

平成 30 年 6 月 9 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：16K21533

研究課題名(和文) 肺癌における腫瘍浸潤制御性T細胞が関与する癌微小環境の同定

研究課題名(英文) Identification of tumor microenvironment involving tumor infiltrating regulatory T cells in lung cancer

研究代表者

黒瀬 浩史(Kurose, Koji)

川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：30551139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肺癌微小環境の炎症の有無と局所浸潤制御性T細胞(Treg)の関与を明らかにするため、肺癌手術、気管支鏡検体を用い、腫瘍浸潤リンパ球、Treg分画、および抑制性分子PD-1、TIM-3と、腫瘍細胞のPD-L1との関連性を検討した。肺癌では、PD-L1高発現群では腫瘍浸潤リンパ球が多い一方で、活性化Treg割合も多く、T細胞表面にPD-1、TIM-3高発現を認めた。さらに抗CCR4抗体によるTreg除去により、腫瘍浸潤リンパ球数増加と腫瘍細胞のPD-L1発現上昇を認めた。PD-L1高発現症例では、Treg除去と抗PD-1抗体療法により治療効果を増強させる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, in order to clarify the presence or absence of inflammation of the tumor microenvironment and the involvement of tumor infiltrating regulatory T cells (Treg) in lung cancer, we examined the association of tumor infiltrating lymphocytes, Treg fraction, and inhibitory molecules PD-1, TIM-3 on T-cells with PD-L1 on tumor cells. In the high expression group of PD-L1, there were many tumor infiltrating lymphocytes, whereas there were also many activated Tregs, and high expression of PD-1 and TIM-3 on T cells was observed. Furthermore, Treg depletion using anti-CCR4 antibody resulted in an increase in the number of tumor infiltrating lymphocytes and an increase in the expression of PD-L1 on tumor cells. In the high expression group of PD-L1, Treg depletion and anti-PD-1 therapy may enhance the therapeutic effect.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：肺癌微小環境 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

① 研究の学術的背景

<がんにおける宿主免疫抑制機構と治療法>

近年、がん患者では、抗腫瘍免疫が十分に働いていないことが明らかになった。生体には、本来過剰な免疫を抑える免疫制御のメカニズムが備わっているが、抗腫瘍免疫にも免疫抑制機構が働いている。その一つとして FoxP3 陽性制御性 T 細胞 (Treg) による抑制がある。腫瘍増殖に Treg による抑制が関与している直接の証明はないが、近交系マウスの移植腫瘍を用いた研究で、Treg 除去により腫瘍拒絶が引き起こされることが報告されている (Onizuka et al. *Cancer Res.* 1999)。ヒトでは、肺・卵巣・腎・乳癌において、患者の末梢血、腫瘍原発巣、転移巣、リンパ節に Treg が多いこと、また、その数と腫瘍の悪性度あるいは患者予後との相関が報告されている。さらに近年、T 細胞表面の免疫制御分子 (免疫チェックポイント分子) が明らかにされ、がんに対する免疫抑制機構として、腫瘍組織内におけるこれら分子による抗腫瘍免疫の抑制機構が明らかになった。これら免疫チェックポイント分子を標的とした抗体治療 (抗 CTLA-4、PD-L1/PD-1 抗体) は、抑制性シグナルを阻害することによる顕著な抗腫瘍免疫反応の増強を認めており、その腫瘍縮小効果と、予後延長効果により抗 CTLA-4 抗体はメラノーマ、抗 PD-1 抗体はメラノーマおよび肺扁平上皮癌で FDA の認可を受け、さらに他癌種においても第 III 相試験が実施または計画中である。

<がん治療としての Treg 除去>

石田ら (*Cancer Res.* 2006; *J.Clin Oncol.* 2012) は、ケモカイン受容体 CCR4 が成人 T 細胞白血病 (ATL) の腫瘍細胞表面に発現し、ADCC 活性を高めたフコース除去 CCR4 抗体 (モガムリズマブ) を用いることにより、ATL に対する劇的な治療効果を報告している。同時に CCR4 は、FoxP3 陽性 Treg 表面に高発現し、抗 CCR4 抗体によって FoxP3 陽性 Treg 除去が可能であることを示唆している。我々はこれまで、①肺癌局所では、腫瘍関連マクロファージが産生するケモカイン CCL22 の作用により CCR4 陽性 Treg が末梢から局所に多く集積すること (下図)、さらに②抗 CCR4 抗体を用いた末梢血 CCR4 陽性 Treg 除去による免疫増強効果を *in vitro* で明らかにした (Kurose et al. *J Thorac Oncol.* 2015)。このデータを基盤とし、Treg 除去を目的とした「固形がんに対する抗 CCR4 抗体療法第 Ia/Ib 相医師主導治験」を実施中である。しかしながら固形がん患者において、Treg 除去が有効となる患者群は明らかとなっていない。本研究では、腫瘍局所の炎症の有無と腫瘍浸潤 Treg 分画および免疫制御分子を解析し、Treg によって抗腫瘍免疫が抑制されている腫瘍環境を同定することで、真に Treg 除去が有効となる患者群を選

