

令和元年5月17日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16937

研究課題名(和文) 制御性T細胞に着目した頭頸部癌における抗腫瘍免疫の解析と免疫治療への応用

研究課題名(英文) Investigating roles of regulatory T cells in inducing anti-tumor immunity and developing immunotherapy in head and neck cancer

研究代表者

的場 拓磨(Matoba, Takuma)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研究医

研究者番号：40790712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：制御性T細胞は、腫瘍(癌)に対する免疫を含め様々な免疫を抑制する。一方、頭頸部癌は主に口腔、咽喉頭に発生する癌であり、近年増加傾向にある。私たちは頭頸部癌における制御性T細胞の特徴を見出すため、その表現型や遺伝子発現などを解析した。その結果、頭頸部癌組織において制御性T細胞の割合が増加しており、多くの制御性T細胞が免疫抑制にかかわる分子を発現していることを見出した。さらに、遺伝子発現解析によってそれらの制御性T細胞に特徴的な遺伝子発現パターンを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、免疫チェックポイント阻害薬をはじめ、癌に対する免疫が注目されている。しかし、そのメカニズムはまだ明らかになっていない部分も多い。頭頸部癌に対しても免疫チェックポイント阻害薬が使用可能となったが、効果の不十分な場合も多く、メカニズムの解明が求められている。私たちは抗腫瘍免疫を抑える制御性T細胞が、頭頸部癌においてどのような特徴をもつかを見出した。発現する分子や遺伝子などのデータを生かし、頭頸部癌に対する免疫治療のよい適応や他の治療法との組み合わせなどを決定することに役立たせることができる。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells suppress several types of immunity, including anti-tumor immunity. On the other hand, head and neck cancer, mostly occurred from oral cavity, pharynx and larynx, have been increasing recently. To find out the feature of regulatory T cells in head and neck cancer, we analyzed the phenotypes and gene expression patterns of those cells. As a result, we found that the frequency of regulatory T cells was increased in head and neck cancer tissue and many of regulatory T cells expressed immune-suppressive molecules. Furthermore, we found the signature gene expression patterns of those regulatory T cells.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：制御性T細胞 頭頸部癌 抗腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

様々な癌の治療において、免疫チェックポイント阻害薬が使用可能となり、抗腫瘍免疫に対する関心が高まっていた。頭頸部癌は主に口腔、咽喉頭から発生する癌であり、その生命予後は必ずしも良いとは言えず、また呼吸、嚥下、発声などの機能に関わる臓器に発生するため大きく生活の質に影響する癌である。その頭頸部癌に対しても免疫チェックポイント阻害薬 (PD-1 に対する抗体であるオプジーボ) が使用可能となったが、十分な効果が得られない症例も多く、そのメカニズムの解明が求められた。

制御性 T 細胞は免疫抑制において中心的な役割を担うとされ、抗腫瘍免疫についても制御性 T 細胞の解析が重要視されていた。しかしながら、頭頸部癌における制御性 T 細胞についての研究は不十分であり他癌と比較し文献や発表は少ない。

### 2. 研究の目的

頭頸部癌における抗腫瘍免疫メカニズムを解明することを目的とし、特に制御性 T 細胞に着目した研究を行うこととした。それによって頭頸部癌に対する新たな治療戦略の開発や、免疫治療の適応決定に役立つデータを打ち出し、頭頸部癌患者の予後改善や生活の質の改善につなげる。

### 3. 研究の方法

頭頸部癌組織と、比較対象として他癌の組織や癌のない組織の検体を収集し、そこからリンパ球を採取する。リンパ球をフローサイトメトリーや RNA シークエンスにて解析し、主に制御性 T 細胞の表現型や遺伝子発現を解析した。

頭頸部癌組織は、主に手術検体を新鮮な状態で収集した。それを細断しセルストレイナーを通すことでリンパ球を採取し、凍結保存した。採取したリンパ球は既存の方法で蛍光抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーを用いて表現型を解析した。頭頸部癌の原発腫瘍、転移のあるリンパ節、転移のないリンパ節、また扁平上皮癌と非扁平上皮癌、さらに比較として乳癌の転移リンパ節について、リンパ球を採取してフローサイトメトリーで解析した。そこで特徴的な表現型を示した細胞や症例については、表面抗原の発現によってセルソーティングにていくつかの分画に分けた後、RNA シークエンスを行って遺伝子発現を解析した。遺伝子発現データは、主成分解析やクラスター解析の他、Gene ontology 解析や Gene set enrichment 解析も行い、どの細胞分画においてどのような遺伝子発現が上昇しており、それらの遺伝子 (分子) が関わる経路が何であるかということ解析した。

