

令和元年6月5日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10508

研究課題名(和文) 免疫チェックポイント分子の機能解析とその制御を標的とした新しい治療法の開発

研究課題名(英文) Functional analysis of immune checkpoint molecules and the new therapeutic development by targeting their regulation

研究代表者

有上 貴明(Arigami, Takaaki)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：40527058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではT細胞性免疫応答を調節する免疫チェックポイント分子PD-L1とHHLA2に着目し、これらの発現の臨床的意義について検討を行った。胃癌症例の治療前末梢血液を用いてPD-L1とHHLA2のmRNA発現をRT-PCR法により評価した。PD-L1発現は深達度や遠隔転移、進行度と正の相関を示し、高発現群の予後は明らかに予後不良であった。一方、HHLA2発現は深達度や遠隔転移、進行度と逆相関しており、低発現群の予後は明らかに予後不良であった。今回の研究でPD-L1とHHLA2は、それぞれT細胞性免疫応答に対して促進的と抑制的に働いている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌免疫療法の標的となっている免疫チェックポイント分子は未だに限定的であるが、新規免疫チェックポイント分子のHHLA2は、T細胞性免疫応答に対して促進的に作用することが判明したため免疫療法の新たな標的分子として期待される。さらに簡便に採取可能な血液検体を用いて免疫チェックポイント分子の発現を解析することで悪性度や予後予測を行うことが可能となり、治療方針を決定する上で重要な手助けとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study assessed the clinical significance of PD-L1 and HHLA2 mRNA expressions in blood specimens obtained from patients with gastric cancer. PD-L1 and HHLA2 mRNA expressions were evaluated by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. PD-L1 expression correlated positively with depth of tumor invasion, distant metastasis, and stage. Patients with high PD-L1 expression displayed significantly poorer prognosis. On the other hand, HHLA2 expression was inversely correlated with depth of tumor invasion, distant metastasis, and stage. Patients with low HHLA2 expression showed significantly poorer prognosis. Consequently, this study suggests that PD-L1 and HHLA2 have inhibitory and facilitatory signals for T cell-mediated immune response, respectively.

研究分野：癌免疫療法

キーワード：免疫チェックポイント阻害剤 免疫逃避機構 T細胞性免疫応答 B7 ligand family 바이오マーカー
免疫チェックポイント分子 免疫療法

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

1. 研究開始当初の背景

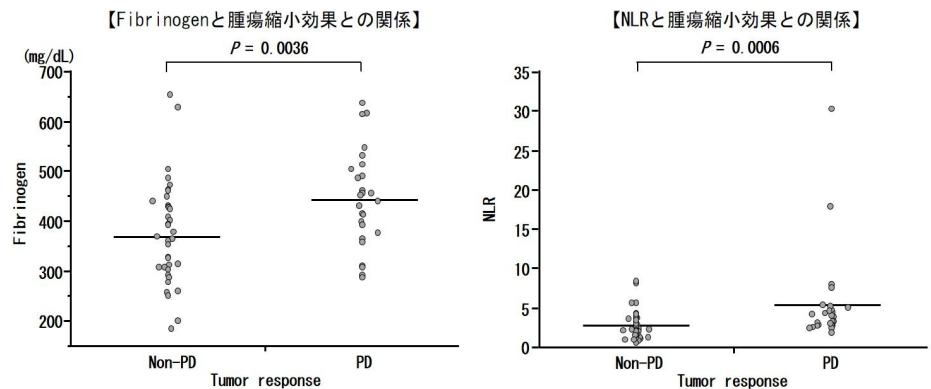
免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1/PD-L1 (B7-H1) 抗体や抗 CTLA-4 抗体は 2011 年に米国食品医薬品局 (FDA) によって承認され、臨床試験でも著明な腫瘍縮小率が報告されている。これらの免疫チェックポイント阻害剤は、腫瘍細胞や抗原提示細胞上の B7 ligand family とそのレセプターである T 細胞表面上の CD28 family の結合を阻害する薬剤であり、抑制された宿主の T 細胞性免疫応答をブロックすることでがんに対する免疫寛容を解除する (免疫逃避機構の制御)。