別するためのバイオマーカーを明らかにする。

2. 研究の目的

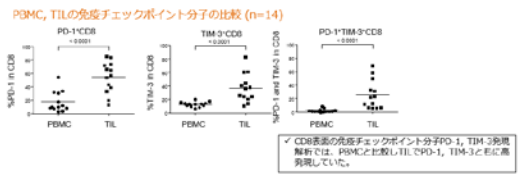
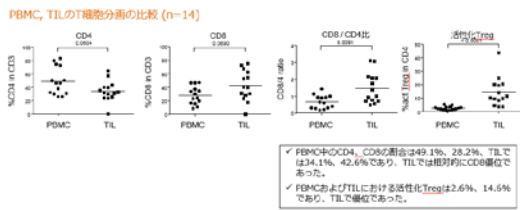
Treg によって抗腫瘍免疫が抑制されている腫瘍環境を同定し、真に Treg 除去が有効となる患者群を選別するバイオマーカーを明らかにする。

3. 研究の方法

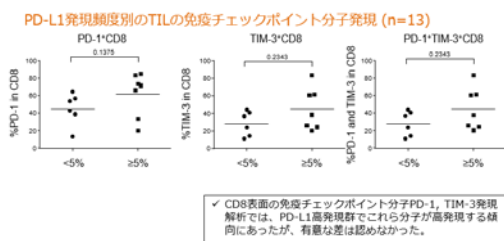
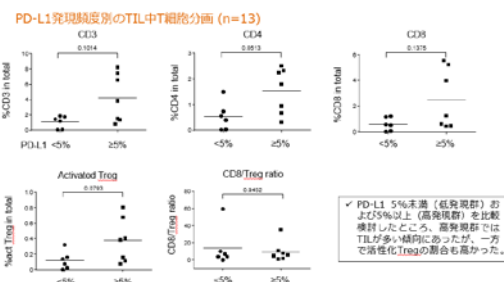
本研究では、肺癌微小環境における局所浸潤 Treg の関与を明らかにする。肺癌手術症例、気管支鏡症例の組織よりリンパ球浸潤の多寡と腫瘍の PD-L1 発現を解析し、これにより局所の炎症の有無を判定する。さらに同一症例から TIL を分離し、TIL 中の Treg 分画を同定、免疫活性化・抑制性分子 (PD-1、TIM-3) を解析することで、癌微小環境の違いによる Treg 分画の特徴を明らかにする。手術症例、気管支鏡検査症例において切除、生検標本から免疫組織化学染色の実施および TIL を採取する。臨床検体を使用することから、倫理委員会 (川崎医科大学同附属病院倫理委員会 承認番号 2071、UMIN 登録番号: 000016678) の承認を得た。検体採取にあたり、手術症例は切除検体の一部、また気管支鏡検査症例は通常診療で行う範囲内での検体採取とし、病理診断に支障のない範囲で研究用検体への利用を行い、患者に新たな侵襲が加わらないよう配慮する。気管支鏡検体は微小な組織検体であることから、TIL 採取困難となる可能性があるが、前段階で行った実験で微小な組織検体から TIL を解析する手法を確立した。具体的には、手術検体の場合は約 5 mm<sup>3</sup> 以上、気管支鏡検体の場合は生検検体 3 個以上確保を行い、組織のホモジネート、赤血球破砕処理を迅速に行い、フローサイトメトリーによる解析を行う。TIL の解析では組織の凝集が常に問題となるため、必ず新鮮検体で処理を行い、組織の運搬あるいは検体処理中は EDTA 添加メディウムを使用する。

4. 研究成果

本研究では、肺癌微小環境の炎症の有無と局所浸潤 Treg の関与を明らかにするため、肺癌手術、気管支鏡検体を用い、腫瘍局所浸潤リンパ球、Treg 分画、および抑制性分子 PD-1、TIM-3 をフローサイトメトリー法で解析し、さらに腫瘍細胞の PD-L1 を免疫染色し、これら分子と PD-L1 発現との関連性を検討した。気管支鏡検査症例 14 例における解析では、末梢血と比較し腫瘍局所では CD4 に比べ CD8 優位であり、CD8 上の抑制性分子 PD-1<sup>+</sup>TIM-3<sup>+</sup>、および PD-1<sup>+</sup>TIM-3<sup>-</sup>分画が腫瘍局所で増加していた。これらの結果は手術症例 12 例においても同様の傾向であった。次に PD-L1 (SP142) による免疫染色を行った。気管支鏡検査症例 14 例のうち、PD-L1 5%未満発現症例は 7 例 (50%)、5%以上発現症例は 7 例



