

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09040

研究課題名（和文）胃癌腫瘍微小環境における免疫抑制機構の解明とその臨床応用について

研究課題名（英文）Elucidation of immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment of gastric cancer and its clinical application

研究代表者

三村 耕作（Mimura, Kosaku）

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90568031

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）：Public database、胃癌細胞株、臨床検体を用いた解析より、胃癌細胞には、PD-1のligand（PD-L1とPD-L2）に加え、LAG-3のligand（LSECtinとMHC class II）、TIM-3のligand（CEACAM-1）が発現しており、それらは共発現している傾向が示された。この結果は、大腸癌、PD-1療法不応性メラノーマ消化管転移巣においても同じ傾向にあった。さらに、腫瘍抗原特異的細胞傷害性T細胞（CTL）は、これらの各経路から抑制を受けており、各々の経路を阻害することで腫瘍抗原特異的CTLの細胞傷害能は増強された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗PD-1抗体が進行・再発胃癌に使用されているが、その奏効率は未だに低く、効果増強方法の開発が急務である。本研究により、胃癌におけるPD-1経路以外の免疫抑制機構（LAG-3経路とTIM-3経路）の存在が明らかとなり、各経路を阻害することで腫瘍抗原特異的細胞傷害性T細胞の機能が増強されることが証明された。これらの成果は、PD-1経路と他の抑制性免疫チェックポイント経路を標的とした複合がん免疫療法の開発の礎となり、医療経済的效果をもたらすだけでなく、進行・再発胃癌の新たな治療戦略を創造する。

研究成果の概要（英文）：Analysis of public database, gastric cancer cell lines, and clinical samples showed that in addition to PD-1 ligands (PD-L1 and PD-L2), LAG-3 ligands (LSECtin and MHC class II) and TIM-3 ligand (CEACAM-1) are expressed on gastric cancer cells, and they tend to be co-expressed. The same tendency was observed in colorectal cancer and in gastrointestinal metastases of malignant melanoma refractory to PD-1 therapy. Furthermore, tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) are suppressed by these pathways, and the inhibition of each pathway enhanced the cytotoxicity of tumor antigen-specific CTLs.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：胃癌 免疫療法 PD-L1 PD-L2 CEACAM-1 LSECtin

1. 研究開始当初の背景

本邦において、抗 PD-1 抗体が進行・再発胃癌に対する治療薬として使用されている。しかし、その奏効率は未だに低く、バイオマーカーの同定や効果増強方法の開発が急務である。今までの胃癌に関する抗 PD-1 抗体の臨床試験結果を検討すると、腫瘍細胞の PD-L1 が陰性でも抗 PD-1 抗体の効果を認める症例、腫瘍細胞上の PD-L1 が陽性であっても抗 PD-1 抗体の効果が持続しない症例が存在する。その機序として、PD-1/PD-L2 経路による T 細胞の抑制、更に、PD-1 経路以外の T 細胞抑制機構の存在が考えられる。

2. 研究の目的

PD-1 経路と CTLA-4 経路以外の抑制性免疫チェックポイント経路の中で、LAG-3 経路と TIM-3 経路は各々の抗体薬を用いた臨床試験が進行固形腫瘍に対して進行しており、将来胃癌にも適応が拡大する可能性がある。しかし、胃癌細胞において、それらの経路におけるリガンドの共発現状況や、PD-1 経路以外の抑制経路が細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の機能に及ぼす影響について詳細に検討した報告は、文献検索上認めなかった。本研究では、胃癌腫瘍微小環境における T 細胞抑制機構として、PD-L1 と PD-L2 (PD-1 の Ligand)、LSECtin (LAG-3 の Ligand)、CEACAM-1 (TIM-3 の Ligand) の共発現の状況を解析し、更に、各経路の CTL 抑制能について検討した。

3. 研究の方法

The Cancer Genome Atlas の stomach adenocarcinoma tissue dataset (PanCancer Atlas, n=401) (<http://www.cbioportal.org/>) から mRNA expression z-scores of genes (RNA Seq V2 RSEM) を入手し、胃癌症例における PD-L1/PD-L2/LSECtin/CEACAM-1 の mRNA の発現状況と共発現の程度について解析した。

