

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09079

研究課題名(和文) CyTOFによる大腸腫瘍浸潤CD4+FOXP3+細胞の解析と予後因子としての役割

研究課題名(英文) Analysis of CD4+FOXP3+ cells infiltrating colorectal tumors using CyTOF and their relationship to prognosis

研究代表者

吉田 晋 (YOSHIDA, Shin)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：60554805

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)：大腸癌腫瘍浸潤CD4陽性細胞とFOXP3陽性細胞のそれぞれの細胞機能を詳細に解明するには至らなかったが、局所免疫反応と全身性炎症反応との関連を解析した研究により成果を得た。既報では大腸癌組織中の腫瘍細胞と間質細胞のどちらが血中IL-6に強い影響を与えるかは不明であった。CyTOFを用いた研究によって、大腸癌における間質細胞と血中IL-6濃度に有意な相関を認め、さらに腫瘍浸潤免疫細胞におけるIL-6高発現は抑制性の免疫細胞(MDSC、effector制御性T細胞)の高集積と関連があり、予後不良の一因となっている可能性があるという新たな知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、大腸癌における間質細胞と血中IL-6濃度に有意な相関を認め、さらに腫瘍浸潤細胞におけるIL-6高発現は抑制性の免疫細胞(MDSC、effector制御性T細胞)の高集積と関連があり、予後不良の一因となっている可能性があるという新たな知見が得られた。大腸癌に対する治療戦略をたてる上で、本研究がその一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We were unable to elucidate in detail the respective cellular functions of colorectal cancer tumor-infiltrating CD4+ cells and FOXP3+ cells. Results were obtained from studies analyzing the relationship between local immunity and systemic inflammation. It has been previously reported that IL-6 levels in colorectal cancer tissue strongly correlate with serum IL-6 levels. However, it was unclear whether tumor cells or stromal cells have a stronger effect on blood IL-6. The present study using CyTOF showed a significant correlation between stromal cells and serum IL-6 concentration in colorectal cancer. Furthermore, we found that high IL-6 expression in tumor-infiltrating cells is associated with a high concentration of immunosuppressive cells, which may contribute to a poor prognosis.

研究分野：癌免疫

キーワード：大腸癌 腫瘍浸潤リンパ球 マスサイトメトリー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦では大腸癌の治療方針決定に、大腸癌取扱い規約による進行度(ステージ)分類が主に用いられている。しかし、同じステージでも予後が異なる症例が含まれている。予後予測因子はいくつか報告されているが明確な基準がないため、予後予測因子として新たなバイオマーカーの探索研究が世界的に進められている。腫瘍浸潤リンパ球は予後予測因子として以前より報告されているが、Immunoscore により世界的基準が提示された(Jerome G, Hazama S, Suzuki N, et al:THE LANCET 2018)。我々、研究代表者らは Jerome らとの共同研究で、大腸癌 342 例の切除標本を用いて免疫染色で腫瘍浸潤 CD3/CD8 陽性細胞の定量を行ったが、独自に CD4/FoxP3 陽性細胞についても追加で定量を行った。その結果、CD4 陽性細胞と Foxp3 陽性細胞の腫瘍浸潤が多い症例で有意に予後が良好であった。しかし、大腸癌において腫瘍浸潤 Foxp3 陽性細胞がどのような役割を果たしているかは、未だ不明である。

(2) 炎症が細胞の癌化や癌の浸潤に好都合な微小環境を作り出し、炎症性サイトカインが腫瘍増殖に関与していることが報告されている(Ferrone C.:J Clin Oncol 2010, Zhang F: AGS 2022)。実際に申請者の所属する研究室でも、炎症性サイトカインの一つである IL-6 が、進行再発大腸癌に対するペプチドワクチン療法 responder の有効なバイオマーカーとなる可能性を報告している(Hazama S, Suzuki N, et al: Anticancer research 2014)。しかし、大腸癌の予後予測因子である前出の Immunoscore と炎症性サイトカインにどのような関連性があるかは不明である。

2. 研究の目的

Immunoscore と IL-6 を始めとした炎症性サイトカインの両者を組み合わせた、より強い大腸癌再発危険因子となるバイオマーカーを探索すると共に、腫瘍浸潤 Foxp3 陽性細胞の役割を分析し、予後との関連を明らかにする。