(50%) であり、50%以上発現症例は 4 例 (29%) であった。PD-L1 5%未満 (低発現群) および 5%以上 (高発現群) の症例を比較検討したところ、高発現群では腫瘍浸潤 CD3<sup>+</sup>T 細胞が多い傾向にあったが、一方で活性化 Treg の割合も高く、CD4<sup>+</sup>T 細胞上に PD-1<sup>+</sup>TIM-3<sup>+</sup>が高発現していた。また PD-L1 低発現群では、腫瘍浸潤 T リンパ球は少ない傾向にあったが、一部の症例では CD8/Treg 比が低く、Treg 優位な腫瘍環境を示す症例が存在し、それらの症例では CD4<sup>+</sup>T 細胞上に PD-1<sup>+</sup>TIM-3<sup>+</sup>が高発現していた。



肺癌において PD-L1 低発現群では腫瘍浸潤リンパ球が少なく、免疫抗体療法不応性となる可能性が高いが、一部の症例で Treg 優位な症例が存在し、Treg 除去が有効となる可能性がある。また、PD-L1 高発現群では腫瘍浸潤リンパ球が多い傾向にあったが、活性化 Treg も誘導されており、抗 PD-1 抗体療法に Treg 除去を組み合わせることで治療効果を増強させる可能性がある。

本研究では、さらに、「固形がんに対する抗 CCR4 抗体療法第 Ia/Ib 相医師主導治験」に登録された肺癌患者で付随研究に同意した症例について腫瘍局所の状態を解析した。

ヒト化抗 CCR4 抗体投与により末梢血 Treg 除去された肺癌症例で、治療後に再生検を施行した症例を解析したところ、いずれも CCR4<sup>+</sup>Treg の減少を確認した。さらに一部の症例で CD3<sup>+</sup>T 細胞、PD-1<sup>+</sup>細胞の増加および腫瘍細胞における PD-L1 発現上昇を認め(図)、Treg 除去により腫瘍微小環境に炎症を惹起しうることを示唆する結果が得られた。

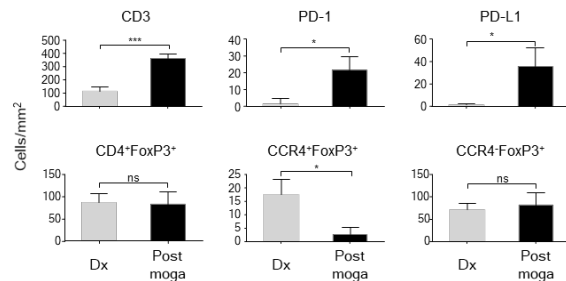


図 診断時および抗 CCR4 抗体 (mogamulizumab) 投与後における腫瘍微小環境の変化

## 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 Kodama S, Kurose K, Mukai T, Morita Y. Nivolumab-induced polyarthrititis. *BMJ Case Rep*. 査読有, 2017 Dec 2  
Doi: 10.1136/bcr-2017-223387

② 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. *J Immunother*. 査読有, 2017 Mar 23.  
Doi: 10.1097/CJI.000000000000162.

③ 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 Immunol Res*. 査読有, 2016 Dec. 4(12):1049-1060.

Doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0266

〔学会発表〕(計6件)

①黒瀬 浩史, 大植 祥弘, 磯辺 みどり, 鈴木 進, 和田 尚, 上田 龍三, 中山 睿一, 岡 三喜男、Reviving chemotherapy sensitivity after anti-CCR4 mAb (mogamulizumab) treatment in lung cancer patients. 第15回日本免疫治療学研究会学術集会、2018/2/17、国内

② 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, 2017/10/17, 国内

③ 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 International Cancer Immunotherapy Conference. 2017/09/06, 国外

④黒瀬浩史、大植祥弘、磯辺みどり、西尾祐美、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、2016/12/19、国内

⑤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Ia相他施設共同医師主導治験、第113回日本内科学会講演会、2016/4/15、国内

⑥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Ia相他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、2016/4/8、国内

〔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〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒瀬 浩史 (Kurose, Koji)  
川崎医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30551139

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

大植 祥弘 (Ohue, Yoshihiro)  
川崎医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70435014

中山 睿一 (Nakayama, Eiichi)  
川崎医科大学・客員教授  
研究者番号：60180428

岡 三喜男 (Oka, Mikio)  
川崎医科大学・医学部・教授  
研究者番号：40223995