胃癌細胞株を IFN- γ の存在下に培養し、PD-L1/PD-L2 発現の変化について解析した。

胃癌症例を対象とし、腫瘍微小環境における癌細胞の PD-L1/PD-L2/LSECtin/CEACAM-1 の発現状況、共発現の程度について免疫染色で評価した。

腫瘍抗原特異的 CTL を誘導し、PD-1/PD-L1 経路、PD-1/PD-L2 経路、LAG-3/LSECtin 経路、TIM-3/CEACAM-1 経路を介する腫瘍抗原特異的 CTL の機能抑制を評価し、その解除方法について検討した。

大腸癌症例、PD-1 療法不応性メラノーマ消化管転移巣における PD-L1/PD-L2/LSECtin/CEACAM-1 の発現状況と共発現の程度について免疫染色で評価した。

4. 研究成果

TCGA の胃癌データ (PanCancer Atlas, n=401) を用いた解析より、PD-L1 と PD-L2 ($r=0.55$, $p<0.001$)、PD-L1 と CEACAM-1 ($r=0.22$, $p<0.001$)、PD-L1 と MHC class II ($r=0.42$, $p<0.001$) の発現に有意な相関関係を認めた。

胃癌細胞株を用いた実験で、各細胞株を IFN- γ の存在下に培養したところ、ほぼ全ての細胞株で PD-L1 の発現は増強し、一部の細胞株においては PD-L2 の発現も増強した。

各細胞株における PD-L1 と PD-L2 の発現強度 (flow cytometry で測定)

	PD-L1 (MFI)		PD-L2 (MFI)	
	original	IFN- γ	original	IFN- γ
GSU	108	344	175	211
HGC-27	39.6	109	65.3	69.4
KATOIII	63.6	105	110	149
MKN7	640	1471	434	692
MKN45	39.2	224	84	107
MKN74	18.9	19	N.D.	N.D.

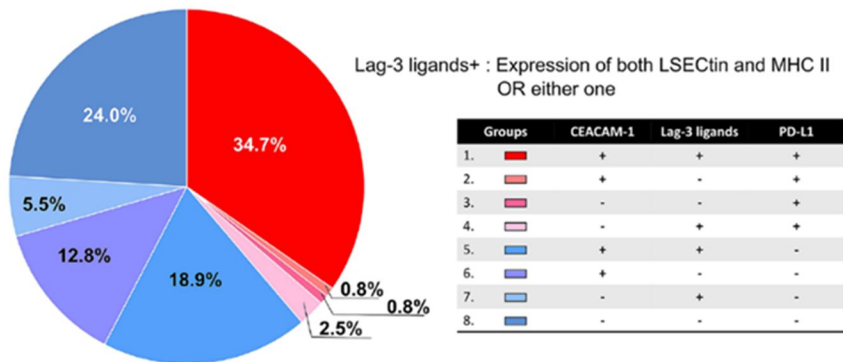
	PD-L1 (MFI)		PD-L2 (MFI)	
	original	IFN- γ	original	IFN- γ
NUGC-3	1369	3919	391	1228
NUGC-4	60.2	794	88.6	95.6
NCI-N87	75	658	80.4	86.6
OCUM-1	74.5	1310	124	125
OE19	37	119	N.D.	N.D.

胃癌手術症例群の切除標本 (n=194) を用いた免疫染色では、16.0% の症例で PD-L1 と PD-L2 が腫瘍細胞に共発現し、17.0% の症例で PD-L1 のみ、12.4% の症例で PD-L2 のみが腫瘍細胞に発現していた (右表)。また、別の胃癌手術症例群 (n=365) の標本を用いた PD-L1、LAG-3 ligands (LSECtin と MHC class II)、CEACAM-1 の多重蛍光免疫染色では、34.7% の症例で全ての分子が共発現しており、76% の症例で何れかの分子が発現していた (下図)。

腫瘍における PD-L1 と PD-L2 の発現頻度

		PD-L2 expression on TCs	
		+	-
PD-L1 expression on TCs	+	16.0 % (31/194)	17.0 % (33/194)
	-	12.4 % (24/194)	54.6 % (106/194)

