

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 28 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861091

研究課題名(和文) 消化器がん患者に対する制御性B細胞を標的とした免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of immunotherapy targeting regulatory B cell for gastrointestinal cancer.

研究代表者

佐瀬 善一郎 (Saze, Zenichiro)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10468126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌患者の低比重好中球が抑制機能を有するかを検証するために癌患者PBMCを低比重および高比重に分離した。それぞれからCD15+好中球を抽出しPBMCと共培養、刺激を加え、ELISAにてINF- γ を測定した。高比重・低比重好中球それぞれについて抑制実験を行った。高比重CD15+好中球との共培養ではINF- γ の産生は抑制されなかった。また低比重細胞はpurityが低く現在purity、収量の改善を得るべく研究を継続中。胃癌標本のCD15免疫染色を行い、臨床病理学的因子と比較検討し、Iy+群ではIy-群に比較して有意に腫瘍中にCD15陽性細胞浸潤を認めた。今後制御性B細胞についても検討を行っていく。

研究成果の概要(英文)：To verify whether low-density neutrophil cells have regulatory potential, we divided human PBMCs into low-density neutrophil cells and high-density cells. Then, we extracted CD15+ cells from each fraction, co-cultured with PBMCs under stimulation and measured INF- γ by ELISA. Suppression of INF- γ production was not observed in co-culture with high-density neutrophil cells. We were not able to examine suppression assay of co-culture with low-density neutrophil cells due to purity of CD15+ cells was low and the numbers of harvested low-density neutrophil cells from cancer patients were so small. Now we are trying to improve purity and quantity of low-density neutrophil cells. Using IHC, we analyzed correlation between CD15+ neutrophil in tumor and clinicopathological factors. No. of CD15+ cells of Iy+ group was significantly higher than those of Iy- group. We have plans to study about regulatory B cells from gastrointestinal cancer patients' PBMC and tumor infiltrating lymphocytes.

研究分野：消化器外科

キーワード：MDSC 制御性B細胞

1. 研究開始当初の背景

消化器癌の治療成績向上を目指し分子標的薬や細胞療法などの免疫療法の開発が盛んに行われているが、いまだ進行再発消化器癌の予後は非常に不良である。制御性 T 細胞が報告されて久しいが、近年 Myeloid Derived Suppressor Cells (MDSC) など非 T 細胞の免疫抑制細胞が報告されてきている。しかしながらヒトにおける MDSC は確立されたマーカーが存在せず、heterogeneous な細胞群とされており、その抑制機序については未だ解明されていない。これまでに低比重の好中球が MDSC である可能性が報告されている。¹ 今回我々は消化器癌患者において末梢血中の好中球が抑制機能を有するか否かについて検討を行う。また本抑制機能の機序を解明することにより新たな免疫療法が確立できる可能性がある。また、B 細胞は液性免疫の要と考えられているが、制御性 B 細胞についての報告が散見され始めており²、我々はこれまでに活性化 B 細胞が 5'-AMP を産生することにより活性化 T 細胞に対し高度の抑制を行うことを報告した³。活性化 B 細胞は非活性化 B 細胞に比して有意に CD39 (cytosolic 5'-nucleotidase 1) の発現が亢進し、CD73 (ecto-5'-nucleotidase) の発現低下により外因性 ATP 存在下に 5'-AMP 産生能が亢進していた。Preliminary な data では担癌状態の頭頸部癌患者末梢血中 B 細胞は正常ドナーに比して有意に CD39 発現が亢進していた。またアデノシンデアミナーゼと結合して存在する CD26 は非活性化 B 細胞では発現が認められなかったが、活性化 B 細胞では発現を認めた。これにより活性化 B 細胞が産生する 5'-AMP がアデノシンに分解されることなくさらに大量に産生されることが予測された。これは癌患者では B 細胞の活性化が亢進しており、effector T cell に対する抑制

能力を獲得している可能性を示すものと考えられる。このことは B 細胞が癌患者において何らかの抑制機構を担っている可能性があることを示唆しており、同機構を明らかにすることにより制御性 B 細胞に対する免疫療法が樹立でき、抗原特異性を必要としない癌に対する新たな免疫療法が確立できる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、消化器癌(食道癌・胃癌・結腸直腸癌、肝癌、胆管癌、膵癌)患者の末梢血中 MDSC、腫瘍浸潤好中球、末梢血 B 細胞および腫瘍浸潤 B 細胞の解析を行うとともに、その抑制機構を明らかにすること、また癌患者の臨床病理学的因子との関連を明らかにすることである。ひいては、MDSC もしくは制御性 B 細胞を標的とした新規免疫抑制経路の発見ならびに新規免疫療法の構築を探ることである。

