

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09555

研究課題名(和文) 肺癌での免疫細胞機能障害に關するマイクロRNAの次世代シーケンサーによる探索

研究課題名(英文) Elucidation of microRNAs causing immune cell dysfunction by next generation sequencer in patients with lung cancer

研究代表者

青木 琢也 (AOKI, Takuya)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：70255438

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)：肺癌の増悪・転移・治療効果と関連した免疫系細胞をフローサイトメーターで解析し、さらに血清エクソソーム中のmicroRNA(miRNA)を次世代シーケンサーで測定し、その標的遺伝子を bioinformatics的手法により決定し、免疫障害を遺伝子レベルから解明することを目的とした。肺癌進行例では制御性T細胞の増加と細胞傷害性T細胞の減少を認めた。細胞表面マーカーでは肺癌の進行によりPD-1、PD-L1とCTLA-4の発現増加を認めた。以上より、肺癌進行時に免疫障害が明らかとなった。その際のmiRNAの解析により1000以上の発現解析を行い、重要と考えられるいくつかのmiRNAが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体は、もともと癌を攻撃する能力を有していますが、免疫系の障害により、癌を有効に排除できない状態となっています。リンパ球は癌攻撃の中心的な役割を果たします。今回、私達は、肺癌患者さんと健康な方から採血を行い、そのリンパ球を含む免疫系細胞を解析し、また、マイクロRNAと呼ばれる小分子を調べました。その結果、病状が進行する症例では、制御性Tリンパ球の増加と細胞傷害性Tリンパ球の減少を認めました。さらに、これらの障害にいくつかのマイクロRNAが関与することが示唆されました。これらの結果は、免疫細胞の異常が肺癌の進行に關与することを示唆し、いくつかのマイクロRNAが治療の標的になる可能性があります。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate dysfunction of immune cells and related microRNA(miRNA) by using a flow cytometer(FACS) and a next generation sequencer, respectively. Furthermore, target genes of miRNAs were determined by bioinformatical analyses. Patients with deterioration of lung cancer had increased rate of regulatory T cells and decreased rate of cytotoxic T lymphocytes. Moreover, cell surface marker analyses with FACS revealed increased expression of PD-1, PD-L1, and CTLA-4 on T cells with CD8+. These results suggest that immunological dysfunction contributes to progression in lung cancer. There were over 1,000 miRNAs observed during this process. Several miRNAs are suggested to play key roles in this lung cancer deterioration.

研究分野：腫瘍学

キーワード：肺癌 免疫異常 リンパ球 マイクロRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性腫瘍において、免疫機構による防御反応は不可欠と考えられている (Schreiber RD, et al. Science 2011; 331: 1565-70)。

腫瘍免疫において骨髄系とリンパ系の細胞のバランスが重要であり、骨髄系の細胞 (単球、マクロファージ、好中球および樹状細胞) がリンパ系の細胞 (T 細胞、B 細胞) を活性化し、腫瘍を破壊すると考えられている。

しかしながら、癌患者においては、骨髄系細胞およびリンパ系細胞の機能不全が起こり、腫瘍を有効に破壊することができない。

(2) 生体における腫瘍に対する免疫寛容において、T リンパ球に含まれる制御性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) は極めて重要と考えられている。

Treg は抗腫瘍免疫の抑制に関与すると考えられ (Pardoll DM. Nat Rev Cancer. 2012; 12: 252-264)、その機能は、マスター転写因子である forkhead transcription factor FOXP3 によって制御されている (Hori S, et al. Science 2003; 299: 1057-1061)。

一般に FOXP3 の発現は、Treg に特異的である。FOXP3 は、他の転写因子を制御して免疫抑制性の様々な因子の産生に関わる。

免疫チェックポイント阻害薬の標的分子の一つである CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) の発現上昇やエフェクターサイトカインの産生抑制は、FOXP3 の転写活性の上昇による。

(3) 腫瘍免疫に対する障害を惹起するうえで、腫瘍関連因子 (tumor-derived factors: TDF) が重要な役割を果たす。

近年、大規模なゲノム解析が可能となり、タンパク質へ翻訳されない 20 塩基から数千塩基となる non-coding RNA (ncRNA) の多彩な機能が報告され、腫瘍における癌化、増殖、不死化、浸潤、転移、血管新生に関与する ncRNA が報告されつつある (Gutschner T, et al. RNA Biol. 2012; 9: 703-719)。

転写因子活性を調節する ncRNA も報告されている (Hung T, et al. Nat Genet. 2011; 43: 621-629)。

ncRNA の一つであるマイクロ RNA (microRNA: miRNA) は、特定の他の遺伝子のメッセンジャー RNA に対する相補的な配列を有し、その遺伝子の発現を抑制する。エクソソームと呼ばれる細胞外小胞内で安定に存在し、血流により離れた細胞への情報の伝達が可能である。

