

令和元年6月6日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06956

研究課題名(和文) 婦人科癌患者に対する活性化制御性T細胞に注目した新規治療標的因子の探索

研究課題名(英文) New target for gynecologic cancers focusing on activated regulatory T cell

研究代表者

森本 晶子 (Morimoto, Akiko)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：60601193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌における腫瘍免疫学的プロファイリングでは、卵巣癌における腫瘍免疫は組織型との関連が示唆され、予後との相関を認めた。また、卵巣癌では他癌腫と異なり、PD-1/Tim3共発現T細胞においてIFN- $\gamma$ の産生能が維持されており、疲弊していない可能性が示唆された。卵巣癌においてFoxP3陽性Treg細胞はIL-10およびTGF- $\beta$ などの抑制性サイトカインを産生することにより、腫瘍免疫を抑制している可能性が示唆された。卵巣癌腫瘍内における腫瘍免疫を抑制する細胞としてMDSCが重要である可能性が考えられ、末梢血MDSCに比べ腫瘍内MDSCで発現が増加している分子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、卵巣癌における包括的な免疫学的プロファイリングを行った。新鮮卵巣腫瘍を用いた報告は過去になく、今回の結果は意義があると考えられる。また、卵巣癌においても重要とされていた抑制性免疫細胞に関わる特異的な分子を同定できたことは今後創薬の対象となる可能性も考えられ、今後発展させていきたい。

研究成果の概要(英文)：Tumor immunological profiling in ovarian cancer showed that pathology was the most and the only related factor in tumor immunology and related with prognosis. PD-1 and Tim3 coexpressing T cells maintain IFN- $\gamma$  production, which suggested that those cells were not completely exhausted.

FoxP3 positive Treg inhibited ovarian cancer tumor immune by producing inhibitory cytokines. Moreover MDSC was considered as key inhibitory molecule in ovarian cancer.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 卵巣癌 制御性T細胞

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

### 1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍免疫が注目を集めており、様々な治療薬が使用されるようになってきている。しかし、婦人科癌においては著効する症例が少ないのが現状である。卵巣癌においては、腫瘍免疫治療のターゲットの有望性が報告されているが、他癌腫ほど効果が認められていない。そこで今回、卵巣癌における包括的な腫瘍免疫の解析および活性化制御性 T 細胞 (Treg) に着目して腫瘍免疫における役割を検討することとした。

### 2. 研究の目的

#### (1) 卵巣癌における腫瘍内リンパ球のプロファイル解析

卵巣癌においては免疫細胞が卵巣癌腫瘍組織への浸潤が多いほど予後良好であることや、卵巣癌腫瘍組織の CD8 陽性 T 細胞数が多いほど生存期間が有意に延長することが報告されている。過去の報告では、凍結保存検体を使用し、CD8 陽性 T 細胞や一部の細胞表面分子を評価しているものが多いが、今回新鮮卵巣癌検体を用いて、flow cytometry により腫瘍内 T 細胞表面分子の発現を詳細に解析した。またその結果を T 細胞表面分子発現頻度に基づきクラスター解析した。

#### (2) 卵巣癌における PD-1/Tim3 共発現細胞の役割

他癌腫では PD-1/Tim3 共発現 CD8 陽性 T 細胞と疲弊についての報告がなされており、IFN- $\gamma$  産生能の低下や予後との関連が報告されている。卵巣癌における PD-1/Tim3 共発現細胞の役割については未だ報告がないため、今回検討することとした。

#### (3) 卵巣癌における腫瘍内 Treg の機能

卵巣癌においては腫瘍内浸潤制御性 T 細胞 (Treg) 細胞数が多いほど予後が悪いことが報告されているが、卵巣癌腫瘍内において Treg がどのように腫瘍免疫を抑制しているかまでは、未だ明らかになっていない。そこで、卵巣癌腫瘍内 Treg 機能について評価した。