3. 研究の方法

(1) MDSC

消化器癌患者末梢血単核球および腫瘍浸潤好中球を用いて実験を行う。フローサイトメトリー法、ウエスタンブロット、RT-PCR 法、ELISA により、癌患者と正常ドナーの末梢血 MDSC および腫瘍浸潤好中球のプロファイリングを施行し比較する。また末梢血単核球より Ficoll 法およびマグネティックビーズを用いて低比重の好中球を分離し、PBMC と共培養し低比重好中球の免疫抑制実験を行う。また、低比重好中球を網羅的遺伝子解析に提出し、その特徴を検索する。

また、腫瘍浸潤 MDSC と胃癌の臨床病理学的因子につき検討を行う。対象は当科において切除術の施行された胃癌であり、切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋切片を抗 CD15 抗体による免疫染色を施行し、腫瘍内に浸潤した CD15+cells を、400 倍率の

HPF(high-power fields)でランダムに選択した 10 視野分を観察し、その数をカウントし平均を算出し、臨床病理学的因子と比較検討を行う。

(2) 制御性 B 細胞

消化器癌患者末梢血単核球および腫瘍浸潤 B 細胞を用いて実験を行う。フローサイトメトリー法、ウエスタンブロット、RT-PCR 法、ELISA により、癌患者と正常ドナーの末梢血 B 細胞および腫瘍浸潤 B 細胞のプロファイリングを施行し比較する。また末梢血単核球より B 細胞をマグネティックビーズを用いて分離し、ectonucleotidase(CD39/CD73) およびフローサイトメトリーで同定された制御性 B 細胞の表面マーカーにつき、ウエスタンブロットでの検証および mRNA レベルでの発現解析を施行するとともに制御性 B 細胞のサイトカイン発現について検討する。癌患者から分離された末梢血中 B 細胞および腫瘍浸潤 B 細胞を autologous な T 細胞と共培養し、B 細胞の抑制性の比較を施行する。

(参考文献)

1. Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell reports*. 2015;10(4):562-573.
2. Fremd C, Schuetz F, Sohn C, Beckhove P, Domschke C. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology*. 2013;2(7):e25443.
3. Saze Z, Schuler PJ, Hong CS, Cheng D, Jackson EK, Whiteside TL. Adenosine production by

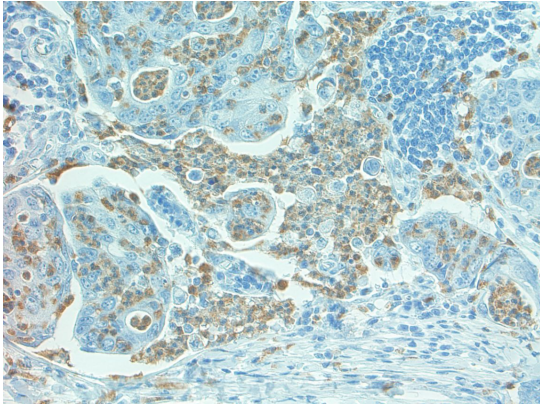
human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood*. 2013;122(1):9-18.

