

平成30年6月27日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19066

研究課題名(和文)膵がん腫瘍免疫におけるInnate lymphoid cellの役割に関する研究

研究課題名(英文)The role of innate lymphoid cells in tumor immunity of pancreatic cancer

研究代表者

吉田 裕 (Yoshida, Hiroshi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医員

研究者番号：70750751

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)：innate lymphoid cells(ILCs)は、近年同定されたリンパ球系細胞群であり、腫瘍免疫における役割は解明されていない。本研究では、ILCsの膵がん免疫微小環境形成における役割を検討した。NK細胞、ILC1、ILC2、ILC3について免疫染色により膵がん組織での分布と数を評価し臨床病理学的に解析した。各ILCsはがん組織内でT細胞と類似の分布を呈し、浸潤数はより少なかった。NK細胞、ILC1、ILC3浸潤の多い症例は少ない症例に比して予後良好であった。一方、ILC2細胞浸潤が多い症例は予後不良であった。ILCsは類似機能を持つT細胞と同様の役割をしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Innate lymphoid cells (ILCs) have been recognized as new subgroups of lymphoid cells showing various functions like as helper or cytotoxic T cells. However, the role of ILCs in tumor-immunity remains to be elucidated. The aim of this study was to understand the role of ILCs in development of tumor microenvironment of pancreatic cancer. The number and distributions of ILCs containing NK cells, ILC1, ILC2 and ILC3 in the pancreatic cancer tissue were evaluated by immunohistochemical staining.

All ILC subtypes showed similar distribution as T-cell, however, the number of ILCs were less than those of T-cell. The group of higher NK cells, ILC1 or ILC3 infiltration demonstrated longer the overall survival and progression free survival than those of the group of lower infiltration. Inversely, higher ILC2 group showed poor prognosis compared to lower ILC2 group. Based on these findings, ILCs may play similar roles of corresponding T-cells in immune-microenvironment of pancreatic cancer.

研究分野：pathology

キーワード：pancreatic cancer Innate lymphoid cells

## 1. 研究開始当初の背景

近年急速に期待が高まっている抗腫瘍免疫療法は、前立腺癌や悪性黒色腫では標準治療の一つとして位置づけられ、長期生存例も報告されている。しかしながら、その効果は未だ十分とは言えず、より効率的で持続可能な効果を示す免疫療法の開発が望まれている。

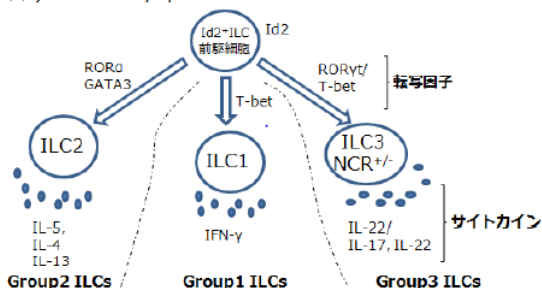
抗腫瘍免疫療法の開発においては、動物モデルが頻用され重要な知見が積み重ねられてきた。しかしながら、動物モデルで効果が示された治療も、臨床試験では十分な成果が得られないことが多く、ヒトと動物モデル間の免疫反応性や組織微小環境の違いが要因の一つとされている。そのため、動物モデルに加え、ヒト腫瘍組織を対象とした免疫応答・微小環境の解析が求められている。

これまでに当研究グループではヒト膵がんを中心として、多段階膵がん過程から進行がんにおける宿主免疫反応の変化、腫瘍免疫微小環境の形成に携わる免疫細胞、液性因子、間質細胞等の役割について検討してきた (Clin Cancer Res 2006;12:5423, Gastroenterology 2011;140:310, Br J Cancer 2013;108:914)。

本研究では、最近、新たなリンパ球系細胞群として存在が明らかになったが (Nat Immunol 2011;12: 21-7)、未だ腫瘍免疫における役割が十分に理解されていない「Innate lymphoid cells (ILCs)」に注目し、ILCs が腫瘍免疫にどのように寄与しているのかについて、膵がんを用いて検討する。

ILCs は、T 細胞レセプターを有さず、機能分化した各ヘルパーT 細胞や細胞障害性 T 細胞に対応するようなサイトカイン分泌を示し、骨髄球系・樹状細胞系の形質を欠く、一群のリンパ球系細胞群である。ILCs には既知のNK 細胞やlymphoid tissue inducer cells が含まれる。新たに同定された ILCs を加えて、共通の前駆細胞に由来する細胞群として、機能分化した各細胞種を分泌液性因子と特異的な転写因子発現により、ILC1~ILC3 の大きく3群に分類している(Nat Rev Immunol 2013;13:145-9)。

