

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15259

研究課題名(和文) 皮膚希少癌における制御性T細胞の解析と新規免疫療法の有効性の研究

研究課題名(英文) Investigating regulatory T cells in skin rare cancer to predict effectiveness of a new immunotherapy

研究代表者

山崎 小百合 (Yamazaki, Sayuri)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70567255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：メラノーマに免疫チェックポイント阻害剤といわれる抗CTLA-4抗体や抗PD-1抗体による治療が開始され、効果をあげている。免疫チェックポイント阻害剤の適応のないメラノーマ以外の皮膚希少癌や他の癌腫に対して、これらの免疫療法の有効性を予測できるような基礎データを出すために本研究を遂行した。貴重な検体であるため、サンプリングに注意をはかり、酵素処理などの条件決定を行った。フローサイトメーターによる解析で皮膚希少癌や他の癌腫において制御性T細胞が浸潤し、特徴的な表現型を持っていることがわかった。制御性T細胞は、特徴的な遺伝子発現パターンを示しているというデータも得た。

研究成果の概要(英文)：Immune checkpoint inhibitors such as anti-CTLA-4 Ab and anti-PD1 Ab are now available for melanoma, which is effective for some patients. We conducted this research to provide data that these immunotherapies can be also effective for skin rare cancers and other cancers that are not yet approved for the use of immune checkpoint inhibitors. First we determined sampling conditions such as usage of enzymes to digest tumors because samples were very valuable. We found that regulatory T cells infiltrated into skin rare cancers and other cancers by flowcytometry. We also found that the regulatory T cells expressed specific gene expression patterns.

研究分野：免疫学分野

キーワード：制御性T細胞 皮膚希少癌

1. 研究開始当初の背景

制御性T細胞は、末梢CD4+Tリンパ球の5-10%を占める自己免疫反応を抑制する細胞集団である。制御性T細胞は広い意味の自己である癌に対する免疫応答も抑制する (Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. J Immunol 1999; Ko K, Yamazaki S et al. J Exp Med 2005; Yamazaki S et al. PLoS One 2011)。研究代表者らは、制御性T細胞上のCTLA4を阻害する事で有効な腫瘍免疫が誘導される事、GITR という新規分子のシグナルにより制御性T細胞の抑制が解除される事も見出した (Yamazaki S et al. Nat Immunol 2002; Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S et al. J Exp Med 2000)。現在では、これらの研究及び他のグループの研究に基づき、制御性T細胞の免疫抑制解除を利用した癌の免疫療法が使用され、抗CTLA4抗体や抗PD1抗体による進行メラノーマの治療が開始されている。抗GITR抗体による臨床試験も米国で進んでいる。一方、進行すると治療法のない皮膚希少癌においては有効な免疫療法の開発が待たれていた。そのための基礎データを出すため、本研究を提案した。メラノーマ同様に新たな免疫療法が可能となれば、学術的のみでなく、社会的にも意義が大きいと考えた。

2. 研究の目的

上述の様に、研究代表者らは、自己免疫寛容の維持に重要な制御性T細胞が腫瘍免疫も抑制している、という発見に貢献した。難治で予後不良の皮膚希少癌において、制御性T細胞の免疫抑制解除による免疫療法の有効性を検討するため、制御性T細胞を中心とした免疫学的解析を行うことを本研究の目的とした。本研究成果は他の癌にも応用できる可能性があり、二人に一人が癌になる超高齢化社会の医療に貢献できると考えた。

Ira Mellmanらにより、メラノーマや他の固形癌のPDL1の腫瘍浸潤リンパ球における発

現抗PDL1抗体による治療効果の予測につながる事が報告された (Herbst et al. Nature 2014; CRI-CIMT-EATI-AACR Inaugural International Cancer Immunotherapy Conference, Sept 16-20, 2015)。当時、皮膚希少癌におけるimmune checkpoint 関連分子であるCTLA4 やPD1, PDL1, PDL2 の発現を含んだ制御性T細胞の解析はほとんどなされていなかったため、これを明らかにすることにした。

3. 研究の方法

1) メラノーマ、メルケル細胞癌などの皮膚希少癌、他の癌腫のサンプリングと保存
貴重な検体であるため、サンプリング、保存に細心の注意をはかり、サンプリングの条件決定を行った。腫瘍浸潤リンパ球中の制御性T細胞の解析が可能のように新鮮な状態で、サンプルの一部を物理的に破砕し、生存している腫瘍浸潤リンパ球をカウントし、セルバンカーで凍結し、液体窒素で保存した。十分な大きさのサンプルに関しては、組織切片作成用としてOCTコンパウンド中にいれて液体窒素で凍結し、-80度に保存した。

2) Immune checkpoint 関連分子を含んだ制御性T細胞のタンパクレベルの発現解析
Immune checkpoint 関連分子であるCTLA4 やPD1, PDL1, PDL2 の発現をFlow cytometerにて主に行った。少量のサンプルでも多くの情報が得られるように大阪大学坂口志文教授、大倉永也教授との共同研究で BDLSRFortessaを用いて 20色までのmultiple color の解析を行った。

3) 制御性T細胞の遺伝子発現解析

大阪大学坂口志文教授、大倉永也教授との共同研究で腫瘍浸潤リンパ球より制御性T細胞、そうでないCD4+T細胞をソートし、RNA sequencing (RNA seq) による遺伝子発現解析を行った。

