

令和 2 年 6 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16308

研究課題名(和文) 胃癌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と効果増強への応用

研究課題名(英文) To predict and improve the response to neoadjuvant chemotherapy in gastric cancer, targeting for immunological factor

研究代表者

浦川 真哉 (Urakawa, Shinya)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：40768975

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)：胃癌患者の術前化学療法前後の腫瘍組織から抽出した免疫細胞をフローサイトメトリーで解析した。結果、化学療法後にCD8陽性細胞にTim-3分子を単独発現する特異的細胞群を認めた。これら細胞群はグランザイムB・パーフォリンといった細胞傷害性分子を高発現した。食道がんでは、化学療法後にTim-3単独発現細胞群を認めず、治療前のCD8陽性細胞中のPD-1・Tim-3共発現細胞の高頻度群が術前治療の非奏効に関連した。これら細胞は、細胞傷害性分子の発現低下を認めた。以上、抗腫瘍効果を有する可能性のあるTim-3単独発現細胞の出現は、胃癌特異的もしくは使用抗がん剤に影響することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、特定条件下では、化学療法によって抗腫瘍効果をより有する細胞群が出現する可能性を示した。また、食道がんのようにTim-3分子を発現した細胞は、様々ながん種で予後不良の因子と報告されてきた。本研究の結果はこれらと異なるものであり、Tim-3分子の新しい知見につながる。現在、手術前もしくは手術後・再発後の治療選択肢として、免疫療法の導入が検討されており、予後改善に寄与する結果も出始めている。加えて、本研究は化学療法と免疫療法との併用が予後改善につながる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Immune cells extracted from pre- and post-neoadjuvant chemotherapy fresh tumor tissues in gastric cancer were analyzed by flow cytometry. The unique immune cells in CD8+ cells, which expressed only Tim-3, not PD-1, were found (Tim-3+ PD-1- in CD8+ cells). These immune cells showed higher expression of granzyme B and perforin than other cells. On the other hands, Tim-3+ PD-1- in CD8+ cells were not observed in esophageal tumor tissues after neoadjuvant chemotherapy. % PD-1+ Tim-3+ in CD8+ cells was conversely associated with the response to neoadjuvant chemotherapy. These cells showed low expression of granzyme B, perforin and IFN-g. Our findings indicate that Tim-3+ PD-1- in CD8+ cells, which might have anti-tumor immunity, is specific to gastric tumor tissues or anti-cancer agents used for gastric cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：術前化学療法 Tim-3 胃癌 食道がん PD-1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんの治療法の一つである抗 PD-1 抗体療法の成功は、腫瘍免疫の重要性を示している。一方で既存の化学療法には、腫瘍免疫を介することで抗腫瘍効果を発揮するオプターゲット効果が存在する。我々は、化学療法後の胃がん組織内において特徴的な細胞群(CD8 陽性 Tim-3 単独発現細胞群)の出現を新たに見出し、化学療法におけるオプターゲット効果と考えた。この細胞群はグランザイム B やパーフォリンを高分泌し、高い細胞傷害活性を持っている可能性がある。他方で、CD8 陽性細胞の疲弊マーカーの一つである Tim-3 分子は、発現が高いほど細胞傷害活性が低く、これまで予後不良因子とされてきた(Granier C, Cancer Res. 2017)。我々が示した結果は、これまでの報告とは異なるものである。化学療法と腫瘍免疫との関わりにおいて、Tim-3 単独発現細胞群の存在や機能、また臨床病理学的意義については未だ不明である。これらを明らかにすることは、腫瘍免疫における Tim-3 分子に対する新しい知見をもたらすだけでなく、がん治療における効果予測の新規バイオマーカーの発見や新たな免疫化学療法につながるのではないかと考えた。進行胃がんの5年生存率は、いまだ満足できるものではない。多剤併用での術前・術後補助化学療法が試験的に行われているが、いまだ生存率は改善していない。そのため新規バイオマーカーの探索および新規治療介入は急務である。

2. 研究の目的

(1)術前化学療法前後で、同一患者の新鮮腫瘍組織や末梢血を採取し、CD8 陽性 Tim-3 単独発現細胞を中心に、術前治療効果予測の新規バイオマーカーを探索する。

(2)化学療法時の免疫動態を解明し、化学療法の効果を増強させる免疫関連因子の誘導や除去・阻害といった複合免疫療法の開発につなげ、患者予後の改善を目指す。

3. 研究の方法

(1)術前化学療法時の胃がん新鮮組織における Tim-3 単独発現細胞の解析:

術前化学療法を予定する胃がん患者から、胃がん新鮮組織を治療前(生検)・治療後(生検)、手術時(摘出標本)に、末梢血を治療前、治療中、手術前に採取し、抽出した免疫細胞をフローサイトメトリーで解析する。Tim-3 単独発現細胞の経時的変化に加え、T細胞、腫瘍関連マクロファージ(TAM: tumor associated macrophage)、抑制性免疫細胞(Treg: regulatory T cells, MDSC: myeloid derived suppressive cells)、免疫チェックポイント分子(PD-1, PD-L1, CTLA-4)、活性化マーカー(4-1BB, OX-40, ICOS)なども、検体採取量に応じて解析する。

(2)Tim-3 単独発現細胞の機能解析(細胞内サイトカイン解析および細胞傷害活性評価):

Tim-3 単独発現細胞の細胞内サイトカイン解析(IL2, IL4, IL10, IL17, TNF- α , IFN-g, Perforin, Granzyme など)を行う。また FACS Aria を用いて Tim-3 単独発現細胞を精製し、標的細胞(CD3 高発現株)と共培養することで細胞傷害活性評価を行う。

(3)Tim-3 単独発現細胞の臨床病理学的意義(予後と治療効果):

年齢、性別、臨床病期、組織系、治療因子(抗がん剤の種類、投与量、投与期間など)、治療効果、予後などの臨床病理学的因子に着目し、Tim-3 単独発現細胞群との関連性を検討する。

研究期間中、術前化学療法が適応となる進行胃がん症例の集積が困難となり、研究対象を術前化学療法が標準治療である食道がんに変更した。

(4)術前化学療法前後の食道がん新鮮組織・末梢血採取と免疫プロファイリング作成:

術前化学療法が適応となる食道がん患者から、食道がん新鮮組織を治療前(生検)・手術時(摘出標本)に、末梢血を治療前、手術前に採取し、抽出した免疫細胞をフローサイトメトリーで解析する。(1)の結果を参照にし、胃がんとの比較を行うとともに、治療効果・予後に関わる細胞群・免疫関連因子を探索する。

(5)細胞内サイトカイン解析および細胞傷害活性評価:

(4)で探索した治療効果・予後に関わる細胞群を、(2)と同様の系で機能評価する。

(6)網羅的解析および発生メカニズム解析:

術前化学療法の奏効例、非奏効例から採取した組織を次世代シーケンサー(NGS)で網羅的に解析する。また in vivo での、発生メカニズム解析を行う。

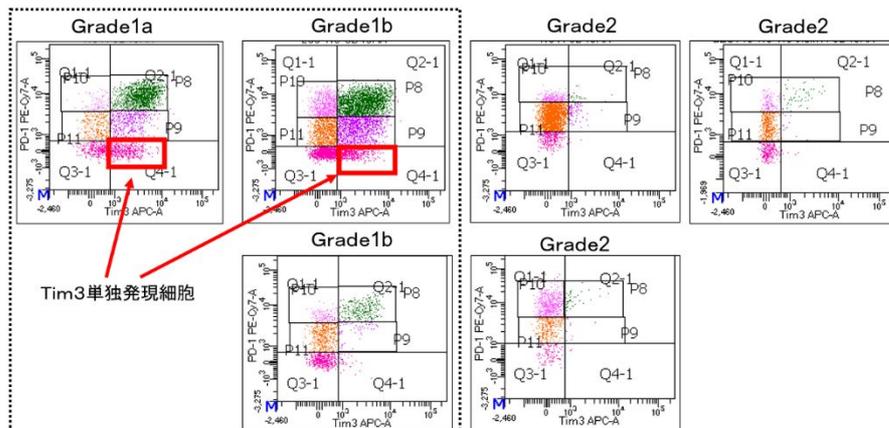
4. 研究成果

(1)術前化学療法時の胃がん新鮮組織における Tim-3 単独発現細胞の解析:

術前化学療法後の腫瘍組織浸潤免疫細胞をフローサイトメトリーで解析した結果、17 例中 2

例に Tim-3 単独発現細胞群を認めた。いずれも組織学的効果判定が grade1 (1/3 以上のがん組織が残存) であり、grade2 以上 (2/3 以上のがん組織が消失) の症例には Tim-3 単独発現細胞群を認めなかった。これはがん微小環境が、Tim-3 単独発現細胞の発生メカニズムの一つであることを示唆する (図 1)。

