

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09153

研究課題名（和文）胃癌浸潤B細胞Tertiary Lymphoid Structure の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of tertiary lymphoid structure in gastric cancer

研究代表者

田中 浩明（Tanaka, Hiroaki）

大阪公立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：90382168

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）：TLS内B細胞は、PCRの結果では、BCR遺伝子発現にクローン化の傾向があった。さらにB細胞はCD70が発現しており、CD8T細胞との相互作用が示された。TLS周囲には、レジデントメモリーT細胞が多く存在することを示した。胃癌におけるTLSとNivolumabの治療効果との関連について検討を行った。当科でNivolumabが導入された切除不能進行再発胃癌症例のうち、irAEは有意にTLS high群で多く認めまたPR3例は全てTLS high群であり、病勢制御率はTLS high群で高い傾向にあった。その他の因子では有意差は認めなかった。投与後のOSは有意にTLS high群で延長していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、胃癌局所の免疫反応誘導においてTLSの重要性が機能的に明らかとなった。つまり、これまで、腫瘍浸潤リンパ球の由来は明らかではなかったが、TLS内で抗原提示が行われ、T細胞との相互作用により、エフェクターT細胞が誘導されることが示唆された。さらにこのエフェクターT細胞がレジデントメモリーT細胞であり、免疫チェックポイント阻害剤の効果と関連することを我々は報告した。つまり、メモリー機能を持ったt細胞が腫瘍局所で存在することが示唆され、今後の免疫治療の有用な効果予測因子となることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：PCR results showed a clonal trend in BCR gene expression. Furthermore, both B cells and CD8+ T cells expressed CD70 in addition to CD27, indicating that they are activated together through interaction, indicating that so-called resident memory T cells, CD103+CD8+, are abundant around the TLS. We investigated the relationship between the presence of TLS and the therapeutic effect of Nivolumab in gastric cancer. Among patients with unresectable advanced recurrent gastric cancer treated with Nivolumab, irAE was significantly higher in the TLS high group, and all three PR cases were in the TLS high group, and the disease control rate tended to be higher in the TLS high group. Other factors did not differ significantly. OS after treatment was significantly prolonged in the TLS high group.

研究分野：胃癌

キーワード：免疫療法 リンパ節 腫瘍浸潤リンパ球

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1. 胃癌に対する免疫治療 (免疫チェックポイント阻害剤)

免疫チェックポイントが効果を示す症例はおよそ 2 割にとどまるため、適切な患者選択が必要と考えられ、そのため効果予測バイオマーカーの確立が急務である。免疫チェックポイント分子の効果予測マーカーとして、最も重要な因子は腫瘍浸潤リンパ球の存在など局所の微小環境である。

2. < B 細胞と腫瘍抑制効果 >

細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の効果を増強させるサイトカインの産生、グランザイム B 産生や抗体依存性反応による直接的癌細胞傷害を引き起こす。一部の B 細胞 (CD11c+) は抗原提示能を有する。一般的に T 細胞を増殖させる抗原提示細胞は樹状細胞が中心であるが、樹状細胞は腫瘍環境では著しくその数が低下しており機能も抑制されているため、腫瘍局所での抗原提示に B 細胞が関与していることは容易に想像できる。

3. Tertiary lymphoid structure (TLS) について

近年、2 次リンパ組織から離れた 3 次リンパ組織 (Tertiary Lymphoid Structure; TLS) においても免疫反応が誘導されることが分かってきた。TLS は、リンパ節と同様の形態を有する。TLS は肺癌、乳癌などの腫瘍において TLS の存在が良好な予後と関連することが報告されてきた。TLS 内において B 細胞が T 細胞に抗原提示を行いさらに抗腫瘍抗体も抗腫瘍効果を示すと予測される一方で、TLS 内には regulatory T 細胞が多いとの報告は regulatory B 細胞など腫瘍免疫抑制作用を有する B 細胞もある。つまり、B 細胞の機能は腫瘍それぞれに異なるため、B 細胞サブセットがどのように存在しているのか、胃癌における TLS の役割の検討は必要である。さらに、TLS が形成されるメカニズムについても不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「胃癌における腫瘍周囲 TLS について研究し免疫治療に応用すること」である。つまり、TLS の胃癌における役割の明確化と今後の免疫チェックポイント阻害剤の治療効果予測バイオマーカーとしての可能性を探る研究である。