SorterはBDARIA SORPを利用して、ヒート

コントローラーも使用して、細胞を高い生存率で素早く分離、採取するようにした。

4. 研究成果

研究の方法1)で示したように、検体が貴重であるため、サンプリングの方法に注意をはかり、大きさに余裕のあるものを使用して、サンプリングの条件決定を行った。MACS gentle dissociator (Milteny)を使用する場合、酵素入りの試薬を使うと制御性T細胞に発現するCD45RAの発現が下がるため、制御性T細胞を解析する場合は、酵素を使わない方がよいことがわかった。一方、樹状細胞などの抗原提示細胞を解析するためには、コラゲナーゼ処理を行った方が回収率が高いことがわかった。サンプルの大きさにより、実験計画を考慮し、酵素処理を行う、行わない、を判定してサンプル保存を行った。

大阪大学坂口志文教授、大倉永也教授との共同研究で、BDLSRFortessaを用いて20色までのmultiple colorの解析で、隆起性皮膚線維肉腫、メルケル細胞癌などにも制御性T細胞が浸潤していることがわかった。制御性T細胞は、既存の種々マーカーをタンパクレベルで発現していた。これらの皮膚希少癌においては制御性T細胞、エフェクターT細胞の浸潤の数は多くなく、サンプルも貴重であるため、さらにRNA seqによる遺伝子発現の解析を行うために、他の癌腫を使用して、条件を設定を行った。RNA seqのサンプルは細胞数が多い程よいが、細胞の生存状態も重要である。サンプル処理と保存に注意をし、ソート条件にも注意をはかった。腫瘍浸潤リンパ球中の制御性T細胞、制御性T細胞でないCD4+T細胞をCD25, CD127などのマーカーと、死細胞を除去するためにlive deadで染色し、BDARIA SORPでソートした。その結果、腫瘍浸潤リンパ球中から、制御性T細胞と制御性T細胞でないCD4+T細胞を採取することに成功した。

採取した細胞から、RNAを採取、ライブラリーを作成し、次世代シーケンサーで解析し、RNA seqによる遺伝子発現を解析した。その結果、私たちの解析した癌腫に浸潤している制御性T細胞と他のT細胞を比較したところ、特徴的な遺伝子発現を見出す事ができた。現在論文原稿をまとめておりもうすぐ投稿予定である (manuscript in preparation to J Exp Med.)。

同様の遺伝子発現が、隆起性皮膚線維肉腫、メルケル細胞癌にも認められる可能性があり、現在保存しているサンプルについて解析を検討している。さらに今回見出された特徴的な遺伝子発現の機能解析やMass cytometryによる38色の解析も計画している。今回の発見が、将来、癌に浸潤している制御性T細胞を標的とする新しいターゲットになる可能性が考えられた。

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3件)

志馬寛明、松本美佐子、山崎小百合、瀬谷司、TLRアゴニストを用いた抗癌免疫アジュバント療法、Thrombosis Medicine、2018、印刷中

査読無

DOI:なし

Yamazaki S*, Odanaka M, Nishioka A, Kasuya S, Shime H, Hemmi H, Imai M, Riethmacher D, Kaisho T, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A. Ultraviolet B-induced maturation of CD11b-type Langerin dendritic cells controls the expansion of Foxp3⁺regulatory T cells in the skin.

Journal of Immunology. 2018;

200:119-129. *Corresponding author

査読有

DOI: 10.409/jiimuno.1701056

Kubo R, Muramatsu S, Sagawa Y, Saito C, Kasuya S, Nishioka A, Nishida E, Yamazaki S, Morita A. Bath-PUVA therapy improves impaired resting regulatory T cells and increases activated regulatory T cells in psoriasis.

J Dermatol Sci. 2017; 86:46-53.

査読有

DOI: 10.1016/j.jdermsci.2017.01.001

〔学会発表〕(計2件)

Yamazaki S, Odanaka M, Shime H, Imai M, Nishioka A, Kasuya S, Riethmacher D, Hemmi H, Kaisho T, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A.

Foxp3⁺ regulatory T cells are expanded by ultraviolet B-exposed PD-L1⁺ skin dendritic cell expressing a unique set of genes in a CSF1-independent manner.

IID2018 International Investigative Dermatology. Florida USA, 2018

Yamazaki S, Nishioka A, Kasuya S, Odanaka M, Hemmi H, Imai M, Riethmacher D, Kaisho T, Ohkura N, Sakaguchi S, Morita A.

The critical role of dendritic cell subset in expanding Foxp3⁺ regulatory T cells in the murine skin after ultraviolet B exposure.

LC2017 15th International Workshop on Langerhans Cells. NewYork USA, 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

・ホームページ

名古屋市立大学大学院医学研究科免疫学分野

http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/immunol_dir/index.html

・講演(計4件)

2018年4月 イタリア・メッシーナ大学招待講演「Regulating immunity by dendritic cells and regulatory T cells」

2017年11月～2018年1月 山崎小百合他 名古屋市立大学最新医学講座 オープンカレッジ「免疫の制御で病気を治す新時代～名古屋ゆかりの免疫学者が世界へ発信する研究と治療戦略について」(全8回)

2017年11月 岐阜大学特別講演「樹状細胞と制御性T細胞による免疫制御」

2017年8月 免疫ふしぎ未来「お肌の健康と制御性T細胞」

・新聞(計2件)

2018年6月12日発行予定 中部経済新聞「免疫の制御を利用する」

2017年5月号 名古屋市地域女性団体連絡協議会機関誌 女性なごや「免疫と病気」

・雑誌(計1件)

The Journal of Experimental Medicine (JEM) 諮問編集委員会 Advisory Editorial Board 選出

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 小百合 (YAMAZAKI, Sayuri)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 70567255

(2) 研究分担者

小田中 瑞夕 (ODANAKA, Mizuyu)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号： 00510281

今井 優樹 (IMAI, Masaki)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号： 30440936

(3)連携研究者

森田 明理 (MORITA, Akimichi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号： 30264732

大倉 永也 (OHKURA, Naganari)
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・
教授
研究者番号： 20300949

(4)研究協力者

()