療標的分子としてのさらなる研究が期待できるものと思われた。

(4) 食道扁平上皮癌 107 例を対象として、ETBR 発現の臨床的意義を検討した結果、ETBR 発現は有意な独立予後因子であることが判明した。さらに ETBR と宿主免疫との明らかな関係は認めず、一方血管新生とは有意な関連が認められ

た。このことから、血管新生を機序の一つとして、ETBR が食道癌の進展に関連している可能性が、初めて示唆された。

(5) 膵癌において、CD155 腫瘍発現の臨床的意義を検討した結果、CD155 高発現群の予後は低発現群に比して、有意に予後不良であった。多変量解析では CD155 発現は独立予後因子であることが明らかとなった。一方、CD155 発現とTNM因子やstage分類との関連は認めなかった。CD155 高発現群において有意にCD8、CD4およびCD45ROのT細胞腫瘍内浸潤が抑制されていた。またCD155発現とVEGF mRNA発現およびCD31陽性腫瘍内微小血管には有意な正の相関がみられ、腫瘍血管新生が機序の一端と示唆された。さらに膵癌細胞における直接的作用を検討するために、MIA-Paca-2、PANC-1細胞を用いて、siRNA法による検討を行った結果、CD155 knockdownにより増殖能および遊走能が阻害されることが判明した。以上より、従来のTNM分類とは非依存性にCD155発現が予後に関連していること。機序として、CD155腫瘍発現による腫瘍免疫の抑制や腫瘍血管新生の促進、さらには膵癌細胞増殖能および遊走能の直接的促進作用が示唆された。結果として、CD155は多様な直接的・間接的機序により、腫瘍進展および予後に影響を及ぼすことが初めて明らかとなった。

(6) 膵癌において、Nectin-4 発現の意義を検討した。その結果、有意な独立予後因子の一つであることが明らかとなった。さらに *in vitro* 等の詳細な検討の結果、腫瘍免疫や血管新生、さらには直接的な膵癌細胞の増殖等とも関連していることが判明した。上記の結果と併せて、Nectin Family に属する member のいくつかは、膵癌に有意な関連を有しており、新たな治療標的分子となり得る可能性が示唆された。

■ T細胞 Negative Signal 阻害と抗血管新生阻害による抗腫瘍効果における相乗効果の検討
CT26 マウス消化器癌モデルを用いて、抗 PD-1 と VEGFR2 (KDR) 同時阻害による相乗効果を検証した。その結果、各々の単独阻害よりも同時阻害による相乗的効果を *in vivo* で確認し得た。さらにこの効果は、腫瘍細胞に直接的に影響するものではなく、T細胞の腫瘍内浸潤の促進と腫瘍血管新生抑制に基づくものであることを証明した。また、抗体治療後の腫瘍局所免疫の活性化も明らかとなった。これら結果から、新たな癌治療として、今後の臨床応用が期待できるものと思われた。

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9件)

