

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18088

研究課題名（和文）腸管内におけるTim3単独発現細胞-大腸がん新規免疫治療に向けて-

研究課題名（英文）Immunotherapy targeting Tim-3+ PD-1- CD8+ cells in colorectal cancer

研究代表者

北風 雅敏（Kitakaze, Masatoshi）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30835252

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）：大腸がん患者の腫瘍組織・正常腸管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、正常腸管でCD8陽性細胞にTim-3分子を単独発現する特異的細胞群を高頻度で認めた。これら細胞群は、食道、胃といった他臓器の正常組織に認めなかった。一部の症例で、これら細胞群はIFN- γ を産生能が比較的高い結果であった。正常腸管のCD8陽性Tim-3単独発現細胞頻度は年齢との関連があったが、その他の腫瘍局在、進行度、予後との関連性を認めなかった。以上、抗腫瘍効果を有する可能性のあるTim-3単独発現細胞は、大腸組織特異的であり、臨床病理学的因子との関わり、発生メカニズムに関して、更なる研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、大腸内の正常組織に抗腫瘍効果を有する特異的細胞群が存在することを示した。これら細胞群は、他臓器の正常組織にほとんど存在しないことから、腸内細菌が発生メカニズムの一つである可能性がある。また、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おり、本研究の結果はこれまでの報告と異なるものであり、Tim-3分子の新しい知見となる。

研究成果の概要（英文）：Immune cells extracted from fresh tumor tissues and normal tissues in colorectal cancer patients were analyzed by flow cytometry. The unique immune cells in CD8+ cells, which expressed only Tim-3, not PD-1 (Tim-3+ PD-1- in CD8+ cells), were found more frequently in normal tissues. On the other hand, these immune cells were not observed in normal tissues of other organs such as the esophagus and stomach. Tim-3+ PD-1- CD8+ cells in some cases showed higher productivity of IFN- γ than other cells. On the contrary, these immune cells were not associated with clinicopathological factors such as the tumor location, progression, and prognosis except for age. Our findings indicate that Tim-3+ PD-1- in CD8+ cells, which might have anti-tumor immunity, is specific to colon normal tissues. Further studies should be warranted to investigate how these immune cells are generated and have an influence on colorectal cancer cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 正常粘膜 tim-3単独発現細胞 PD-1 腸内細菌 抗腫瘍免疫

様 式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

がん治療の一つとして抗 PD-1 抗体の成功は、腫瘍免疫の重要性を示している。一方で抗腫瘍免疫に対する腸内細菌叢の働きも明らかになってきた。我々は、大腸がん患者の正常腸管において特徴的な細胞群 (Tim3 単独発現 CD8T 細胞群) を見出した。同一患者の腫瘍組織内では比較的少ないことや他臓器の正常組織には存在しないことから、これら細胞群の出現には腸内細菌叢が関与しているのではないかと考えた。加えて術前化学療法後の胃がん組織内で出現する Tim3 単独発現 CD8T 細胞 (オフターゲット効果) は、グランザイム B やパーフォリンを高分泌することから、大腸正常腸管においても同様の機能を持つことが期待される。CD8T 細胞の疲弊マーカーの一つである Tim3 分子は PD-1 分子とともに発現し、発現が高いほど細胞傷害活性が低く、予後不良因子とされてきた (Granier C, Cancer Res. 2017)。また腫瘍組織内免疫細胞に発現する分子とされてきた。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り、また大腸がん患者の正常腸管における 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、がん治療としての腸内細菌を用いた新規免疫療法につながるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1) 大腸がん同一患者の新鮮正常組織・腫瘍組織・末梢血を採取し、免疫プロファイリングを作成する。これらデータをもとに、CD8 陽性 Tim-3 単独発現細胞を中心に、臨床病理学的因子との関連性を解析する。

(2) 同時に正常腸管より腸内細菌 (粘液層、粘膜下層) を採取し、CD8 陽性 Tim-3 単独発現細胞の誘導に関わる免疫関連因子を同定し、腸内細菌を介した新規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) 大腸がん正常組織における Tim3 単独発現 CD8T 細胞の頻度解析:

大腸がん手術を施行した症例において、正常組織・腫瘍組織・手術前末梢血から免疫細胞を抽出し、Tim3 単独発現 CD8T 細胞の頻度をフローサイトメトリーで解析する。Tim-3 単独発現細胞頻度に加え、T 細胞 (CD4, CD8)、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)、免疫チェックポイント分子 (PD-1, PD-L1)、活性化マーカー (4-1BB, OX-40, ICOS) など、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- γ , Perforin, Granzyme など) を行う。また FACS Aria II 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) Tim3 単独発現 CD8T 細胞の臨床病理学的意義: 予後

年齢、性別、臨床病期、組織系、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。腸内細菌叢の形成に関わる食生活に関しても、アンケート調査を行う。

また大腸がん腫瘍組織および末梢血から得られた免疫プロファイリングについても臨床データとの関連性を検討する。

(4) Tim3 単独発現 CD8T 細胞の発生メカニズム解析: 腸内細菌の同定:

大腸がん切除検体より正常組織を採取し、粘液層と粘膜下層に分離し保存する。Tim3 単独発現 CD8T 細胞群を認める症例、Tim3 単独発現 CD8T 細胞群を認めない症例のうち、各 10 例を解析対象とする。次世代シーケンサーを用い、16SrRNA をコードする遺伝子を PCR で解析することで、Tim3 単独発現に関わる腸内細菌を同定する。

4. 研究成果

(1) 大腸がん正常組織における Tim3 単独発現 CD8T 細胞の頻度解析:

大腸がん腫瘍組織/正常組織検体を 77 例集積し、フローサイトメトリーでの測定・解析を実施した。正常組織における Tim3 単独発現 CD8T 細胞の割合は $7.1 \pm 6.4\%$ であり、同一患者の腫瘍組織での割合 ($4.1 \pm 3.7\%$) と比較して、有意に高発現していた ($P=0.001$)。また正常組織においては、77 例中 10 例に、10%以上の Tim-3 単独発現細胞群を認めた (図 1、図 2)。

同時期に採取した食道がん手術症例の正常組織検体と比較したところ、食道正常組織には Tim3 単独発現 CD8T 細胞をほとんど認めなかった ($0.5 \pm 0.7\%$ 、図 2)。これは、胃・腎臓・卵巣においてもほぼ同様の結果であった。これは大腸内細菌叢が、Tim-3 単独発現細胞の発生メカニズムの一つである可能性を示唆する。