図1) 新規 Innate lymphoid cells の分類



## 2. 研究の目的

がんの重要な臨床的特性は、がん細胞、がん間質、また両者の相互作用によって規定されている。免疫担当細胞はがん間質を構成する一員であり、がんの微小環境に与える影響は大きい。開発の進められている免疫療法にとって、ヒトがんで実際に起こっている、がんヒト免疫系を含めたがん間質との相互作用を深く理解することは不可欠である。

Innate lymphoid cells (ILCs)は、多様なサブセットを有する T 細胞に匹敵するような、新たなリンパ球系細胞群として、その存在がよく最近明らかになり注目を集めている。しかし、腫瘍免疫における ILCs の役割は未だ十分に解明されていない。

本研究では、難治がんである膵がんを対象とし、ILCs の腫瘍免疫における意義・役割について理解を深めることを目的に、ILCs が膵がん免疫微小環境形成にどのように寄与しているのかを、ヒト臨床材料とマウス膵がんモデル系を用いて検討する。また膵がん・進展過程における ILCs の作用点やヒト膵がんにおける ILCs の臨床病理学的意義についても検討する。

## 3. 研究の方法

A. 膵がん組織に浸潤する ILC 等の免疫細胞の臨床病理学的意義に関する研究

アジュバント化学療法が標準治療になっていない時期の 2003-2005 年、およびアジュバント化学療法が標準治療になっている時期の 2009-2010 年に、国立がん研究センター中央病院肝胆膵外科で切除された 2 つの膵がんコホート約 100 症例と約 120 症例を解析対象とした。切除膵は、膵頭十二指腸切除検体については水平断で、膵体尾部検体については矢状断で、各 5mm 間隔で全割全埋組織ブロックを作成し腫瘍のマッピングを実施した。その中から腫瘍の最大断面を含む代表的な組織切片を選出して、以下の免疫組織化学を実施した。T 細胞は CD4, CD8 サブセット、マクロファージは CD163 陽性 M2 マクロファージについて検討した。T 細胞・B 細胞・骨髄球系細胞を同定する各 2-3 種のマーカーを系統マーカーとした。ILC1, ILC2, ILC3, NK 細胞を一分子で判別可能な、有用免疫組織化学マーカーは乏しいことから、系統マーカーと各 ILC に特徴的なマーカーの多重染色を実施して、系統マーカー陰性・特徴的なマーカー陽性細胞を各 ILC として同定した。多重染色を施した組織切片は、ヴァーチャルスライドスキャナー(Nanozoomer, 浜松ホトニクス株式会社, 浜松, 日本)を用いてヴァーチャルスライドを作成し、低倍率観察によって膵がん組織内で各 ILC が多く存在する部を定め、高倍率観察によって ILC 細胞数をカウントした。免疫組織化学染色により同定した ILCs に対して、膵癌主要組織内での分布・浸潤数を評価し、次に腫瘍浸潤各 ILC を中間

値で浸潤の多い群と少ない群の2群に分けて、患者予後を主体に臨床病理学的情報と比較検討した。

#### B. 免疫微小環境を特徴付けるサイトカイン遺伝子あるいはサイトカインリセプター遺伝子発現の同定に関する研究

膵がんコホート(2003-2005 年当院切除約120 症例)について、凍結組織から全 RNA を抽出し、それを元にサイトカイン遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法により解析し、ホルマリン固定組織に対してはサイトカイン分子に対する抗体を作成し、免疫組織化学によりそのサイトカイン分子を発現する ILC 浸潤を解析し、患者予後情報を含めた臨床病理学的情報と比較検討した。

#### 4 . 研究成果

ILCs は NK (natural killer)細胞、ILC1, ILC2, ILC3 の各細胞種について検討した。いずれの細胞も免疫組織化学により膵がん組織内での分布と浸潤細胞数をカウントして臨床病理学的に解析した。

T 細胞の膵がん組織への浸潤は主として腫瘍辺縁部に多く認められ、腫瘍中心部では T 細胞浸潤が目立って少ない。CD4, CD8 いずれのサブセットも同様の傾向を示した。マクロファージの浸潤はがん組織内全体的に認められるが、腫瘍辺縁部や壊死巣近傍で多く、後者への T 細胞浸潤はほとんどみられない。これに対して、各 ILC 細胞浸潤は T 細胞と類似の分布を呈するが浸潤数は T 細胞よりも少なかった。