3. 研究の方法

大腸癌 200 症例の切除標本を用いた免疫染色による腫瘍浸潤 CD3/CD8/CD4/FoxP3 陽性細胞の解析を行う。さらに、免疫染色を行った症例の術前末梢血を用いて ELISA 法で炎症性サイトカインを測定し、これらの結果を統合してより強い術後予後予測因子を抽出する。また、予後不良例(ステージ IV)25 例と予後良好例(ステージ II)25 例の切除標本を用いてマスマイトメトリー(CyTOF)を行い、大腸癌における腫瘍浸潤 Foxp3 陽性細胞の役割を解明すると共に予後関連因子の総合的解析を行う。

Metat	Target	Surface/Intracellular	Clone
89Y	CD45	Surface	H130
115In	IL-1b	Surface	8516MAB201
141Pr	CD3	Surface	UCHT1
142Nd	IL-4	Intracellular	MP4-25D2
143Nd	CD45RA	Surface	HT100
144Nd	CD11b (Mac-1)	Surface	ICRF44
145Nd	CD163	Surface	GHI/61
146Nd	CD8a	Surface	RPA-T8
147Sm	CD20	Surface	2H7
148Nd	CD274 (PD-L1)	Surface	29E-2A3
149Sm	CD194 (CCR4)	Surface	L291H4
150Nd	CD134 (OX40)	Surface	ACT35
151Eu	CD278/ICOS	Surface	C398.4A
152Sm	TNFA	Intracellular	Mab11
153Eu	TIGIT	Surface	MBSA43
154Sm	TIM-3	Surface	F38-2E2
155Gd	CD279 (PD-1)	Surface	EH12.2H7
156Gd	IL-6	Intracellular	MO2-13A5
158Gd	CD33	Surface	WM53
159Tb	FoxP3	Intracellular	259D/C7
160Gd	CD39	Surface	A1
161Dy	Ki-67	Intracellular	B56
162Dy	CD80 (B7-1)	Surface	2D10.4
163Dy	TGFbeta	Intracellular	TW4-6H10
164Dy	Arginase 1	Intracellular	14D2C43
165Ho	CD223/LAG-3	Surface	11C2C65
166Er	IL-10	Intracellular	JES3-9D7
167Er	CD197 (CCR7)	Surface	G043H7
168Er	IFNg	Intracellular	27B
169Tm	CD25 (IL-2R)	Surface	2A3
170Er	CD152 (CTLA-4)	Surface	14D3
171Yb	CD68	Surface	Y1/82A
172Yb	IL-17A	Intracellular	BL168
173Yb	HLA-DR	Surface	L243
174Yb	CD4	Surface	SK3
175Lu	Perforin	Intracellular	B-D48
176Yb	CD56 (NCAM)	Surface	NCAM16.2
209Bi	CD16	Surface	3G8

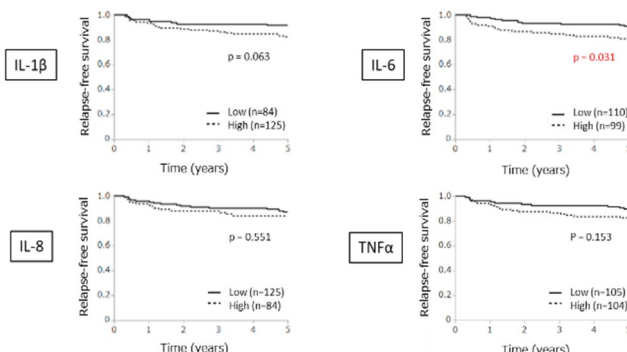
表1: CyTOF 解析で使用した抗体

追加研究:1993年から2012年の間に教室で根治切除術を行った大腸癌患者 209 例(術前治療を行った症例を除く)を対象とした。術前の血清 IL-6 値を始めとした血中サイトカイン濃度(IL-1, IL-6, IL-8, TNF-)は、ELISA 法を用いて測定した。切除標本における、腫瘍および間質細胞の IL-6 発現、腫瘍浸潤リンパ球(CD3/CD8/CD4/FoxP3 陽性細胞)を免疫組織化学染色(IHC)法で評価した。さらに 10 例において、CyTOF による 38 種類の抗体(表1)を用いた腫瘍浸潤免疫細胞の単一細胞解析を行った。IL-6 と制御性 T 細胞を含む種々の腫瘍浸潤リンパ球との関係を統計学的に検討した。最後に、IL-6 が腫瘍浸潤免疫細胞に与える影響を評価するため、IL-6 転化による PBMC のフェノタイプの変化を in-vitro で解析した。