1. Clinical Significance of CD155 Expression in Human Pancreatic Cancer. Nishiwada S, **Sho M**, Yasuda S, Shimada K, Yamato I, Akahori T, Kinoshita S, Nagai M, Konishi N, Nakajima Y. *Anticancer Res.* 2015 Apr;35(4):2287-97.
2. Nectin-4 expression contributes to tumor proliferation, angiogenesis and patient prognosis in human pancreatic cancer. Nishiwada S, **Sho M**, Yasuda S, Shimada K, Yamato I, Akahori T, Kinoshita S, Nagai M, Konishi N, Nakajima Y. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015 Mar 28;34(1):30.
3. HVEM expression contributes to tumor progression and prognosis in human colorectal cancer. Inoue T, **Sho M**, Yasuda S, Nishiwada S, Nakamura S, Ueda T, Nishigori N, Kawasaki K, Obara S, Nakamoto T, Koyama F, Fujii H, Nakajima Y. *Anticancer Res.* 2015 Mar;35(3):1361-7.
4. Clinical impact of herpesvirus entry mediator expression in human hepatocellular carcinoma. Hokuto D, **Sho M**, Yamato I, Yasuda S, Obara S, Nomi T, Nakajima Y. *Eur J Cancer.* 2015 Jan;51(2):157-65.
5. Endothelin B receptor expression correlates with tumour angiogenesis and prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. Tanaka T, **Sho M**, Takayama T, Wakatsuki K, Matsumoto S, Migita K, Ito M, Hamada K, Nakajima Y. *Br J Cancer.* 2014 Feb 18;110(4):1027-33.
6. Significant involvement of herpesvirus entry mediator in human esophageal squamous cell carcinoma. Migita K, **Sho M**, Shimada K, Yasuda S, Yamato I, Takayama T, Matsumoto S, Wakatsuki K, Hotta K, Tanaka T, Ito M, Konishi N, Nakajima Y. *Cancer.* 2014 Mar 15;120(6):808-17.
7. Simultaneous blockade of programmed death 1 and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) induces synergistic anti-tumour effect in vivo. Yasuda S, **Sho M**, Yamato I, Yoshiji H, Wakatsuki K, Nishiwada S, Yagita H, Nakajima Y. *Clin Exp Immunol.* 2013 Jun;172(3):500-6.
8. Clinical impact of tumor-infiltrating CD45RO α memory T cells on human gastric cancer. Wakatsuki K, **Sho M**, Yamato I, Takayama T, Matsumoto S, Tanaka T, Migita K, Ito M, Hotta K,

Nakajima Y. *Oncol Rep.* 2013 May;29(5):1756-62.

9. PCA-1/ALKBH3 contributes to pancreatic cancer by supporting apoptotic resistance and angiogenesis. Yamato I, **Sho M**, Shimada K, Hotta K, Ueda Y, Yasuda S, Shigi N, Konishi N, Tsujikawa K, Nakajima Y. *Cancer Res.* 2012 Sep 15;72(18):4829-39.

(学会発表) (計11件)

1. 山戸一郎, 庄 雅之. 難治性消化器癌に対する免疫不活化経路制御と外科治療との融合による新規癌治療戦略. 第 112 回日本外科学会定期学術集会. 2012.4.12. 千葉
2. 北東大督, 庄 雅之. ヒト肝細胞癌における HVEM 発現の臨床病理学的意義. 第 112 回日本外科学会定期学術集会. 2012.4.14. 千葉
3. 山戸一郎, 庄 雅之. ヒト膵癌における PCA-1/ALKBH3 発現の臨床的意義と新規治療の可能性. 第 67 回日本消化器外科学会総会, 2012.7.19. 富山
4. 庄 雅之. 癌における T 細胞 Negative Pathway の意義と新規癌免疫治療の可能性. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 2013.4.13. 福岡
5. 山戸一郎, 庄 雅之. 膵癌における PCA-1/ALKBH3 の役割と新規治療の可能性. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 2013.4.11. 福岡
6. 西和田敏, 庄 雅之. ヒト膵癌における CD155 発現の臨床病理学的意義. 第 113 回日本外科学会定期学術集会. 2013.4.11. 福岡
7. 安田里司, 庄 雅之. PD-1 と VEGFR2 の同時阻害による相乗的抗腫瘍効果. 第 68 回日本消化器外科学会総会. 2013.7.18. 宮崎
8. 西和田敏, 庄 雅之. 膵癌における CD155 腫瘍発現の臨床病理学的意義. 第 68 回日本消化器外科学会総会. 2013.7.18. 宮崎
9. 西和田敏, 庄 雅之. 膵癌における CD155 腫瘍発現の臨床的意義とそのメカニズム. 第 114 回日本外科学会定期学術集会. 2014.4.5. 京都
10. 右田和寛, 庄 雅之. ヒト食道扁平上皮癌における herpesvirus entry mediator (HVEM)関与の重要性. 第 52 回日本癌治療学会学術集会. 2014.8.28. 横浜
11. 西和田敏, 庄 雅之. ヒト膵癌における CD155 発現の臨床的意義とそのメカニズム. 第 52 回日本癌治療学会学術集会. 2014.8.28. 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄 雅之 (SHO MASAYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 50364063