

令和元年6月3日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16790

研究課題名(和文) 泌尿器科癌組織内における免疫状態の解明と新規治療標的因子の探索

研究課題名(英文) Clarification of immune status in urological cancer tissues and identification for novel therapeutic targets

研究代表者

河嶋 厚成 (Kawashima, Atsunari)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50746568

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)：腎細胞癌および尿路上皮癌において癌組織内浸潤Tリンパ球(TILs)の発現様式を検討し発現様式と悪性度が有意な相関を示すことを明らかにした。
またTILsをCD4、CD8T細胞各々でPD-1、TIM-3の発現様式に基づいて分画化して機能を評価することで、腎細胞癌において高悪性度腫瘍ではCD8疲弊化分画の上昇、制御性T細胞分画の上昇、CD4多機能性の低下を認め、抗PD-1抗体単剤治療で予後不良であることを見出した。以上から現在の抗PD-1抗体単剤に対する難治性の症例に対してCD8T細胞の再活性化、制御性T細胞の腫瘍内環境からの除去、CD4T細胞多機能性の回復が必要であると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗PD-1抗体をはじめとする免疫チェックポイント分子を標的とした癌免疫療法は有望な治療であるものの、その効果は限定的である。当研究では、ヒト組織から抽出した癌組織内リンパ球の機能を評価し、腫瘍の悪性度と癌組織内リンパ球の機能が相関すること、また腫瘍の悪性度が抗PD-1抗体の治療効果と有意に相関することを明らかにした。これは、現在存在していない、腎細胞癌に対する抗PD-1抗体治療の効果予測因子として重要な意味を持つと考えている。

研究成果の概要(英文)：We examined the expression pattern of infiltrating T lymphocytes (TILs) in cancer tissues in renal cell carcinoma and urothelial carcinoma and revealed that expression pattern significantly correlated with tumor malignancy.

In addition, TILs are fractionated based on the expression pattern of PD-1 and TIM-3 of both CD4 and CD8 T cells to evaluate their functions. We found that fraction of exhausted CD8 T cells and regulatory CD4 T cells were elevated and the multi-functionality of CD4 T cells was decreased. Moreover, the prognosis of patients with high grade tumor treated by anti PD-1 antibody was poor. From the above, 1) reactivation of CD8 T cells, 2) removal of regulatory T cells from the tumor environment and 3) recovery of multi-functionality of CD4 T cell are necessary for the refractory case against the current anti-PD-1 antibody single agent.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：腎細胞癌 尿路上皮癌 PD-1 TIM-3 ニボルマブ 効果予測 予後予測

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

1. 研究開始当初の背景

イムノチェックポイント分子を標的とした癌免疫療法の進歩はめざましく、各癌種に対する優れた効果が報告されている。癌免疫療法には 免疫活性化: 癌ワクチン療法、癌抗原特異的 T 細胞輸注療法等、免疫抑制解除: 免疫チェックポイント阻害療法の 2 つの軸がある。これらは今後の癌免疫療法の発展において注目すべき治療法であるが、治療効果が限定的であることや重篤な副作用が一定の割合で出現することなど解決すべき点は未だ多い。

これらを解決するための大きな方向性として、

(1) 癌局所内での免疫活性系及び抑制系細胞発現解析に基づいた包括的免疫状態評価の理解

(2) 臨床的意義を有する癌局所内免疫担当細胞の発現意義の解明

が急務であり、上記を明らかにすることで治療方法の層別化ならびに治療補助方法の確立・新規治療標的因子の探索が可能となると考えている。

これまで、研究代表者は泌尿器科癌(腎細胞癌・尿路上皮癌)の外科切除新鮮標本から抽出した免疫担当細胞を用いてフローサイトメトリーによる解析を行い、癌局所内免疫状態の評価および臨床的意義の探索を行ってきた。その結果、腎細胞癌(80 症例 109 サンプル)局所内免疫状態を 10 種類の免疫担当細胞発現分画を用いて Unsupervised clustering 解析で評価したところ、

(1) 腫瘍の悪性度と有意に相関を認める 3 群に大別されること

(2) 各 3 群は転移無し生存率および非再発率と有意な相関を示し、予後に関与すること

を明らかにしてきた(Kawashima et al. Can Immunol Immunother 2018)。又当 Group I&II において高発現を認める免疫イムノチェックポイント分子の一つである CD8+TIM-3+の発現割合が、尿路上皮癌(58 症例)においても腫瘍深達度および腫瘍悪性度と有意な相関を示すことを見出した。以上の結果から、複数癌種に渡り、癌局所内免疫状態は腫瘍の悪性度や予後と有意に相関を示し、両者の相互関係の理解が重要であることが示された。

