

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09709

研究課題名(和文) 癌組織内制御性T細胞を標的とした尿路上皮癌に対する新規免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of cancer immunotherapy for urothelial carcinoma targeting tissue infiltrating regulatory T cells

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：癌組織内浸潤制御性T細胞の特異的表面分子であるCCR8の発現と治療的意義を明らかにすることを当研究の目的とした。シングルセルシーケンスにより、腎細胞癌や肺癌と同様に、膀胱癌でもCCR8は組織内制御性T細胞として特異性が高い分子であることを再確認した。一方、The Cancer Genome Atlas (TCGA) 膀胱癌群のデータでは、CCR8の発現が予後予測因子にはならなかった。CCR8を標的とした治療抗体の有用性が同時期に他グループから次々と報告され、治療標的としての重要性が確認されており、発癌機構への更なる検討が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌組織内浸潤制御性T細胞の特異的表面分子であるCCR8の発現と治療的意義を明らかにすることを当研究の目的とした。シングルセルシーケンスにより、腎細胞癌や肺癌と同様に、膀胱癌でもCCR8は組織内制御性T細胞として特異性が高い分子であることを再確認した。一方、The Cancer Genome Atlas (TCGA) 膀胱癌群のデータでは、CCR8の発現が予後予測因子にはならなかった。CCR8を標的とした治療抗体の有用性が同時期に他グループから次々と報告され、治療薬の臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the expression and therapeutic significance of CCR8, a specific surface molecule of regulatory T cells infiltrating into cancer tissues. By single cell sequencing, we reconfirmed that CCR8 is a highly specific molecule as a tissue-infiltrating regulatory T cells in bladder cancer as well as in renal cell carcinoma and lung cancer. On the other hand, the Cancer Genome Atlas (TCGA) bladder cancer group data showed that CCR8 expression was not a prognostic factor. The usefulness of therapeutic antibodies targeting CCR8 was reported one after another by other groups confirming its importance as a therapeutic target, and further investigation into the mechanism of carcinogenesis is expected.

研究分野：癌免疫学、泌尿器腫瘍

キーワード：膀胱癌 シングルセルシーケンス

1. 研究開始当初の背景

抗 PD-1 抗体治療は尿路上皮癌において既に臨床応用されているが、より治療効果が高く副作用の少ない新規免疫療法の開発が重要である。これまで、我々は抗 PD-1 抗体単剤治療の効果が乏しい症例の特徴として、癌組織内における制御性 T 細胞分画の上昇が関与していることを見出した。当研究では、尿路上皮癌に対する癌組織内制御性 T 細胞を標的とした治療薬の可能性を、Xenograft モデル 自然発がんモデルで評価すると共に、外科切除標本を用いた免疫組織化学染色により癌組織内制御性 T 細胞発現の臨床的意義を検討し、尿路上皮癌に対する新たなる治療戦略の創生を行うことを目的とする。

2. 研究の目的

抗 PD-1 抗体治療は尿路上皮癌において既に臨床応用されているが、より治療効果が高く副作用の少ない新規免疫療法の開発が重要である。これまで、我々は抗 PD-1 抗体単剤治療の効果が乏しい症例の特徴として、癌組織内における制御性 T 細胞分画の上昇が関与していることを見出した。その為、癌組織内における制御性 T 細胞に特異的に発現する分子を同定し、新規免疫療法薬として開発を行っている。当研究では、尿路上皮癌に対する癌組織内制御性 T 細胞を標的とした治療薬の可能性を、Xenograft モデル 自然発がんモデルで評価すると共に、外科切除標本を用いた免疫組織化学染色により癌組織内制御性 T 細胞発現の臨床的意義を検討し、尿路上皮癌に対する新たなる治療戦略の創生を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

尿路上皮癌では、進行性・転移性尿路上皮癌に対する治療と同時に非浸潤性尿路上皮癌の腔内再発に対する治療が重要である。その為に癌組織内制御性 T 細胞に特異的な分子を標的とした抗体の治療効果を検討する方法として 同系マウス尿路上皮癌細胞株を使用した Xenograft モデル プチル-N-(4-ヒドロキシプチル)(以下 BBN)を使用した自然発癌モデルを使用して検討を行う。

同系マウス尿路上皮癌細胞株 Xenograft モデルを用いた検討 : C3H/HeN 系の MBT-2、C57BL/6 系の MB49 の 2 種類のマウス膀胱癌 cell line による Xenograft に対して抗体を投与。各々の腫瘍に対する腫瘍縮小効果・好転移株である MB49 に対する転移抑制効果・組織型横断的腫瘍縮小効果を検討する。治療効果が乏しい場合には、既に臨床応用されている抗 PD-1 抗体の併用療法を行うことで、治療効果の相乗もしくは相加効果を有するかを検討する。

