

平成30年 4月23日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18463

研究課題名(和文) 肺癌局所の免疫微小環境における免疫抑制因子の同定とその制御

研究課題名(英文) Identification of immunosuppressive factor in tumor microenvironment in patient with lung cancer

研究代表者

大植 祥弘 (Ohue, Yoshihiro)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：70435014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌における抗体免疫療法の効果は未だ不十分であり、新たな免疫抑制機序の解明が重要である。今回、腫瘍浸潤T細胞のPD-1及びTIM-3の発現と腫瘍細胞におけるそれらのリガンドの発現を検討し、予後との相関を解析した。腫瘍発現PD-L1とGalectin-9及びがん精巢抗原のXAGE1は、TNM分類と独立した予後因子であった(HR:0.40, p=0.01)。
以上の結果から、腫瘍局所を詳細に検討することで、肺腺癌患者の予後が予測できる。また、腫瘍局所では、PD-1/PD-L1経路のみならず、TIM-3/Galectin-9経路が重要であり、それらを阻害するがん免疫療法の開発が重要である。

研究成果の概要(英文)：The effect of immunotherapy in lung cancer is still insufficient, and elucidation of new immunosuppressive mechanism is important. In this study, expression of PD-1 and TIM-3 on tumor-infiltrating T cells and expression of their ligands on tumor cells were examined and analyzed for correlation with survival. Expression of PD-L1 and galectin-9 and XAGE 1 antigens on tumor cells were independent prognostic factors of TNM classification (HR: 0.40, p = 0.01). Based on the above results, the survival of patients with lung adenocarcinoma can be predicted by investigating the tumor microenvironment in detail. Furthermore, in addition to the PD-1 / PD-L1 pathway, the TIM-3 / galectin-9 pathway is also important in the tumor microenvironment and development of cancer immunotherapy that inhibits them is very important.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：肺がん がん抗原 免疫療法 免疫チェックポイント分子

1. 研究開始当初の背景

XAGE1 に対する抗体反応を免疫バイオマーカーとして用い、肺腺癌の自然経過を前向き研究により観察した。進行期肺腺癌において、XAGE1 抗原の陽性と陰性での全生存期間の差は認めなかった。しかし XAGE1 が陽性で XAGE1 に対する潜在的な免疫応答を有する患者は、免疫応答がない患者と比較し、有意に生存期間の延長が認められた。すなわち、進行期肺腺癌において XAGE1 抗体反応陽性患者は予後が著明に延長することが明らかとなった。XAGE1 免疫の生存期間延長効果は注目すべき事実で、本抗原の強い免疫原性が、がんワクチンなどとして用いた場合にも発揮されることが十分に期待される。

一方で、XAGE1 免疫が誘導されても腫瘍の完全拒絶には至らない。近年、腫瘍特異的な CD4, CD8 T 細胞免疫を負に制御する分子として TIM-3/Galectin-9, 2B4/CD48, PD-1/PD-L1 LAG-3/MHC-, BTLA/HVEM などが報告され、免疫抑制細胞としては、制御性 T 細胞や、MDSC 細胞が注目されている。その為、これらの免疫を抑制する因子を標的とした分子標的薬や抗体医薬の創薬が積極的に行われている。

2. 研究の目的

進行期肺腺癌では、XAGE1 に対する潜在的な免疫が誘導されている患者は予後が延長することが明らかになった。しかしながら、がん終末期で、種々の免疫抑制因子が上昇している患者では XAGE1 に対する潜在的免疫応答も強く抑制されていることが明らかとなった。肺癌局所においても同様に種々の免疫抑制因子の影響で抗腫瘍免疫が強く抑制されていることが示唆される。その為、腫瘍局所におけるがん免疫微小環境の全容を解明し、真の免疫抑制因子を同定する必要がある。

3. 研究の方法

17 例の肺腺癌患者の新鮮組織検体と末梢血単核球を用いて、腫瘍浸潤リンパ球における免疫チェックポイント分子の発現と CD27, Ki-67, Annexin V を指標とした T 細胞機能解析をフローサイトメトリー法で行った。

