

令和元年5月27日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16892

研究課題名(和文)腫瘍微小環境における免疫抑制細胞の作用と機序の解明と新規治療法への発展

研究課題名(英文)Development of novel treatment to target immune suppressive cells in tumor microenvironment

研究代表者

伊原 史英 (Ihara, Fumie)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：40779906

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)：制御性T細胞(Regulatory T cell)は、癌微小環境では抗腫瘍免疫を抑制して癌細胞の増殖や進展に深く関わる細胞である。

本研究では、頭頸部癌患者に有意に活性型Tregの割合で増加していること、この細胞集団がNKT細胞や細胞傷害T細胞などの他の免疫細胞の機能を抑制することを示した。さらに、頭頸部癌患者の活性型Tregに有意に発現が増加する遺伝子群を同定し、今後は症例数を増やして治療標的の妥当性について検討を行う必要がある。また既に頭頸部癌に対して適応となっている抗がん剤を用いることで、Tregの機能の抑制、さらにTregにより抑制された他の免疫細胞の機能回復につながることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部癌患者では、増加した活性型Tregにより臨床経過が不良となることから、パクリタキセルや、活性型Tregに特異的な遺伝子や表面抗原などを標的とした新規治療の開発は、Tregの抑制効果を減弱させ、担癌患者における免疫抑制の解除につながることから、今後の頭頸部癌患者の新たな治療戦略の確立という点において非常に有意義と考える。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Treg) reportedly play a crucial role in suppressing anti-tumor immunity in advanced cancer patients. We demonstrated increased numbers of activated Tregs in the peripheral blood of head and neck cancer (HNC) patients and confirmed that Tregs exerted a potent suppressive effect on other immune cells. Thus, we aimed to detect activated Treg-specific genes as a diagnostic biomarker for recurrence or metastasis of HNC and evaluate the utility of paclitaxel (PTX) in selectively suppressing the Treg function. We identified several candidate genes whose expression was specific for Tregs derived from advanced HNC patients. Low-dose PTX suppressed Treg proliferation and the cytokine function, but not in cytotoxic T cells. The suppressive effects of PTX on Tregs could lead to the restoration of other immune cell functions, such as the cytotoxic activity of NKT cells. Our results suggest the possible utility of Treg-targeted therapy as a therapeutic strategy for advanced HNC.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：制御性T細胞 頭頸部扁平上皮癌 骨髄性抑制細胞 effector Treg NKT細胞

1. 研究開始当初の背景

制御性 T 細胞 (Regulatory T cell) は、末梢の免疫寛容に関わる重要な免疫細胞である一方で、癌微小環境では抗腫瘍効果を有する免疫細胞の働きを抑制することで癌細胞の増殖や進展に深く関わる細胞として、注目を集めている。

また進行期頭頸部癌に対しては、抗がん剤、放射線療法、手術療法が標準治療として行われている。近年では、これらの集学的治療の発達により局所制御率が改善する一方で、遠隔転移や再発が予後不良因子となり、進行期頭頸部癌症例の予後の改善を妨げている。同時に、頭頸部は、呼吸や嚥下、発声などの日常生活で重要な機能を担う領域であることから、標準治療後に完全寛解に至った症例においても、治療後に著しい QOL の低下を招く症例も少なくない。

このような状況から、頭頸部癌、特に進行期頭頸部癌の治療においては、遠隔・再発を早期に発見するバイオマーカーの探索と治療後に QOL の維持を期待できる新規治療法の開発が望まれる。

