

令和元年6月11日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10498

研究課題名(和文) 消化器癌における制御性B細胞の解析とその制御による新たな癌免疫治療の開発

研究課題名(英文) An investigation regarding regulatory B cells in gastrointestinal cancer.

研究代表者

齊藤 博昭 (SAITO, Hiroaki)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：20335532

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)：胃癌患者の末梢血中の制御性B細胞の頻度は健常成人と比較して有意に高率であった。また胃癌患者の末梢血の制御性B細胞の頻度は根治術後に有意に低下した。胃癌組織中に存在する制御性B細胞の頻度は非癌部や末梢血と比較して有意に高率であった。同様の結果を食道癌および大腸癌でも確認した。また、胃癌患者から分離した制御性B細胞はCD4Tリンパ球の細胞増殖能およびのIFN γ 産生能を抑制した。さらに胃癌組織中の制御性B細胞数が多い患者の予後は少ない患者の予後と比較して有意に不良であった。さらに多変量解析にて胃癌組織中の制御性B細胞数は独立した予後予測因子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により消化器癌患者の腫瘍局所には細胞性免疫抑制機能を有する制御性B細胞が多く存在し、予後を悪化させることが明らかとなった。このことは制御性B細胞が消化器癌に対する新たな免疫治療を開発する重要なターゲットになることを示す結果である。今後の検討により制御性B細胞をターゲットとした治療法が開発されれば、消化器癌患者の予後向上につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The frequency of peripheral regulatory B cells (Bregs) was significantly higher in gastric cancer (GC) patients than in healthy controls. The frequency of Bregs in GC tissue was significantly higher than in peripheral blood and healthy gastric tissue. We also confirmed that the same phenomenon could be observed in esophageal and colorectal cancer. With regard to the function of Bregs obtained from GC patients, carboxyfluorescein succinimidyl ester labeling revealed that Bregs could suppress the proliferation of autologous CD4 $^{+}$ T cells. Moreover, Bregs inhibited the production of interferon-gamma by CD4 $^{+}$ T cells. Double staining immunohistochemistry of interleukin-10 and CD19 revealed 5-year overall survival rates of patients with BregHigh (13.3%) was significantly lower than that of patients with BregLow (65.4%, $P < 0.0001$). Multivariate analysis indicated that the frequency of Bregs was an independent prognostic indicator in GC patients.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：制御性B細胞 腫瘍免疫 細胞性免疫 胃癌 大腸癌 免疫逃避機構

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

1. 研究開始当初の背景

癌患者の予後は、近年の診断技術の向上による早期発見率の上昇、外科的治療技術の進歩や新規抗癌剤および分子標的治療薬の開発などにより改善しているが、一方で依然として多くの再発例や切除不能例を経験する。なかでも消化器癌患者は非常に多く、その予後改善のためには新しい治療方法の開発が必要不可欠である。近年、免疫チェックポイント阻害薬が開発され、多くの癌腫において極めて良好な治療成績が臨床試験で報告されており、癌免疫治療に大きな注目が集まっている。一方で免疫チェックポイント分子阻害薬も効果を示さない症例が依然として多く存在することも明らかになってきている。その一つの大きな原因として腫瘍局所の免疫抑制環境が考えられる。様々な要因によって腫瘍局所の免疫抑制は形成されているが、その一つの大きな要因として免疫抑制細胞の存在が報告されている。これまでに制御性 T 細胞や骨髄由来免疫抑制細胞などが癌による免疫抑制に関与することが様々な癌腫で報告されている。最近の報告では液性免疫を構成する主要細胞である B リンパ球のなかに免疫抑制機能をもつ細胞が存在することが報告されており、制御性 B 細胞と呼ばれている。本細胞はこれまでに炎症性腸疾患や関節リウマチにおいて重要な役割を有していることが報告されている。一方で癌における制御性 B 細胞の状態や役割に関してはこれまでに皮膚がんの発現過程にこの細胞が関与することが報告されている。また、マウスモデルを用いて制御性 B 細胞が癌の進展に関与することも報告されているが、これまでに検討は極めて少なく、特に消化器癌においては本細胞の状態や癌進展への関与などに関してはこれまでのところ全く不明である。そこで今回われわれは胃癌、食道癌、大腸癌、膵癌などの消化器癌を対象として制御性 B リンパ球の検討を行うことを計画した。