#### (4) 卵巣癌における腫瘍内抑制性細胞の同定

腫瘍内には Treg 以外にも抑制性細胞が多数存在しており、それらの細胞が腫瘍免疫の働きを抑制していることが知られている。しかしながら、卵巣癌においていずれの細胞が抑制性細胞として重要なのかは明らかになっていない。そこで、卵巣癌における抑制性細胞を見出し、この細胞に特異的に発現する分子の探索を実施することとした。

#### (5) 卵巣癌における腫瘍内 MDSC 発現分子の探索

卵巣癌以外の癌種においては、腫瘍内 MDSC が腫瘍免疫の抑制に重要な役割を担っていることを示唆する報告がなされている。しかしながら、いずれの報告においても MDSC を規定するマーカーは統一されておらず、メカニズムにおいても arginase や PDL1 の関与など種々の報告があるものの一定の見解は得られていない。そこで、既報のメカニズムが卵巣癌でも起こっているかを確認するとともに、腫瘍内 MDSC 特異的発現分子の探索を行い、新たな腫瘍免疫抑制のメカニズム解明の一端とすることとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 卵巣癌における腫瘍内リンパ球のプロファイル解析

新鮮卵巣癌腫瘍をはさみでミンスし、human tumor dissociation kit を用いて分散し、単細胞を得た。Flow cytometer にて T 細胞における腫瘍免疫分子の発現を解析し、それらをクラスター解析し、臨床項目との相関を考察した。

#### (2) 卵巣癌における PD-1/Tim3 共発現細胞の役割

新鮮卵巣癌腫瘍をはさみでミンスし、human tumor dissociation kit を用いて分散し、単細胞を得た。Flow cytometer にて CD8 陽性細胞における PD-1 および Tim3 の発現を解析し、発現パターンによって分画化した。それぞれの分画化された細胞を Flow cytometer にて sorting し、細胞障害活性および PMA/ionomycin 刺激による IFN- $\gamma$  産生能を評価した。

#### (3) 卵巣癌における腫瘍内 Treg 細胞の役割

新鮮卵巣癌腫瘍をはさみでミンスし、human tumor dissociation kit を用いて分散し、単細胞を得た。腫瘍内細胞中の FoxP3 陽性細胞における CD39、TIGIT、CTLA4 などの抑制性マーカーの発現を flow cytometer にて測定した。また、PMA/ionomycin で刺激したのちに IL-10 および TGF- $\beta$  産生能を測定した。

#### (4) 卵巣癌における腫瘍内抑制性細胞の同定

新鮮卵巣癌腫瘍をはさみでミンスし、human tumor dissociation kit を用いて分散し、単細胞を得た。この腫瘍内全細胞から各種抑制性細胞を除去し、一晚培養した。その後、PMA/ionomycin 刺激による IFN- $\gamma$  産生能を flow cytometer にて測定した。

(5) 卵巣癌における腫瘍内 MDSC 発現分子の探索

新鮮卵巣癌腫瘍をはさみでミンスし、human tumor dissociation kit を用いて分散し、単細胞を得た。腫瘍内 MDSC における arginase および PDL1 の発現を flow cytometry にて確認し、末梢血中 MDSC における発現と比較した。また PE 標識 361 抗体のパネルである LEGENDScreen human PE kit を用いて、腫瘍内 MDSC における 361 分子の発現を確認した。さらに同一卵巣患者患者から採血し得た末梢血についても LEGENDScreen human PE kit にて染色し、末梢血中 MDSC における 361 分子の発現を確認した。

4 . 研究成果

(1)卵巣癌における腫瘍内リンパ球のプロファイル解析

卵巣癌 100 例をクラスター解析し、T 細胞表面分子の発現が高い Hot 群と発現が低い Cold 群の 2 群に分類した。( 図 1 )