そこで、我々はこれまでに進行頭頸部癌患者の末梢血を構成する免疫細胞のバランスを解析することで、様々な免疫細胞のうち、末梢血リンパ球分画中 Treg 割合の増加が治療効果や臨床経過の増悪に関与することを報告した。この結果から、今後の頭頸部癌患者、特に進行癌の患者において増加した Treg が抗腫瘍免疫を強く抑制していると考えられ、予後改善には Treg による抗腫瘍免疫の抑制を解除することが、有効な治療効果を得るために非常に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、頭頸部癌患者を対象として細胞障害 T 細胞や NK 細胞、NKT 細胞に対する Treg の抑制効果とその機序を解明することを目的とする。特に近年報告された表面分子 CD45RA と転写因子 Foxp3 の発現による機能的分類に基づいて、Treg のうち抑制作用の強い effector Treg の分画に注目した。この effector Treg が抗腫瘍免疫細胞に及ぼす抑制効果とその機序について明らかにするとともに、機序解明を通して Treg に特異的な遺伝子やターゲット分子を探索した。Treg に特異的に発現している遺伝子の同定は、過去に申請者が報告したようにフローサイトメトリーで末梢血リンパ球分画中 Treg 割合を評価する方法と比較して、より簡易的で再現性の高い結果が期待できる Treg の新たな評価方法の確立につながり、頭頸部癌治療において課題となっている再発、転移の早期診断を可能とする。また、ターゲット分子の同定により、Treg の機能を選択的に抑制できれば Treg によりもたらされる免疫抑制を解除することが可能となり、抗がん剤や放射線治療などの標準治療のみではなく、免疫チェックポイント阻害薬や分子標的薬などの新規治療法の臨床効果を増強しうると考えた。

3. 研究の方法

(1) 頭頸部扁平上皮癌患者の末梢血解析

千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉・頭頸部外科を受診し、新規に頭頸部扁平上皮癌と診断された患者と良性腫瘍と診断された患者のうち、研究参加に同意を得られた患者を対象とした。

Foxp3 染色を行わず、Treg 上の細胞表面抗原のみで、表面分子 CD45RA と転写因子 Foxp3 の発現に基づいた Treg の機能的分類に相当する分離方法を探索した。この同定方法を用いて、FACS Aria により単離された抑制作用の強い effector Treg と抑制効果の弱い naive Treg から mRNA を抽出して、各分画の遺伝子発現パターンについて比較した。

(2) Treg による抑制効果とその機序に関する検討

各患者より末梢血を採取し、リンパ球比重分離液を用いて末梢血単核球分画を単離した。末梢血単核球分画中の T 細胞、NK 細胞、NKT 細胞、MDSC 細胞、Treg の割合についてフローサイトメトリーにより測定した。さらに、Treg に関しては機能を反映するとされている CTLA-4 や PD-1/PD-L1 の発現、CCR4 の発現についても検討した。

Treg を NKT 細胞や T 細胞、樹状細胞などと共培養を行い、他の免疫細胞に対する抑制効果と機序について検討を行った。

評価は、増殖能、細胞数はフローサイトメトリーを用いて、サイトカイン産生は培養上清を用いて Cytometric Bead Assay (CBA) を行った。また細胞障害活性は、腫瘍株との共培養後にアポトーシス細胞の割合をフローサイトメトリーで評価した。

(3) effector Treg をターゲットとした治療法の有効性に関する検討

Treg を標的とした新規治療法の開発に向けて、抑制効果を有するとされる薬剤を複数用いて Treg の増殖能や、他の免疫細胞に対する抑制効果について検討を行った。

さらに、この治療法の臨床応用に向けて *in vivo* の検討が必須であったため、マウス担癌モデルを作成し、既存の治療法との併用による抗腫瘍効果の増強が得られるかについて評価を行った。マウス担癌モデルの作成には、扁平上皮癌の腫瘍株を用いた。

一定量の腫瘍株を腹部皮下に注射し、腫瘍が生着したことを確認したのちに、パクリタキセル (Paclitaxel: PTX) の至適濃度と至適投与回数について検討を行い、治療スケジュールを確定させた。樹状細胞は、マウス骨髓細胞を採取し、GM-CSF 存在下に培養を行った。確定したスケジュールに沿って、PTX 単独治療と樹状細胞療法との併用療法を行い、腫瘍増大速度の比較によ