2. 研究の目的

当研究では、現在臨床応用されている抗 PD-1 抗体に続く新規免疫チェックポイント分子として、その抗体薬が既に開発・臨床治験されている TIM-3 に注目し、T 細胞における TIM-3 発現調整のメカニズムと発現意義を明らかにし、治療効果予測を伴った新規治療標的因子の探索を行う。

3. 研究の方法

T リンパ球上の TIM-3 発現は、血液内、正常組織内リンパ球ではほぼ認めない一方、癌組織内リンパ球では発現の程度に明らかな患者間の差を認めることを見出した。又、複数癌種において、その発現が腫瘍の悪性度と相関を認めており、TIM-3 発現のメカニズムを解明することで、癌細胞と免疫担当細胞との相互関係の解明が可能になると考えている。当研究では、これまで臨床検体の解析から得られた知見を元に、下記 3 項目を主たる目的として研究を行った。

(1) 癌組織内 T 細胞上における TIM-3 発現調節機構の解明とその機能解析

我々の知見では、T 細胞上における TIM-3 発現は、癌組織内においてのみ CD4、CD8 両者に発現しており、多段階性を踏むことが判明している。以上の結果から、血液中のリンパ球および癌局所内リンパ球での PD-1/TIM-3 の発現状態に基づいてソーティングを行い、採取された細胞を用いて RNA シークエンスを行うことで TIM-3 発現に基づいた機能評価を行う。

また、癌組織内リンパ球を用いて、サイトカイン産生能および細胞障害活性機能の評価を行い、各々の機能の裏付けを行った。

(2) 癌組織内 T 細胞上における TIM-3 発現の有無に影響を及ぼす腫瘍因子の同定

癌局所内 T 細胞上 TIM-3 発現の有無によって、層別化を行うことで、前述の通り、腫瘍の悪性

度と相関をすることが示された。このことから、腫瘍内リンパ球を採取した際に凍結保存している腫瘍サンプルから抽出した RNA を用いてマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行うと同時に *in silico* 解析を行い、T 細胞上 TIM-3 発現に影響を及ぼしうる、より詳細な腫瘍因子を同定する。

(3) 癌組織内 T 細胞の機能に影響を及ぼす臨床因子とニボルマブ治療の効果予測

当院においてニボルマブ単剤治療を施行した転移性腎細胞癌患者 17 例を用いて、T 細胞の機能に影響をおよぼす因子が、効果予測となりうるかを検討した。

4. 研究成果

(1) 癌組織内 T 細胞上における TIM-3 発現調節機構の解明とその機能解析

末梢血 T 細胞 (PBMC)、癌組織内浸潤 T 細胞 (TIL) と正常組織内浸潤 T 細胞 (NIL) が同時にサンプリングされた 48 人の患者を比較したところ、CD8 T 細胞では、PD-1 の発現強度は TIL、NIL、PBMC の順に高く、TIM-3 の発現は PD-1 の発現が高い場合にのみ認められた。CD4 T 細胞では、CD8 T 細胞と同様に、PD-1 発現の強度は TIL、NIL、PBMC の順で高く、TIM-3 発現が高い集団は 2 つのグループに分類された。CD8 T 細胞を 4 つのグループに (Fr. I : PD-1-TIM-3-、Fr. II : PD-1dimTIM-3-、Fr. III : PD-1+TIM-3-、Fr. IV : PD-1+TIM-3+) および CD4 T 細胞を 5 つのグループに分けた (Fr. I : PD-1-TIM-3-、Fr. II : PD-1dimTIM-3-、Fr. III : PD-1+TIM-3-、Fr. IV : PD-1+TIM-3+、Fr. V : PD-1dimTIM-3+)。TIL と NIL が同時にサンプリングされた 48 人の患者では、NIL と TIL の間の頻度は、CD8 T 細胞の全画分と Fr. IV を除く CD4 T 細胞の 4 画分で有意に異なっていた。