その他、胃癌における腫瘍浸潤 B 細胞の役割。2. TIL の由来 3. TLS を解析することによる新しい抗原解析や免疫治療効果予測法の提唱も行う。

3. 研究の方法

1. 胃癌組織内腫瘍浸潤 B 細胞に注目し TLS 内の B 細胞のサブセットを明らかにする

2. TLS 周囲の樹状細胞 (DC)、T 細胞サブセットを解析し、その機能を解析する

1,2. TLS 内 B 細胞のサブセットについては腫瘍組織から細胞を採取しフローサイトメトリーで解析する。B 細胞: Pre-pro B cell: CD45R, Immature B cell: B220, CD25, IL-7R, CD19, Mature B cell: CD24, CD93, CD21, CD23, Plasma cell: XBP-1, BLIMP-1, CD38, CD138, T 細胞: CD8, CD4, Treg, Memory T cell, Th1,2,17, DC: CD8, LAMP-3, S-100, などにわけその割合などを評価する。主要な population についてはソーティングし、サイトカイン産生などの機能解析を行う。腫瘍から分離した B 細胞と癌細胞を反応させ、癌細胞の浸潤能などを評価する。

3. TLS 周囲の TCR あるいは BCR のレパトア解析を行い抗原特異的あるいは腫瘍特異的抗体遺伝子を同定する

レパトア解析については、レーザーマイクロダイセクションにて TLS 周囲の遺伝子を採取し匿名化シタカラバイオ (株) などの外部に依頼する。

4. 解析データと免疫チェックポイント阻害剤投与例における臨床データとの関連について検討する。臨床的には、臨床効果ばかりでなく原発巣の免疫チェックポイント分子の発現、TIL との関係などについて免疫組織染色により評価し B 細胞、TLS との関連について検討する。

4. 研究成果

1. TLS 内の B 細胞サブセットについて

腫瘍内 B 細胞を単離して flow cytometry を用いて、IgD および CD38 の発現に基づいた各 B 細胞サブセット (naive B 細胞、pre-GC B 細胞、germinal center (GC) B 細胞、memory B 細胞、Plasmablast)、および HLA-ABC/DR、CD80/CD86、CD27/CD70 の発現を調べ、健常末梢血由来、摘出標本のリンパ節および正常組織下の B 細胞と比較検討した。また CD27/CD70 発現は CD8+ T 細胞においても検討した。さらに PCR により腫瘍内 B 細胞の B cell receptor (BCR) 遺伝子を解析することで、そのクローン性について検討した。

【結果】腫瘍内 B 細胞は、他部位と比較して IgD 発現の低下および CD38 発現の上昇が見られ、活性化に伴い分化誘導していることが示された。PCR の結果では、PBMC と比較して腫瘍内 B 細胞では BCR 遺伝子発現にクローン化の傾向があった。また腫瘍内において HLA-ABC/DR に加え補助

刺激分子である CD80/CD86 の発現が認められ、さらに B 細胞および CD8+ T 細胞ともに CD27 に加え CD70 が発現しており、相互作用により共に活性化していることが示された。

2 . TLS 周囲の樹状細胞(DC)、T 細胞サブセットを解析し、その機能を解析する

TLS 周囲には、CD103+CD8+のいわゆるレジデントメモリーT 細胞が多く存在することを示した。D103 + T 細胞は腫瘍細胞間隙に多く存在していた。また CD8 + T 細胞は腫瘍間質だけでなく、CD103 + T 細胞と同様に腫瘍細胞間隙にも存在していた。CD103 + T 細胞に関する患者背景では、組織型、腫瘍深達度、リンパ節転移の有無、病理学的 Stage で有意差を認め、分化型、腫瘍浸潤度が低い症例で有意に CD103 が高発現していた。予後に関しては、全生存率(OS)および無再発生存率はともに CD103 高発現群で有意に延長していた。Stage 別の検討では、StageII/III/IV において高発現群で有意に OS が延長していた。また CD103 + T 細胞と CD8 + T 細胞の浸潤量には正の相関関係が見られ、両者を組み合わせた OS を検討したところ、CD103 と CD8 がともに高発現の症例で最も良好な予後が得られた。

3 . 解析データと免疫チェックポイント阻害剤投与例における臨床データとの関連について

われわれは、胃癌における TLS の存在と Nivolumab の治療効果との関連について検討を行った。当科で Nivolumab が導入された切除不能進行再発胃癌症例のうち、術前未治療で切除標本のあ