申請者は、B7 ligand family に属する新規免疫チェックポイント分子 B7-H3 と B7-H4 に注目し、これらの発現の臨床的意義について 4 編のオリジナル論文を発表してきた。米国留学中の 2010 年には世界で初めて乳がん細胞における B7-H3 発現を免疫染色や RT-PCR を用いて確認し、リンパ行性転移を促進する重要な免疫チェックポイント分子であることを報告した (Arigami, et al. Ann Surg 2010)。さらにこれまでほとんど研究されていない消化器がんでも同様に解析を進め、胃がん患者の末梢血液や組織で B7-H3 や B7-H4 の発現を確認し、腫瘍悪性度や予後を予測する新規マーカーとしての臨床的意義について発表した (Arigami, et al. Cancer Sci 2011. Arigami, et al. J Surg Oncol 2010)。これらの研究成果は、B7-H3 と B7-H4 が消化器がんにおける免疫チェックポイント阻害剤の新規治療標的となる可能性を示唆している。一方、免疫チェックポイント分子の機能的な役割や作用についても申請者は予備的検討を行い、胃がん原発巣の B7-H4 発現と腫瘍浸潤 T リンパ球数とは逆相関の関係にあり、宿主の T 細胞性免疫応答を抑制しているという研究結果を発表した (Arigami, et al. World J Surg 2011)。しかしながら、消化器がんにおける免疫チェックポイント分子を介した腫瘍細胞の免疫逃避機構の詳細な機序については一定の見解が得られておらず、近年同定された B7-H5 や B7-H6、B7-H7 については、その機能的な役割についても不明な点が多い。さらに免疫チェックポイント阻害剤の治療効果予測のためのバイオマーカーに関する研究はこれまでほとんど行われていないのが現状である。

本研究計画では免疫チェックポイント分子の未だ解明されていない T 細胞性免疫応答への影響について基礎的研究を行うと同時に患者の免疫状態を評価する新たな血液バイオマーカーを幅広く探索し、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果予測としての有用性について検討を行うことで消化器がんに対する新規がん免疫療法の治療戦略への足がかりをつかみたい。

計画を進めていく上で、申請者は予備的解析を行い、免疫状態を評価する指標

としての血清 Fibrinogen と Neutrophil-Lymphocyte Ratio (NLR) は、胃がんの化学療法や化学放射線療法に対する腫瘍縮小効果 (Tumor response) を予測する上で有用なマーカーであるという研究結果を得ており (前頁の図)、これらの簡便な血液バイオマーカーが免疫チェックポイント阻害剤の治療効果予測としても利用できる可能性がある。



2. 研究の目的

近年、**免疫チェックポイント分子を標的とした新たながん免疫療法**が注目されており、実際の臨床試験でも著明な腫瘍縮小効果や生存期間の延長が報告されている。申請者はこれまで免疫チェックポイント分子である B7 ligand family に着目し、**宿主の T 細胞性免疫応答を緻密に調節**していることを見出ししてきた。本研究は消化器がんにおける免疫チェックポイント分子を介した免疫逃避機構の詳細な機序を分子生物学的に解明すると同時に免疫チェックポイント阻害剤の治療効果予測のためのバイオマーカーを探索することを目的とする。本研究によって患者の免疫状態に合わせた効率的な個別化がん免疫療法が可能となり、バイオマーカーを用いたスクリーニングをすることで無駄な医療費の削減も期待される。

3. 研究の方法

【平成28年度】

(1) 消化器がんの臨床検体を用いた局所での免疫チェックポイント分子発現と T 細胞性免疫応答に関わる因子との関係

腫瘍内での免疫チェックポイント分子 B7 ligand family 発現の T 細胞性免疫応答に対する影響を明らかにする目的で消化器がんの切除臨床検体を用いて免疫チェックポイント分子やヘルパー T 細胞、CTL、Treg の発現を評価し、解析する。