図 1

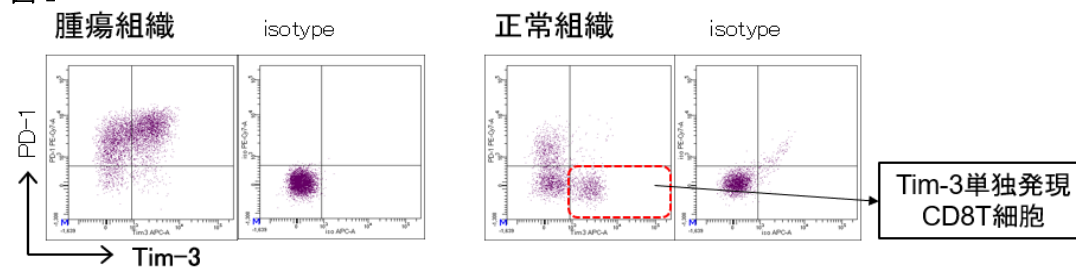
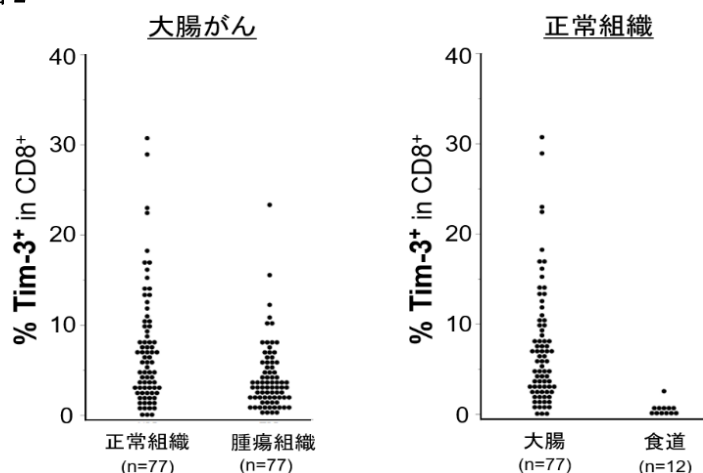
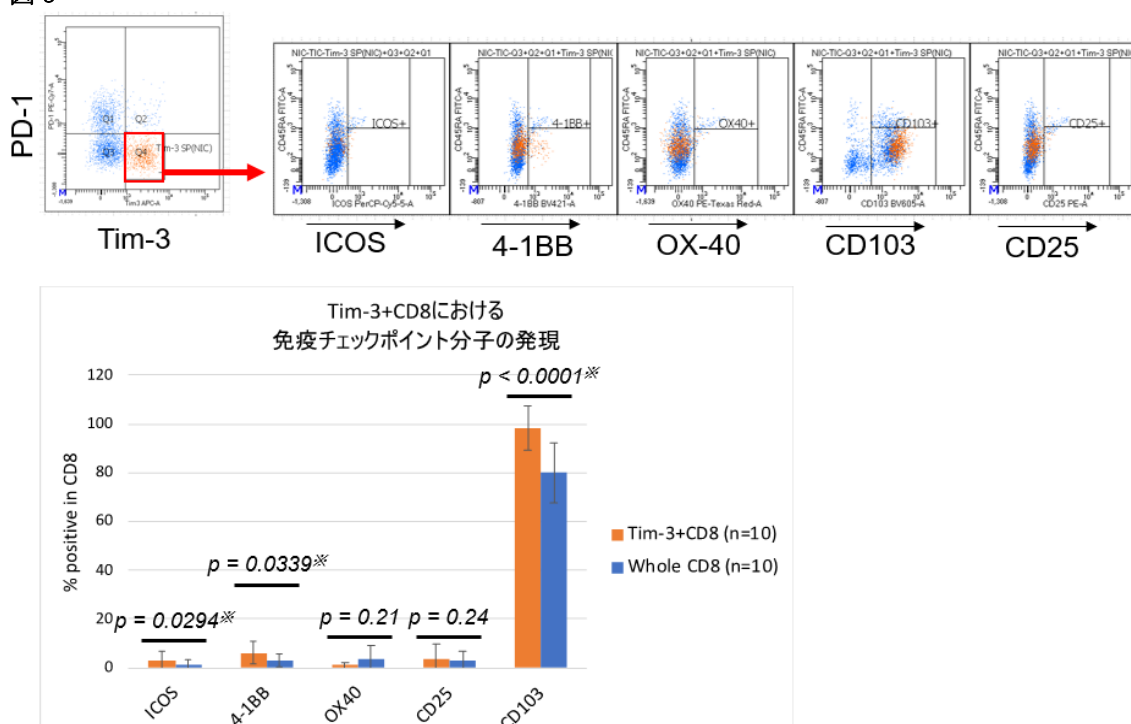


図 2



つぎに Tim3 単独発現 CD8T 細胞に発現している表面分子を解析した。Tim-3 単独発現細胞は、全 CD8T 細胞と比較して、4-1BB, CD103, ICOS といたった表面分子を高発現していることが分かった(図 3)。