4. 研究成果

(1) 大腸癌における腫瘍浸潤 Foxp3 陽性細胞の役割を解明し、予後関連因子の総合的解析を行うには至らなかった。

以下は、(2)追加研究の成果を示す。
血中サイトカイン濃度と予後の関連を解析した。結果、血清 IL-6 値のみが大腸癌患者の予後不良(無再発生存率)と有意な相関を認めた(図1)。さらに、腫瘍深達度とも相関を認めた。そこで、今後の研究は IL-6 に焦点を当てた。



cut-off値: 時間依存ROC曲線より算出 (IL-1β: 0.0693pg ml⁻¹, IL-6: 0.9825pg ml⁻¹, IL-8: 17.9423pg ml⁻¹, TNFα: 2.0673pg ml⁻¹).

図1: 血清サイトカイン濃度と予後

腫瘍組織における IL-6 発現部位を検討したところ、腫瘍細胞および腫瘍間質細胞に IL-6 の発現を認められた(図4)。一方で、血清 IL-6 値と相関を認められたのは腫瘍間質細胞における IL-6 発現のみであった。以上の結果から、腫瘍間質における IL-6 発現細胞が血清 IL-6 および予後と関連する可能性を考えた。

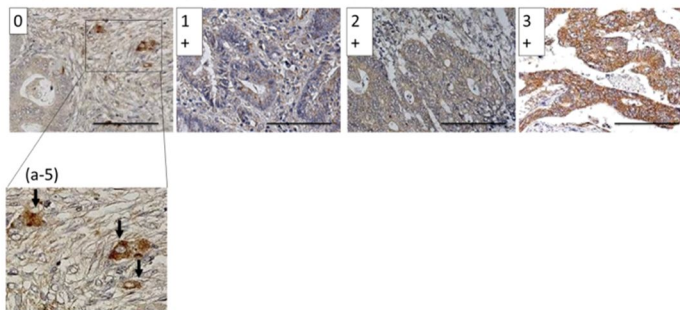


図2：腫瘍組織における IL-6 発現状態の評価

続いて、血清 IL-6 値と腫瘍浸潤免疫細胞との関係を検討した。結果、血清 IL-6 値は CD3、CD4 陽性細胞ならびに FOXP3 陽性細胞の密度と関連を認められた(表2)。腫瘍浸潤リンパ球と予後の解析では、腫瘍浸潤 FoxP3 陽性細胞高密度群は有意に予後不良であった。

	CD3			CD4			CD8			FOXP3		
	TIL density		<i>p</i> -value	TIL density		<i>p</i> -value	TIL density		<i>p</i> -value	TIL density		<i>p</i> -value
	Low	High		Low	High		Low	High		Low	High	
Stromal cells												
IL-6 Low	46	59	0.061	46	59	0.061	48	57	0.188	46	59	0.083
High	59	45		59	45		57	47		58	46	

TILs tumor-infiltrating lymphocytes, IHC immunohistochemistry, CD cluster of differentiation, FOXP3 forkhead box P3, IL interleukin.

表2：血清 IL-6 値と腫瘍浸潤リンパ球の関係

以上の解析結果より、血清 IL-6 値は腫瘍浸潤免疫細胞を通じて大腸癌の予後と関連する可能性を考えた。そこで、腫瘍浸潤免疫細胞と IL-6 との関係の詳細に検討するため、CyTOF を用いた解析を行った。

図3に得られたデータの次元圧縮を行った t-SNE map の代表例を示す。まず、腫瘍浸潤免疫細胞のうち IL-6 陽性細胞は主に骨髓球系細胞で構成され、リンパ系細胞はほとんど構成されていないことが示された(図4)。中でも、CD33+HLADR+ の DC や単球系、CD33+HLADR- の骨髓由来抑制性細胞(MDSC)および CD68+マクロファージがその多くを占めていた。

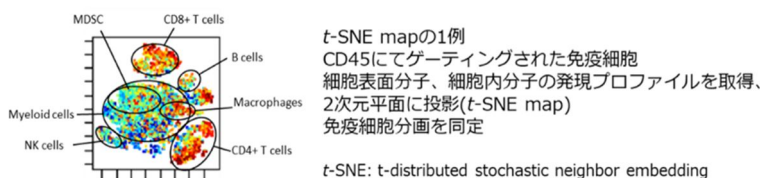
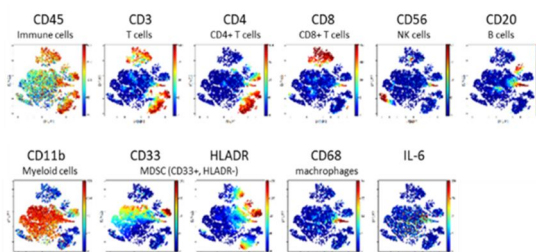