4 . 研究成果

(1) MDSC

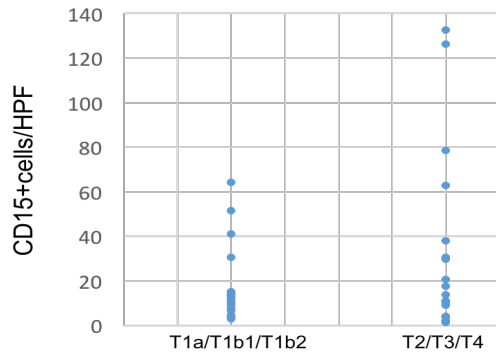
はじめに、検体量が十分に得られると思われた MDSC についての実験を行った。

癌患者の低比重好中球が抑制機能を有するかを検証するために癌患者の末梢血単核球を MONO-POLY^R を用いて低比重 PBMC および高比重 PBMC に分離した。それぞれからマイクロビーズを用いて CD15+好中球を抽出し、PBMC と共培養し、PBMC を anti-CD3/CD28 を用いて刺激を加え、ELISA にて INF- γ を測定した。これに先立ち、CD15+陽性細胞と PBMC 間に allo-reaction が存在するかどうかを検証するために CD15+細胞と PBMC を共培養し INF- γ を測定したが INF- γ は検出されなかった。これを踏まえ、高比重・低比重好中球それぞれについて抑制実験を行った。高比重 CD15+好中球との共培養では INF- γ の産生は抑制されなかった。癌患者より分離された低比重 CD15+好中球は、purity が低く、また収量が非常に少なく抑制実験が施行できなかった。また、これらの CD15+好中球の網羅的遺伝子解析を施行したが RNA の収量が不足しており結果が得られなかった。現在、purity および収量の改善を得るべく研究を行っている。また、腫瘍浸潤 MDSC と胃癌の臨床病理学的因子につき検討であるが、対象は胃癌 38 例 (stage A : 20 例、stage B : 2 例、stage A : 1 例、stage B : 7 例、stage A : 6 例、stage B : 0 例、stage : 1 例) であった。抗 CD15 抗体による免疫染色を施行した (Fig.1)。

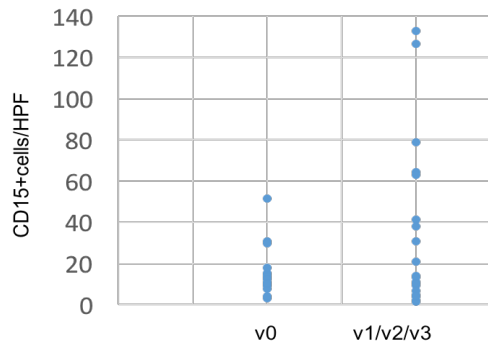


(Fig.1)

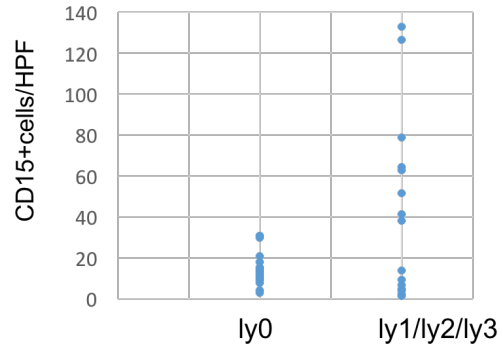
その結果、CD15+cells/HPF の平均は T1 vs T2 (17.3 ± 16.6 vs 34.9 ± 41.5 , $p=0.90$, Fig.2), Iy0 vs Iy1-3 (14.2 ± 7.8 vs 40.1 ± 43.5 , $p=0.01$, Fig.3) v0 vs v1-3 (15.5 ± 11.9 vs 33.8 ± 39.9 , $p=0.08$, Fig.4) 分化型 vs 未分化型 (33.4 ± 41.6 vs 22.4 ± 27.2 , $p=0.35$, Fig.5) であり、Iy 陽性群は Iy 陰性群に比較して優位に CD15+cells/HPF が高値であった。



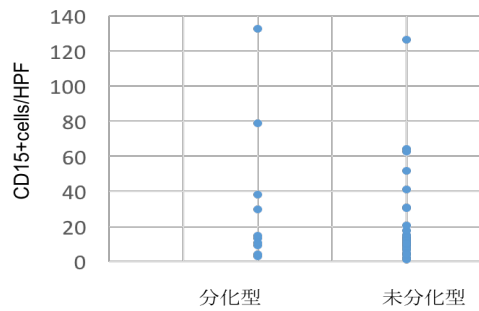
(Fig.2)



(Fig.3)



(Fig.4)



(Fig.5)

(2) 制御性 B 細胞

MDSC での実験結果を踏まえ、現在、以下の研究を計画中である。

消化器癌患者末梢血単核球および腫瘍浸潤 B 細胞を用いて実験を行う。フローサイトメトリー法、ウエスタンブロット、RT-PCR 法、ELISA により、癌患者と正常ドナーの末梢血 B 細胞および腫瘍浸潤 B 細胞のプロファイリングを施行し比較する。また末梢血単核球より B 細胞をマグネティックビーズを用いて分離し、ectonucleotidase(CD39/CD73) およびフローサイトメトリーで同定された制御性 B 細胞の表面マーカーにつき、ウエスタンブロットでの検証および mRNA レベルでの発現解析を施行するとともに制御性 B 細胞のサイトカイン発現について検討する。癌患者から分離された末梢血中 B 細胞および腫瘍浸潤 B 細胞を autologous な T 細胞と共培養し、B 細胞の抑制性の比較を施行する。

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 1 件)

1 . 抑制性 B 細胞の同定と機能評価(解説)

Author : 佐瀬 善一郎, 後藤 満一

Source : Surgery Frontier 21 巻 3 号

Page308-312(2014.09)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐瀬 善一郎 (SAZE ZENICHIRO)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 10468126

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :