

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10034

研究課題名(和文) 難治性消化器癌に対する新たな集学的癌免疫治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of new immunotherapy for intractable gastrointestinal cancer

研究代表者

庄 雅之 (Sho, Masayuki)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50364063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌，大腸癌において，HVEM発現の意義について検討した結果，いずれも有意な予後因子となり，また腫瘍内浸潤T細胞との間に有意な逆相関を認めた．HVEMが肝細胞癌および大腸癌の進展において有意な影響を及ぼすことが示唆され，新たな予後因子，治療標的となり得る可能性が明らかとなった．さらに，膵癌におけるCD155およびNectin family発現について検討した．術前未治療膵癌標本を用いて検討した結果，CD155やNectin発現と予後に有意な関連が認められ，腫瘍内浸潤T細胞との逆相関も認められ，両分子の腫瘍免疫への関与が示唆された．今後，膵癌治療において有意な標的分子となる可能性が示された．

研究成果の概要(英文)：In this study, we have evaluated HVEM expression in hepatocellular carcinoma and colorectal cancer. As a result, tumor HVEM expression had a significant prognostic value. Furthermore, HVEM expression was inversely correlated with tumor-infiltrating T cells, suggesting its important role in tumor immunity. In addition, we have evaluated CD155 and Nectin family in human pancreatic cancer. We found such molecules had significant prognostic value and played an important role in pancreatic cancer. Therefore, targeting T cell negative pathways including HVEM, CD155, and Nectin family may hold significant promise for future clinical application in cancer immunotherapy.

研究分野：消化器外科，一般外科

キーワード：膵癌 消化器癌 腫瘍免疫

## 1. 研究開始当初の背景

新規化学療法等の癌治療の進歩により、消化器癌においても予後の向上がみられている。一方、今なお全ての消化器癌に切除不能例や進行例がみられ、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開発が必須である。応募者は、これまで膵癌を中心とした消化器癌に関する臨床研究とともに、免疫を中心とした基礎的研究を精力的に行い、論文発表を行ってきた。特に腫瘍領域において、(1) T細胞の不活化・抑制経路であるPD-L/PD-1, B7-H3, HVEM, ETBR等に関する新たな知見を見だし、それらの臨床的意義および新規癌免疫療法の可能性を世界に先駆けて報告してきた。また、(2) 腫瘍内浸潤メモリーT細胞が種々の癌腫において普遍的に、従来のTNM-Stage分類とは独立して、予後や術後再発と関連することを見いだした。T細胞上のPD-1やCTLA-4といった負の受容体の存在は、T細胞を機能不全に陥らせ、ワクチン等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、これまででない抗腫瘍効果をもたらす可能性がある。実際に、進行メラノーマを対象とした第III相臨床試験において、ヒト型抗CTLA-4抗体や抗PD-1抗体の有用性が実証され、現在世界的に注目されている。さらに最近の癌幹細胞に関する一連の研究報告は、難治癌の治療抵抗性に癌幹細胞が重要な役割を果たしている事を示唆している。我々がこれまで蓄積してきた研究成果および最新の癌研究報告を併せて鑑みると、(1)既知のT細胞不活化分子以外にも、生体内腫瘍免疫機構において重要な機能を有する他分子が存在する可能性、(2)癌幹細胞に対するT細胞不活化阻害は、腫瘍根絶に至る革新的治療法となり得る可能性があるのではないかとこの着想に至った。

## 2. 研究の目的

消化器癌臨床検体を用いた分子生物学的および免疫学的検討により、各癌腫のメモリーT細胞発現の臨床的意義およびその機序について検討する。具体的には、膵癌、胆道癌、食道癌、胃癌、大腸癌等の切除標本を用いて、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。さらにその機序を明らかにするために、T細胞 Negative SignalであるPD-L発現、宿主免疫回避に関わると最近報告されたEndothelin B receptor (ETBR)発現、腫瘍局所免疫活性との相関についても検討する。さ

らに腫瘍内浸潤調節T細胞, CD4+, CD8+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第一の目標とした。得られた結果を基盤として、動物腫瘍モデルを用いて、各モノクローナル抗体治療による抗腫瘍効果および術前治療による再発および転移抑制効果を検討し、臨床導入に向けて、有用性と安全性を検証する。次世代の新規集学的癌治療戦略を立案することを最終目標とする。

## 3. 研究の方法

(1) 消化器癌における新規 T 細胞 Negative Signal 分子発現の臨床的意義の解明  
新規 T 細胞 Negative Signal 分子として報告されている HVEM, CD155, Nectin について膵癌、肝癌、大腸癌等の切除標本を用いて、免疫染色による各分子の蛋白発現や Real-time PCR による mRNA 発現を評価し、定量化した。臨床病理学的あるいは予後との関連について検討した。

(2) 腫瘍内浸潤 T 細胞および局所免疫活性との関連についての検討

これまでに蓄積してきた CD45RO+メモリーT細胞, CD4+, CD8+T細胞, FOXP-3 発現に関する教室のデータベースと照合し、前項の T 細胞 Negative Signal 分子との関連を検討する。必要に応じて、2重染色等による詳細な解析を系統的に行い、生体内の獲得免疫機構を包括的に解明する。さらに凍結保存標本を用いて Real-time PCR 法により、Perforin, Granzyme B, IFN-g, CCR7 等の免疫活性化因子、各種サイトカイン、ケモカイン、接着因子等の発現を解析する。

## 4. 研究成果

(1) 肝細胞癌における HVEM 発現の意義について検討した。150例の肝細胞癌切除標本を用いて免疫染色により検討した結果、腫瘍の HVEM 発現と患者年齢、腫瘍マーカー、TNM ステージ分類と相関し、さらに術後の予後および再発とも有意な相関が認められた。さらに、多変量解析の結果、HVEM が有意な独立予後因子であることも明らかとなった。さらに腫瘍内浸潤 T 細胞の免疫染色での結果、CD4, CD8, CD45RO との有意な逆相関が認められ、腫瘍免疫との関連が示唆された。さらに Real-time PCR での検討の結果、perforin, Granzyme B, IFN-g との有意な逆相関も認められ、腫瘍局所の免疫活性との関連が、機序の一つと考えられた。

(2) 大腸癌における HVEM 発現の臨床的意義について検討した。免疫染色により、大腸正常粘膜、過形成ポリープ、腺腫、大腸癌について計 234 例において検討した。その結果、

正常粘膜，過形成ポリープにおいては，HVEM 発現は認めなかったが，一方，腺腫の 24%，約 50%以上の大腸癌に HVEM 発現を認めた．HVEM 発現と T 因子，Stage との有意な相関が認められ，予後にも有意な関連が認められた．さらに，腫瘍内浸潤 T 細胞と HVEM との有意な逆相関が認められた．統合解析の結果，HVEM が大腸癌の進展において有意な影響を及ぼすことが示唆され，新たな予後因子さらには，治療標的となり得る可能性が明らかとなった．

(3) 膵癌における CD155 発現について検討した．術前未治療膵癌 134 例の切除標本を用いて，抗ヒト CD155 抗体にて免疫組織染色を行った．CD155 腫瘍発現と臨床病理学的因子，予後との関連について検討した．また，同時に抗 CD4，CD8，CD45RO 抗体を用いて免疫組織染色を行い，CD155 発現と Tumor infiltrating lymphocytes (TIL)との関連を検討した．その結果，多くの膵癌において，CD155 発現が確認された．発現強度により，2 群に分類した結果，CD155 低発現群は，CD155 高発現群に比して，有意に予後良好であった．CD155 発現と TNM 因子や stage 分類との関連は認めなかったが，Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析では，CD155 高発現群は独立予後因子であった(ハザード比 1.753, P=0.0157)．TIL との関連については，CD155 高発現群において有意に CD8，CD4 および CD45RO の T 細胞腫瘍内浸潤が少なかった．以上より，従来 of 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．機序の一つとして，CD155 腫瘍発現による TIL の抑制が示唆された．以上より，膵癌において，CD155 は腫瘍免疫の抑制因子として機能しており，同時に新たな治療標的分子となる可能性が示唆された．

(4) 膵癌における Nectin family 腫瘍発現の臨床的意義について統合的解析を行った．術前未治療膵癌 123 例の切除標本を用いて免疫染色を行い，各分子の腫瘍発現と臨床病理学的因子，予後との関連につき検討した．その結果，腫瘍発現では，Nectin-1, 2 の腫瘍発現は限定的であったが，Nectin-3, 4, CD155/Necl-5 は膵癌腫瘍細胞で高頻度に過剰発現がみられた．発現強度により各々高発現群，低発現群の 2 群に分類し，以下の解析を行った．Nectin-3, 4, CD155/Necl-5 発現には正の相関がみられた．各分子と TNM 分類を含む臨床病理学的因子との関連は認めなかった．多変量解析では Nectin-3 低発現，Nectin-4 高発現，CD155/Necl-5 高発現は，各々独立予後不良因子として有意であった．腫瘍内浸潤 T 細胞 (TIL)との関連について検討した結果，Necl-5/CD155 高発現群において有意に TIL が抑制されていた．さらに，血管新生との関連を検討した結果，Nectin-3, 4, Necl-5/CD155 各発現と VEGF および腫瘍内血