図3：腫瘍浸潤免疫細胞の CyTOF 解析における t-SNE マップ

そこで、腫瘍浸潤免疫細胞のうち CD11+腫瘍浸潤骨髓球に着目し解析を行った。検討方法として、腫瘍浸潤免疫細胞における IL-6 発現程度によって中央値で高値群と低値群に分け、両群間の免疫細胞フェノタイプの違いを検討した。

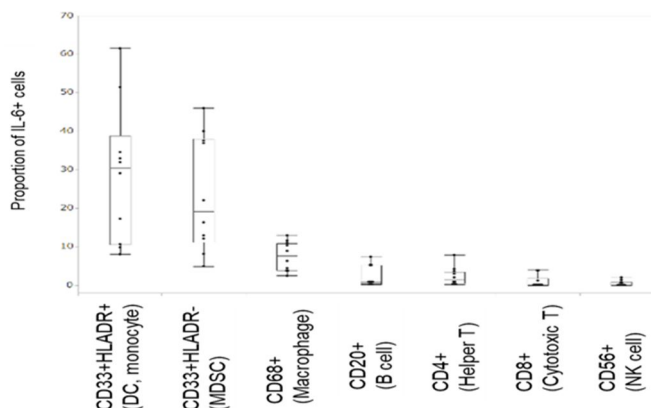


図4：IL-6 陽性細胞のフェノタイピング

IL-6 高発現群では、CD11b+CD33+HLADR-骨髄由来抑制細胞(MDSC)の割合が IL-6 低発現群より有意に高く(p=0.028)、IL-6 高値群では MDSC 上の IL-10 陽性細胞の割合が高い傾向を認めた(p=0.078)(図5)。同様に CD11b+CD68+マクロファージは IL-6 高値群で高い傾向を認めた一方で、M1/2マクロファージといった極性と IL-6 の相関は認められなかった。制御性 T 細胞に関しては、IL-6 高値群では CD4+FOXP3highCD45RA エフェクター制御性 T 細胞(eTreg)の割合が有意に高値であった(p=0.047)。さらに、eTreg 上の IL-10+または CTLA-4+細胞の割合は IL-6 高値群で高い傾向を認めた(p=0.076)(図6)。CD3+リンパ球についても同様に IL-6 との関係を検討したが、チェックポイント分子や細胞障害マーカー等の発現状況と有意な相関は認められなかった。以上の検討結果から、腫瘍間質の IL-6 は特に骨髄球系の腫瘍浸潤免疫細胞と関連する可能性が示唆された。

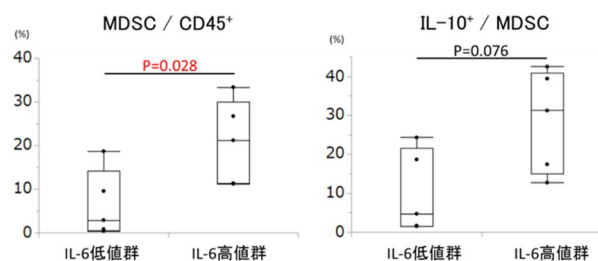


図5：IL-6 陽性細胞数と MDSC の関係

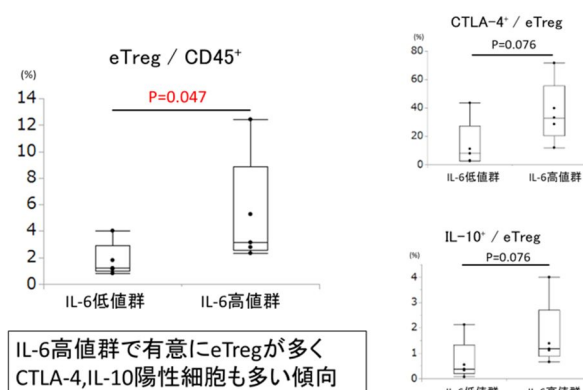


図6：IL-6 と制御性 T 細胞の関係

最後に、IL-6 が腫瘍浸潤免疫細胞に与える影響を評価するため、患者 PBMC を用いた検討を行った。PBMC に IL-6 を添加し、フェノタイプの変化をフローサイトメトリーで評価した。結果、IL-6 添加により MDSC の割合は増加する傾向を認めたが有意差は認められなかった。一方で、MDSC 上の IL-6 発現量の有意な増加を認めた。その他の免疫細胞に明らかな変化は認められなかった。