る 19 例を対象とした。切離標本の原発巣を抗 CD20 抗体による免疫組織学的染色を行った。CD20 陽性細胞の集合により形成されたクラスターを TLS と認識し、20 倍でカウントして濃染色域 3 視野を選択し、image J software を用いて面積率の平均値を算出した。中央値にて TLS high 群と TLS low 群にわけ、患者背景や予後を評価した。

19 症例のうち、男性 7 例、女性 12 例であり、年齢中央値は 69 (60 76) 歳であった。irAE は 4 例で認め、治療効果は PR3 例、SD5 例、PD11 例であり、病勢制御率は 42.1%であった。TLS 面積率の中央値は 1.24 (0.312 2.15) %であり、2 群に分けて患者背景の比較を行うと、irAE は有意に TLS high 群で多く認め (p=0.018) また PR3 例は全て TLS high 群であり、病勢制御率は TLS high 群で高い傾向にあった (66.7% vs 20%, p=0.067)。その他の因子では有意差は認めなかった。Nivolumab 投与期間は TLS high 群で長い傾向にあり、投与後の予後について検討すると、OS は有意に TLS high 群で延長していた (p=0.045)。PFS に関しては、統計学的有意差はないものの TLS high 群で延長している傾向にあった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mori Takuya, Tanaka Hiroaki, Suzuki Shugo, Deguchi Sota, Yamakoshi Yoshihito, Yoshii Mami, Miki Yuichiro, Tamura Tatsuro, Toyokawa Takahiro, Lee Shigeru, Muguruma Kazuya, Wanibuchi Hideki, Ohira Masaichi	4. 巻 112
2. 論文標題 Tertiary lymphoid structures show infiltration of effective tumor resident T cells in gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1746 ~ 1757
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14888	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mori Takuya, Tanaka Hiroaki, Deguchi Sota, Yamakoshi Yoshihito, Miki Yuichiro, Yoshii Mami, Tamura Tatsuro, Toyokawa Takahiro, Lee Shigeru, Muguruma Kazuya, Ohira Masaichi	4. 巻 17
2. 論文標題 Clinical efficacy of nivolumab is associated with tertiary lymphoid structures in surgically resected primary tumors of recurrent gastric cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0262455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0262455	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihito Yamakoshi, Hiroaki Tanaka, Chie Sakimura, Sota Deguchi, Takuya Mori, Tatsuro Tamura, Takahiro Toyokawa, Kazuya Muguruma, Kosei Hirakawa, Masaichi Ohira	4. 巻 57
2. 論文標題 Immunological potential of tertiary lymphoid structures surrounding the primary tumor in gastric cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 171-182
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2020.5042.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森 拓哉、田中浩明、出口惣大、吉井真美、田村達郎、豊川貴弘、李 栄柱、六車一哉、大平雅一
2. 発表標題 胃癌患者におけるCD103+T細胞と予後との関連
3. 学会等名 第93回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 拓哉、田中浩明、出口惣大、三木友一朗、吉井真美、田村達郎、豊川貴弘、李 栄柱、六車一哉、大平雅一
2. 発表標題 Nivolumabの治療効果と胃癌内tertiary lymphoid structureの関係
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中浩明、山越義仁、出口惣大、森 拓哉、崎村千恵、吉井真美、田村達郎、渋谷雅常、豊川貴弘、李 栄柱、六車一哉、大平雅一
2. 発表標題 胃癌組織内への腫瘍浸潤T細胞誘導機構について
3. 学会等名 第41回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 拓哉、田中浩明、出口惣大、井関康仁、吉井真美、福岡達成、田村達郎、渋谷雅常、永原 央、豊川貴弘、李 栄柱、六車一哉、平川弘聖、大平雅一
2. 発表標題 腫瘍内Tissue-Residentメモリー T cellと胃癌の予後に関する検討
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中浩明、山越義仁、出口惣大、森 拓哉、三木友一朗、吉井真美、田村達郎、豊川貴弘、李 栄柱、六車一哉、大平雅一
2. 発表標題 胃癌組織内の3次リンパ組織の免疫学的役割
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 拓哉、田中浩明、出口惣大、三木友一朗、吉井真美、田村達郎、豊川貴弘、李 栄柱、六車一哉、大平雅一
2. 発表標題 胃癌組織におけるCD103+T細胞とCD8+腫瘍浸潤リンパ球に関する検討
3. 学会等名 第31回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森拓哉、田中浩明、出口惣大、吉井真美、田村達郎、豊川貴弘、李 栄柱、六車一哉、平川弘聖、大平雅一
2. 発表標題 胃癌腫瘍内のTissue resident メモリーTcellとCD8陽性T細胞との関連
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------