

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861094

研究課題名(和文)獲得免疫による再発予防を目指したT細胞不活化制御による新規集学的治療戦略の開発

研究課題名(英文) Novel strategy of multimodal treatment for prevention of recurrence by inactivation of T cell negative pathway

研究代表者

安田 里司 (Yasuda, Satoshi)

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：30721576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍根治切除術を施行した症例の切除検体を用いて、免疫染色を施行し術前治療の有無によるCD45RO陽性メモリーT細胞をはじめとしたCD4陽性Tリンパ球、CD8陽性Tリンパ球、FOXP3陽性Tリンパ球(Treg)など、各リンパ球の浸潤を検討し、それをもとに術前治療の有無による違いを検討した。当初は想定された傾向が表れていたが、検討を進めるにつれて術前治療と腫瘍浸潤リンパ球との間に差が見られなくなり、再検討を要する。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the difference of the tumor infiltrating lymphocyte (TIL) including CD45RO positive T lymphocyte, CD4 positive T lymphocyte, CD8 positive T lymphocyte, and FOXP3 positive T lymphocyte (Treg), between the groups with or without preoperative treatment. At first, the significant difference was observed between the groups with or without preoperative treatment, however, now We could not detect significant difference. We are examining the outcomes and reconsidering the strategy.

研究分野：消化器外科

キーワード：腫瘍免疫 メモリーT細胞 腫瘍浸潤リンパ球

### 1. 研究開始当初の背景

近年、新たな癌治療戦略として免疫療法が注目を集めている。腫瘍免疫において T 細胞の活性化を抑制する B7/CTLA-4 経路や PD-L/PD-1 経路は、免疫応答の終息、恒常性の維持、過剰免疫の抑制などの生体にとって極めて重要な機能を有している。

応募者は、これまで T 細胞の不活化経路である B7/CTLA-4 や PD-L/PD-1 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た<sup>1,2</sup>。すなわち、腫瘍の PD-L 発現と腫瘍内浸潤 T 細胞との間に有意な負の相関がみられ、PD-L 発現が独立予後因子であることを報告してきた。他の癌腫での臨床研究においても、この経路が有意な関与をなしていることが報告され、多くの癌腫に共通する普遍的な事象である可能性が示唆されている。さらに我々はマウスモデルにおいて、抗体治療による PD-1 阻害が、肝転移の抑制をはじめ強力な *in vivo* での抗腫瘍効果を発揮し得る事や、腫瘍切除後の再接種による腫瘍の再生着を予防することを確認している。また PD-1 阻害と VEGFR-2 阻害による血管新生阻害治療とが相乗的な抗腫瘍効果を示すことを報告し<sup>3</sup>、PD-1 阻害による免疫療法は機序の異なる他の治療法と組み合わせることによって、さらに高い効果を発揮する可能性が期待できる。

CTLA-4 に対する阻害抗体 (Ipilimumab) は、進行メラノーマに対する臨床試験において有意に全生存率を延長させ<sup>4</sup>、免疫治療薬としてすでに FDA に認可されている。これに引き続き、抗 PD-1 抗体 (MDX-1106) の臨床試験も各種癌において進められており、良好な抗腫瘍効果と CTLA-4 に比べて副作用が少ないことが報告され<sup>5,6</sup>。今後の臨床応用が強く期待されている。

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。応募者らはヒト食道癌において、腫瘍上の CD45RO をマーカーとしたメモリー T 細胞の発現と全生存率、リンパ節転移再発、肺転移再発の間に、負の相関関係があることを見出し報告した<sup>7</sup>。このことからメモリー T 細胞の誘導によって術後の再発を予防しうる可能性が示唆される。

一方で応募者らは実際の臨床において、難治性癌である膵癌や食道癌に対して術前の化学療法、放射線療法を積極的に行い、腫瘍局所での抗腫瘍効果を認め、リンパ節転移を減少させることを報告してきた<sup>8</sup>。しかし、現時点においてその効果は十分に満足しうるものではなく、メモリー T 細胞を含めて腫瘍免疫に及ぼす影響は未解明である。またこれまでに、化学放射線療法によって樹状細胞への腫瘍抗原の取り込みなどを介して、腫瘍特異的な CD8 陽性の細胞傷害性 T 細胞が誘導される報告されており<sup>9,10</sup>、メモリー T 細胞を

賦活化しうることを示唆される。

以上のことから応募者は、術前 (腫瘍切除前) の T 細胞不活化経路阻害治療が腫瘍特異的なメモリー T 細胞を誘導すること、さらに T 細胞不活化経路阻害治療に術前の化学療法や放射線療法を併用することによって、腫瘍特異的なメモリー T 細胞をより強く誘導し、相乗的な術後再発および転移抑制効果が得られるのではないかの着想に至った。