2. 研究の目的

免疫チェックポイント阻害薬がさまざまな癌種において極めて有効であることが報告されており、癌免疫治療に大きな注目が集まっている。一方で担癌状態の免疫抑制状態の詳細については不明な点が多く、これらの詳細な理解が、今後のさらなる免疫治療の発展には必要不可欠である。今回の研究では免疫抑制機能を有する制御性 B 細胞の詳細を消化器癌患者で解析し、癌患者で認められる免疫抑制状態のメカニズムの一端を解明することを目的とする。さらに、その制御によるあらたな免疫治療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

- (1) 胃癌、大腸癌、食道癌患者の末梢血を対象として制御性 B 細胞の頻度をフローサイトメータで検討した。制御性 B 細胞はインターロイキン 10 を産生する CD19 陽性細胞とした。また、非癌部および癌部においても制御性 B 細胞の頻度をフローサイトメータで確認した。
- (2) セルソーターを用いて CD19⁺CD24^{Hi}CD27⁺細胞を分離した。分離した細胞を CD4T リンパ球と混合培養し、細胞増殖能の抑制効果を CSFE 染色で、IFN 産生能を ELISA 法にて検討した。
- (3) 切除標本のパラフィン包埋切片を用いて CD19 とインターロイキン 10 の 2 重免疫組織染色を行い、制御性 B 細胞の頻度と予後との関連を検討した。

4. 研究成果

- (1) 胃癌患者の末梢血中の制御性 B 細胞の頻度は健常成人と比較して有意に高率であった (図 1)。また胃癌患者の末梢血中の制御性 B 細胞の頻度は根治術後に有意に低下した (図 2)。同様の結果を食道癌および大腸癌でも確認した。これらの結果は消化器癌に関わる何らかの因子が制御性 B 細胞の増加に影響していることを示す結果である。

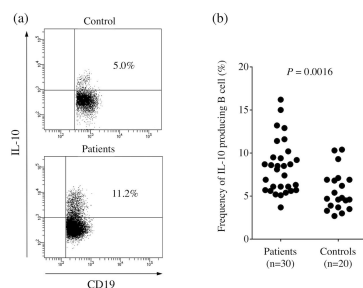


図1. 胃癌患者と健常成人における末梢血中の制御性B細胞頻度の比較

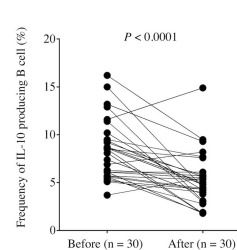


図2. 胃癌患者の術前・後の末梢血中の制御性B細胞頻度の比較

- (2) 従来の検討では制御性 B 細胞は CD19⁺CD24^{Hi}CD27⁺分画に多く含まれることが報告

されている。実際今回の消化器癌患者を対象とした検討でも上記分画に制御性 B 細胞が有意に多く含まれていること、 $CD19^+CD24^{Hi}CD27^+$ 細胞の頻度は制御性 B 細胞の頻度と有意な正の相関関係が認められることを確認した。