り治療効果を比較した。さらに、腫瘍内浸潤リンパ球数に関してはフローサイトメトリーを用いて解析を行なった。

4. 研究成果

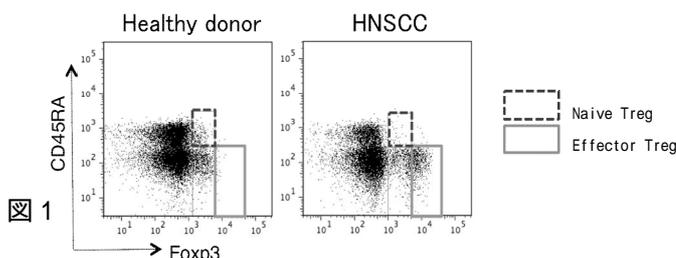
(1) 頭頸部扁平上皮癌患者の末梢血解析

マスター遺伝子である Foxp3 を用いた Treg の評価はよく知られているが、Foxp3 をフローサイトメトリーで核内染色をする処理により、細胞死が引き起こされることから、その後の細胞培養などの機能評価を目的とした研究には用いることができないという欠点があった。そのため、上記の CD45RA と Foxp3 を用いた分類に基づいて FACS Aria による effector Treg と naive Treg の単離、その後に各細胞集団の機能を評価するという本研究の目的を達成するために、まず本研究では、細胞表面抗原を複数組み合わせることで上記と同様に機能的な分類が可能となる方法を確立させた。

さらに、この方法に基づいて単離した頭頸部癌患者と良性腫瘍患者のそれぞれの末梢血 effector Treg と naive Treg を比較して、頭頸部癌患者の effector Treg に特異的に発現が上昇している遺伝子群を同定した。これらの遺伝子群は主に細胞分裂に関わる遺伝子群であったことから、頭頸部癌患者の末梢血で effector Treg が増加していた背景も鑑みるとこれらの遺伝子群が、effector Treg の特徴を表す有力な遺伝子群となりうると考えられた。そこで、effector Treg に特異的に発現する候補遺伝子として捉え、治療のターゲット分子として、また再発・転移の診断マーカーとしての妥当性について症例数を増やし検討を進めるに至った。

(2) Treg による抑制効果とその機序に関する検討

頭頸部癌患者では、末梢血 Treg のうち抑制効果の強い effector Treg の割合が有意に増加していた。さらにこれらの分画

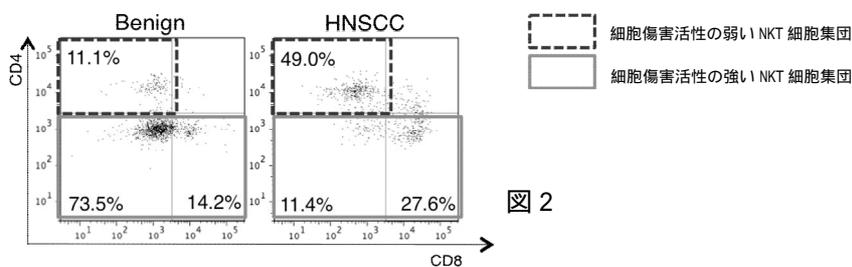


の Treg では、T 細胞の機能抑制に関わる細胞表面分子 CTLA-4 や Treg の遊走能に関わるケモカインレセプター CCR4 の発現が高いことが分かった (図 1)。これらの結果は、細胞表面分子 CD45RA と転写因子 Foxp3 を用いた機能的分類を用いることで、Treg の機能を正當に評価可能であることを表す。頭頸部癌患者の末梢血で、この effector Treg の割合が増加していたことは、

担癌患者の末梢血でより強い免疫抑制がかかっていることを示す結果であった。末梢血 CD4⁺細胞から誘導した Treg が、高い割合で effector Treg の分画に含まれる細胞集団となることから、誘導・培養した Treg を用いて NKT 細胞、T 細胞への抑制効果を評価することで、担癌患者の腫瘍局所での免疫抑制環境を *in vitro* で検討した。

末梢血より誘導し、培養・増殖させた Treg は、T 細胞とは直接的な細胞接触により機能を著明に抑制する一方で、細胞傷害 T 細胞と並んで強い抗腫瘍効果を有するとされている NKT 細胞に対しては直接的な抑制効果は持たず、樹状細胞を介した間接的な抑制の機序が存在することを明らかとした。

NKT 細胞の抗腫瘍効果を減弱させる機序については、NKT 細胞の分画を評価することでさらなる探索を行なった。NKT 細胞は細胞表面上の CD4 と CD8 の発現パターンから、大きく分け