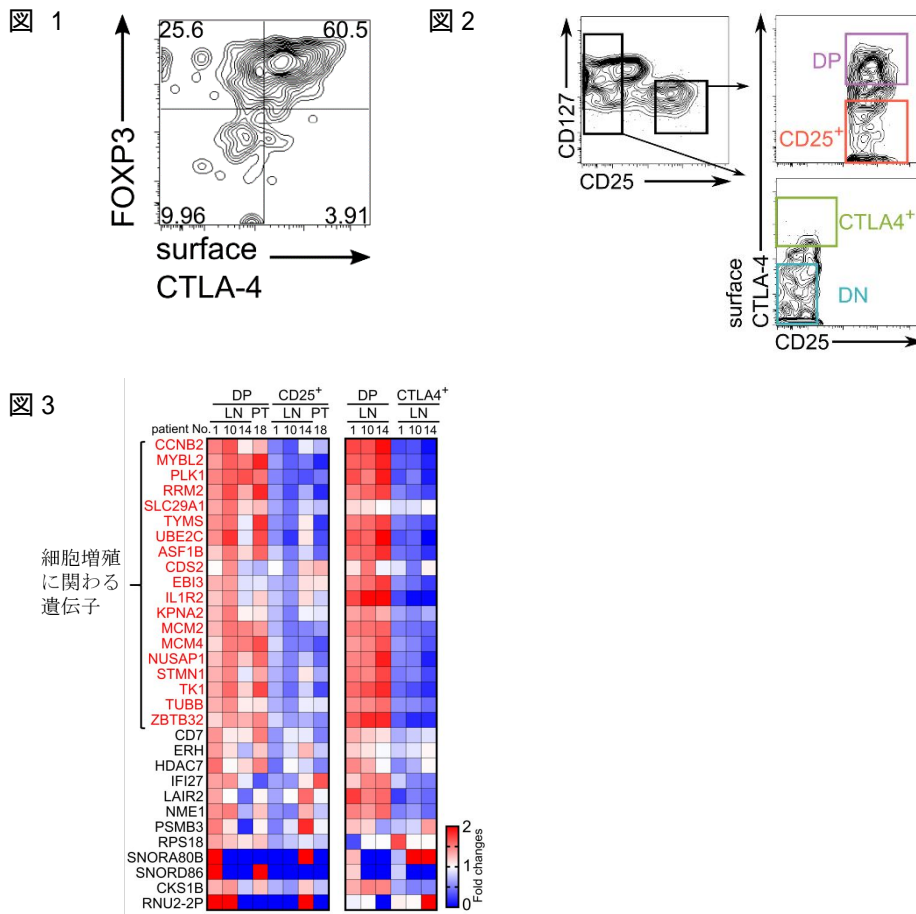
### 4. 研究成果

頭頸部癌において、CD4 陽性 T 細胞中の制御性 T 細胞の割合が増加していることを発見した。その中でも、細胞表面に CTLA-4 という免疫抑制に関わる分子を発現している制御性 T 細胞が増加していた (図 1)。CTLA-4 は免疫抑制能が強く、細胞表面への発現は厳重にコントロールされているため、通常末梢血等ではフローサイトメトリーで数%しか表面への発現が検出されないが、頭頸部癌に浸潤する制御性 T 細胞では、半数程度が細胞表面に CTLA-4 を発現しており、注目すべきデータであった。国内外において、頭頸部癌に浸潤する制御性 T 細胞の、細胞表面への CTLA-4 の発現に着目した研究は他になく、ここに着目してさらなる検討を行うこととした。

次に RNA シークエンスを行い、細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞、細胞表面に CTLA-4 を発現していない制御性 T 細胞、また conventional T 細胞についてそれぞれ遺伝子発現を解析した (図 2、3)。頭頸部癌は解剖学的な複雑性や局在から大きな組織をとることが難しく、もともと割合の多くない細胞である制御性 T 細胞を、CTLA-4 の発現によって分け、それぞれについて RNA シークエンスによる遺伝子発現解析に成功したのは世界初である。制御性 T 細胞と conventional T 細胞とで比較したところ、今までに発表されている制御性 T 細胞に特徴的な遺伝子の発現は、頭頸部癌においても同様に確認された。4 例について RNA シークエンスを行ったが、いずれも同様の発現パターンを示しており、再現性の高いデータが得られたと言える。さらに、今回着目した細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞に特徴的な遺伝子発現パターンを探るため、細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞と発現していない制御性 T 細胞との比較や、conventional T 細胞との比較を行った。その結果、細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞は他と比べ細胞増殖や DNA 複製、細胞周期などに関わる遺伝子の発現が上昇していた (図 3)。

