

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16715

研究課題名(和文) CCR4陽性Tregに着目した前立腺癌に対する免疫治療確立に関する研究

研究課題名(英文) Study on establishment of immunotherapy for prostate cancer focusing on CCR4-positive Treg

研究代表者

渡邊 将人 (WATANABE, MASAHIITO)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：50513389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌と診断された患者より根治的前立腺切除術、前立腺生検標本によって得られた標本を分析して、前立腺癌における制御性T細胞の浸潤を評価した。さらに生検標本における制御性T細胞やT細胞の総数とCCR4陽性制御性T細胞の比率を、予後不良群とそうでない群に分けて比較した。またCCR4陽性T細胞の多寡でも2群に分割し予後との関連について検討した。

前立腺摘除標本においてはGleason scoreが高いものはCCR4陽性制御性T細胞の発現が多く、細胞数による比較においては予後不良群は予後良好な群に比して、制御性T細胞、およびCCR4陽性制御性T細胞の発現が顕著であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行性前立腺癌に対する有効な治療法の確立は急務であるとされているものの、近年様々な癌腫において有効性が報告されている免疫チェックポイントやサイトカインを介した免疫逃避をターゲットとする免疫治療についてはいまだ未解明である。そういった治療の開発の前段階として、本研究のような前立腺癌組織内における腫瘍免疫について、分子細胞学的に評価することは極めて有用であるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：A total of 15 radical prostatectomy (RP) specimens and 60 biopsy specimens from individuals diagnosed with prostate cancer were analyzed to evaluate the infiltration of CCR4+Tregs in prostate cancer. Moreover, the total number of Tregs, CCR4+Tregs, and T cells and the ratio of CCR4+Tregs to Tregs and T cells in biopsy specimens were compared between patients with poor prognosis who progressed to castration resistant prostate cancer (CRPC) within 12 months and those with good prognosis who were stable with hormone sensitive prostate cancer over 12 months.

Furthermore, biopsy specimens were divided into two groups: low and high CCR4+Treg expression groups and the prognosis was compared between them.

There was a higher expression of CCR4+Tregs in RP specimens with a higher(≥ 8) Gleason score than in those with a lower(< 8) Gleason score. The total number of Tregs and CCR4+Tregs significantly increased in the poor prognosis group.

研究分野：前立腺癌

キーワード：前立腺癌 CCR4 制御性T細胞 免疫チェックポイント分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

・臨床的背景

従来より前立腺癌に対する薬物療法として内分泌治療が行われているが、この治療に対する抵抗性を獲得した、いわゆる去勢抵抗性前立腺癌(Castration resistant prostate cancer - CRPC)に対する治療としては、2008年に docetaxel の前立腺癌に対する適応拡大、2014年に abiraterone, enzalutamide, cabazitaxel が保険収載された。しかしながら、一例をあげれば abiraterone は海外での第三相試験(COU-AA-302 試験)においてもプラセボ群に比して全生存期間において 5.2 ヶ月の延長を認めるのみである。また、cabazitaxel においても海外第三相試験において 84.4%に副作用を認めるなど、CRPC に対する治療薬剤において、有効性、安全性ともに未だ課題が山積している状態である。

・今回我々が着目した免疫治療について

今回我々は、このような去勢抵抗性前立腺癌に対する治療として免疫治療に着目した。癌組織に対して人体が持つ免疫機構、つまり癌免疫として通常は細胞傷害性 T 細胞や NK 細胞、樹状細胞などによる癌細胞の排除が行われている。しかしながら、これに対し、癌細胞は腫瘍抗原や抗原提示分子の消失、免疫チェックポイント分子の制御や制御性 T 細胞 (Treg - regulatory T cell) を介して、前述の免疫機構からの逃避を起こしていることが明らかとなってきている。近年このような癌の免疫逃避を克服する治療として、免疫抑制に関与する細胞上の分子である免疫チェックポイント分子に作用する抗体療法が明確な治療効果を持つことが明らかとなっている。その端緒となったのが進行性悪性黒色腫に対する、免疫抑制補助シグナル分子 CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4) のモノクローナル抗体療法であり、抗 CTLA-4 抗体である ipilimumab の臨床的有用性が報告されている(Hodi FS et al. N Engl J Med. 2010)。また、CTLA-4 は免疫抑制的な性質を持つ Treg に恒常的に発現しており、T 細胞による免疫の直接的な抑制だけでなく、Treg を介した間接的な抑制に影響するとされている。このことから、Treg 上に発現する免疫関連分子に対する抗体療法を行うことで、癌患者の組織内における免疫逃避機構を抑制することが可能であると考えられる。