具体的には当院で外科切除を施行した消化器がん臨床検体 (パラフィンブロック) を用いて、申請者のこれまでの研究成果で絞り込まれた key molecule や近年同定された新規免疫チェック

ポイント分子である B7-H1(PD-L1), B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6, B7-H7 を免疫染色にて評価する。同時に CD3, CD4, CD8, Foxp3 に対する抗体を用いて T 細胞性免疫応答に関わる因子も同様に免疫染色にて発現解析を行う。申請者はこれらの免疫染色に関する手技も既に確立させている (Arigami, et al. Cancer Sci 2011. Arigami, et al. J Gastroenterol Hepatol 2014)。最終的には免疫チェックポイント分子発現の程度と T 細胞性免疫応答に関わる因子との関係を統計学的に解析することで腫瘍の免疫逃避に関する免疫抑制のメカニズムを明らかにする。

(2)免疫チェックポイント分子をノックダウンさせたがん細胞株の樹立とマウス体内移植モデルの作成

免疫チェックポイント分子の機能的な役割を詳細に解析する目的で消化器がん細胞株に siRNA の手技を用いて免疫チェックポイント分子を特異的にノックダウンさせる実験を行う。具体的な研究方法としては、上記の臨床検体を用いた免疫組織化学的な実験結果から最も免疫抑制を引き起こしている分子を抽出し、siRNA によりノックダウンさせたがん細胞株を樹立する。引き続き、これらの細胞株を用いたマウス体内移植モデルを作成する。申請者らは、これまで siRNA を用いた機能解析実験を行っており、豊富な知識と経験を持っている (Narita, Arigami, et al. Oncogene 2009)。また予備実験により siRNA によりノックダウンさせたがん細胞株の樹立

【平成29年度】

(3)マウス体内移植モデルを用いた *in vivo* における免疫チェックポイント分子の機能解析

ノックダウンがん細胞株によるマウス体内移植モデルを用いて免疫チェックポイント分子の機能的な役割や作用について解析を行い、*in vivo* でも同様に免疫抑制のメカニズムが証明できるか確認を行う。

具体的には前年度に作成されたマウス体内移植モデルを用いて経時的な腫瘍の変化を観察し、サイズや重量を測定する。さらに摘出された腫瘍を用いて免疫チェックポイント分子の発現を免疫染色や RT-PCR にて解析する。同時に前年度に評価を行った T 細胞性免疫応答に関わる因子も免疫染色にて細胞数を解析し、統計学的な検討を加えて前年度の *in vitro* での実験結果との整合性を確認する。またノックダウンされていないがん細胞株によるマウス体内移植モデルも作成し、同様に評価を行い、比較検討することで免疫チェックポイント分子の機能的な側面についてさらに詳細な検討が可能になると思われる。申請者は RT-PCR による mRNA 発現解析結果を多数報告しており、プライマーのデザインなどにも習熟している (Arigami, et al. Br J Cancer 2005. Arigami, et al. Ann Surg 2006)。

(4)重度免疫不全 NOG マウスを用いた *in vivo* における免疫チェックポイント分子の機能解析

重度免疫不全状態下での免疫チェックポイント分子の機能的な役割や作用を検討する目的で NOG マウスを用いたがん細胞株による移植モデルを作成し、検討を行う。NOG マウスは、T 細胞、B 細胞および NK 細胞が欠損し、補体活性やマクロファージ、樹状細胞などの機能も減退しているため免疫チェックポイント分子が重度免疫不全状態の環境下で何らかの作用をもたらすのかも含めて解析する。