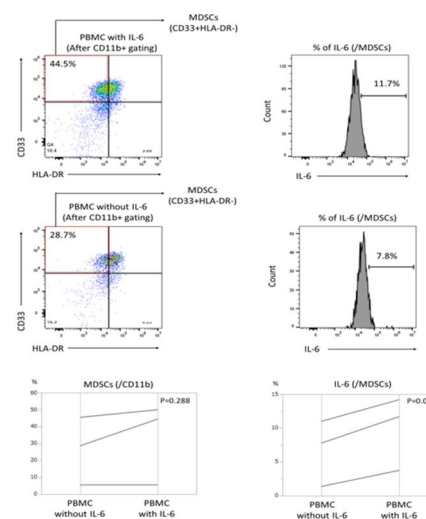


図7：IL-6 が MDSC に及ぼす影響

【成果のまとめ】大腸癌における間質細胞と血中 IL-6 濃度に有意な相関を認めた。腫瘍浸潤細胞における IL-6 高発現は抑制性の免疫細胞の高集積と関連を認め、予後不良の一因となっている可能性がある。

< 引用文献 >

Pagès F, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet*. 2018 May 26;391(10135):2128-2139.

Kuwahara T, et al. Intratumoural-infiltrating CD4 + and FOXP3 + T cells as strong positive predictive markers for the prognosis of resectable colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2019 Oct;121(8):659-665.

Ferrone C, Dranoff G. Dual roles for immunity in gastrointestinal cancers. *J Clin Oncol*. 2010 Sep 10;28(26):4045-51.

Zhang F, Qiao S. Research progress on the relationship Between inflammation and colorectal cancer. *Ann. Gastroenterol. Surg*. 2022; 6: 204-211.

Hazama S, et al. Predictive biomarkers for the outcome of vaccination of five therapeutic epitope peptides for colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2014 Aug;34(8):4201-5.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamamoto Tsunenori, Suzuki Nobuaki, Yoshida Shin, Tomochika Shinobu, Xu Ming, Nakagami Yuki, Hazama Shoichi, Nagano Hiroaki, et al	4. 巻 -
2. 論文標題 IL-6 Levels Correlate with Prognosis and Immunosuppressive Stromal Cells in Patients with Colorectal Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-023-13527-y	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本常則、吉田晋、裕彰一、鈴木伸明、友近忍、徐明、中上裕有樹、永野浩昭
2. 発表標題 大腸癌患者における腫瘍内サイトカイン発現と血中サイトカイン濃度の関係
3. 学会等名 第43回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本常則、吉田晋、裕彰一、鈴木伸明、友近忍、徐明、中上裕有樹、永野浩昭
2. 発表標題 大腸癌術前血中サイトカイン濃度と腫瘍内サイトカイン発現の関係
3. 学会等名 第31回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本常則、吉田晋、裕彰一、鈴木伸明、友近忍、徐明、中上裕有樹、永野浩昭
2. 発表標題 大腸癌患者における血中 IL-6 濃度と腫瘍微小環境における免疫抑制状態、予後との関係
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本常則、吉田晋、碓彰一、鈴木伸明、友近忍、徐明、中上裕有樹、永野浩昭
2. 発表標題 大腸癌切除例における IL-6 と予後および腫瘍浸潤免疫細胞の関係
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

〔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	碓 彰一 (HAZAMA Shoichi) (50253159)	山口大学・医学部・特別医学研究員 (15501)	
研究分担者	鈴木 伸明 (SUZUKI Nobuaki) (50526910)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (15501)	
研究分担者	友近 忍 (TOMOCHIKA Shinobu) (30403679)	山口大学・医学部附属病院・助教 (15501)	
研究分担者	徐 明 (JO Mei) (40645503)	山口大学・大学院医学系研究科・学術研究員(寄附金) (15501)	
研究分担者	中上 裕有樹 (NAKAGAMI Yuki) (30843304)	山口大学・医学部・学術研究員 (15501)	

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