次に RNA シークエンスを用いて CD4、CD8 T 細胞の各 8 集団の特徴を決定した。Gene set enrichment analysis (GSEA) では、CD8 T 細胞における PD-1+Tim-3+ および CD4 T 細胞における PD-1dimTim3+ の集団がそれぞれ疲弊化 CD8 T 細胞および制御性 CD4 T 細胞として特徴付けられた。多機能性および細胞傷害性機能性の結果はこれらの結果と一致していた。また、高悪性度 (Grade 3、4) を有する患者では、これらの細胞集団が両者とも高い割合を有する患者群が有意に上昇していた ($p < 0.05$)。

非常に興味深いことに、CD4 T 細胞および CD8 T 細胞の上記以外の個別の分画内において、腫瘍悪性度の低い患者のサイトカイン産生能は腫瘍悪性度の高い患者のサイトカイン産生能と比較して有意に高いことが分かった。これらの結果から、腫瘍の悪性度は癌組織内における全般的なリンパ球の機能低下と有意に相関していることが分かった。

2) 癌組織内 T 細胞上における TIM-3 発現の有無に影響を及ぼす腫瘍因子の同定

上記を踏まえて、The Cancer Genome Atlas の腎細胞癌データから腫瘍悪性度と有意に相関をきたしうる somatic mutation の同定を試みたが、単一の変異同定には至らず腫瘍の悪性度とリンパ球との直接的な関係性を明らかにする *in vitro* の実験は行えなかった。

3) 癌組織内 T 細胞の機能に影響を及ぼす臨床因子とニボルマブ治療の効果予測

最後に、セカンドライン以上の治療としてニボルマブ単独療法で治療された 17 人の RCC 患者を、腫瘍グレードによって層別化された治療効果について評価した。全患者の Progression Free Survival (PFS) 中央値は 6.35 カ月であった (95% 信頼区間 [CI]、0.0-16.0)。サブグループ分析において、低悪性度腫瘍を有する患者 ($n = 8$) の PFS は、高悪性度腫瘍を有する患者 ($n = 9$) よりも優れていた ($P = 0.006$)。また全患者の Cancer Specific Survival (CSS) の中央値は 20.5

か月 (95%CI、4.28-36.75)であった。サブグループ分析は、低悪性度腫瘍を有する患者 (n=8) の CSS が高悪性度腫瘍を有する患者 (n=9) よりも良好であることを示した (P=0.009)。多変量回帰分析により、MSKCC リスク分類とともに、腫瘍悪性度 (ハザード比[HR]:19.22、95%CI:1.53-242.16、P=0.022) が PFS 時間の独立した予測因子であることが証明された。同様に、MSKCC リスク分類と共に CSS 期間の独立した予測因子として、腫瘍悪性度が同定された (HR:17.05、95%CI:1.15~252.83、P=0.039)。

以上から腫瘍の悪性度と癌組織内リンパ球の機能が相関すること、また腫瘍の悪性度が抗 PD-1 抗体の治療効果と有意に相関することを明らかにした。これは、現在存在していない、腎細胞癌に対する抗 PD-1 抗体治療の効果予測因子として重要な意味を持つと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kawashima Atsunari, Kanazawa Takayuki, Jingushi Kentaro, Kato Taigo, Ujike Takeshi, Nagahara Akira, Fujita Kazutoshi, Morimoto-Okazawa Akiko, Iwahori Kota, Uemura Motohide, Imamura Ryoichi, Wada Hisashi, Nonomura Norio
Phenotypic Analysis of Tumor Tissue Infiltrating Lymphocytes in Tumor Microenvironment of Bladder Cancer and Upper Urinary Tract Carcinoma Clin Gen Can 2019 (17) 114-24.

〔学会発表〕(計 4 件)

Atsunari Kawashima 他 The significance as a prognostic predictor of immunological phenotype in urothelial carcinoma varies depending on the tumor sites AUA annual meeting 2018.5.14 Boston USA.

Atsunari Kawashima 他 Overall dysfunction of T cells was significantly correlated with tumor grade in Renal Cell Carcinoma patients 35th Korea-Japan Urological Congress 2018.12.07 Okinawa Japan.

河嶋厚成 他 膀胱癌と上部尿路上皮癌における癌局所内免疫状態の比較 第 77 回日本癌学会総会 2018.9.28 大阪国際会議場 (大阪)

河嶋厚成 他 腎細胞癌の腫瘍悪性度は癌組織内 T 細胞の機能低下と有意な相関を示す 第 68 回泌尿器科学会中部総会 2018.10.04 名古屋国際会議場 (名古屋)

〔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。