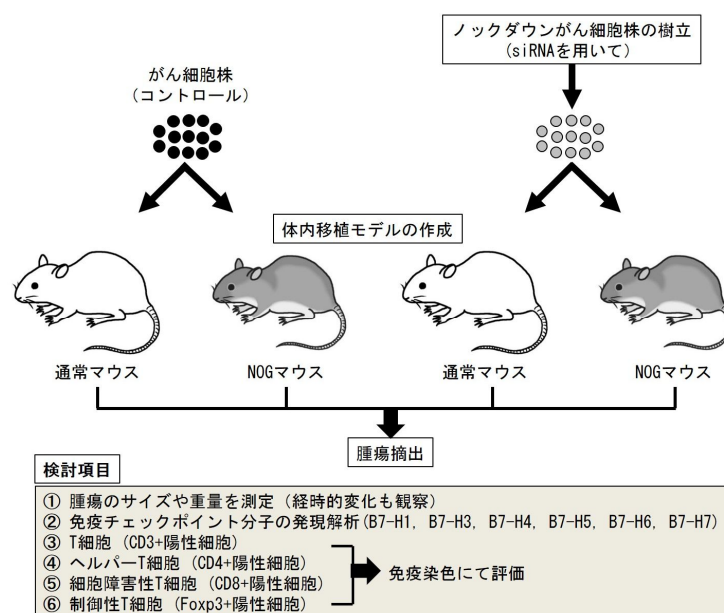
具体的な研究方法は、前回のマウス体内移植モデル実験と同様にがん細胞株による NOG マウス移植モデルを作成し、腫瘍サイズや重量の経時的な変化を観察する。最終的には腫瘍を摘出し、前回と同様に免疫チェックポイント分子の発現を免疫染色や RT-PCR にて解析することで免疫不全状態下での免疫チェックポイント分子の機能的な役割が明らかとなる。

【平成30年度】

(5)免疫チェックポイント阻害剤の治療効果予測となる血液バイオマーカーの探索

非小細胞肺癌では免疫チェックポイント阻害剤である抗PD-L1抗体による単剤投与において PD-L1陽性患者では陰性患者に比較して高い奏効率が示されている。そこで消化器がんに対する免疫チェックポイント阻害剤の臨床応用に向けて治療効果予測となる血液バイオマーカーの探索を行う。

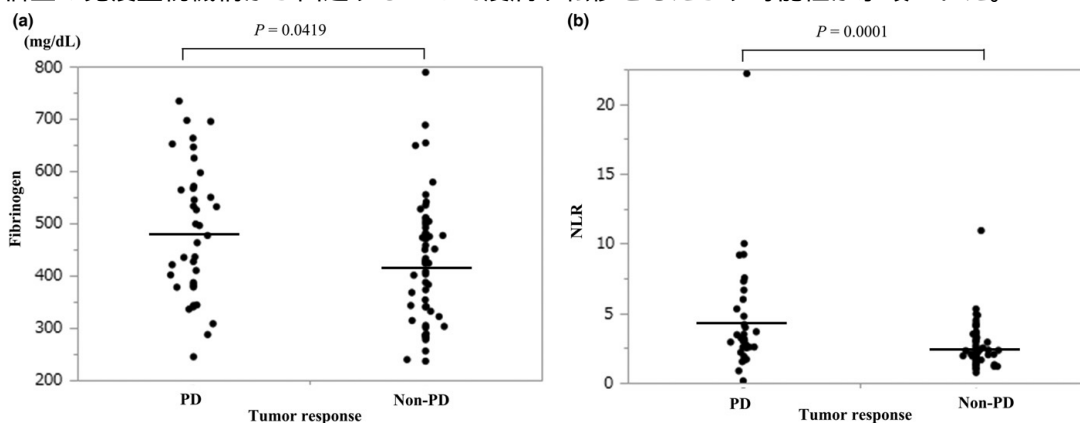
申請者は血中循環腫瘍細胞が免疫チェックポイント分子である B7-H3 や B7-H4 を発現していることを確認しているため末梢血液と組織内での免疫チェックポイント分子の発現をそれぞれ