プチル-N-(4-ヒドロキシプチル)(以下 BBN)を使用した自然発癌モデルを用いた検討 : BBN 投与による膀胱癌発癌は経時的に非浸潤性膀胱癌から筋層浸潤性膀胱癌に推移することが報告されている。当モデルでは、CCR8 抗体による膀胱癌発癌抑制効果ならびに筋層浸潤性膀胱癌への進展抑制効果の両者を検討するため、BBN 投与 10 週齢と BBN 投与 28 週齢をエンドポイントとし評価する。治療効果が乏しい場合には、既に臨床応用されている抗 PD-1 抗体の併用療法を行うことで、治療効果の相乗もしくは相加効果を有するかを検討する。各々の実験において研究分担者の和田教授(大阪大学臨床腫瘍免疫学共同研究講座)と協力し、腫瘍より免疫担当細胞を抽出し、腫瘍内制御性 T 細胞除去効果・浸潤 T 細胞表面

分子発現の変化・腫瘍内マクロファージを含む顆粒球発現・腫瘍内 T 細胞機能回復について評価し、その治療効果との相関を検討する。また、血清から全身のサイトカイン評価を行う。最後に抗体を投与して残存した腫瘍を使用し、治療抵抗性細胞株の樹立を目指す。

臨床検体を用いた臨床的意義の検討：尿路上皮癌における制御性 T 細胞の発現意義を検討するため、大阪大学泌尿器科(研究分担者：野々村教授)にて外科的治療を施行した筋層非浸潤性膀胱癌、筋層浸潤性膀胱癌、上部尿路上皮癌の外科切除標本を用いて免疫組織化学染色を行い、予後情報(膀胱腔内再発、非転移生存、病勢非進行生存、癌疾患特異的生存)との関連を評価する。

4. 研究成果

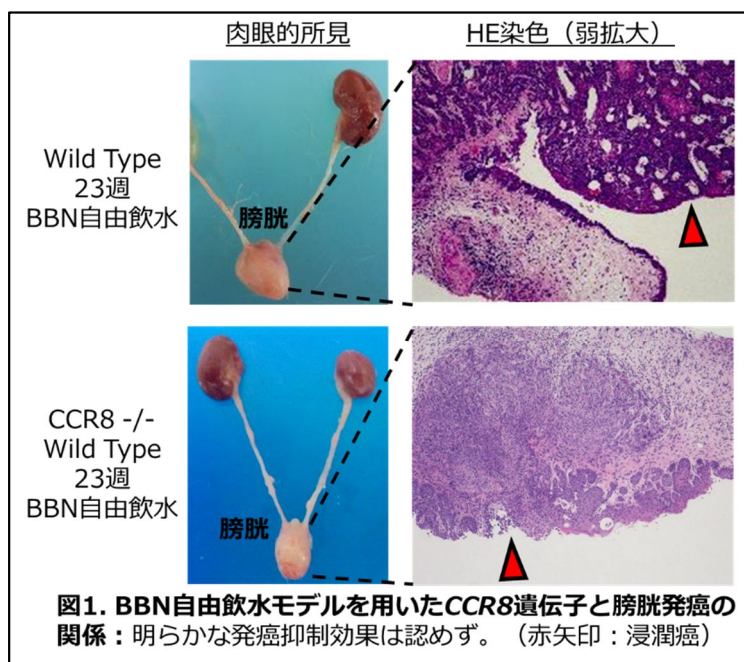
上記 について各研究経過ならびに結果を下記に示す。

同系マウス尿路上皮癌細胞株 Xenograft モデルを用いた検討

2020年5月に中国のグループより膀胱癌患者におけるCCR8発現の意義と術前補助化学療法を含む治療層別化に有用とされる論文がpublishされた(Wang T, et al. Cancer Immunol Immunother 2020 May 4 Epubahead)。上記論文ではCCR8治療抗体の有用性も示しており、マウスモデルを用いたCCR8治療抗体の有用性の評価についても中止とした。

ブチル-N-(4-ヒドロキシブチル)(以下 BBN)を使用した自然発癌モデルを用いた検討：

前年度において修正した計画に基づき、BALB-Cマウスを元としてCRISPR-CAS9システムを用いたCCR8ノックアウトマウスを樹立した。Allograft膀胱癌マウスモデルを用いた抗CCR8抗体を用いた治療有用性の検討が、報告されたため(Cambell JR et al. Can Res 2021)、CCR8が膀胱癌の発癌に寄与するかを検討することとし、自然発がんモデルマウスを用いた発癌抑制の検討を行うこととした。ノックアウトマウスの樹立は成功し、N-Butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine (以下BBNと略)を投与することで、発癌抑制を検討することとした。既報ではC57/BL6の雄マウスに0.5%BBNを投与することで、23週目に膀胱癌が100%発症する事は報告されている。また、同マウスで2週目の膀胱内ではCCR8が高発現していることも報告されていることから、CCR8が膀胱癌発癌抑制に寄与する可能性は非常に高いと考えている。ノックアウトマウス系統であるBALB-Cマウスでは自然発癌モデルの報告例が少ないため、まずモデルとして適しているかについて検討を開始した。その結果、23週での膀胱癌の発症割合は60%程度であり、これまでの100%の発症割合よりも低い割合であることが分かった。投与方法の違いによる発癌割合も検討したが、100%の発症割合には至らなかった。一方、CCR8ノックアウトマウスでの膀胱発がん効果を検討したところ、図1に示すように浸潤性膀胱癌の存在を