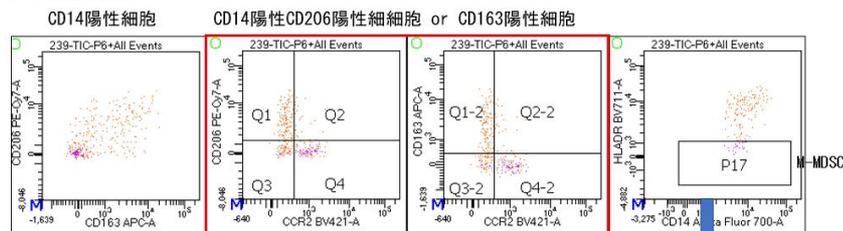
図1 組織学的効果判定とCD8陽性Tim3単独発現細胞



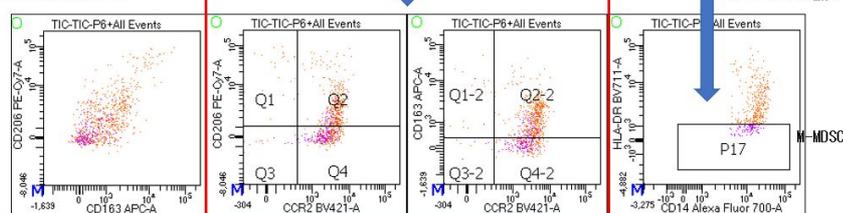
術前化学療法中に、内視鏡での生検検体採取が可能であった 2 例で、経時的变化を解析した。結果、術前治療後に CCR2 分子を発現した TAM (CD14 陽性細胞のなかで CD163 分子もしくは CD206 分子を発現) の増加を認めた。また CD14 陽性細胞中の単球系 MDSC 頻度の増加も認めた (図 2)。しかし、Tim-3 単独発現に関わる免疫関連因子は、症例数が少ないため探索困難であった。

図2 腫瘍組織内骨髄免疫細胞の経時的变化

術前治療前 (生検組織)



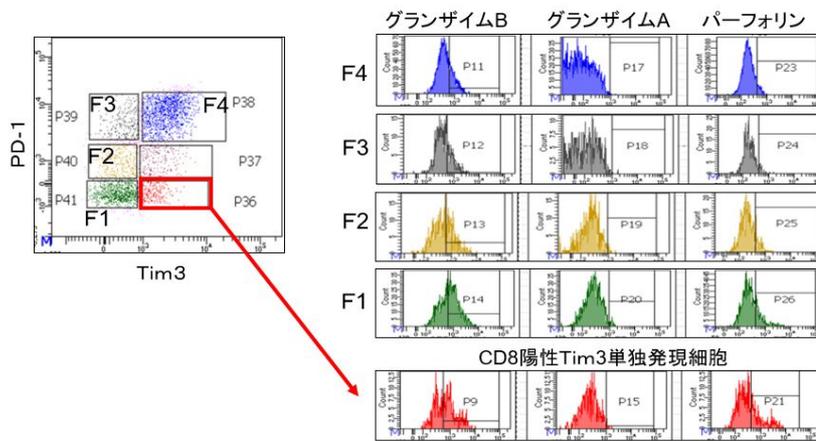
術前治療後 (生検組織)



(2) Tim-3 単独発現細胞の機能解析 (細胞内サイトカイン解析および細胞傷害活性評価):

術前化学療法後の腫瘍組織内に Tim-3 単独発現細胞群の出現を認めた 2 例で、サイトカイン解析を行った。結果、Tim-3 単独発現細胞群は、他の細胞群に比してグランザイム B 及びパーフォリンを高発現し、一方でグランザイム A には違いを認めなかった (図 3)。IFN-g 等のサイトカインに関しては、PMA・イオノマイシン刺激後に解析を試みたが、刺激後に Tim-3 単独発現細胞群は消失し、これら細胞群は viability の低い細胞である可能性が示唆された。化学療法後の腫瘍組織から抽出可能な免疫細胞数は少なく、Tim-3 単独発現細胞を十分量精製することが難しく、CD3 高発現株と共培養する系での細胞傷害活性評価は行えていない。

図3 CD8陽性Tim3単独発現細胞のサイトカイン解析



(3) Tim-3 単独発現細胞の臨床病理学的意義(予後と治療効果):