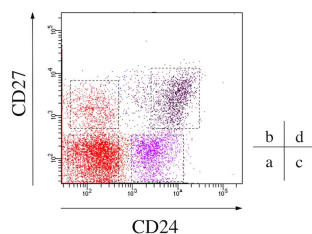


図3a. 胃癌患者の末梢血中の制御性B細胞頻度のCD24およびCD27発現

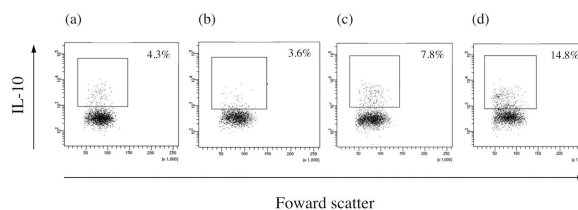


図3b. CD24およびCD27発現と制御性B細胞頻度

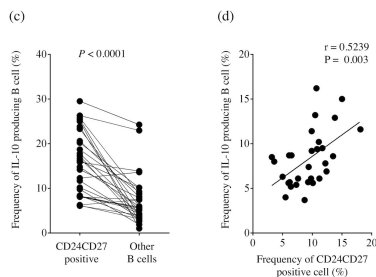


図3c, 3d. CD24およびCD27発現と制御性B細胞頻度の関連

- (3) 胃癌組織中に存在する制御性B細胞の頻度は非癌部や末梢血と比較して有意に高率であった。

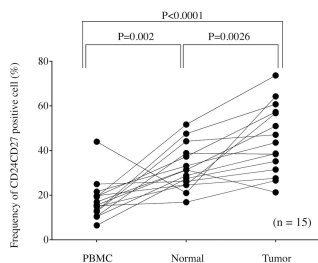


図4. 癌部、非癌部、末梢血中の制御性B細胞頻度

- (4) セルソーターを用いて $CD19^+CD24^{Hi}CD27^+$ 細胞とそれ以外の B 細胞とに分離した。分離した細胞を CD4T リンパ球と混合培養し、細胞増殖能の抑制効果を CFSE 染色で検討したところ $CD19^+CD24^{Hi}CD27^+$ 細胞は CD4T リンパ球の細胞増殖能を抑制した。さらに CD4T リンパ球の IFN 産生能を ELISA 法にて検討した結果、同様に $CD19^+CD24^{Hi}CD27^+$ 細胞は CD4T リンパ球の IFN 産生を有意に抑制した。

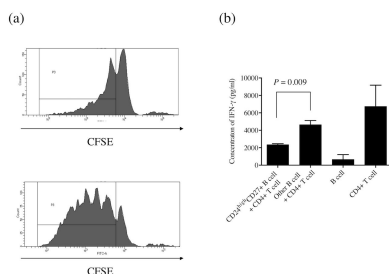


図5. 制御性B細胞のTリンパ球機能抑制効果

- (5) 切除標本のパラフィン包埋切片を用いて CD19 とインターロイキン 10 の 2 重免疫組織染色を行い、胃癌組織中の制御性 B 細胞を同定した。その頻度と予後との関連を検討したところ、胃癌組織中の制御性 B 細胞数が多い患者の予後は少ない患者の予後と比較して有意に不良であった。さらに多変量解析にて胃癌組織中の制御性 B 細胞数は独立した予後予測因子であった。

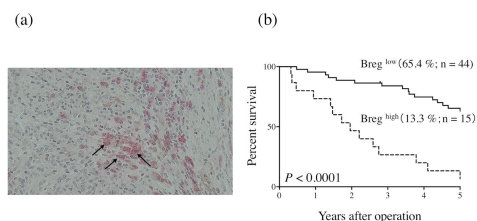


図6. 胃癌組織中の制御性B細胞と予後との関係

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

齊藤博昭、村上裕樹、清水翔太、河野友輔、宍戸裕二、宮谷幸造、松永知之、福本陽二、蘆田啓吾、藤原義之、胃癌患者における制御性Bリンパ球の検討、第119回日本外科学会定期学術集会、2019年

齊藤博昭、村上裕樹、清水翔太、河野友輔、宍戸裕二、宮谷幸造、松永知之、福本陽二、蘆田啓吾、藤原義之、胃癌患者における制御性Bリンパ球の検討、第31回日本バイオセラピー学会学術集会総会、2018年

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。