て 2 つの異なる細胞集団で構成される。CD4⁺NKT 細胞は IFN- γ や グランザイム を多量に産生する強い抗腫瘍活性をもつ Th1 様の細胞集団である。対照的に CD4⁺NKT 細胞は、IL-4 や IL-10 の産生が多く抗腫瘍活性が非常に弱い Th2 様の細胞集団である。Treg の存在下に培養した NKT 細胞では CD4⁺NKT 細胞が著明に高い割合になった。さらに、effector Treg の増加した進行期頭頸部癌患者の末梢血 NKT 細胞も同様に CD4⁺NKT 細胞が有意に高くなっていることが明らかとなった。

これらのことから effector Treg の存在により CD4⁺NKT 細胞が多い集団から、CD4⁺NKT 細胞が多い細胞集団と変化することが抗腫瘍効果の減弱につながる可能性が考えられた (図 2)。

(1)、(2)の結果から、末梢血を用いた検討により现阶段で必要な知見が得られたことから、患者負担も考慮して腫瘍組織を用いた検討は今回の研究では行わなかった。

今後、(1)で得られた候補遺伝子により末梢血を用いた十分な検討を行ったのちに、腫瘍組織を用いて同様に検討を進めたいと考えている。

(3) effector Treg をターゲットとした治療法の有効性に関する検討

Treg の増殖、機能を抑制する薬剤として複数の抗がん剤を含む薬剤が過去に報告されている。これらのうち、頭頸部癌に対しても既に適応となっている PTX に注目をした。

PTX は T 細胞、NKT 細胞に対しては、弱いアポトーシス誘導効果しか発揮しない一方で、Treg に対しては非常に低濃度から強いアポトーシスを誘導することが示された (図 3)。

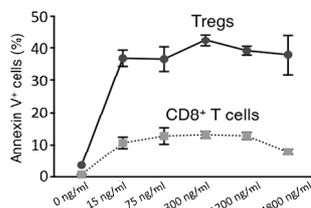


図 3

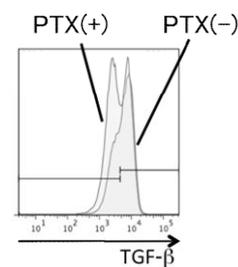


図 4

PTX で Treg の前処理を行うことで TGF- β 産生 Treg を減少させた (図 4)。

そこで PTX で前処理をした Treg と T 細胞、NKT 細胞の共培養を行うと、前処理を行わなかった Treg と比較して Treg の抑制作用が抑えられ、T 細胞、NKT 細胞はいずれも増殖能力・サイトカイン産生能が回復した。これらの結果から、Treg を選択的に抑制する薬剤として PTX が有用であることが確認できた。

次に、Treg をターゲットとした低濃度 PTX 療法の確立に向けて、マウスを用いた *in vivo* の実験を行った。始めに、PTX の至適投与濃度と至適投与時期を探索した。続いて、確定した治療プロトコルに沿って、PTX 投与群、DC 細胞療法群、PTX と DC 細胞療法併用群の 3 群間で比較を行ったところ、PTX、DC 細胞療法併用群において、他 2 群と比較して腫瘍の増大が抑えられた。また腫瘍浸潤 Treg 数は、PTX 投与群において非投与群と比較して減少が認められると同時に、腫瘍浸潤 NKT 細胞数に関しては DC 療法群において DC 非投与群と比較して増加した。併用群ではこの傾向が著明に見られた。

この結果から、低濃度の PTX との併用により NKT 細胞を標的とした樹状細胞免疫療法の治療効果がさらに増強することが確認された。

本研究で同定した effector Treg に特徴的な遺伝子群を用いることで、末梢血採血という患者負担の少ない方法で、進行期頭頸部癌患者の予後増悪につながる再発・転移などをより早期に診断し、早期の治療介入が可能となると考えている。さらに、これらの遺伝子をターゲットとした治療法や低濃度パクリタキセル療法など effector Treg の抑制効果減弱を狙った治療法は、標準治療、免疫チェックポイント阻害薬などの新規の免疫治療薬を含めた多くの治療法の効果をさらに増強する有用な治療法となりうることを示す結果であった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Harada K, Ihara F, Takami M, Kamata T, Mise N, Yoshizawa H, Hishiki T, Saito T, Terui K, Nakata M, Komatsu S, Ikeuchi T, Nakayama T, Yoshida H, Motohashi S.: Soluble factors derived from neuroblastoma cell lines suppress dendritic cell differentiation and activation. **Cancer Sci.** 110(3): 888-902 (2019) 査読有 DOI: 10.1111/cas.13933

