

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19927

研究課題名(和文) 癌幹細胞に起因する抗腫瘍免疫回避に対する治療法の探索

研究課題名(英文) Combination immunotherapy targeting for chemoresistant cancer stem cells with PD-L1 expression

研究代表者

浦川 真哉 (URAKAWA, SHINYA)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40768975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：食道扁平上皮癌切除標本において、免疫染色でのPD-L1高発現群(腫瘍)は予後不良であったが、PD-L1発現と術前治療の有無や治療効果との関連性は認めなかった。化学療法前の生検腫瘍組織および切除検体から抽出した免疫細胞を、フローサイトメトリーで解析すると、CD8陽性T細胞上のPD-1発現が高いものほど治療抵抗性であり、治療後にPD-1発現が上昇する症例を認めた。これはPD-L1/PD-1経路による免疫回避機構が治療抵抗性に関わることを示唆する。現在、治療前生検組織の免疫染色を行うとともに、免疫細胞を含むがん微小環境を再現する培養方法を模索し、化学療法抵抗性PD-L1発現癌幹細胞を検証している。

研究成果の概要(英文)：Although immunohistochemistry showed tumorous PD-L1 expression was associated with poor overall survival in esophageal cancer patients who underwent esophagectomy, no relationship was identified between PD-L1 expression and presence of preoperative therapy or tumor response. In flow cytometry analysis of tissue-infiltrating lymphocytes extracted from pre-therapeutic biopsy tissue and resected specimen, percentage of positive PD-1 in CD8+ cells was higher in non-responders compared with responders while some cases showed increased PD-1-expression after chemotherapy, thus indicating that PD-L1/PD-1 pathways was associated with chemoresistance in esophageal cancer. Now, we are analyzing PD-L1 expression in pre-therapeutic biopsy tissue by immunohistochemistry and establishing a new method to culture tumor tissue together with immune cells to investigate the mechanism of cancer stem cells with PD-L1-expression resistant to chemotherapy.

研究分野：がん免疫

キーワード：食道癌 癌幹細胞 PD-L1 抗腫瘍免疫回避機構

1. 研究開始当初の背景

食道癌に対する様々な治療法が開発されているが、未だ十分な治療成績が得られていない。この原因として治療抵抗性や再発に関与する癌幹細胞の存在が考えられている。Dallasらの報告では、抗癌剤に暴露し、耐性を獲得した大腸癌細胞株では癌幹細胞の比率が高くなることが示されている⁽¹⁾。また、癌幹細胞自身が様々な抗腫瘍免疫回避機構に関わっていることが報告されている⁽²⁾。その中でも膠芽腫においては、癌幹細胞にPD-L1が発現していること、そのPD-L1がエフェクターT細胞の増殖抑制、アポトーシス誘導に関わり、抗腫瘍免疫を回避しているということが報告されている⁽³⁾。

2. 研究の目的

食道癌においても、術前補助化学療法後に癌幹細胞の比率が増加することで、PD-1/PD-L1経路を介した抗腫瘍免疫回避機構が働き、予後の悪化をもたらしているのではなかという仮説をたてた。本研究ではこのメカニズムを解明し、免疫療法によって食道癌幹細胞にアプローチすることで新たな治療法を探求することとした。

3. 研究の方法

(1) 【化学療法による食道癌幹細胞割合および腫瘍PD-L1発現の変化】

2000年から2013年に、当院で根治切除を行った食道癌251例の切除検体を対象とし、腫瘍細胞および免疫担当細胞のPD-L1発現を免疫染色で評価し、臨床病理学的因子との関連性を検討した。PD-L1発現評価には、rabbit anti-PD-L1 monoclonal antibody (clone SP142, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA)を用い、5%以上染色されるものを高発現としている。

(2) 【化学療法による免疫関連分子と化学療法効果との相関】

術前補助化学療法を施行した食道癌35例を対象とし、治療前生検組織および切除検体から腫瘍組織浸潤リンパ球(Tumor Infiltrating Lymphocyte: TIL)を抽出し、CD4、CD8、PD-1、CD25を含む様々な免疫関連分子をフローサイトメトリーで解析し、化学療法の奏功に関わる因子を探索した。