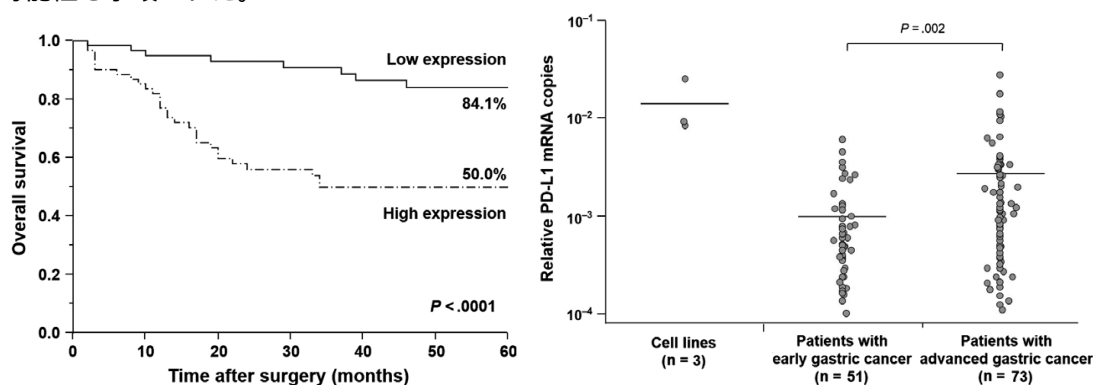
RT-PCR や ELISA 法、免疫染色を用いて評価比較し、治療効果予測のために有望な免疫チェックポイント分子を絞り込む。次に絞り込まれた分子と患者の免疫状態を評価する Fibrinogen や NLR などの簡便な血液マーカーとの関係を解析し、より精度の高い治療効果予測のための血液バイオマーカーに基づいた効率的な個別化がん免疫療法の構築を目指す。

4. 研究成果

(1)化学療法あるいは化学放射線療法を施行した切除不能進行食道癌 98 例での平均血清 Fibrinogen 値および NLR は、それぞれ 448.2 ± 122.2 mg/dL、 3.3 ± 2.8 であった。非奏功進行群(PD)では、non-PD群に比較して有意に血清 Fibrinogen 値、NLR とともに高値であった ($P=0.0419$, $P=0.0001$)。一方、血清 Fibrinogen 値および NLR の高値群は、低値群に比較して有意に予後不良であった ($P=0.0242$, $P=0.0019$)。これらの結果より癌細胞は、全身性の炎症反応を誘発し、宿主の免疫監視機構から回避することで浸潤や転移をもたらす可能性が示唆された。



(2)当科にて手術あるいは化学療法を行った胃癌 124 例の治療前末梢血液を用いて免疫チェックポイント分子である PD-L1 の mRNA の発現を RT-PCR 法により評価した。進行胃癌患者の末梢血液における PD-L1 mRNA 発現は、早期胃癌患者に比較して明らかに高値であった ($P=0.002$)。臨床病理学的因子との関係では、PD-L1 発現は有意に深達度や遠隔転移の有無、進行度と相関していた ($P=0.001$, $P<0.001$, $P<0.001$)。さらに高発現群の予後は低発現群に比較して明らかに予後不良であった ($P<0.0001$)。また多変量解析では、PD-L1 発現は独立した予後因子のひとつであった ($P=0.024$)。今回の研究で胃癌における PD-L1 発現の検索は、血中遊離癌細胞に対する分子学的診断法となる可能性があり、PD-L1/PD-1 を介した免疫療法のバイオマーカーとなる可能性も示唆された。