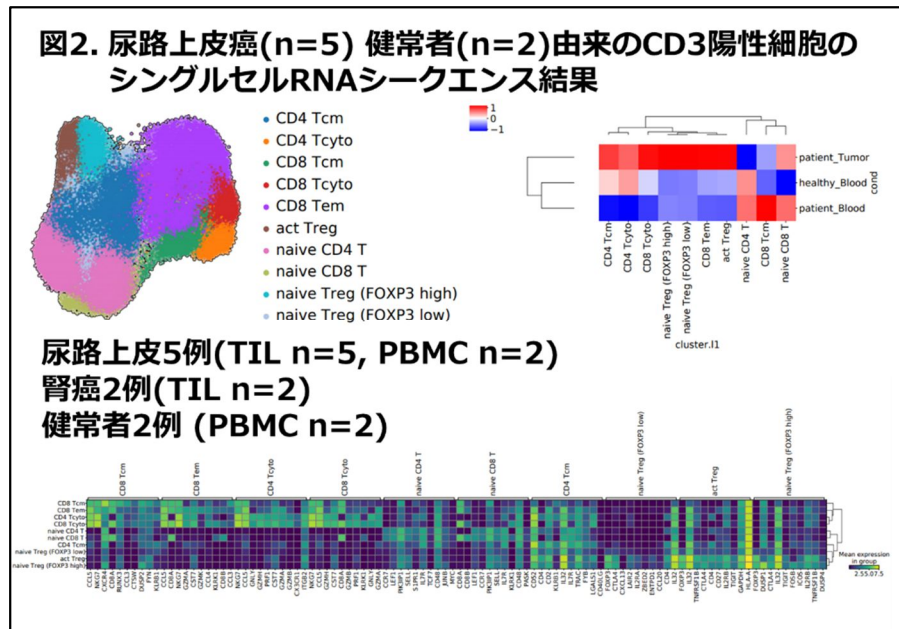
認めており、少数例の検討ではあるが明らかな発がん抑制効果を立証するには至らなかつ

た。

臨床検体を用いた臨床的意義の検討 :

腎細胞癌におけるエフェクター制御性T細胞のようにFoxP3とCD25highが一對一で対応する癌種がある一方、膀胱癌のエフェクター制御性T細胞のように一致しない症例が認められることが分かってきたため、ソーティングによる細胞抽出が困難な症例を対象として、シングルセルシーケンスを用いて膀胱癌をはじめとする泌尿器科癌組織内に浸潤するエフェクター制御性T細胞に特異的な分子を同定することとした。シングルセルシーケンスによりmRNAの発現で採取した細胞群を評価すると同時に、抗体標識によるタンパク発現を同時に評価することが可能である。膀胱癌5例・腎細胞癌2例を主として11サンプル(健康者PBMC: n=2, 膀胱癌TIL: n=5, 膀胱癌PBMC: n=2, 腎癌TIL: n=2)を採取し、解析を行った。PBMCおよび腫瘍内のリンパ球はそれぞれ分離され、全般に10個の細胞分画に分けられることが分かった。これは、患者間での違いは大きくなく、少数例ではあるが腎細胞癌と尿路上皮癌の間で明瞭な分離は不可能であった。一方、10個の細胞分画の中にはFOXP3陽性細胞の特異的な分画が存在し、CCR8のmRNA発現も同部位に一致して特異的に発現していた。FOXP3陽性T細胞分画は、細胞表面にCD25が高発現している分画で、前述の通りCCR8が特異的に高発現していた。また、以前我々が報告したようにTIM-3の中等度発現も認められた。GITRもFOXP3陽性T細胞分画に高発現していたが、CCR8がより特異性が高いことが見てとれる。以上より、CCR8は組織内制御性T細胞として特異性が高い分子であることが再確認された。

一方、The Cancer Genome Atlas (TCGA) 膀胱癌群のデータを用い、全生存率を層別化したが、膀胱癌ではCCR8の発現は予後を層別化することができなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Kidani Y, Nogami W, Yasumizu Y, Kawashima A, et al.	4. 巻 119
2. 論文標題 CCR8-targeted specific depletion of clonally expanded Treg cells in tumor tissues evokes potent tumor immunity with long-lasting memory.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A.	6. 最初と最後の頁 e2114282119.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2114282119	査読の有無 無
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
研究分担者	野々村 祝夫 (Nonomura Norio) (30263263)	大阪大学・医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	和田 尚 (Wada Hisashi) (70243459)	大阪大学・医学系研究科・特任教授（常勤） (14401)	

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
---------	---------