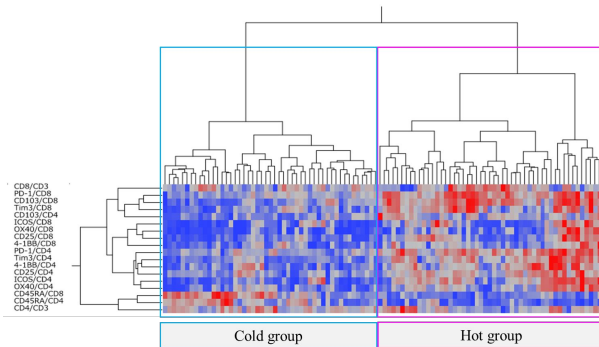


図 1 卵巣癌における T 細胞中の腫瘍免疫細胞の発現に基づくクラスター解析

Hot 群で漿液性腺癌の割合が有意に高く ( $p < 0.001$ )、再発率も有意に高かった ( $p=0.02$ )。手術完遂度や進行度との相関は認めなかった。多変量解析では、組織型 (漿液性腺癌) のみで有意差を認め ( $p < 0.01$ )、免疫学的特徴は組織型に規定されていることが判明した。また、Hot 群は Cold 群に比して有意に無再発期間が短く、予後との相関を認めた。

(2)卵巣癌における PD-1/Tim3 共発現細胞の役割

卵巣癌腫瘍中の CD8 陽性細胞では、PD-1/Tim3 の発現が増加するに従い、細胞障害活性が低下していた。しかし、IFN- $\gamma$  産生においては、PD-1/Tim3 共発現分画においても産生能が維持されており、他癌腫では共発現分画において産生能が低下するのと異なる傾向を示した。IFN- $\gamma$  産生能を詳細に検討すると、PD-1/Tim3 発現の増加と共に低下する群と増加する群に分かれていた。( 図 2 )

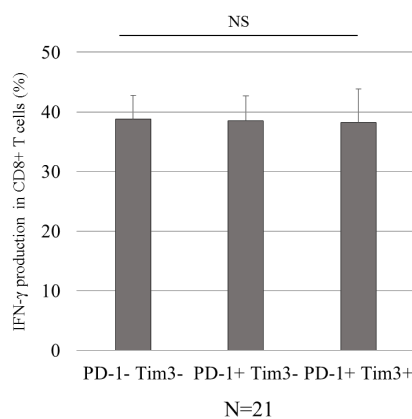


図 2 卵巣癌における CD8 陽性 T 細胞中の IFN- $\gamma$  産生

(3)卵巣癌における腫瘍内 Treg 細胞の役割

卵巣癌腫瘍中 CD39、TIGIT、CTLA4 の発現を測定した結果、FoxP3 陰性細胞と比較して FoxP3 陽性細胞では発現が有意に高かった。また、PMA/ionomycin にて 4 時間刺激したのちに IL-10 および TGF- $\beta$  産生能を確認したところ、FoxP3 陽性細胞において有意に高かった。したがって、卵巣癌において FoxP3 陽性 Treg 細胞は IL-10 および TGF- $\beta$  などの抑制性サイトカインを産生することにより、腫瘍免疫を抑制している可能性が示唆できた。( 図 3 )

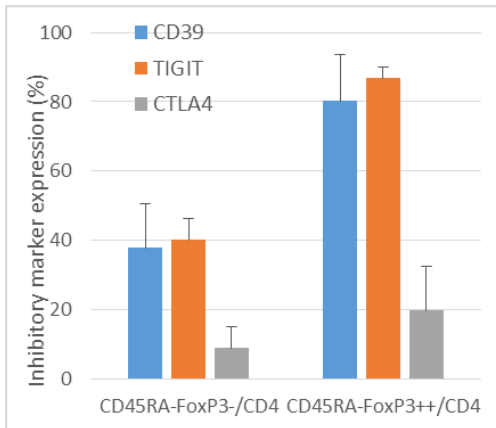
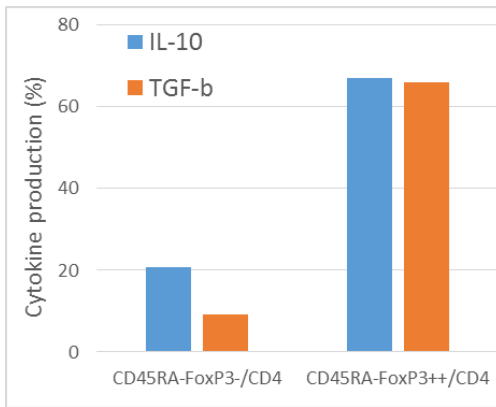