術前補助化学療法は全例、DCF (docetaxel, cisplatin, 5-FU)療法を行っている。また免疫担当細胞の抽出には、gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec)およびTumor Dissociation Kit for humans (Miltenyi Biotec)を用いている。

(3) 【食道癌幹細胞、非幹細胞と健常者由来末梢血単核細胞(PBMC)との共培養】食道癌治療前の生検組織から初代培養を行い、同一患者より得られたPBMCと共培養し、まず免疫細胞の表現型変化を解析した。これにより共

培養系が、免疫細胞も含めたがん微小環境を反映しているかを検証する。

(4) 【抗PD-L1抗体投与による癌幹細胞の変化】

食道癌細胞株より癌幹細胞をsortingし、抗PD-L1抗体投与群・非投与群を作成する。処置後の細胞を取り出し、sphere形成能、腫瘍増殖能を評価する。

(5) 【抗癌剤と抗PD-L1抗体併用による癌幹細胞に対する治療効果の相違】

食道癌細胞株より癌幹細胞をsortingし、(3)で確立した免疫担当細胞との共培養系を用いて、抗PD-L1抗体投与群・非投与群を作成する。処置後の細胞を取り出し、in vitroで培養して各種抗癌剤に暴露しMTT assayで感受性を評価する。

4. 研究成果

(1) 【化学療法による食道癌幹細胞割合および腫瘍PD-L1発現の変化】

免疫染色の結果、PD-L1高発現症例は251例中39例(15.5%)認められた。高発現群と低発現群では、年齢、性別、腫瘍の局在、組織型、pStage、術前補助化学療法の有無、術前治療症例における組織学的効果判定について両群間で統計学的有意差は認めなかった。一方で、予後に関しては、PD-L1高発現群で有意に不良であった(log-rank, p=0.0207, 図1-2)。現在、同一症例での治療前生検組織の免疫染色を行い、治療後にPD-L1発現癌幹細胞が残存するという当初の仮説を検証する。

図1: 食道癌におけるPD-L1発現 (免疫染色)

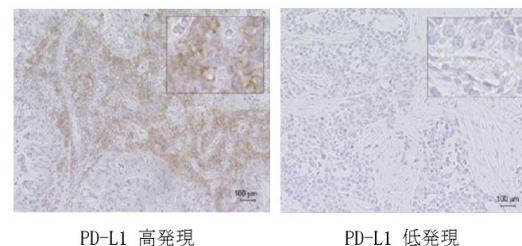
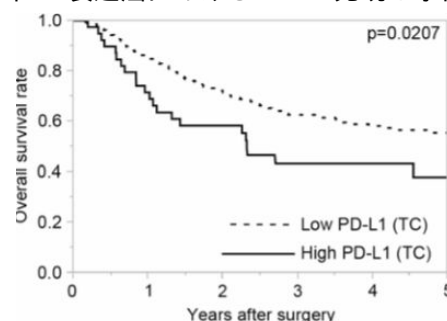


図2: 食道癌におけるPD-L1発現と予後



(2) 【化学療法による免疫関連分子と化学療法効果との相関】

組織学的効果判定の Grade1a-1b を非奏功群、Grade2-3 を奏功群とした。35 例中 13 例 (37.1%) に非奏功群を認めた。以前より報告されている CD8 陽性 T 細胞/CD4 陽性 T 細胞割合や制御性 T 細胞 (Treg) 頻度と治療効果との関連性は認めなかった。一方で、CD8 陽性 T 細胞上の PD-1 発現頻度が高いものほど治療抵抗性であった (図 3-4)。また非奏功群では、治療後に PD-1 発現が上昇する症例を認めた。この結果は、PD-L1/PD-1 経路による免疫回避機構が治療抵抗性に関わることを示唆する。

