

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：82606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06878

研究課題名(和文)腫瘍(自己)抗原に対する免疫不応答の解除に基づいた新規がん免疫療法の基盤研究

研究課題名(英文)Development of novel cancer immunotherapy based on the release of immune anergic state

研究代表者

前田 優香 (Maeda, Yuka)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：20757223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：自らの免疫を賦活化させてがんを駆逐するがん免疫療法は近年目覚ましい効果を挙げている。しかし、この恩恵を享受できない症例も一定数存在する。がん免疫療法の効果を得られない原因の一つに多くのがん抗原が自己抗原であることが挙げられる。自己抗原に対しては生体の恒常性を保つために制御性T細胞によって自己免疫寛容が成立する。以前、制御性T細胞が抑制しているCD8陽性T細胞の特徴を報告した。制御性T細胞により抑制された不応答性細胞は細胞増殖やサイトカインの産性能を失っていた。本研究では、悪性黒色腫検体を用いて、不応答性細胞の頻度や機能・その他共発現している細胞表面マーカーを解析し臨床転機との相関を検討した。

研究成果の概要(英文)：Cancer immunotherapies are now a critical category of cancer therapy. However, the clinical benefits with immune checkpoint inhibitors are observed in limited patients. Additionally, immune-related adverse effects are often experienced in the treated patients, indicating the importance to identify predictive biomarkers for both clinical responders and patients with adverse effects. As most tumor antigens are derived from self-constituents, immunological self-tolerance induced by naturally occurring Tregs may hamper the induction of effective T-cell responses. We investigated Treg-suppressed tumor (self) antigen-specific CD8+ T cells and found that Tregs rendered them anergic by inhibiting co-stimulation of antigen-presenting cells. In this study, we examined frequency, function and markers of anergic T cells in malignant melanoma patients. We then propose that the correlation of cancer immunosuppressive state (anergic state) and clinical outcome of malignant melanoma patients.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：がん免疫療法 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

自らの免疫を賦活化させてがんを駆逐する、がん免疫療法は近年目覚ましい効果をあげている。しかしながら一方でこの恩恵を得られていない患者も一定数存在する。免疫療法の効果は宿主の免疫に拠るところが大きい。そのため、正しく宿主の免疫状態を把握することが重要である。そこで、本研究では腫瘍局所での免疫不応答状態をフローサイトメトリーなどを用いて検討し、宿主の免疫状態と予後との関連を検討する。

2. 研究の目的

研究代表者は以前、制御性 T 細胞 (Regulatory T cell:Treg) が自己反応性 CD8+ T 細胞を安定した不応答 (アネルギー) 状態に陥らせることにより長期の免疫寛容を成立させていること、またこれらの不応答 T 細胞が特徴的なフェノタイプ (CCR7+CTLA-4+) を持つことを報告した。近年、Treg による抗腫瘍免疫応答抑制により、がん免疫療法の効果が十分に発揮されていないことが指摘されている。がん抗原の多くが自己抗原由来であることを鑑みると、Treg による抗腫瘍免疫応答抑制と不応答誘導の関連が示唆される。本研究では、悪性黒色腫検体 (腫瘍局所浸潤リンパ球:TIL) を用いて、腫瘍微小環境での Treg によるエフェクター T 細胞 (特に CD8+ T 細胞) への不応答状態の誘導とそのメカニズムを明らかにするとともに、CD8+ T 細胞/Treg 比や不応答状態のエフェクター T 細胞の存在と予後と関連を検討し、新たな治療標的およびバイオマーカー同定に向けた基盤検討を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、悪性黒色腫局所に浸潤している腫瘍 (自己) 抗原特異的 CD8+ T 細胞のフェノタイプ解析と機能解析を行うとともに、CD4、CD45RA、FoxP3 の発現パターンから Treg を同定する手法を使用し Treg の解析、抗原提示細胞への影響を明らかにする。さらに抗原提示細胞を介した Treg 抑制メカニズムがいかに重要かを明らかにする。またこれらの Treg により抑制された不応答性 CD8+ T 細胞の浸潤頻度が病態・予後と関連するのかを以下の様に検討する。

(1) 悪性黒色腫局所サンプルを採取し、CD4、CD45RA、CCR7、CTLA-4、FoxP3、CD8、などで染色し、フローサイトメーターで解析する。

(2) 腫瘍局所の不応答性 CD8+ T 細胞・CD8/Treg の頻度と病態・予後の相関を解析する。さらに免疫チェックポイント阻害剤治療を受けた患者検体でも解析し、治療効果との関連も検討する。

4. 研究成果

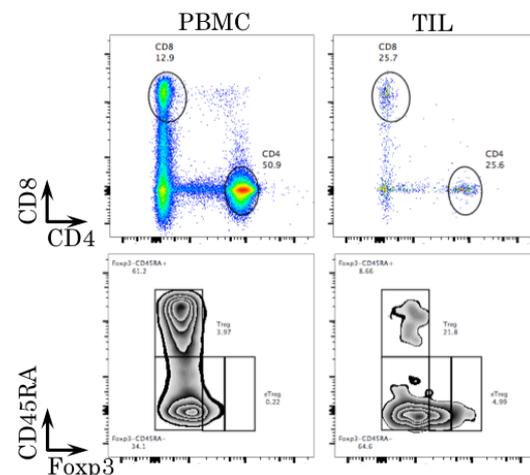
(1) 悪性黒色腫患者から末梢血単核球

(PBMC)・腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を回収・保存を行った。研究代表者らは、腫瘍局所より単核球を酵素処理なしで分離・保存する手法を確立している (Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y et al. PNAS 110 17945-50, 2013)。この手法を用いて、悪性黒色腫局所 (手術検体) および患者末梢血より単核球を分離・保存を行った。