・前立腺癌に対する免疫治療について

前立腺癌に対する免疫治療としては癌腫瘍抗原と顆粒球単球コロニー刺激因子融合蛋白で感作した自己樹状細胞ワクチンである sipuleucel-T が上記の免疫治療に先駆けて FDA に承認され、欧米では去勢抵抗性前立腺癌にたいする標準治療の一つとなっているが、PD-1 (programmed cell death 1) 抗体のような免疫チェックポイントをターゲットとした治療においては進行前立腺癌(去勢抵抗性前立腺癌)に対する治療効果を認めるに至っていない(CA209-003 試験)。

・我々が着目した Treg の表面マーカーについて

今回、我々は、Treg 上に発現する CCR4 (CC chemokine receptor 4) に着目した。CCR4 は G 蛋白質共役型 7 回膜貫通型のケモカインレセプターであり、Treg および Th2 細胞に発現する。抗 CCR4 抗体である mogamulizumab は CCR4 陽性の成人 T 細胞性リンパ腫(ATL)に対する治療として確立されているが、固形癌においても Treg は組織内に遊走し、癌に対する免疫逃避をもたらしていることが報告されていること(Curiel TJ et al. Nat Med 2004)、また本邦においても、固形癌(肺がん、胃がん、食道がん、悪性黒色腫、卵巣がん)に対する抗 CCR4 抗体の第 1a/1b 相試験が開始されていることもあり、抗 CCR4 抗体による固形癌に対する治療効果が期待されている。

2. 研究の目的

前立腺癌組織以外においても、病理組織標本に対する CCR4 および FOXP3 の免疫染色を行っているのは皮膚科領域においてセザリ-症候群および菌状息肉腫での報告があるのみで、前立腺癌を含めた他の固形癌についても組織内におけるエフェクター型 Treg の浸潤の程度・分布などは明らかにされていない。本研究では前立腺組織内における CCR4 陽性 Treg サブセットを中心とした免疫抑制環境を明らかにし、新たな免疫治療を開拓することを目的としている。

3. 研究の方法

<対象>

- 1) 当施設において前立腺癌と診断され、前立腺全摘除術を施行した症例
- 2) 当施設において前立腺針生検を施行し、前立腺癌と診断され内分泌療法を施行した症例

<研究方法>

上記 1) の前立腺組織包埋切片に対する免疫染色を行う。前立腺全摘除術で得られた組織標本について抗 CCR4 抗体および抗 FOXP3 抗体を用いて二重染色することで、前立腺癌組織およびその周囲組織の微小環境における、CCR4 陽性 Treg を中心とした免疫抑制環境を確認する。

2) から得られた生検標本に対して CCR4 および FoxP3 について免疫染色を行う。本症例群においては後に CRPC と診断されるような予後不良の前立腺癌患者と内分泌療法が奏効するような予後良好な前立腺癌患者の生検標本について免疫染色を行い、その予後や治療効果と、CCR4 陽性

Treg 細胞数との関連について統計学的検討を行う。この、後に CRPC となるような症例に関して免疫染色を行い、予後良好な前立腺癌患者の生検組織標本との差、組織学的特徴と予後・治療効果との相関について検討を行う。また、前立腺癌に対しては他の癌種において有効性が示されているような PD-1/L1 などターゲットとした免疫治療が奏効しないことが知られているが、このような他の免疫チェックポイント因子に対する免疫組織学的染色も行うことで、前立腺癌に対して他の免疫治療が有効でないと考えられる原因についても検討する。