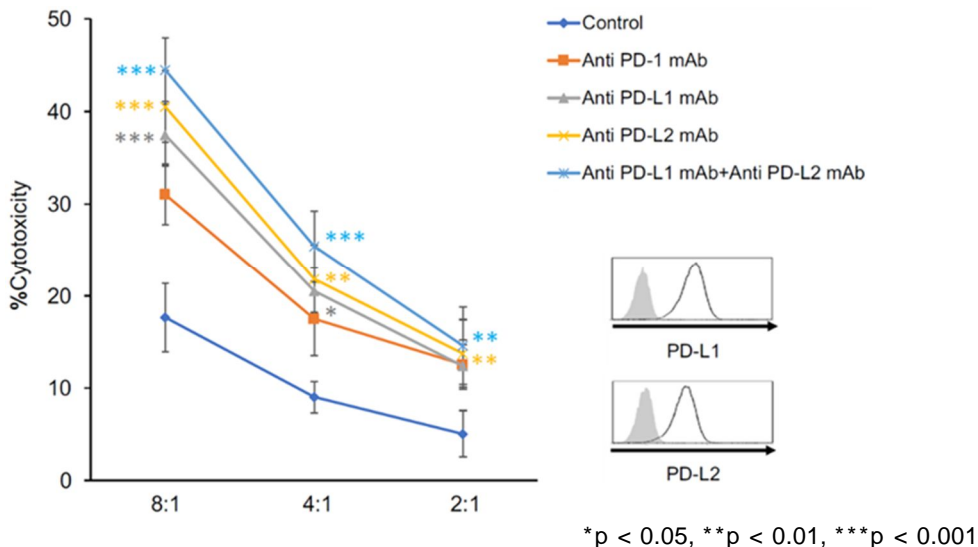
腫瘍における PD-L1、LAG-3 ligands、CEACAM-1 の発現頻度



腫瘍抗原特異的CTLを用いた実験で、抗PD-1抗体/抗PD-L1抗体/抗PD-L2抗体/抗LAG-3抗体/抗TIM-3抗体は、標的となるリガンドを発現する胃癌細胞株に対して、腫瘍抗原特異的CTLの細胞傷害能を増強した。さらに、これらを併用することで相加効果を認めた。

胃癌細胞株 (MKN7) を標的とした

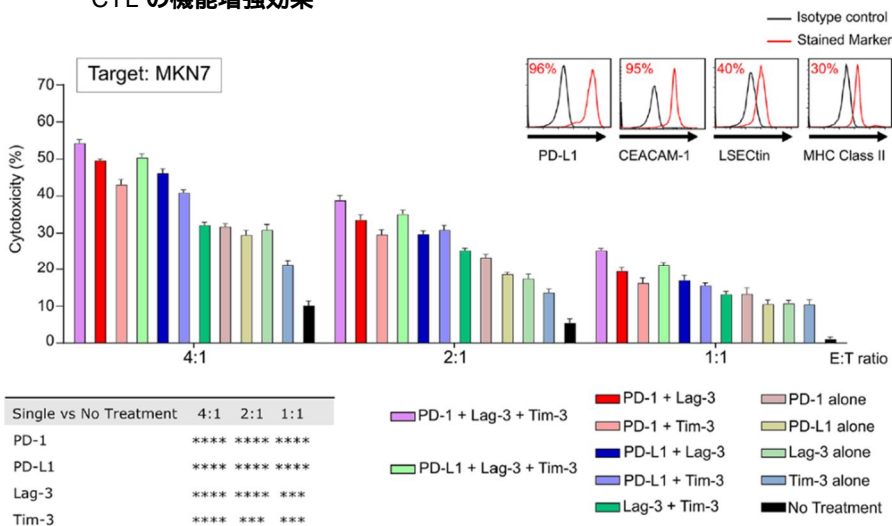
抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 PD-L2 抗体の CTL の機能増強効果



胃癌細胞株 (MKN7) を標的とした

抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 LAG-3 抗体、抗 TIM-3 抗体の

CTL の機能増強効果



Dual vs Single	4:1	2:1	1:1		4:1	2:1	1:1		4:1	2:1	1:1
PD-1+Lag-3 vs PD-1	****	****	****	PD-L1+Lag-3 vs PD-L1	****	****	**	Lag-3+Tim-3 vs Lag-3	ns	***	ns
PD-1+Lag-3 vs Lag-3	****	****	****	PD-L1+Lag-3 vs Lag-3	****	****	**	Lag-3+Tim-3 vs Tim-3	****	****	ns
PD-1+Tim-3 vs PD-1	****	**	ns	PD-L1+Tim-3 vs PD-L1	****	****	**				
PD-1+Tim-3 vs Tim-3	****	****	**	PD-L1+Tim-3 vs Tim-3	****	****	**				