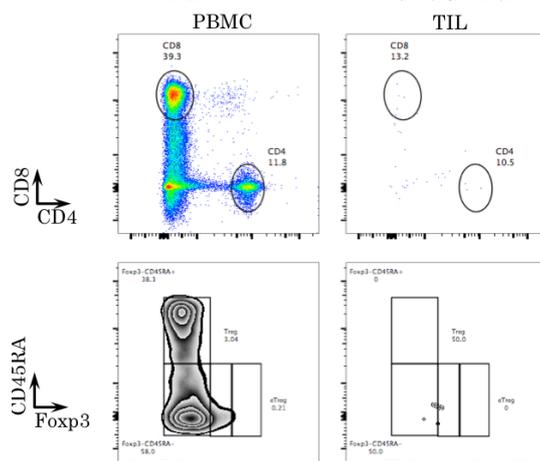
(2) 保存した PBMC/TIL を用いた T 細胞フェノタイプの解析では、研究代表者らがすでに確立したマルチカラー染色 (Maeda Y. et al. Science 346 1536-40 2014) を用いて、悪性黒色腫患者 PBMC/TIL の表面マーカー、FoxP3 核内染色・免疫チェックポイント分子の発現頻度をフローサイトメトリーを用いて解析を行った。

(3) 悪性黒色腫手術検体・免疫チェックポイント阻害剤非奏功例を用いた検討

手術検体・未治療



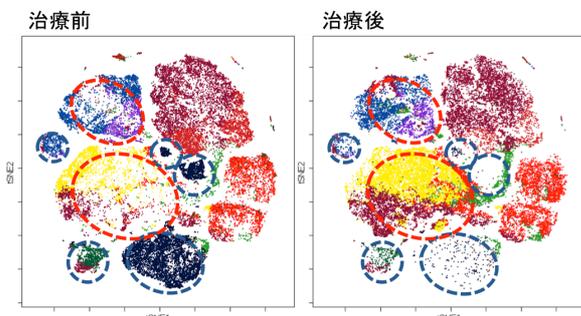
免疫チェックポイント阻害剤投与後



TIL では PBMC に比較して effector Treg に高頻度に浸潤していた。また、CD8 上の免疫チェックポイント分子の発現も薬剤投与後に亢進している傾向があった。免疫チェックポイント阻害剤投与の副作用による休薬後に悪性黒色腫の多発転移が認められたケースでは腫瘍局所へ浸潤しているリンパ球がそもそも少ないことがわかった。1.研究開始当初の背景で述べた通り、免疫療法の効果は

宿主の免疫に拠る。そのため、腫瘍局所にリンパ球が存在しないことは免疫療法への反応性が低いことを示唆している。今後も TIL を中心に Treg 上の免疫チェックポイント分子の発現と予後の相関について引き続き検討を行う。

(4)マスマイトメトリーを用いた解析



免疫療法前後の検体を用いて各種マーカーをマスマイトメトリーで解析を行なった。末梢血でも治療前後で様々な細胞の頻度・発現マーカーが異なることが分かった。腫瘍局所と共に末梢血のみでの治療効果予測の可能性が示唆された。特に、リンパ球・抗原提示細胞の機能に差が見られた。治療予後との相関関係を今後もモニタリングしていく。

#### 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 2 件)

① Saito T, Nishikawa H, Wada H, Nagano Y, Sugiyama D, Atarashi K, Maeda Y, Hamaguchi M, Ohkura N, Sato E, Nagase H, Nishimura J, Yamamoto H, Takiguchi S, Tanoue T, Suda W, Morita H, Hattori M, Honda K, Mori M, Doki Y, Sakaguchi S  
 “Two FOXP3+CD4+ T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers” *Nature Medicine*; doi:10.1038/nm.4086. 2016 (査読有)

② Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, Miller ML, Rekhtman N, Moreira AL, Ibrahim F, Bruggeman C, Gasmı B, Zappasodi R, Maeda Y, Sander C, Garon EB, Merghoub T, Wolchok JD, Schumacher TN, Chan TA, “Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer” *Science*; 348(6230):124-128, 2015 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

① 前田優香、Perspective of T cell responses as predictive markers in cancer immunotherapy, 第 75 回日本癌学会学術総会腫瘍別シンポジウム、2016/10/06、パシフィコ横浜 (神

奈川県)

② Yuka Maeda, Cancer antigens recognized by CD8+ T cells inducing tumor regression, 第 31 回名古屋癌治療国際シンポジウム、2016/02/13、愛知県がんセンター国際医学交流センター (愛知県)

③ Yuka Maeda, Regulatory T Cell-mediated Anergy Induction in Tumor-selfantigen-specific CD8+ T Cells, SITC, 2015/11/04, ワシントン (米国)

④ Yuka Maeda, Cancer antigens recognized by CD8+ T cells which induce tumor regression, 第 74 回日本癌学会学術総会 International Session, 2015/10/08, 名古屋国際会議場 (愛知県)

[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  
 前田 優香 (MAEDA, Yuka)  
 国立研究開発法人国立がん研究センター  
 研究所・研究員  
 研究者番号：20757223

(2) 研究分担者  
 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
 ( )

研究者番号：

(2) 研究協力者

山崎 直也 (YAMAZAKI, Naoya)

森 泰昌 (MORI, Taisuke)