

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09832

研究課題名(和文) 婦人科がんにおける新規免疫チェックポイントの機能解析と複合的免疫療法の開発

研究課題名(英文) Functional analysis of novel immune checkpoints and development of combined immunotherapy in gynecological cancer

研究代表者

西尾 浩(Nishio, Hiroshi)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：90445239

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)：がん微小環境での制御性T細胞(Treg)に特異的に発現する Neuritin1(Nr1)の機能解析を行った。Nr1KOマウスに移植した腫瘍はWTマウスに移植した腫瘍よりも腫瘍の増殖は抑えられていた。腫瘍浸潤するTregの数を比較すると、腫瘍に浸潤するTregの数が抑えられていた。すなわちNr1はがん微小環境においてもTregの誘導にかかわることが判明した。RNA sequenceによるNr1の解析ではNr1がTreg関連する遺伝子と発現状態が連動することが示され、Nr1は制御性T細胞の誘導また機能維持に重要な分子であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チェックポイント阻害剤が臨床効果を認めるという点やCD8+T細胞を中心とした免疫病態には個体差があること、また個体差が免疫療法のみならず手術・化学療法などの標準治療の反応性にも関与することが報告されている。しかしこれらの機序の解明についてはまだ不明なことが多く、免疫病態を制御するための新たな治療標的の同定や治療薬の開発は遅れているのが現状である。今回新たに同定したNr1をターゲットとしたがん免疫療法はこれまで世界で報告がなく、本研究は極めて高い学術的独自性を有している。またNr1が治療標的としての効果が確認されれば、婦人科がんのみならず様々ながん腫に応用が広がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the function of Neuritin1 (Nr1), which is specifically expressed on regulatory T cells (Treg) in the cancer microenvironment. Tumors transplanted into Nr1KO mice showed less tumor growth than those transplanted into WT mice. The number of tumor-infiltrating Tregs was also suppressed. The RNA sequence analysis of Nr1 showed that Nr1 was linked to the expression status of Treg-related genes, suggesting that Nr1 is an important molecule for the induction and maintenance of regulatory T cells. Nr1 is thought to be an important molecule for the induction and maintenance of regulatory T cells.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 がん免疫療法 がん微小環境 免疫寛容

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは免疫防御から逃避しており(がん免疫逃避機構),がん免疫微小環境の病態解明や免疫療法の開発の意義は低いとの考えが広がりつつあったが,近年,免疫チェックポイント阻害剤(Immune Checkpoint Inhibitor 以下ICI)や培養T細胞養子免疫療法などのがん免疫療法の臨床試験において明確な治療効果が認められ(Topalian SL: N Engl J Med 20--12,Ribas A; Cell 2017,Andre T, N Engl J Med 2020),さらに免疫病態が標準がん治療の反応性に関与する事象も報告され(Robert C: N Engl J Med 2011, Eggermont AM; N Engl J Med 2016, Mandal R; Science2019),ICIを中心とする免疫療法は第4のがん治療法として認識され,がん免疫病態の解明と制御に対して世界的に研究が進められている.これまでICIは様々な癌腫でその臨床効果が確認されているが,その効果は癌腫により異なる.例えば,治療選択肢の極めて乏しい進行悪性黒色腫に対して50%以上の奏効率と約20%の長期完全奏効が認められ,さらに免疫療法の有効性が低いとされてきた固形がんである肺がん・腎がん・大腸がん・子宮体がんに対して,一定の臨床効果をもとめている.一方で,進行再発卵巣がんに対する化学療法を併用したICIの臨床試験では期待された効果はこれまで得られていない(Liao JB: J ImmunotherCancer 2021).またICIの効果が高いとされる癌腫の中でも全く効果を認めない個体差も存在し,ICI耐性のメカニズムの解析に加え,新規治療ターゲットの同定および免疫療法の効果が望まれる症例選択方法の構築(バイオマーカー検索),さらに既存の治療法と免疫療法を組み合わせた複合的免疫療法の開発が急務となっている.