1. Nomi T et al. **Clin Cancer Res** 2007; 13(7): 2151.

2. Ohigashi Y et al. **Clin Cancer Res** 2005; 11(8): 2947-2953.

3. **Yasuda S** et al. **Clin Exp Immunol** 2013; **172**: 500-506

4. Hodi FS et al. **N Engl J Med** 2010;363:711

5. Topalian SL et al. **N Engl J Med** 2012; **366**:2443-54.

6. Brahmer JR et al. **J Clin Onco** 2010;28:3167

7. K. Enomoto et al. **Clin Exp Immunol** 2012; 168: 186-191

8. Sho M, **Yasuda S**, et al. **J Hepatobiliary Pancreat Sci** 2013 20(2):197-205

9. Suzuki Y et al. **Cancer Res** 2012; 72(16): 3967-3976

10. Kono K et al. **Cell Death Dis** 2013; 4(6): e688

### 2. 研究の目的

膵癌や胆道癌、食道癌をはじめとする難治性癌の成績は未だ満足できるものではなく、切除後に再発することが多く根治は困難なことが多い。これらの癌腫に対する新たな治療戦略、特に再発予防を目指した集学的治療戦略の確立が必須であると考えられる。これまで応募者は T 細胞の不活化経路に注目し、その経路の阻害による抗腫瘍効果および再発予防効果を確認した。本研究では術前 (腫瘍切除前) の免疫療法が腫瘍特異的なメモリー T 細胞を誘導することを検証する。さらに術前の化学療法や放射線療法との併用による相乗的なメモリー T 細胞の誘導を介した術後再発および転移抑制効果を検討し、臨床応用可能な治療戦略の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究の目的は、術前に T 細胞不活化経路の阻害治療と化学放射線療法とを併用することによって、メモリー T 細胞の誘導促進を介し、術後再発・転移を予防、抑制することである。

そのために、以下のことを明らかにする予定である。

消化器癌に対する術前化学療法や放射線療法による、メモリー T 細胞誘導に与える影響

動物腫瘍モデルにおける術前免疫療法に

よる腫瘍特異的なメモリーT細胞誘導の促進効果

術前免疫療法と術前化学放射線療法との併用による相乗的な再発、転移抑制効果

腫瘍特異的なメモリーT細胞の抗腫瘍効果および転移抑制効果

### 消化器癌に対する術前化学療法・放射線療法 のメモリーT細胞誘導の検討

膵癌、胆道癌、原発性および転移性肝癌、大腸癌、胃癌および食道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染色を行う。メモリーT細胞の腫瘍内浸潤と、予後や再発形式、再発率、臨床病理学的因子との関連について検討する。化学療法、放射線療法などの術前治療の有無による誘導効率を比較検討する。さらにはCD4、CD8、FoxP3の発現を調査し、比較検討する。2重染色などによる詳細な解析を行う。各腫瘍においてメモリーT細胞を中心とした抗腫瘍免疫に対して、術前治療が及ぼす影響を解明しようものと思われる。

### 動物腫瘍モデルにおいて術前免疫療法による腫瘍特異的なメモリーT細胞誘導の検討

応募者のこれまでの実験で、マウスに腫瘍を接種しT細胞不活化経路の阻害抗体を投与した後に腫瘍を切除すると、無治療で切除したマウスに比べて腫瘍再接種後の生着率が有意に低下することを見出した。これは同系腫瘍の再接種においてのみ見られ、異系腫瘍を摂取すると生着が見られたことから考察すると、腫瘍特異的な免疫が誘導されている可能性が示唆される。その免疫学的機構を詳細に検討するために、腫瘍やリンパ節、脾臓からTリンパ球を分離し、抽出してCD45RO、CD45RA、CD44、CD62L、CCR7、CD28、CD27などの発現をFACSにて解析し、メモリーT細胞が誘導されるかどうかを検証する。さらにELISPOTによる全身免疫活性およびReal time PCRによる腫瘍局所の免疫活性を解析し、作用機序の解明を行う。

### 術前免疫療法と術前化学放射線療法との併用による相乗的な再発、転移抑制効果の検討

上記のモデルをさらに発展させ、抗PD-1抗体の投与と並行して抗癌剤投与ならびに放射線照射を行う。抗癌剤は現在臨床で使用されている5-FUやGemcitabine、oxaliplatin、irinotecanなどを用い、それぞれ単独治療に比べて腫瘍生着の相乗的な抑制効果が見られることを調査する。同時にメモリーT細胞の誘導についても、併用による相乗的な効果を検証する。また肝転移モデルを使用し、肝転移抑制効果を検証する。

### 腫瘍特異的なメモリーT細胞の抗腫瘍効果および転移抑制効果

上記のいずれかにより誘導したメモリーT細胞、脾臓・リンパ節からFACS sortingにより回収し同系担癌免疫不全マウス(Rag ko)に養子移入し、抗腫瘍効果および転移抑制効果を検証する。ナイーブT細胞移入との比較を行い、腫瘍抗原特異性及び高す用効果の強度をin vivoにおいて検証する。

これらの検討から、臨床に即した、術前治療を中心とした外科治療を含む集学的治療戦略を開発、確立することを目標にする。以上の研究計画に関する分子生物・免疫学的手法にはこれまでに十分習熟しており、実施に問題はないものと思われる。下記の図のように各実験を分担、共同で行い、データ解析は安田が行う。

実験の実施に問題が生じたり、予期しない結果が得られた場合には、国内外の共同研究者にコンサルテーションを行い、解決策を討議する。

#### 4. 研究成果

膵癌根治切除術を施行した症例の切除検体を用いて、免疫染色を施行し術前治療の有無によるCD45RO陽性メモリーT細胞をはじめとしたCD4陽性Tリンパ球、CD8陽性Tリンパ球、FOXP3陽性Tリンパ球(Treg)など、各リンパ球の浸潤を検討し、それをもとに術前治療の有無による違いを検討した。当初は想定された傾向が表れていたが、検討を進めるにつれて術前治療と腫瘍浸潤リンパ球との間にさが見られなくなり、今後の方向性を検討中である。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 里司 (YASUDA, Satoshi)  
奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員  
研究者番号：30721576

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

西和田 敏 (NISHIWADA, Satoshi)  
尾原 伸作 (OBARA Shinsaku)