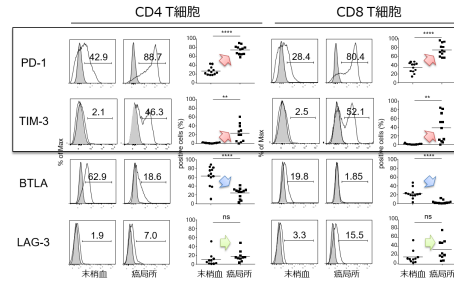
また、肺癌細胞株 PC-9 (EGFRmt) および OU-LC-SK (EGFRwt) を用いて、分子標的薬である Afatinib (EGFR-TKI) で処理し、培養上清中の PD-L1, Galectin-9 を ELISA 法で検出した。T 細胞クローンのアポトーシス誘導阻止実験では、アポトーシスをリコンビナント Galectin-9 蛋白で誘導し、抗 Galectin-9 抗体および抗 TIM-3 抗体の添加によるアポトーシスの阻止効果をフローサイトメトリー法で解析した。

また、予後との関連については、肺腺癌 120 例の組織マイクロアレイを用いて腫瘍に発現する PD-L1, Galectin-9, XAGE1 の多寡を

免疫組織化学染色法で検討した。

4. 研究成果

腫瘍浸潤リンパ球における、PD-1, TIM-3, BTLA, LAG-3 分子の発現を検討した結果、末梢血と比較し、PD-1+リンパ球、TIM-3+リンパ球の割合が有意に多かった (図 1)。

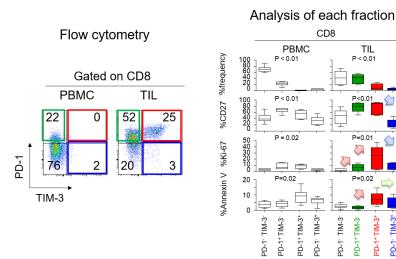


腫瘍局所では PD-1/PD-L1 と GAL-9/TIM-3 経路が重要

図 1. 腫瘍局所に浸潤する T 細胞に発現する免疫抑制因子

また PD-1+TIM-3+CD8 T 細胞は CD27 及び Ki-67 の発現が維持されていたが、PD-1-TIM-3+CD8 T 細胞では、CD27 および Ki-67 の発現が低下していた。一方で、Annexin V は TIM-3+CD8 T 細胞で強く発現していた。これらのことより、T 細胞上の PD-1 分子の発現は T 細胞の活性化状態を示し、TIM-3 分子の発現は T 細胞の疲弊を示していると考えられる (図 2)。

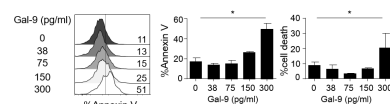
図 2. 腫瘍浸潤リンパ球の機能解析



PD-1+ 細胞は活性化、TIM-3+ 細胞は疲弊している

次に、TIM-3 のリガンドである Galectin-9 による T 細胞クローンのアポトーシス誘導を検討した。TIM-3+ の抗原特異的 T 細胞クローンにリコンビナント Galectin-9 蛋白を添加すると Galectin-9 の濃度依存性に T 細胞はアポトーシスに陥った。アポトーシスは抗 Galectin-9 抗体および抗 TIM-3 抗体で阻止された (図 3)。

Apoptosis by galectin-9



Antibody blocking

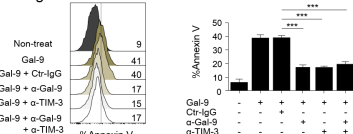


図 3. 可溶性 Galectin-9 によるアポトーシスの誘導

次に、肺癌細胞株における PD-L1 および Galectin-9 の発現をフローサイトメトリー法で検討したところ、PD-L1 は主に細胞表面に、Galectin-9 は細胞内に発現していた。また PC-9 および OU-LC-SK を Afatinib (10 nM) で処理、非処理した結果、Afatinib で処理した PC-9 の培養上清で Galectin-9 が有意に高かった。また健康人および患者血清と比較し、癌性胸水においても Galectin-9 が有意に高かった (図 4)。一方で、PD-L1 はほとんど検出されなかった。このことは、腫瘍に豊富に存在する Galectin-9 が腫瘍死によって局所に大量に放出され、放出された Galectin-9 によって腫瘍局所に浸潤する TIM-3+ T 細胞がアポトーシスに陥ることを示唆している。