Dual vs Dual	4:1	2:1	1:1		4:1	2:1	1:1
PD-1+Lag-3 vs PD-1+Tim-3	**	ns	ns	PD-1+Tim-3 vs PD-L1+Tim-3	ns	ns	ns
PD-1+Lag-3 vs PD-L1+Lag-3	ns	ns	ns	PD-1+Tim-3 vs Lag-3+Tim-3	****	ns	ns
PD-1+Lag-3 vs PD-L1+Tim-3	****	ns	ns	PD-L1+Lag-3 vs PD-L1+Tim-3	*	ns	ns
PD-1+Lag-3 vs Lag-3+Tim-3	****	****	**	PD-L1+Lag-3 vs Lag-3+Tim-3	****	*	ns
PD-1+Tim-3 vs PD-L1+Lag-3	ns	ns	ns	PD-L1+Tim-3 vs Lag-3+Tim-3	****	**	ns

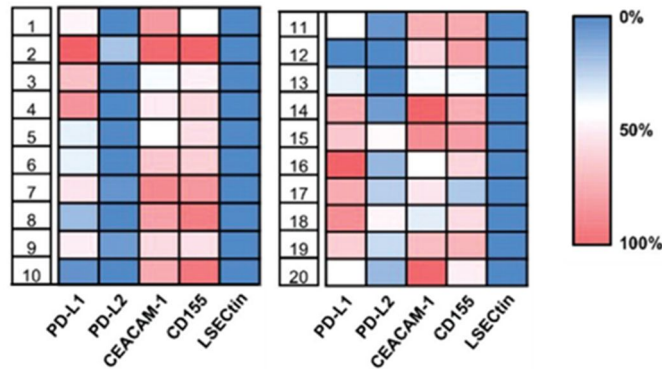
Triple vs Dual	4:1	2:1	1:1		4:1	2:1	1:1
PD-1+Lag-3+Tim-3 vs PD-1+Lag-3	****	**	ns	PD-L1+Lag-3+Tim-3 vs PD-L1+Lag-3	****	***	ns
PD-1+Lag-3+Tim-3 vs PD-1+Tim-3	****	****	****	PD-L1+Lag-3+Tim-3 vs PD-L1+Tim-3	****	***	**
PD-1+Lag-3+Tim-3 vs Lag-3+Tim-3	****	****	****	PD-L1+Lag-3+Tim-3 vs Lag-3+Tim-3	****	****	****

*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001

大腸癌症例(上図)、PD-1療法不応性メラノーマ消化管転移(下表)においても、腫瘍細胞においてPD-L1、PD-L2、CEACAM-1の発現を認め、これらは共発現している傾向にあった。

大腸癌における

抑制性免疫チェックポイントリガンドの発現頻度



PD-1 療法不応性メラノーマ消化管転移における

抑制性免疫チェックポイントリガンドの発現

Case	Tumor cells									
	PD-L1		PD-L2		CD155		CEACAM-1		LSECtin	
	Primary	Metastasis	Primary	Metastasis	Primary	Metastasis	Primary	Metastasis	Primary	Metastasis
1	+	-	-	-	-	+	Medium	High	-	-
2	-	-	-	-	-	+	Medium	High	-	-
3	+	-	-	-	-	+	Low	High	-	-
4	-	-	-	-	-	+	Low	High	-	-

以上の結果より、胃癌細胞上には PD-L1 と PD-L2 (PD-1 の Ligand) に加え、LSECtin と MHC class II (LAG-3 の Ligand)、CEACAM-1 (TIM-3 の Ligand) が発現しており、それらは共発現している傾向にあった。この結果は、大腸癌、PD-1 療法不応性メラノーマ消化管転移巣においても同じ傾向にあった。さらに、腫瘍抗原特異的 CTL は、これらの各経路から抑制を受けており、各経路を阻害することでその細胞傷害能は回復した。

これらの結果は、PD-1 経路と他の抑制性免疫チェックポイント経路を標的とした複合がん免疫療法の開発、PD-1 療法不応時における新たな免疫療法の開発の礎となる。