そこで再度フローサイトメトリーで細胞増殖マーカーである Ki-67 や抗原特異的な制御性 T 細胞のマーカーである 4-1BB の発現を確認したところ、細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞において Ki-67 と 4-1BB の発現が高く、頭頸部癌の腫瘍抗原に反応して細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞が増殖していることが示唆された。また、PD-1 の発現も高く、制御性 T 細胞の中でも強い抑制能をもつ分画が多いということも見出した。

これらのデータから、細胞表面に CTLA-4 を発現した制御性 T 細胞が新たな治療のターゲットとなり得、頭頸部癌に対する治療戦略の開発に役立つと考えられる。また今後さらなる研究を重ねることで、免疫チェックポイント阻害薬の適応を決定したり、他の治療法との組み合わせを開発したりすることに役立つデータが得られると期待できる。



図表説明文

図 1 . 頭頸部癌組織に浸潤する CD4 陽性細胞にゲートし、FOXP3 と細胞表面の CTLA-4 の発現をフローサイトメトリーでみたもの。代表的なプロットを表示。数字は CD4 陽性細胞中の各分画の百分率。

図 2 . 頭頸部扁平上皮癌に浸潤する T 細胞を表面抗原の発現に基づき 4 つの分画にセルソーティングを行った際のゲートを示したもの。DP: : 細胞表面に CTLA-4 を発現する制御性 T 細胞、CD25+: 細胞表面に CTLA-4 を発現していない制御性 T 細胞、CTLA4+: 細胞表面に CTLA-4 を発現している conventional T 細胞、DN: 細胞表面に CTLA-4 を発現していない conventional T 細胞。

図 3 . 他の分画に比べ、細胞表面に CTLA-4 を発現している制御性 T 細胞に発現が高かった遺伝子。

5 . 主な発表論文等

1. Matoba T, Imai M, Ohkura N, Kawakita D, Ijichi K, Toyama T, Morita A, Murakami S, Sakaguchi S, Yamazaki S. Regulatory T cells expressing abundant CTLA-4 on the cell surface with a proliferative gene profile are key features of human head and neck cancer. *Int J Cancer*. Jun 1;144(11):2811-2822. 2019 ( 査読あり ) DOI: 10.1002/ijc.32024

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )

1. 的場拓磨、今井優樹、大倉永也、川北大介、伊地知圭、遠山竜也、森田明理、村上信五、坂口志文、山崎小百合 . 頭頸部癌における制御性 T 細胞の新たな特徴 . 第 37 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 , 2019

2. Takuma Matoba, Masaki Imai, Naganari Ohkura, Daisuke Kawakita, Kei Ijichi, Tatsuya Toyama, Akimichi Morita, Shingo Murakami, Shimon Sakaguchi, Sayuri Yamazaki. A new feature of regulatory T cells in human head and neck cancer. 第 47 回日本免疫学会 , 2018 [ 学会発表 ] ( 計 2 件 )

[ 図書 ] ( 計 件 )

[ 産業財産権 ]  
出願状況 ( 計 件 )

名称 :  
発明者 :

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

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

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：今井 優樹

ローマ字氏名：( IMAI , masaki )

研究協力者氏名：大倉 永也

ローマ字氏名：( OHKURA , naganari )

研究協力者氏名：川北 大介

ローマ字氏名：( KAWAKITA , daisuke )

研究協力者氏名：伊地知 圭

ローマ字氏名：( IJICHI , kei )

研究協力者氏名：遠山 竜也

ローマ字氏名：( TOYAMA , tatsuya )

研究協力者氏名：森田 明理

ローマ字氏名：( MORITA , akimichi )

研究協力者氏名：村上 信五

ローマ字氏名：( MURAKAMI , shingo )

研究協力者氏名：坂口 志文

ローマ字氏名：( SAKAGUCHI , shimon )

研究協力者氏名：山崎 小百合

ローマ字氏名：( YAMAZAKI , sayuri )

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。