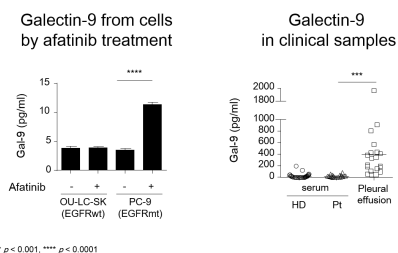


図 4. 腫瘍より放出される可溶性 Galectin-9

これらの結果をもとに、肺癌組織検体をを用いて、これまで肺腺癌の予後との関連が明らかな XAGE1(GAGED2a)発現の有無に加え、PD-L1、Galectin-9 の多寡を指標に予後との関連を検討した (図 5)。

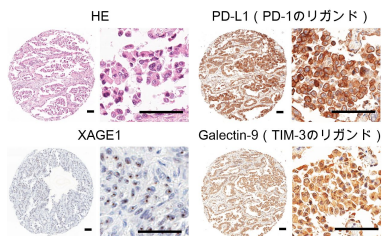


図 5. 肺癌組織に発現する免疫抑制分子と XAGE1

この因子を用いて得られた予後判別関数は、肺腺癌患者の予後を明確に判別でき、PD-L1 と腫瘍浸潤リンパ球は予後良好因子として、Galectin-9 と XAGE1(GAGED2a)発現は予後不良因子として関与していることが明らかになった。得られた判別関数は、病理学的病期、組織の悪性度と独立した予後因子 (HR:0.40、P=0.01) であった (図 6)。

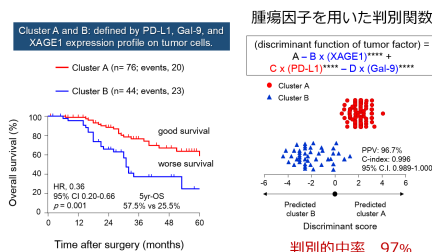


図 6. 腫瘍 PD-L1, Gal-9, XAGE1 発現を指標とした肺腺癌の予後予測

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)

1. Takeoka T, Nagase H, Kurose K, Ohue Y, Yamasaki M, Takiguchi S, Sato E, Isobe M, Kanazawa T, Matsumoto M, Iwahori K, Kawashima A, Morimoto-Okazawa A, Nishikawa H, Oka M, Pan L, Venhaus R, Nakayama E, Mori M, Doki Y, Wada H. NY-ESO-1 Protein Cancer Vaccine With Poly-ICLC and OK-432: Rapid and Strong Induction of NY-ESO-1-specific Immune Responses by Poly-ICLC. Journal of immunotherapy: Epub ahead of print, 2017
DOI: 10.1097/CJI.000000000000162.
2. Ohue Y, Kurose K, Nozawa R, Isobe M, Nishio Y, Tanaka T, Doki Y, Hori T, Fukuoka J, Oka M, Nakayama E. Survival of Lung Adenocarcinoma Patients Predicted from Expression of PD-L1, Galectin-9, and XAGE1 (GAGED2a) on Tumor Cells and Tumor-Infiltrating T Cells. Cancer Immunology Research 4(12):1049-1060, 2016
DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0266
3. Ogawara D, Fukuda M, Ueno S, Ohue Y, Takemoto S, Mizoguchi K, Nakatomi K, Nakamura Y, Obase Y, Honda T, Tsukamoto K, Ashizawa K, Oka M, Kohno S. Drug fever after cancer chemotherapy is most commonly observed on post treatment days 3-4. Supportive Care in Cancer 24(2):615-619, 2016
DOI: 10.1007/s00520-015-2820-8

[学会発表](計 13 件)