2. 研究の目的

(1) 腫瘍免疫の重要性を臨床的に確認する。

病期 III 期および IV 期における根治症例の特徴を検討し、肺癌における腫瘍免疫を検討する。

(2) 増悪・転移・治療効果といった病状と関連した免疫系細胞をフローサイトメーター (FACS) で解析する。

(3) 肺癌症例の miRNA を次世代シーケンサーで測定し、病状および免疫系細胞障害との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 2004 年 3 月から 2011 年 4 月までに肺癌と診断された症例を retrospective に検討し、根治症例の特徴を明らかにすることで、腫瘍免疫の重要性を示す。

臨床研究委員会での申請受理後に検討する。

根治症例の特徴と病理所見を明らかにする。

(2) 肺癌患者から採血を行い、リンパ球を FACS で、miRNA を次世代シーケンサーで解析する。

患者の選択；細胞診あるいは組織診により非小細胞肺癌あるいは小細胞肺癌と診断が確定され、病期が決定された患者および健康人を対象とする。I 期から IV 期まで、すべての病期を対象とする。通常の保険診療において行われる検査により病期を決める。

同意の取得；臨床研究委員会における承認後、本研究の開始に先立ち、被験者に対して、説明文書を用いて十分に説明し、被験者になることの本人の自由意志に基づいた同意を文書で得る。

患者の評価；患者の年齢、体重、身長、喫煙歴、喫煙量、喫煙期間および臨床経過、合併症を含む既往歴、身体所見、検査データを評価する。

採血；インフォームドコンセントを得た後、血液を採取する。血液を EDTA2Na 採血管に採取する。2 か月ごとに血液 8ml を通常の採血に合わせて余分に採血する。4 時間以内に血漿および白血球に分離する。血漿を RNA 抽出用に用い、白血球を FACS による解析に用いる。

FACS による Treg と機能不全骨髄系細胞の解析；サンプル調整と染色方法は、Dako 社の Flow Cytometry Stainig Protocol による。

血漿からのエクソソームの抽出；超遠心法によりエクソソームを抽出する(Schageman J, et al. Biomed Res Int. 2013; 2013: 253957 Epub, Li M., et al. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2014; 369: 1652 Epub)。

血漿エクソソームからの RNA の抽出；分離されたエクソソーム検体から TRIzol® RNA isolation reagents により、RNA を抽出する。

トータル RNA から、miRNA の cDNA を逆転写して library を調整する。

次世代シーケンサーによる解析；Adaptor-Ligation、Reverse-Transcribe および Amplify し、cDNA の精製および Validation を行い、次世代シーケンサーで解析する。

解析；miRNA の標的遺伝子のゲノム上のマッピングを行い、臨床情報から、増悪・転移・改善と関連する遺伝子を明らかにする。遺伝子情報とその解析はバイオインフォマティクスによる手法を用いる。

4 . 研究成果

(1) 肺癌における腫瘍免疫の重要性を明らかにするために、病期 III 期および IV 期における根治症例の特徴を検討した(臨床研究 14R-054)。転移を認める IV 期においても根治症例では腫瘍内に炎症性細胞の著しい浸潤を認め、腫瘍免疫が肺癌と密接に関わることを、以下の論文で報告した。

Analysis of key clinical features for achieving complete remission in stage III and IV non-small cell lung cancer patients.

Aoki et al. Respiratory Research (2019) 20:263 <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1235-3>

(2) 研究課題「肺癌における免疫系の機能障害の解明」(臨床研究 17R-147)を前向きに行った。83 症例 230 point における臨床情報と採血検体を取得し、以下の測定を行った。

FACS を用い、リンパ球 (T cell、B cell、NK cell)の解析および T cell の極性 (Th1, Th2, Treg, Cytotoxic T cell (Tcyt)、Helper T cell)を解析した。病状が悪化する症例では、Treg の増加および Tcyt の減少を認めた。一方、病状に変化のない症例では、Treg と Tcyt の割合は、経過とともに変化しなかった。

細胞表面マーカーとして、免疫抑制に関与する PD-1、PD-L1 と CTLA-4 の発現を調べた。病状の悪化する症例で、Tcyt 表面上の PD-L1 と CTLA-4 の発現上昇を認めた。

(3) miRNA を次世代シーケンサーで解析し、1881 種類の miRNA に関する発現解析を行った。

(4) 現在、病状と FACS の結果を miRNA の発現プロファイルと対比させながら、遺伝子レベルでの免疫障害を検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aoki T, Akiba T, Nishiyama J, Tajiri S, Hayama N, Takahashi G, Tanaka J, Sato M, Takiguchi H, Tomomatsu H, Tomomatsu K, Takihara T, Niimi K, Oguma T, Kohno M, Masuda R, Urano T, Itoh H, Kajiwara H, Nakamura N, Kunieda E, Matsumae M, Iwazaki M, Asano K	4. 巻 20 (1)
2. 論文標題 Analysis of key clinical features for achieving complete remission in stage III and IV non-small cell lung cancer patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respir Res	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1186/s12931-019-1235-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高木 敦司 (TAKAGI Atsushi) (30256101)	東海大学・医学部・教授 (32644)	
研究分担者	秦野 伸二 (HADANO Shinji) (60281375)	東海大学・医学部・教授 (32644)	