4. 研究成果

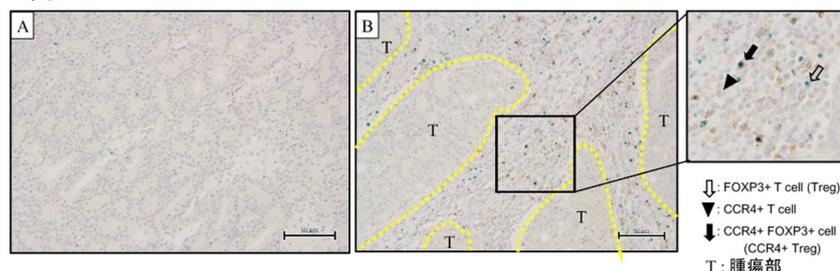
本研究では、前立腺全摘除術 (RP) によって得られた検体 15 例、前立腺生検によって得られた検体 60 例を解析した。平均年齢、初期 PSA 値、グリソンスコア、TNM 病期を表 1 に示す。RP 標本はすべて転移のない限局性前立腺癌であったが、生検標本にはリンパ節転移 18 例 (30%)、遠隔転移 25 例 (41.7%) が含まれていた。

	全摘除検体 (n=15)	生検検体 (n=60)
年齢 (歳)		
中央値	68	75
範囲	53-74	52-87
診断時 PSA (ng/ml)		
中央値	10.15	48.26
範囲	4.6-25.9	4.53-10000
Gleason score		
6	2 (15.4%)	9 (15.0%)
7	3 (23.1%)	9 (15.0%)
8	1 (7.7%)	23 (38.3%)
9	7 (53.8%)	12 (20.0%)
10	0 (0.0%)	7 (11.7%)
T 病期		
T1	0 (0.0%)	10 (16.7%)
T2	7 (53.8%)	10 (16.7%)
T3	6 (46.2%)	26 (43.3%)
T4	0	8 (13.3%)
N 病期		
N0	13 (100%)	38 (62.3%)
N1	0 (0.0%)	18 (30.0%)
M 病期		
M0	13 (100%)	33 (55.0%)
M1	0 (0.0%)	25 (41.7%)

RP 検体における浸潤 CCR4+Tregs の分布

RP 検体における浸潤した CCR4+Tregs の分布を評価したところ、CCR4+Tregs は腫瘍組織の周囲に発現しており、腫瘍内にも少数の CCR4+Tregs が認められた (図 1)。さらに、グリソンスコアが高い (>8) RP 検体では、グリソンスコアが低い (<8) 検体よりも CCR4+Tregs の発現量が高い傾向があった (17.5 ± 21.7 vs. 7.1 ± 9.7 cells/spot, p=0.041)。

図 1



前立腺生検標本中の CCR4+Tregs 数と臨床転帰の関係

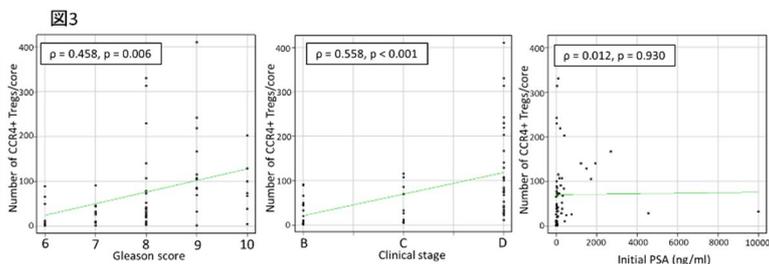
12ヶ月以内に去勢抵抗性前立腺癌へと浸潤した群 (予後不良群) と 12ヶ月間、去勢治療に感受性を示した群 (予後良好群) の 2 群に分けて検討した。全体では FOXP3+細胞の 65.9% で CCR4 が陽性であった。予後不良群 (58.1%) と良好群 (68.0%) の間では、FOXP3+細胞総数に対する CCR4+Tregs の数の比率に有意差はなかった (p=0.052)。しかし、総 FOXP3+細胞数は、予後不良群では予後良好群に比べて有意に増加した (205.31 ± 205.04 vs. 99.55 ± 125.59, p=0.024)。さらに、CCR4+Tregs の数は、予後不良群では予後良好群に比べて有意に増加した (89.38 ± 95.63 vs. 34.26 ± 55.56, p=0.01)。また、CD3 陽性細胞数は両群間で有意差はなかった (1340.12 ± 708.61 vs. 1439.57 ± 893.15, p=0.758)。また、CCR4+Treg/T 細胞比率も両群間で有意差は認められなかった (4.9% vs. 5.3%, p=0.878) (表 2)。さらに、生検コアの腫瘍組織の割合は予後不良群の方が予後良好群よりも高かったが、統計学的に有意な差は認められなかった (0.719 ± 0.218 vs. 0.571 ± 0.294, p=0.097)。