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 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito Misato, Mimura Kosaku, Nakajima Shotaro, Saito Katsuharu, Min Aung Kyi Thar, Okayama Hirokazu, Saito Motonobu, Momma Tomoyuki, Saze Zenichiro, Ohtsuka Mikio, Yamamoto Toshiyuki, Kono Koji	4. 巻 71
2. 論文標題 Immune escape mechanism behind resistance to anti-PD-1 therapy in gastrointestinal tract metastasis in malignant melanoma patients with multiple metastases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 2293 ~ 2300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-022-03154-z	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 Mimura Kosaku, Kua Ley-Fang, Xiao Jin-Fen, Asuncion Bernadette Reyna, Nakayama Yuko, Syn Nicholas, Fazreen Zul, Soong Richie, Kono Koji, Yong Wei-Peng	4. 巻 24
2. 論文標題 Combined inhibition of PD-1/PD-L1, Lag-3, and Tim-3 axes augments antitumor immunity in gastric cancer-T cell coculture models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 611 ~ 623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-020-01151-8	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 該当する

1. 著者名 NEUPANE PRAJWAL, MIMURA KOSAKU, NAKAJIMA SHOTARO, OKAYAMA HIROKAZU, ITO MISATO, THAR MIN AUNG KYI, SAITO KATSUHARU, ONOZAWA HISASHI, FUJITA SHOTARO, SAKAMOTO WATARU, SAITO MOTONOBU, SAZE ZENICHIRO, MOMMA TOMOYUKI, KONO KOJI	4. 巻 41
2. 論文標題 The Expression of Immune Checkpoint Receptors and Ligands in the Colorectal Cancer Tumor Microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4895 ~ 4905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.15303	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10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北堀有希、三村耕作、中嶋正太郎、小野澤寿志、岡山洋和、藤田正太郎、坂本渉、齋藤元伸、門馬智之、佐瀬善一郎、河野浩二
2. 発表標題 大腸癌腫瘍微小環境における免疫チェックポイントレセプターとリガンドの発現について
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三村耕作、中嶋正太郎、多田武志、渡辺洋平、早瀬傑、佐瀬善一郎、河野浩二
2. 発表標題 進行食道扁平上皮癌症例における複合がん免疫療法の開発
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三村耕作、中嶋正太郎、金田晃尚、楡井東、菊池智弘、多田武志、花山寛之、渡辺洋平、佐瀬善一郎、河野浩二
2. 発表標題 上部消化管癌における抗PD-1療法と局所放射線療法を用いた複合がん免疫療法の開発
3. 学会等名 第35回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三村耕作、花山寛之、渡辺洋平、早瀬傑、岡山洋和、齋藤元伸、門馬智之、佐瀬善一郎、河野浩二
2. 発表標題 Development of combination immunotherapy with anti-PD-1 mAb for esophageal squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三村耕作、中嶋正太郎、松本拓朗、多田武志、花山寛之、渡辺洋平、早瀬傑、岡山洋和、齋藤元伸、門馬智之、佐瀬善一郎、河野浩二
2. 発表標題 Development of biomarkers for anti-PD-1 therapy and of the combinatorial immunotherapy in gastric cancer
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 三村耕作、中嶋正太郎、伊藤美郷、金田晃尚、渡辺洋平、佐瀬善一郎、河野浩二
2. 発表標題 Development of combination cancer immunotherapy using anti-PD-1 mAb and radiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma
3. 学会等名 第34回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三村耕作、花山寛之、渡辺洋平、小野澤寿志、佐瀬善一郎、門馬智之、大木進司、河野浩二
2. 発表標題 Development of immunotherapy for gastric cancer (シンポジウム)
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 Kosaku Mimura, Yoshiyuki Suzuki, and Koji Kono
2. 発表標題 Tumor immune response in the tumor microenvironment (シンポジウム)
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kosaku Mimura, Shotaro Nakajima, Yasuyuki Kanke, Hiroyuki Hanayama, Yohei Watanabe, Suguru Hayase, Kazuhiro Okayama, Motonobu Saito, Zenichiro Saze, Tomoyuki Momma, Koji Kono
2. 発表標題 The possibility of phosphor-STAT1 as a biomarker in anti-PD-1 antibody therapy for gastric cancer (ワークショップ)
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三村耕作、花山寛之、渡辺洋平、早瀬傑、門馬智之、佐瀬善一郎、河野浩二
2. 発表標題 上部消化管癌における免疫療法（ワークショップ）
3. 学会等名 第82回日本臨床外科学会総会
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
研究分担者	花山 寛之 (Hanayama Hiroyuki) (00622333)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	
研究分担者	河野 浩二 (Kono Koji) (40283204)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

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