Makita Y, Kunii N, Sakurai D, Ihara F, Motohashi S, Suzuki A, Nakayama T, Okamoto Y.: Activated iNKT cells enhance the anti-tumor effect of antigen specific CD8 T cells on mesothelin-expressing salivary gland cancer. **BMC Cancer** 18(1):1254 (2018) 査読有 DOI: 10.1186/s12885-018-5179-7

Sakurai D, Uchida R, Ihara F, Kunii N, Nakagawa T, Chazono H, Hanazawa T, Motohashi S, Okamoto Y.: Immunosuppressive property of submandibular lymph nodes in patients with head and neck tumors: differential distribution of regulatory T cells. **BMC Res. Notes** 11(1):479 (2018) 査読有 DOI: 10.1186/s13104-018-3587-z

Hishiki T, Mise N, Harada K, Ihara F, Takami M, Saito T, Terui K, Nakata M, Komatsu S, Yoshida H, Motohashi S.: Invariant natural killer T infiltration in neuroblastoma with favorable outcome. **Pediatr. Surg. Int.** 34(2):195-201 (2018) 査読有 DOI: 10.1007/s00383-017-4189-x

Hishiki T, Mise N, Harada K, Ihara F, Takami M, Saito T, Terui K, Nakata M, Komatsu S, Yoshida H, Motohashi S.: Frequency and proliferative response of circulating invariant natural killer T cells in pediatric patients with or without malignant solid tumors. **Pediatr. Surg. Int.** 34(2):169-176 (2018) 査読有 DOI: 10.1007/s00383-017-4185-1

Ihara F, Sakurai D, Horinaka A, Fujikawa A, Sakurai T, Kunii N, Motohashi S, Nakayama T, Okamoto Y.: CD45RA-Foxp3high regulatory T cells have a negative impact on the clinical outcome of head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Immunol. Immunother.** 66(10):1275-1285 (2017) 査読有 DOI: 10.1007/s00262-017-2021-z 66

[学会発表](計 9 件)

伊原史英、櫻井大樹、飯沼智久、國井直樹、米倉修二、岡本美孝 頭頸部癌患者の免疫抑制と免疫細胞療法による治療戦略 第 37 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2019 年

國井直樹、伊原史英、松島可奈、飯沼智久、米倉修二、茶園英明、櫻井大樹、花澤豊行、岡本美孝 メソテリン特異的 CART 細胞と活性化 NKT 細胞を併用したがん免疫細胞療法の有効性に関する前臨床研究 第 37 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2019 年 Motohashi S, Kamata T, Toyoda, T, Tanaka T, Ihara F, Takami M, Yoshino I, Nakayama, T: A Phase II study of α -Galactosylceramide-pulsed antigen presenting cells for advanced or recurrent non-small cell lung cancer. 第 47 回日本免疫学会学術集会 2018 年

伊原史英、高見真理子、國井直樹、櫻井大樹、岡本美孝、本橋新一郎 頭頸部扁平上皮癌患者における制御性 T 細胞の臨床的意義 第 22 回日本がん免疫学会総会 2018 年 Negawa M, Ihara F, Kamata T, Takami M, Motohashi S.: A role for immune checkpoint inhibitors in iNKT cell-based immunotherapy. The 2nd Chiba University – UC San Diego Symposium. 2018 伊原史英、櫻井大樹、米倉修二、飯沼智久、岡本美孝 制御性 T 細胞が頭頸部癌患者に及ぼす免疫抑制作用からの克服を目指した治療法の検討 第 36 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2018 年

Takami M, Ihara F, Kamata T, Motohashi S.: A role of AhR signaling in NKT cell immunotherapy. CD1-MR1 2017

Ihara F, Sakurai D, Takami M, Okamoto Y, Motohashi S.: Regulatory T cells increased in advanced head and neck cancer patients suppress NKT cell function and correlate with disease progression. CD1-MR1 2017

伊原史英、櫻井大樹、堀中敦史、國井直樹、本橋新一郎、岡本美孝 頭頸部扁平上皮癌患者における末梢血制御性 T 細胞の臨床的意義 第 21 回日本がん免疫学会総会 2017 年

6 . 研究組織

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。