コホート1 ,コホート2 いずれにおいても、CD4 T 細胞浸潤が多い症例は全生存、無再発生存が少ない症例に比して有意に長く、同様の結果は CD8 T 細胞でも認められた。逆に M2 マクロファージ浸潤の多い症例は、少ない症例に比して全生存、無再発生存のいずれも短かった。

コホート1 を用いた検討において、NK 細胞浸潤の多い症例は少ない症例に比して全生存・無再発生存のいずれも長いことがわかった。

同様に ILC1, ILC3 細胞浸潤が多しい症例は各少ない症例に比して予後が良好である一方、ILC2 細胞浸潤が多い症例は少ない症例に比して予後不良であることがわかった。

コホート2 を用いた解析を現在実施している。

ILC はヘルパーT 細胞や細胞障害性 T 細胞と類似の細胞形質を有するいくつかのサブセットを有し、各サブセットが異なる役割を担っていると考えられているが、獲得免疫において局所に動員される T 細胞とは異なり、組織定着型細胞として自然免疫に区別されている。effector memory 細胞に近いが、それよりもさらに広いターゲットに対して対応

可能な免疫応答細胞と考えられる。今回の解析により、各 ILC は NK 細胞を除いて、それぞれ対応するヘルパーT 細胞と組織分布が類似し、患者予後等の臨床病理学的意義も類似していることが推定された。このことは ILC が、がん免疫において T 細胞免疫と協調して働いている可能性や T 細胞免疫のプロトタイプの免疫反応を担う細胞であることを示唆している。一方、NK 細胞の分布は T 細胞分布とは異なる。近年の研究から NK 細胞は部分的に獲得免疫類似のメモリー機能を有することや樹状細胞等による制御のあることがわかってきているが、反応時の動員に関して更なる検討が必要である。今後、がん免疫における、ILC と T 細胞免疫との役割分担や互いの制御、関係性についてより理解を深めていくことで、より効果的な免疫療法の開発の促進と、なぜ進化の過程で互いに類似する2つの系統の細胞系列が残ってきているかの疑問に答えられる知見が見出されることが期待される。

#### 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21件)

Kawachi A, Yoshida H, Kitano S, Ino Y, Kato T, Hiraoka N. (2018) Tumor-associated CD204(+) M2 macrophages are unfavorable prognostic indicators in uterine cervical adenocarcinoma. *Cancer Sci.* **109**, 863-70.

Yoshida H, Shimada K, Hiraoka N. (2017) Infrequent mismatch repair protein loss in gallbladder cancer patients in Japan. *Virchows Arch* **470**, 109-12.

Cui L, Nakano K, Obchoei S, Setoguchi K, Matsumoto M, Yamamoto T, Obika S, Shimada K, Hiraoka N. (2017) Small nucleolar noncoding RNA SNORA23, upregulated in human pancreatic ductal adenocarcinoma, regulates expression of SYNE2 to promote growth and metastasis of xenograft tumors in mice. *Gastroenterology* **153**, 292-306.

Ebata T, Yunokawa M, Yoshida H, Bun S, Shimoi T, Shimomura A, et al. The Prognostic

Impact of the Pathological Response to Neoadjuvant Dose-Dense Therapy for Ovarian Carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2017;27(9):1850-5.

Hashimoto T, Yamashita S, Yoshida H, Taniguchi H, Ushijima T, Yamada T, et al. WNT Pathway Gene Mutations Are Associated With the Presence of Dysplasia in Colorectal Sessile Serrated Adenoma/Polyps. *The American journal of surgical pathology*. 2017;41(9):1188-97.

Kihara A, Yoshida H, Watanabe R, Takahashi K, Kato T, Ino Y, et al. Clinicopathologic Association and Prognostic Value of Microcystic, Elongated, and Fragmented (MELF) Pattern in Endometrial Endometrioid Carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 2017;41(7):896-905.

Yoshida H, Ikeda S, Tsukada T, Watanabe R, Hiraoka N, Kato T. Methods for Measuring and Staging a Uterine Cervical Adenocarcinoma Showing Intracystic Papillary Growth: A Case Report. *Int J Gynecol Pathol*. 2017.

Yoshida H, Shimazu T, Kiyuna T, Marugame A, Yamashita Y, Cosatto E, et al. Automated histological classification of whole-slide images of gastric biopsy specimens. *Gastric Cancer*. 2017.

Yoshida H, Yamashita Y, Shimazu T, Cosatto E, Kiyuna T, Taniguchi H, et al. Automated histological classification of whole slide images of colorectal biopsy specimens. *Oncotarget*. 2017;8(53):90719-29.

Yunokawa M, Yoshida H, Watanabe R, Noguchi E, Shimomura A, Shimoi T, et al. Allred

score is a promising predictor of prognosis and medroxyprogesterone acetate efficacy in patients with endometrial cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2017;80(1):127-34.

