

令和元年5月22日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15957

研究課題名(和文) CD4Treg 高抑制能サブセットが大腸癌に及ぼす影響に関する研究

研究課題名(英文) The influence of highly suppressive CD4Treg subset on colorectal cancer

研究代表者

平川 昌宏 (Hirakawa, Masahiro)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：50561023

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)：CD4Tregは抗腫瘍免疫を抑制し腫瘍の増殖を促すと考えられている。CD4Tregにはいくつかのサブセットが存在すると考えられているが、そのマーカーは未だ確立していない。研究代表者はこれまで転写因子であるHeliosの発現がCD4Tregの抑制能に関連するマーカーであることを報告してきた。本研究ではこれらの知見を大腸癌に応用し、新規予後予測因子などの臨床応用への基盤となる研究を行った。大腸癌患者においては、末梢血中及び腫瘍浸潤リンパ球におけるHelios陽性CD4Tregの割合が上昇しており、更には大腸癌患者間ではCD4TregにおけるHeliosの発現は予後に関連している可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、がん研究において免疫の分野は非常に注目されている。中でも、制御性T細胞(Treg)は抑制性のT細胞として重要な働きを担っていると考えられているが、最近ではTregの中でも異なる機能を有したいくつかのサブセットがあることが報告されてきている。しかしながら、そのサブセットをわける明確なマーカーやその機能は十分に解明されているとはいえない。本研究は、Tregの活性化マーカーの可能性のあるHeliosに注目し、大腸癌患者における予後との関連性を解析した貴重な研究であるとする。今後、更なる検討をかさね、予後予測としての活用や治療標的としての可能性なども探索していく予定である。

研究成果の概要(英文)：CD4Tregs are thought to suppress anti-tumor immunity and promote tumor growth. It has been reported that there are several subsets of CD4Tregs, which are functionally and phenotypically heterogeneous. However, the markers that distinguish those subsets are not fully elucidated. We previously reported that the transcription factor Helios is one of the markers associated with the suppressive activity of CD4Tregs. In this research, we analyzed the expression of Helios within CD4Tregs in peripheral blood (PB) and tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in patients with colorectal cancer (CRC). We verified that the proportion of Helios positive CD4Tregs in PB and TIL is increased in patients with CRC. These results suggest that Helios expression in CD4Tregs may be related to prognosis in CRC patients.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸癌 CD4Treg Helios

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

#### 1. 研究開始当初の背景

近年免疫チェックポイント阻害剤は様々ながん種において効果が認められており、免疫療法はますます期待される治療法となっている。Treg は、免疫応答の抑制的な制御、すなわち免疫寛容を司るCD4 T cellの一群であり、がん免疫においては抗腫瘍免疫を抑制し腫瘍の増殖を促進すると考えられている。実際、様々な癌種において末梢血や腫瘍組織内のCD4Treg数は健常人と比べ増加していることが報告されており、CD4Tregの増加レベルと腫瘍の進行は相関することが分かってきている。CD4Tregには、いくつかの機能的にHeterogeneousなサブセットがあると考えられており、様々なSurface markerや転写因子などのIntracellular markerがCD4Tregのサブセットを明らかにするために研究されてきている。

最近の知見ではHeliosの発現はCD4Tregの活性化、増殖能、抑制能と関連している可能性が示唆されている。この知見を大腸癌の腫瘍免疫に応用し、大腸癌患者の末梢血中や腫瘍浸潤リンパ球(TIL)におけるCD4Treg中のHeliosの発現とその役割を解明することは、予後予測や、免疫チェックポイント阻害剤をはじめとするがん免疫療法の効果予測、場合によってはHelios+ CD4Treg自体ががん免疫療法の新たなターゲットとなる可能性も秘めており、非常に重要であると考えられる。

#### 2. 研究の目的

大腸癌患者の末梢血中や腫瘍浸潤リンパ球(TIL)におけるCD4Treg中のHeliosの発現とその役割を解明し、新規予後予測因子としてや新規治療ターゲットとしての臨床応用への基盤となる研究を行う。

#### 3. 研究の方法

(1) 大腸癌患者の末梢血中および腫瘍浸潤リンパ球(TIL)中のCD4Tregサブセットの解析  
・健常者と大腸癌患者の末梢血中および大腸癌患者のTILと正常大腸粘膜におけるCD4Tregのサブセットを解析し、大腸癌患者末梢血や、TILにおけるCD4TregでHeliosの発現が亢進しているかどうかを確認する。