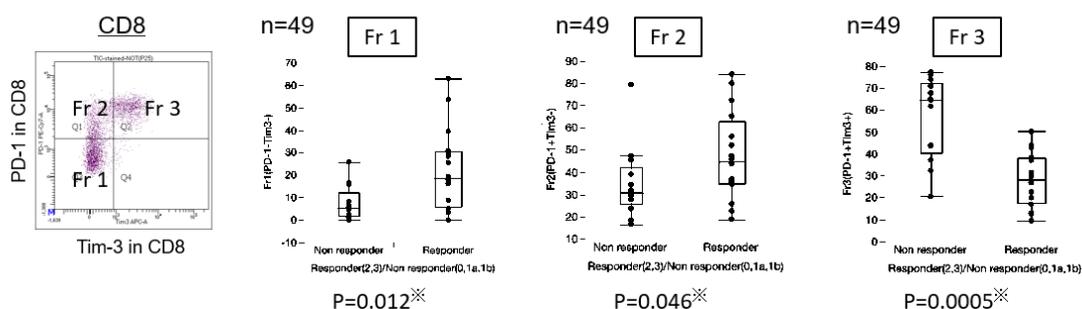
集積症例数が少ないことから、Tim-3 単独発現細胞群と臨床病理学的因子との関連性を見出すことできなかったが、Tim-3 単独発現細胞群を認めた2症例のうち、1例は無再発経過中であり、1例は再発後治療中である。

以下、術前化学療法を施行した食道がんの結果を報告する。

(4) 術前化学療法前後の食道がん新鮮組織・末梢血採取と免疫プロファイリング作成:

12例で術前化学療法後の腫瘍組織浸潤免疫細胞をフローサイトメトリーで解析した結果、食道がんではTim-3 単独発現細胞群の出現は認めなかった。使用抗がん剤やがん種の違い、腸内細菌の違いが影響している可能性がある。しかし49例の術前化学療法前の腫瘍組織浸潤免疫細胞を解析し、治療前のCD8陽性細胞中のPD-1・Tim-3共発現細胞の高頻度群が、術前治療の非奏効群に関連することが分かった。(図4)。

図4 食道がん治療前生検検体49例の検討

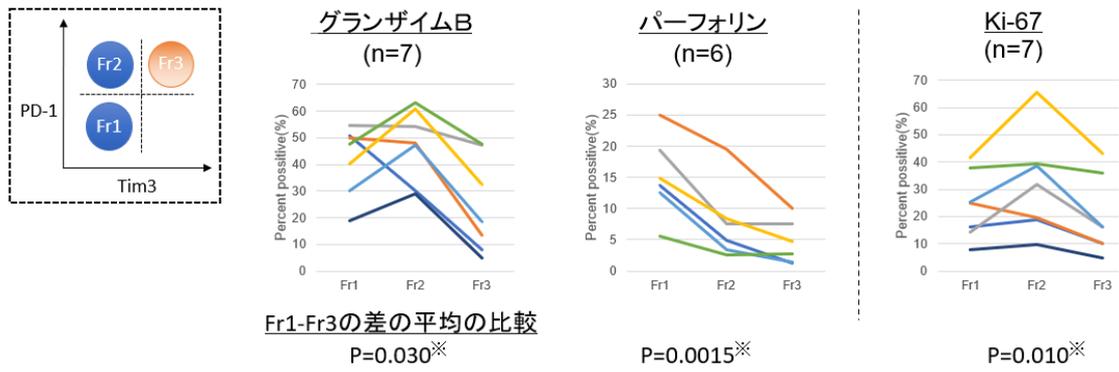


経時的解析では、非奏効例はCD8陽性細胞中のPD-1・Tim-3共発現細胞が残存もしくは増加した。

(5) 免疫細胞機能解析: 細胞内サイトカイン解析および細胞傷害活性評価

他の細胞群に比して、このPD-1・Tim3共発現細胞群はグランザイムB、パーフォリン、IFN-g、TNF-、IL-2が低発現であり、細胞分裂能(Ki-67)の低下を認めた(図5)。標的細胞との培養では、PD-1・Tim3共発現細胞群は細胞傷害活性が低いことも分かった。

図5 機能解析(食道がん治療前生検組織)



(6) 網羅的解析および発生メカニズム解析:

現在、術前治療の奏効2例・非奏効2例でNGSを行っており、解析結果待ちである。それとともに in vivo での実験モデル作成(BALB/C マウス、CT26 細胞株、抗がん剤としてドセタキセル)を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浦川真哉、和田尚、宮崎安弘、牧野 知紀、高橋 剛、黒川 幸典、山崎 誠、森 正樹、土岐 祐一郎
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本食道学会学術集会 72回
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浦川真哉、和田尚、田中晃司、宮崎安弘、牧野知紀、高橋剛、黒川幸典、山崎誠、森正樹、土岐祐一郎
2. 発表標題 食道がん術前化学療法効果と腫瘍組織内免疫細胞との関連性
3. 学会等名 JDDW 26回
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----