1. Oka M, Kurose K, Isobe M, Fukuda M, Ohue Y. Clinical Significance of Humoral Immunity against XAGE1 Cancer-Testis Antigen in Lung Adenocarcinoma. ASCO-SITC Clinical Immuno-oncology Symposium, San Francisco, USA, 2018
2. Ohue Y, Kurose K, Isobe M, Fukuda M, Nakayama E, Oka M. Correlation of Clinical Response and XAGE1 Immunity in Lung Adenocarcinoma. IASLC 18th World Conference on Lung Cancer. Yokohama, Japan, 2017
3. 大植祥弘. 肺腺癌の TIM-3/Galectin-9 経路を介した免疫抑制. 第 14 回日本免疫治療学研究会学術集会, 東京, 2017
4. Oka M, Ohue Y, Kurose K, Nishio Y, Isobe M, Nakayama E. Immuno-inhibitory pathway, TIM-3/Galectin-9, in lung adenocarcinoma: clinical and

- in vitro analysis. 101st Annual Meeting of American Association of Cancer Research, Washington DC, USA, 2017
5. Kurose K, Ohue Y, Isobe M, Suzuki S, Wada H, Oka M, Ueda R, Nakayama E. Reviving chemotherapy sensitivity after anti-CCR4 mAb (mogamulizumab) treatment in lung cancer patients. Third CRI-CIMT-EATI-AACR Second International Cancer Immunotherapy Conference, New York, USA, 2017
 6. Kurose K, Ohue Y, Isobe M, Suzuki S, Wada H, Ueda R, Nakayama E, Oka M. Reviving Chemotherapy Sensitivity after Anti-CCR4 mAb (Mogamulizumab) Treatment in Lung Cancer Patients. IASLC 18th World Conference on Lung Cancer, Yokohama, Japan, 2017
 7. Ohue Y, Kurose K, Nishio Y, Isobe M, Oka M and Nakayama E. Role of TIM-3/Galectin-9 pathway in lung adenocarcinoma. CRI-CIMT-EATI-AACR Second International Cancer Immunotherapy Conference, New York, USA, 2016
 8. 大植祥弘, 黒瀬浩史, 西尾祐美, 磯辺みどり, 福岡順也, 中山睿一, 岡三喜男. 腫瘍 PD-L1, Galectin-9, XAGE1 発現及び T 細胞浸潤を指標とした肺腺癌の予後予測. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2016
 9. 大植祥弘, 黒瀬浩史, 磯辺みどり, 西尾祐美, 岡三喜男, 中山睿一. 肺腺癌の TIM-3/Galectin-9 経路を介した免疫抑制と予後の関連. 第 20 回日本がん免疫学会総会, 大阪, 2016
 10. 大植祥弘, 黒瀬浩史, 西尾祐美, 磯辺みどり, 岡三喜男, 中山睿一. Role of TIM-3/Galectin-9 pathway in lung adenocarcinoma. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016
 11. 黒瀬浩史, 大植祥弘, 西尾祐美, 磯辺みどり, 上中明子, 中山睿一, 岡三喜男. 進行又は再発固形がん患者に対する Mogamulizumab の第 a 相多施設共同医師主導治験. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会, 京都, 2016
 12. 黒瀬浩史, 大植祥弘, 石田高司, 飯田真介, 土井俊彦, 鈴木進, 垣見和宏, 中山睿一, 上田龍三, 岡三喜男. 進行又は再発固形がん患者に対する Mogamulizumab の第 a 相他施設共同医師主導治験. 第 113 回日本内科学会講演会, 東京, 2016
 13. 黒瀬浩史, 大植祥弘, 磯辺みどり, 西尾裕美, 山岡誉明, 福岡順也, 中山睿一, 岡三喜男. 肺腺癌の TIM-3/Galectin-9 経路を介した免疫抑制と予後. 第 57 回日本肺癌学会学術集会, 福

岡, 2016

〔図書〕(計 0 件)
〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.kawasaki-m.ac.jp/resp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大植 祥弘 (YOSHIHIRO, Ohue)
川崎医科大学・医学部・呼吸器内科学・
講師
研究者番号: 70435014

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

岡 三喜男 (MIKIO, Oka)
川崎医科大学・医学部・呼吸器内科学・
教授
研究者番号: 40223995

黒瀬 浩史 (KOJI, Kurose)
川崎医科大学・医学部・呼吸器内科学・
臨床助教
研究者番号: 30551139