図3 Foxp3 発現による抑制性サイトカインの産生および抑制性細胞の発現

#### (4) 卵巣癌における腫瘍内抑制性鍵細胞の同定

卵巣癌腫瘍内の全細胞から Treg、TAM、MDSC をそれぞれ除去し、一晚培養後に PMA/ionomycin 刺激による IFN-g 産生を評価したところ、Treg あるいは TAM を除去した際には IFN-g 産生能に変化が認められなかったが、MDSC を除去したところ IFN-g 産生能の有意な増大が認められた (図4)。

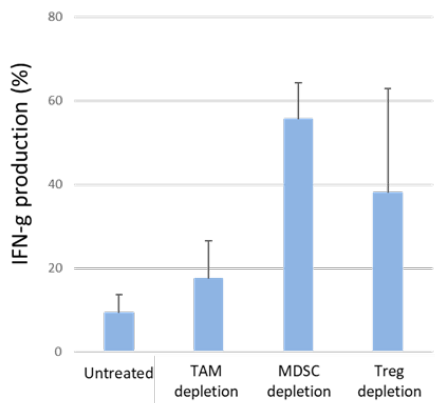


図4 腫瘍内抑制性細胞除去による IFN- 産生

一方で、末梢血中細胞から MDSC を除去しても IFN-g 産生能の増強は認められなかったことから、末梢血中 MDSC には抑制作用がないことが明らかとなった。したがって、卵巣癌腫瘍内における腫瘍免疫を抑制する細胞として MDSC が重要である可能性が示唆できた。

#### (5) 腫瘍内 MDSC 特異的発現分子の探索

卵巣癌腫瘍内 MDSC における arginase および PDL1 の発現は、同一患者の末梢血中 MDSC における発現と差は認められなかった。さらに LEGENDScreen human PE kit を用いて、卵巣癌腫瘍内 MDSC および卵巣癌患者末梢血中 MDSC における 361 分子の発現を確認し、腫瘍内と末梢血中に発現差がある分子を探索した。その結果、末梢血中 MDSC と比較して腫瘍内 MDSC で発現が上がった分子として、TRAIL-R3、siglec-9、CXCR4、LOX-1、CD120b の 5 分子があった。また、末梢血中 MDSC と比較して腫瘍内 MDSC で発現が下がった分子としては、CD151、CD194、DNAM-1、CD165、CD41、CD42b、CD9、CD29、CD61、CD49b、CD62L、P-selectin、CD99、LAP、CD102、CD84、D323、CD36、HLA-A,B,C、CD92、CD49f の 21 分子があった。今後、これらの分子の発現を 1 分子ずつ確認するとともに、腫瘍内 MDSC を減らして腫瘍免疫を復活させるための創薬ターゲットになり

うるか否かを検証していく予定である。

<引用文献>

Hamanishi J et al. Clin Immunol. 2011; 141(3):338-47  
Sato E et al. Proc Natl Acad Sci. 2005; 102(51):18538-43  
Granier C et al. Cancer Res. 2017; 77(5):1075-82

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計1件)

岡澤 晶子 他、Immunological difference between ovarian and endometrial endometrioid adenocarcinoma、第69回日本産科婦人科学会学術集会 2017年4月

[図書](計3件)

岡澤 晶子 他、日本臨牀、日本臨牀社、2018年、409  
岡澤 晶子 他、がん免疫療法、メディカルレビュー社、2017年、108  
岡澤 晶子 他、遺伝子医学MOOK、メディカルドゥ社、2017年、117

[その他]

ホームページ等

<http://www.climm.med.osaka-u.ac.jp/index.html>

6 . 研究組織

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。