(3)当科にて手術あるいは化学療法を行った胃癌 111 例の治療前末梢血液を用いて免疫チェックポイント分子である HHLA2 の mRNA の発現を RT-PCR 法により評価した。胃癌患者の末梢血液における HHLA2 mRNA 発現は、健常者に比較して明らかに低値であった ($P<0.0001$)。臨床病理学的因子との関係では、HHLA2 発現は有意に深達度や遠隔転移の有無、進行度と逆相関していた ($P=0.0331$, $P<0.0001$, $P=0.0032$)。さらに低発現群の予後は高発現群に比較して明らかに予後不良であった ($P=0.0001$)。今回の研究で胃癌における HHLA2 発現は、宿主の免疫応答に対して促進的に作用する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計8件)

Haraguchi N, Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S, Uchikado Y, Mori S, Kurahara H, Kijima Y, Nakajo A, Maemura K, Ishigami S, Natsugoe S. Clinical significance of primary tumor

score determined by tumor depth and size in patients with resectable gastric cancer. Oncotarget; 9: 8512-8520, 2018. (査読有)

Arigami T, Uchikado Y, Omoto I, Sasaki K, Kita Y, Owaki T, Yanagita S, Mori S, Kurahara H, Okumura H, Maemura K, Natsugoe S. Primary Tumor Score Based on Tumor Depth and Length Predicts Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Anticancer Res; 38: 5447-5452, 2018. (査読有)

Shimonosono M, Arigami T, Yanagita S, Matsushita D, Uchikado Y, Kijima Y, Kurahara H, Kita Y, Mori S, Sasaki K, Omoto I, Maemura K, Uenosono Y, Ishigami S, Natsugoe S. The association of human endogenous retrovirus-H long terminal repeat-associating protein 2 (HHLA2) expression with gastric cancer prognosis. Oncotarget; 9: 22069-22078, 2018. (査読有)

Amatatsu M, Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S, Uchikado Y, Kijima Y, Kurahara H, Kita Y, Mori S, Sasaki K, Omoto I, Maemura K, Ishigami S, Natsugoe S. Programmed death-ligand 1 is a promising blood marker for predicting tumor progression and prognosis in patients with gastric cancer. Cancer Sci; 109: 814-820, 2018. (査読有)

Kijima T, Arigami T, Uchikado Y, Uenosono Y, Kita Y, Owaki T, Mori S, Kurahara H, Kijima Y, Okumura H, Maemura K, Ishigami S, Natsugoe S. Combined fibrinogen and neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic marker of advanced esophageal squamous cell carcinoma. Cancer Sci; 108: 193-199, 2017. (査読有)

Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S, Okubo K, Kijima T, Matsushita D, Amatatsu M, Kurahara H, Maemura K, Natsugoe S. Clinical significance of circulating tumor cells in blood from patients with gastric cancer (Review article). Ann Gastroenterol Surg; 1: 60-68, 2017. (査読有)

Arigami T, Uenosono Y, Yanagita S, Okubo K, Kijima T, Matsushita D, Amatatsu M, Hagihara T, Haraguchi N, Mataka Y, Ehi K, Ishigami S, Natsugoe S. Clinical application and outcomes of sentinel node navigation surgery in patients with early gastric cancer. Oncotarget; 8: 75607-75616, 2017. (査読有)

有上貴明, 上之園芳一, 柳田茂寛, 松下大輔, 大久保啓史, 貴島孝, 天辰仁彦, 川越浩輔, 下之園将貴, 石神純也, 夏越祥次. 胃癌とリンパ節転移 リンパ行性微小転移の臨床的意義を中心に . リンパ学; 40: 113-116, 2017. (査読有)

[学会発表](計6件)

Takaaki Arigami, Masahiko Amatatsu, Shigehiro Yanagita, Daisuke Matsushita, Kosuke Kawagoe, Masataka Shimonosono, Keishi Okubo, Takashi Kijima, Yoshikazu Uenosono, Sumiya Ishigami, and Shoji Natsugoe: Analysis of PD-L1 Expression and Neutrophil-Lymphocyte Ratio in Peripheral Blood of Gastric Cancer, 第90回日本胃癌学会総会, 横浜市, 3月8日, 2018.