管には有意な正の相関がみられた．以上より，膵癌における Nectin family の臨床的意義が示された．Nectin 各分子は独立して機能しており，血管新生，腫瘍免疫等の機序を介して，膵癌悪性度の獲得と関連しているものと思われる．今後，Nectin を標的とした新たな膵癌治療戦略の可能性が示唆された．

(5) 胆道癌，胃癌においても同様の検討を進めており，一定の有意な研究結果が得られている．さらに詳細な検討を進行中である．

## 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 5 件)

K-ras mutation analysis of residual liquid-based cytology specimens from endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration improves cell block diagnosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. Sekita-Hatakeyama Y, Nishikawa T, Takeuchi M, Morita K, Takeda M, Hatakeyama K, Nakai T, Uchiyama T, Itami H, Fujii T, Mitoro A, Sho M, Ohbayashi C. PLoS One. 2018;13(3):e0193692. doi:10.1371/journal.pone.0193692.

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;34:30. doi: 10.1186/s13046-015-0144-7.

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;35(4):2287-97.

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 ;35(3):1361-7. PMID: 25750286

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;51

(2):157-65. doi:10.1016/j.ejca.2014.11.004.

〔学会発表〕(計 8 件)

膵癌における Nectin family 腫瘍発現の臨床的意義とその複合的作用メカニズム. 西和田敏, 庄 雅之, 木下正一, 長井美奈子, 安田里司, 尾原伸作, 金廣裕道. 第 117 回日本外科学会定期学術集会. 2017.04.29, 横浜

ヒト膵癌における Nectin Family 腫瘍発現の臨床病理学的意義とそのメカニズム. 西和田敏, 庄 雅之, 赤堀宇広, 木下正一, 長井美奈子, 山田高嗣, 野見武男, 山戸一郎, 北東大督, 安田里司, 川口千尋, 尾原伸作, 吉川高宏, 金廣裕道, 中島祥介. 第 28 回日本肝胆膵外科学会・学術集会. 2016.06.02, 大阪

膵癌における Nectin family 腫瘍発現の臨床的意義とそのメカニズム. 西和田敏, 庄 雅之, 赤堀宇広, 木下正一, 長井美奈子, 山田高嗣, 野見武男, 山戸一郎, 北東大督, 安田里司, 川口千尋, 尾原伸作, 吉川高宏, 中島祥介. 第 116 回日本外科学会定期学術集会. 2016.04.14, 大阪

膵癌における Nectin family 腫瘍発現の予後に及ぼす影響. 西和田敏, 庄 雅之, 安田里司, 赤堀宇広, 木下正一, 長井美奈子, 野見武男, 山戸一郎, 北東大督, 川口千尋, 中島祥介. 第 23 回日本消化器関連学会週間. 2015.10.10, 東京

膵癌における Nectin family 腫瘍発現の臨床病理学的意義. 西和田敏, 庄 雅之, 安田里司, 赤堀宇広, 木下正一, 長井美奈子, 野見武男, 山戸一郎, 北東大督, 中島祥介. 第 70 回日本消化器外科学会総会. 2015.07.16, 浜松

ヒト膵癌における Nectin family 腫瘍発現の臨床病理学的意義. 西和田敏, 庄 雅之, 安田里司, 赤堀宇広, 木下正一, 長井美奈子, 野見武男, 山戸一郎, 北東大督, 川口千尋, 中島祥介. 第 27 回日本肝胆膵外科学会・学術集会. 2015.06.12, 東京

ヒト膵癌における Nectin family 腫瘍発現の予後に及ぼす影響. 西和田敏, 庄 雅之, 安田里司, 赤堀宇広, 木下正一, 長井美奈子, 山戸一郎, 北東大督, 川口千尋, 中島祥介. 第 115 回日本外科学会定期学術集会. 2015.04.16, 名古屋

大腸腫瘍における HVEM 発現の臨床的意義. 井上 隆, 庄 雅之, 安田里司, 西和田敏, 右田和寛, 小山文一, 中村信治, 植田 剛, 錦織直人, 川崎敬次郎, 尾原伸作, 中本貴透, 藤井久男, 中島祥介. 第 115 回

日本外科学会定期学術集会. 2015.04.16, 名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.naramed-u.ac.jp/~1sur/>

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・教授

研究者番号: 50364063

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

西和田敏 (NISHIWADA, Satoshi)

木下正一 (KINOSHITA, Shoichi)