2. 研究の目的

本研究では卵巣がん微小環境における anergy の機序解明とその克服,それらの解析に基づいた卵巣がんに対する複合的な免疫療法の開発を目指す.まず卵巣がん臨床検体,卵巣がんオルガノイドを用いて,ヒト卵巣がん微小環境においてCD73陽性FR4陽性で定義される anergy 細胞のがん免疫動態を解析する.さらに anergy 細胞集団の機能を回復する目的で抗CD73抗体および抗FR4抗体を用いることにより,T細胞の機能が回復するかの検討を行う.続いて卵巣癌細胞株移植モデル・卵巣自然発がんモデルでの腫瘍形成能の比較検討を,抗CD73抗体/抗FR4抗体を用いて行う.さらにICIと併用することによる耐性の克服と抗腫瘍効果の増強の有無を検討する.また次世代sequencerを用いたsingle cell RNA sequenceを行い,bioinformaticsによるヒトとマウスにおいて1細胞レベルでの腫瘍細胞と anergy となった免疫細胞の遺伝子発現を網羅的に解析する.最終的にはそれらの結果を統合して新たな複合的免疫療法の確立する.

3. 研究の方法

(1)卵巣がん臨床検体・腫瘍モデルマウスでの anergy 細胞の検討

Syngeneic マウス卵巣がん細胞(ID8)を移植する腫瘍モデルマウスや申請者が独自に作成した卵巣がん自然発がんモデルマウスにおいて,腫瘍に浸潤する anergy 細胞(CD73陽性FR4陽性)の動態を確認する.細胞レベルでの確認には抗CD73抗体および抗FR4抗体を用いた免疫組織化学およびflow cytometryにより解析する.さらに倫理委員会承認のもと慶應義塾病院産婦人科で得られた卵巣がん臨床検体におけるがん局所に浸潤する anergy 細胞の動態を同様にタンパクレベル,遺伝子レベルでおこなう.これらについては,当科で作成方法を樹立している卵巣がんオルガノイドにおいても同様の解析を行う.

(2)がん浸潤リンパ球からの抗腫瘍T細胞の誘導

がん局所の腫瘍浸潤リンパ球(TIL)をin vitroの系においてT細胞増殖活性化サイトカインであるIL2と共に共培養し抗腫瘍T細胞の誘導を行い,増殖したT細胞の自己腫瘍細胞との反応性をIFN-g産生能を指標としてELISA法にて検討する.これまで卵巣がんにおいて抗原特異的TILを誘導した報告は少なく,悪性黒色腫での方法を参考に行うが,制御性T細胞の増殖を防ぐ目的で抗CCR4抗体投与などを併用して検討を行う.さらに卵巣がんオルガノイドから得られた浸潤T細胞を用いて,抗CD73/FR4抗体を投与する.

(3)RNA Sequencingによる関連分子とpathwayの同定

卵巣がん組織に浸潤するCD4/CD8T細胞をflow cytometerによりsortingを行い,RNAを抽出して次世代sequencerを用いて浸潤T細胞(TIL)の遺伝子発現や anergyT細胞の遺伝子発現を網羅的に解析する.具体的にはRNA sequenceより得られるFPKM値を用い,血液由来の免疫細胞と比較して統計学的に優位に上昇している遺伝子発現リストを作成する.このリストを用いて以下のbioinformatics解析を行う. Gene ontology analysis, GSEA: データベースから機能が関連すると思われるデータベースを抽出し,CD73+FR4+anergyT細胞で特異的に発現する遺伝子リストを作成すると同時に他の免疫細胞との遺伝子発現の違いと相同性を確認する. pathway analysisを行い,CD73およびFR4の発現誘導と関係のあるpathwayを抽出する. t-SNE解析によりsingle cellレベルでの遺伝子発現を可視化する.