有上貴明, 柳田茂寛, 松下大輔, 川越浩輔, 下之園将貴, 内門泰斗, 喜多芳昭, 尾本至, 佐々木健, 盛真一郎, 上之園芳一, 夏越祥次: 切除不能・再発胃癌に対する化学療法効果予測因子としての Neutrophil-Lymphocyte Ratio と Platelet-Lymphocyte Ratio に基づいた血液スコアリングシステムの臨床的意義, 第51回制癌剤適応研究会(シンポジウム), 下呂市, 3月23日, 2018.

有上貴明, **上之園芳一**, 大久保啓史, 貴島孝, 天辰仁彦, 川越浩輔, 柳田茂寛, 内門泰斗, 喜多芳昭, 尾本至, 佐々木健, 盛真一郎, 馬場研二, 石神純也, **夏越祥次**: 胃癌における免疫チェックポイント分子 B7-H3 および B7-H4 発現の臨床的意義と個別化治療への応用, 第 50 回制癌剤適応研究会 (シンポジウム), 徳島市, 3 月 17 日, 2017.

有上貴明, **上之園芳一**, 大久保啓史, 貴島孝, 天辰仁彦, 川越浩輔, 内門泰斗, 盛真一郎, 喜多芳昭, 柳田茂寛, 石神純也, **夏越祥次**: 切除不能進行・再発胃癌における炎症と宿主免疫機能の関係: C-reactive protein と Neutrophil-Lymphocyte Ratio の観点から, 第 38 回癌免疫外科研究会 (シンポジウム), 倉敷市, 5 月 25 日, 2017.

有上貴明, **上之園芳一**, 大久保啓史, 貴島孝, 天辰仁彦, 川越浩輔, 石神純也, 柳田茂寛, **夏越祥次**: 胃癌における血小板数と血清 Fibrinogen の臨床的意義: 腫瘍進行度や予後の予測に有用な凝固系スコアの検討, 第 72 回日本消化器外科学会総会, 金沢市, 7 月 22 日, 2017.

有上貴明, **上之園芳一**, 柳田茂寛, 大久保啓史, 貴島孝, 天辰仁彦, 川越浩輔, 松下大輔, 内門泰斗, 喜多芳昭, 尾本至, 佐々木健, 盛真一郎, 石神純也, **夏越祥次**: 胃癌に対する次世代の免疫療法ターゲットとしての B7-H3 および B7-H4 免疫チェックポイント分子 Liquid biopsy としての血液検体を用いた個別化治療への応用, 第 79 回日本臨床外科学会総会 (ワークショップ), 東京都, 11 月 25 日, 2017.

[図書](計 3 件)

有上貴明, 柳田茂寛, **夏越祥次**: 特集 胃癌 診断・治療の最新知見 総論 第 15 版胃癌取扱い規約のポイント, 日本臨床 2018 Vol.76 No.3: 385-389.

有上貴明, 上之園芳一, **夏越祥次**: 特集 TNM 分類第 8 版を読み解く II. 各論 胃・小腸・大腸のカルチノイド腫瘍, 外科 2017 Vol.79 No.7: 623-627.

有上貴明, **上之園芳一**, 柳田茂寛, 大久保啓史, 貴島孝, **夏越祥次**: 手術手技 Sentinel node concept に基づいた残胃早期癌に対するリンパ節郭清, 手術 2017 Vol.71 No.10: 1457-1462.

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 上之園 芳一

ローマ字氏名: UENOSONO YOSHIKAZU

所属研究機関名: 鹿児島大学病院

部局名: 医歯学域医学系

職名: 客員研究員

研究者番号 (8 桁): 60398279

研究分担者氏名: 夏越 祥次

ローマ字氏名: NATSUGOE SHOJI

所属研究機関名: 鹿児島大学病院

部局名: 医歯学域医学系

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 70237577