図 3

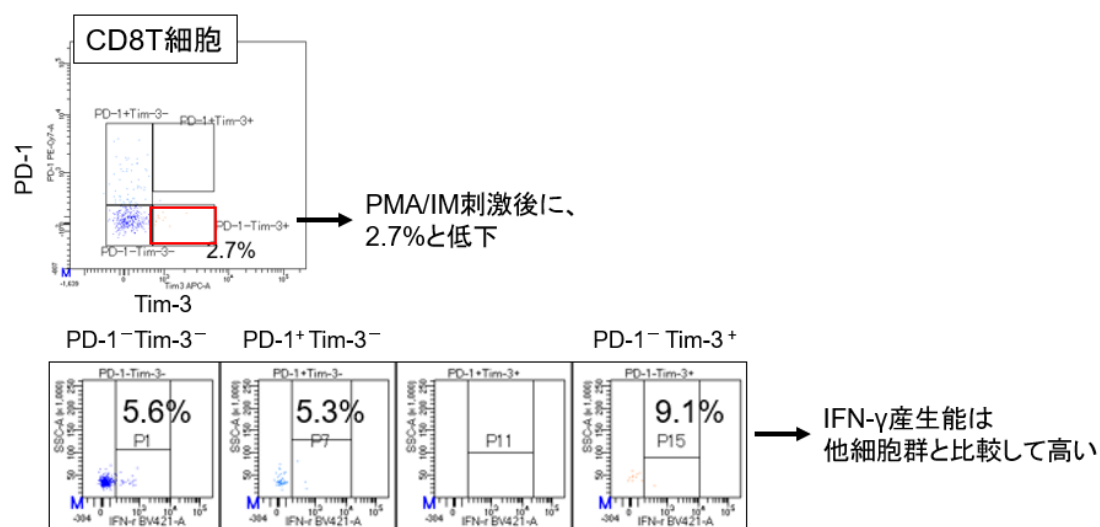


(2) Tim-3 単独発現細胞の機能解析(細胞内サイトカイン解析および細胞傷害活性評価):

研究対象である正常腸管における Tim-3 単独発現 CD8T 細胞は、単位組織あたりの細胞数が少ないこと、また細胞内サイトカイン解析の際の PMA・イオノマイシン刺激にて消失する(死細胞となる)ことから、機能解析に必要な細胞量が得られなかった。これら細胞群が、viability の低い細胞である可能性が示唆され、解析方法変更の必要性があり、現在検討中である。図 4 は細

胞内サイトカイン解析結果の一部であり、Tim-3 単独発現細胞頻度は、PMA・イオノマイシン刺激後に 2.7%に低下していた。本症例では、Tim-3 単独発現細胞群は、他の細胞群と比較して IFN- γ 産生能が高い結果となったが、その他の症例においては細胞数が少ないため評価が困難であった。