Yoshida H, Shimada K, Kosuge T, Hiraoka N. (2016) A significant subgroup of resectable gallbladder cancer patients has an HER2 positive status. *Virchows Arch* **468**, 431-9.

Hori S, Shimada K, Ino Y, Oguro S, Esaki M, Nara S, Kishi Y, Kosuge T, Hattori Y, Sukeda A, Kitagawa Y, Kanai Y, Hiraoka N. (2016) Macroscopic features predict outcome in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Virchows Arch* **469**, 621-34.

Hayashi K, Yoshida H, Sato Y, Tobiume M, Suzuki Y, Ariyoshi K, et al. Histopathologic findings of lung with A/H1N1pdm09 infection-associated ARDS in the post-pandemic season. *Japanese journal of infectious diseases*. 2016.

Mizutani R, Imamachi N, Suzuki Y, Yoshida H, Tochigi N, Oonishi T, et al. Oncofetal protein IGF2BP3 facilitates the activity of proto-oncogene protein eIF4E through the destabilization of EIF4E-BP2 mRNA. *Oncogene*. 2016;35(27):3495-502.

Sekine S, Yamashita S, Tanabe T, Hashimoto T, Yoshida H, Taniguchi H, et al. Frequent PTPRK-RSPO3 fusions and RNF43 mutations in colorectal traditional serrated adenoma. *The Journal of pathology*. 2016;239(2):133-8.

Tanabe Y, Ichikawa H, Kohno T, Yoshida H, Kubo T, Kato M, et al. Comprehensive screening

of target molecules by next-generation sequencing in patients with malignant solid tumors: guiding entry into phase I clinical trials. *Mol Cancer*. 2016;15(1):73.

Yoshida M, Ogawa R, Yoshida H, Maeshima A, Kanai Y, Kinoshita T, et al. TERT promoter mutations are frequent and show association with MED12 mutations in phyllodes tumors of the breast. *British journal of cancer*. 2015;113(8):1244-8.

Hiraoka N, Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Kanai Y, Kosuge T, Shimada K. (2015) Intratumoral tertiary lymphoid organ is a favorable prognosticator in patients with pancreatic cancer. *Br J Cancer* **112**, 1782-90.

Fukutake N, Ueno M, Hiraoka N, Shimada K, Shiraishi K, Saruki N, Ito T, Yamakado M, Ono N, Imaizumi A, Kikuchi S, Yamamoto H, Katayama K. (2015) A novel multivariate index for pancreatic cancer detection based on the plasma free amino acid profile. *PLoS One* **10**, e0132223.

Springer S, Wang Y, Molin MD, Masica DL, Jiao Y, Kinde I, Blackford A, Raman SP, Wolfgang CL, Tomita T, Niknafs N, Douville C, Ptak J, Dobbyn L, Allen PJ, Klimstra DS, Schattner MA, Schmidt CM, Yip-Schneider M, Cummings OW, Brand RE, Zeh HJ, Singhi AD, Scarpa A, Salvia R, Malleo G, Zamboni G, Falconi M, Jang JY, Kim SW, Kwon W, Hong SM, Song KB, Kim SC, Swan N, Murphy J, Geoghegan J, Brugge W, Fernandez-Del Castillo C, Mino-Kenudson M, Schulick R, Edil BH, Adsay V, Paulino J, van Hooft J, Yachida S, Nara S, Hiraoka N, Yamao K, Hijioka S, van der Merwe S, Goggins M, Canto MI, Ahuja N, Hirose K, Makary M, Weiss MJ, Cameron J, Pittman M, Eshleman JR, Diaz LA Jr, Papadopoulos N, Kinzler KW, Karchin R, Hruban RH, Vogelstein B, Lennon AM. (2015) A combination of molecular markers and clinical features improve

the classification of pancreatic cysts. *Gastroenterology* **149**, 1501-10.

㊦ Oguro S, Ino Y, Shimada K, Hatanaka Y, Matsuno Y, Esaki M, Nara S, Kishi Y, Kosuge T, Hiraoka N. (2015) Clinical significance of tumor-infiltrating immune cells focusing on BTLA and Cbl-b in patients with gallbladder cancer. *Cancer Sci* **106**, 1750-60.

〔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

吉田 裕 (Hiroshi Yoshida)  
国立がん研究センター中央病院病理科  
研究者番号：70750751

### (3) 連携研究者

平岡 伸介 (Nobuyoshi Hiraoka)  
国立がん研究センター中央病院病理科・研  
究所分子病理分野  
研究者番号：40276217