	Total (n=60)	予後不良群 (n=13)	予後良好群 (n=47)	(mean ± SD)	p-value
FOXP3+CCR4+ cells (CCR4+Tregs)	46.20 ± 69.22	89.38 ± 95.63	34.26 ± 55.56		0.01*
FOXP3+ cells (Tregs)	122.47 ± 150.93	205.31 ± 205.04	99.55 ± 125.59		0.024*
CD3+ cells (T cells)	1361.88 ± 738.13	1340.12 ± 708.61	1439.57 ± 893.15		0.758
CCR4+Tregs/Tregs ratio	0.659 ± 0.164	0.581 ± 0.151	0.680 ± 0.163		0.052
CCR4+Tregs/T cell ratio	0.052 ± 0.066	0.049 ± 0.024	0.053 ± 0.074		0.878
Percentage of cancer in each biopsy core	0.603 ± 0.284	0.719 ± 0.218	0.571 ± 0.294		0.097

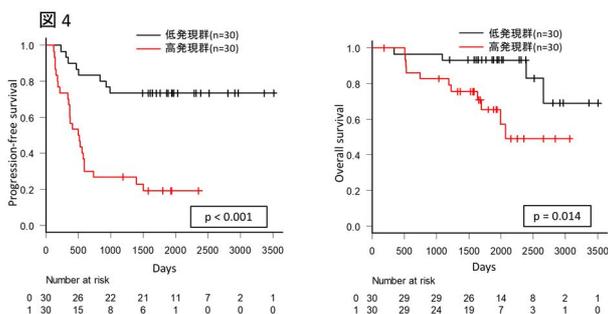
*: p<0.05

前立腺生検標本中の CCR4+Tregs 数と臨床パラメータとの相関性

CCR4+Treg の総数は臨床的な前立腺がんの病期($\rho = 0.558, p < 0.001$)とグリソンスコア($\rho = 0.458, p = 0.006$)との間に相関を認めた。しかし、診断時の CCR4+Tregs 数と PSA 値との間には有意な相関は認められなかった(図 3)。



細胞数に応じてグループ分けした結果、CCR4+Tregs の発現量が低い患者は、CCR4+Tregs の発現量が高い患者に比べて、CRPC への進行期間(未到達 vs. 27.3 カ月、 $p < 0.001$)と生存期間中央値(未到達 vs. 69.0 カ月、 $p = 0.014$)が有意に長かった(図 4)。



上記の結論に至った後、さらに前立腺組織標本に対する種々の免疫チェックポイント分子などに対する免疫染色を行い、前立腺組織内の Treg を中心とした T 細胞の解析を進めていた。しかし、当初予定していたマウス皮下腫瘍モデルについては、通常の抗腫瘍薬であればマウスの免疫を抑制した上で腫瘍を植え付け、抗腫瘍薬による治療効果について評価するものであるが、本研究においては抗 CCR4 抗体を用いて Treg を抑制することが目的であるため、腫瘍を植え付ける際にマウス自体の免疫を抑制することで、抗 CCR4 抗体を含む免疫チェックポイントをターゲットとした薬剤を用いても本来の免疫逃避に対する阻害効果を正しく評価することは困難である可能性が考えられた。そのため、現状では腫瘍免疫を保ったままのマウス皮下モデルの作成には至っておらず、この点に関しては今後、研究の進展を要するところであると考えます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe Masahito, Kanao Kent, Suzuki Susumu, Muramatsu Hiroyuki, Morinaga Singo, Kajikawa Keishi, Kobayashi Ikuo, Nishikawa Genya, Kato Yoshiharu, Zennami Kenji, Nakamura Kogenta, Tsuzuki Toyonori, Yoshikawa Kazuhiro, Ueda Ryuzo, Sumitomo Makoto	4. 巻 79
2. 論文標題 Increased infiltration of CCR4 positive regulatory T cells in prostate cancer tissue is associated with a poor prognosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Prostate	6. 最初と最後の頁 1658 ~ 1665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1002/pros.23890	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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