図 3:食道癌におけるフローサイトメトリー (縦軸:CD45RA 発現、横軸:PD-1 発現)

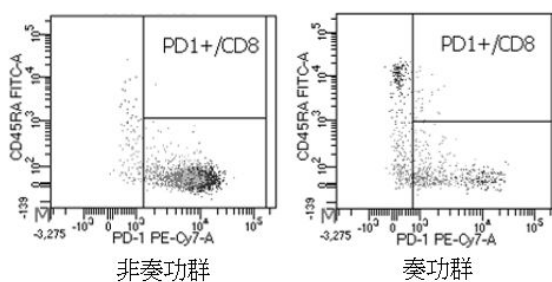
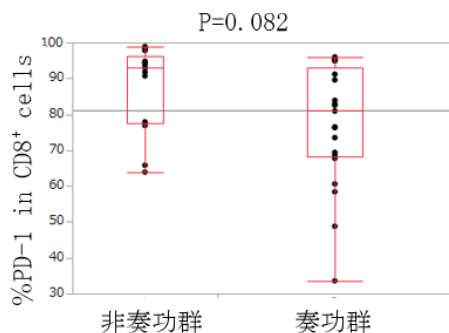


図 4:CD8 陽性 T 細胞上の %PD-1 と治療効果



また末梢血に関しても、化学療法前、day7 (1 コース目)、2 コース開始前、day7 (2 コース目)、手術前の 5 タイムポイントで採取した血液より、末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) を抽出し、保存している。現在、こちらに関してフローサイトメトリーの結果を、cytobanc を用いて奏功群・非奏功群の相違を網羅的に解析している。cytobanc で解析することで、治療前後比較や治療効果比較が信頼性をもって行え、生物学的に意味のある希少細胞群を漏らさず解析可能である。

(3) 【食道癌幹細胞、非幹細胞と健常者由来末梢血単核細胞 (PBMC) との共培養】

初代培養した食道癌組織と同一患者から抽出した PBMC とを共培養し、得られた免疫担当細胞の表現型の変化は、ヒト組織で構築

した免疫プロファイリングとは異なるものであった。この結果は、既存の共培養系では免疫担当細胞を含めたがん微小環境を再現出来ていないことを意味する。新規の共培養系の確立が必要不可欠であり、これまでに構築した免疫プロファイリングがその一助になると考える。

新規共培養系が確立されれば、(4) 【抗 PD-L1 抗体投与による癌幹細胞の変化】、(5) 【抗癌剤と抗 PD-L1 抗体併用による癌幹細胞に対する治療効果の相違】において、信頼性のある結果が得られると考える。

<引用文献>

Dallas NA, Xia L, Fan F, Gray MJ, et al. Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-1 receptor inhibition. *Cancer Res.* 1;69(5):1951-7. 2009

Robert et al. *Advances in Cancer Stem Cell Biology*, Springer 2012

Wei J, Barr J, Kong LY, et al. Glioma-associated cancer-initiating cell induce immunosuppression. *Clin Cancer Res.* 15;16(2):461-73. 2010

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 1 件)

Momose K, Yamasaki M, Tanaka K, et al. MLH1 expression predicts the response to preoperative therapy and is associated with PD-L1 expression in esophageal cancer. *Oncol Lett.* 査読有 14(1):958-964. 2017 年 doi: 10.3892/ol.2017.6215

〔学会発表〕(計 3 件)

浦川真哉, 食道がん腫瘍組織内免疫関連因子を用いた術前化学療法効果予測, 食道学会, 2018 年, 宇都宮

武岡奉均, 食道がんのバイオマーカー DCF 療法の効果予測としての免疫担当細胞の解析, 日本癌治療学会, 2016 年, 横浜

百瀬光太, 食道がんのバイオマーカー 食道癌における MLH-1 発現と化学療法の有効性についての検討, 日本癌治療学会, 2016 年, 横浜

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦川 真哉 (URAKAWA, Shinya)
大阪大学医学部附属病院 消化器外科 医
員

研究者番号：40768975

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()