(4)腫瘍モデルマウスでのT細胞誘導増強法の検討

先述の通りin vivo腫瘍モデルマウスの検討ではヒト卵巣がんを十分に反映するマウス細胞株(ID8)を用いる.このマウスの腫瘍形成能およびICIの効果を抗CD73抗体・抗FR4抗体を加えることで有意な腫瘍縮小を認めるか検討する.また申請者が作成に成功している卵巣がん自然

発がんモデルも用いて同様の解析を行う。さらに内在性腫瘍抗原特異的な免疫を誘導し、抗 CD73 抗体および抗 FR4 抗体、分子標的薬や化学療法剤などの薬剤や ICI を併用し内在性腫瘍抗原に対する T 細胞機能促進方法を *in vivo* で検討する。

4. 研究成果

(1)がん微小環境での制御性 T 細胞(Treg)における Nr1 の機能解析:昨年度の研究に引き続いてがん微小環境での Nr1 の機能解析を行った。B160VA 細胞をマウスに皮下移植して、腫瘍モデルとした。Nr1KO もしくは Nr1WT マウスにそれぞれ B160VA 細胞株を移植し、さらに OT1 マウスより CD8T 細胞を sorting したのちに移植した。Nr1KO マウスに移植した腫瘍は WT マウスに移植した腫瘍よりも腫瘍の増殖は抑えられていた。これらのマウスから腫瘍に浸潤する Treg の数を比較すると、Nr1KO マウスでは WT マウスと比較して、腫瘍に浸潤する Treg の数が抑えられていた。すなわち Nr1 はがん微小環境においても Treg の誘導にかかわることが判明した。

(2)RNA sequence による Nr1 の機能解析: Nr1WT マウスもしくは Nr1KO マウスの CD4T 細胞を FACS AriaII を用いて sorting した。RNA を抽出し、RNA sequence を行い WT と KO で比較した上で、発現変化の大きい遺伝子群を抽出した。Heatmap を作成後、Pathway 解析および GSEA 解析を行った。その結果、Nr1 が Treg 関連する遺伝子と発現状態が連動することが示され、これまで *in vitro* および *in vivo* で得られた結果に矛盾しないことが示された。さらに、Treg と関連する遺伝子群を抽出して、FPKM 値を WT と KO で比較したところ、Nr1KOCD4T 細胞での発現が優位に低下していることが示された。以上より Nr1 は制御性 T 細胞の誘導また機能維持に重要な分子であると考えられる。

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 0件）

1. 著者名 Hiroshi Nishio, Takashi Iwata, Daisuke Aoki	4. 巻 51
2. 論文標題 Current status of cancer immunotherapy for gynecologic malignancies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Jpn J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 167-172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyaa214	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 -

1. 著者名 Akiko Ohno, Takashi Iwata, Yuki Katoh, Shiho Taniguchi, Kohsei Tanaka, Hiroshi Nishio, Masaru Nakamura, Tohru Morisada, Guanliang Chen, Miyuki Saito, Tomonori Yaguchi, Yutaka Kawakami, Daisuke Aoki	4. 巻 159
2. 論文標題 Tumor-infiltrating lymphocytes predict survival outcomes in patients with cervical cancer treated with concurrent chemoradiotherapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gynecol Oncol .	6. 最初と最後の頁 329-334
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygyno.2020.07.106	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 -

1. 著者名 Hirao N, Iwata T, Tanaka K, Nishio H, Nakamura M, Morisada T, Morii K, Maruyama N, Katoh Y, Yaguchi T, Ohta S, Kukimoto I, Aoki D, Kawakami Y.	4. 巻 155
2. 論文標題 Transcription factor homeobox D9 is involved in the malignant phenotype of cervical cancer through direct binding to the human papillomavirus oncogene promoter.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gynecol Oncol	6. 最初と最後の頁 340-348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygyno.2019.08.026.	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Nishio Hiroshi, Iwata Takashi, Tanaka Kohsei, Saiki Naohiko, Nishio Sakiko, Nakamura Masaru, Morisada Tohru, Tanaka Mamoru, Aoki Daisuke.
2. 発表標題 A novel checkpoint molecule, neurotrophic factor X, is a promising immunotherapy target for ovarian cancer.
3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2019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
研究 分担者	岩田 卓 (Iwata Takashi) (30296652)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	
研究 分担者	谷口 智憲 (Tomonori Yaguchi) (40424163)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	

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