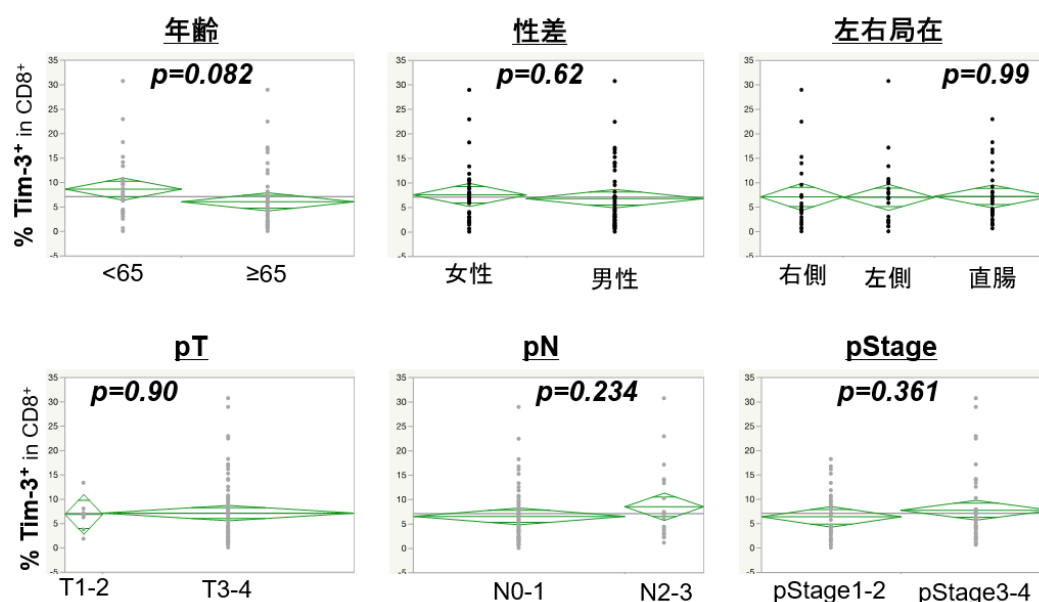
図 4



(3) Tim3 単独発現 CD8T 細胞の臨床病理学的意義：予後

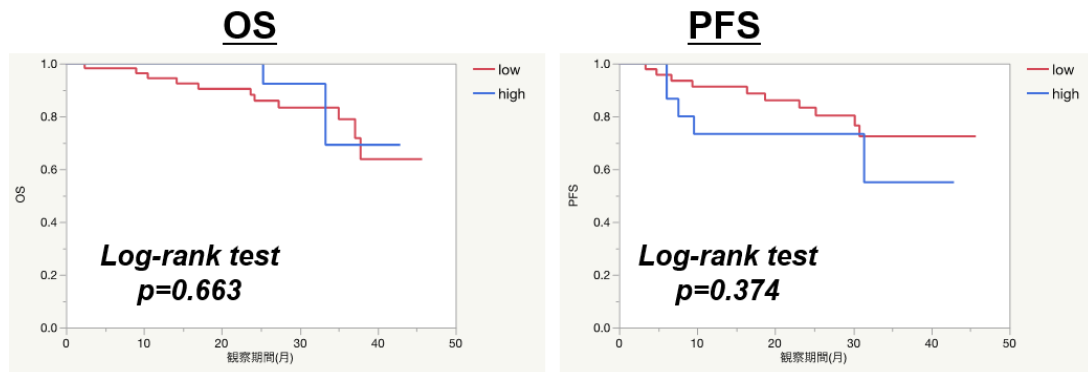
大腸がん患者の正常腸管における Tim-3 単独発現 CD8T 細胞頻度と、年齢(<65 vs ≥ 65)、性別(女 vs 男)、腫瘍の局在(左側結腸 vs 右側結腸 vs 直腸)、進行度(pT1-2 vs pT3-4, pN0-1 vs pN2-3, pStage1-2 vs pStage3-4)を含む臨床病理学的因子との関連性を解析した。やや年齢低値群において Tim-3 の発現量が高い傾向はあるものの($P=0.082$)、その他の因子に関しては統計学的な相関関係は認めなかった(図 5)。

図 5



また予後解析においても、Tim-3 単独発現 CD8T 細胞の高発現群と低発現群とで、全生存期間(overall survival: OS)、無増悪生存期間(progression-free survival: PFS)における統計学的有意差は認めなかった(図 6)。

図 6



腫瘍組織浸潤免疫細胞と、正常組織中 Tim-3 単独発現 CD8T 細胞との関連解析では、腫瘍組織内 Tim-3 陽性 CD4T 細胞との相関を多少認めたが ($R^2=0.23$)、その他の細胞との関連性を認めなかった。

以上より、これら細胞群の発生に腫瘍組織内免疫環境は関連性がない可能性がある。しかし、本解析では Tim-3 単独発現細胞群と患者予後との関連性を認めなかったため、更に細分化する必要性を考え、現在 cytobank を用いて、Tim-3 単独発現細胞を中心に患者予後に関連する免疫学因子を網羅的に解析している。

(4) Tim3 単独発現 CD8T 細胞の発生メカニズム解析：腸内細菌の同定：

(3)において特定の細胞群を同定した後、それら細胞群を認める症例と認めない症例の保存検体(腸内細菌：粘液層、粘膜下層)を解析対象として、次世代シーケンサーを用い細胞群の誘導にかかわる腸内細菌を同定する予定している。解析対象の変更に伴い、現在の保存検体では細胞群を認める症例数が十分ではない可能性があり、随時症例数を増やしていく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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