(2) 大腸癌TIL中のHelios+CD4TregおよびHelios-CD4Tregの機能的な違い  
・各CD4Tregサブセットのサイトカイン産生能の解析  
CD4TregをHelios陽性群とHelios陰性群にわけ、各々のサブセットにおけるIFN $\gamma$ の発現をフローサイトメトリーにて確認する。

(3) 各ステージにおけるHelios陽性Tregの発現  
・大腸癌患者をStage I ~ IVにわけ、各ステージにおけるCD4Treg中のHelios陽性細胞の割合をフローサイトメトリーにて確認する。

(4) Helios+CD4Tregの発現による大腸癌の予後解析  
・大腸癌患者の末梢血中およびTIL中のHelios+CD4Tregの発現によって、Helios高発現群と低発現群にわけ、各Stage別にPFSを解析し、予後との相関を確認する。

#### 4. 研究成果

(1) 大腸癌患者の末梢血中および腫瘍浸潤リンパ球(TIL)中のCD4Tregサブセットの解析  
末梢血中のCD4Tregの解析については、ヘルシードナーもしくは当院で診断された大腸癌患者から採取した血液から末梢血単核球(PBMCs)を分離しFlowcytometryにてCD4Treg中のHeliosの発現を解析した。TILに関しては、同様に当院にて診断・治療を受ける大腸癌患者の手術検体もしくは生検検体を単細胞化し、PBMCs同様にFlowcytometryにてCD4Treg中のHeliosの発

現を解析した。ヘルシードナーにおける PBMCs 中の CD4/CD8 比は 1.18(0.95-1.81), 大腸癌患者における PBMCs 中の CD4/CD8 比は 2.24(1.23-3.94)と、大腸癌患者において CD4 T 細胞の増加を認めた。両群における末梢血 CD4 T 細胞中の Treg の割合はヘルシードナーで 7.5%(4.1%-12.2%), 大腸癌患者においては 10.1% (4.3%-20.2%)と両群に有意差は見られなかった。しかしながら, Treg 中の Helios の発現をみてもヘルシードナーで 51.8% (44.3%-60.2%), 大腸癌患者においては 70.1% (43.2%-75.7%)と大腸癌患者においては Helios 陽性の Treg の割合が上昇していることが確認された。

TIL における CD4Treg の割合は 24.2% (8.2%-35.8%)と正常粘膜における Treg(7.2%)よりも増加を認めた。更には TIL 中の Helios 陽性 Treg の割合は 70.2% (45.3%-78.9%)と正常粘膜における Helios 陽性 Treg の割合 (48.2%) と比べ、著明な上昇を確認した。

#### (2) 大腸癌 TIL 中の Helios+CD4Treg および Helios-CD4Treg の機能的な違い

TIL 中の CD4Treg を Helios 陽性群と Helios 陰性群にわけ、各グループにおける IFN の発現を解析したところ、Helios 陽性群においては IFN 陽性細胞は 2.5%(1.3%-5.5%), Helios 陰性群においては IFN 陽性細胞は 9.6%(5.6%-13.5%)であり、Helios 陽性細胞群は T 細胞活性化に対する抑制能を有するいわゆる Treg であるのに対して、Helios 陰性 Treg は通常の Treg とは異なる、サイトカイン産生能などの異なる機能を有するサブセットである可能性が示唆された。

#### (3) 各ステージにおける Helios 陽性 Treg の発現

大腸癌患者をステージ別にわけ、各ステージにおける末梢血 CD4Treg 中の Helios 陽性細胞の割合を解析してみると、StageI: 50.1%(43.2%-51.7%), StageII: 58.1%(54.1%-62.8%), StageIII:70.1%(60.7%-73.9%), StageIV: 71.9%(64.2%-75.7%)と、ステージが進行するにつれ Helios 陽性 CD4Treg の割合が増加する傾向がみられた。

TIL 中においても、CD4Treg 中の Helios 陽性細胞の割合を解析してみると、StageI: 48.1%(45.3%-56.9%), StageII: 59.2%(55.9%-65.2%), StageIII:73.9%(60.5%-75.3%), StageIV: 75.2%(65.7%-78.9%)と、ステージが進行するにつれ Helios 陽性 CD4Treg の割合が増加する傾向を確認した。

#### (4) Helios+CD4Treg の発現による大腸癌の予後解析

解析対象となっている大腸癌患者を各ステージ毎に更に Helios 高発現群、低発現群にわけ PFS、OS などの予後解析を行っている。現時点では症例数が十分ではなく、明らかな傾向は見いだせていないものの、今後更に症例を蓄積し解析を継続していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：  
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：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。