

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22845

研究課題名(和文)大腸癌における三次リンパ組織形成ならびに抗腫瘍免疫誘導機構の解明

研究課題名(英文) Identification of mechanistic tertiary lymphoid structure induction and anti-tumor immunity in colorectal cancer

研究代表者

伊藤 善郎 (Ito, Yoshiro)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10882251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌手術症例の切除標本を用いてヒト大腸癌組織に存在する自然リンパ球(ILC)分画を明らかとした。ILC分画の中で、NKp44+ ILC3は、大腸正常粘膜および早期腫瘍に豊富に存在しており、腫瘍間質細胞に作用して、リンパ組織形成を誘導することがわかった。また、大腸癌組織において抗腫瘍免疫作用を示す三次リンパ組織(TLS)は、早期腫瘍で多く見られ、進行腫瘍では密度が減少していた。腫瘍進行に伴うTLSの減少とNKp44+ ILC3の減少は相関しており、NKp44+ ILC3が、三次リンパ組織(TLS)形成を介した抗腫瘍免疫誘導に関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、複数の癌腫において、腫瘍関連三次リンパ組織(TLS)の存在が良好な予後と強く相関することが報告され、新たな腫瘍免疫療法の標的として着目されてきた。しかし、腫瘍微小環境におけるTLS形成ならびに抗腫瘍免疫誘導の詳細なメカニズムは解明されていなかった。本研究では、大腸癌において3型自然リンパ球が腫瘍間質細胞に作用してTLS形成に関与する可能性を示した。更なる研究を追加し、抗腫瘍免疫の誘導が明らかとなれば、TLSを賦活し、腫瘍局所で効率的に抗腫瘍免疫を促進させることで、既存の免疫チェックポイント阻害剤などとの併用による治療効果の増大が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified distinct subsets of human innate lymphoid cells (ILCs) in normal colonic mucosa and colorectal cancer (CRC) by isolating lymphocytes from surgically resected specimens. NKp44+ ILC3s, which were abundant in normal colonic mucosa compared to other ILC subsets, were associated with formation of tertiary lymphoid structures (TLSs) and induction of subsequent anti-tumor immunity in CRC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：三次リンパ組織 大腸癌 自然リンパ球 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

腫瘍微小環境においては、組織特異的な免疫環境が作り出されている。近年、免疫チェックポイント阻害剤を皮切りに、癌免疫療法の開発や臨床実用化が急速に発展してきたが、大腸癌に対する効果の高い免疫療法は未だに存在しない。大腸癌に対する新規免疫療法の標的を模索するにあたり、臨床検体を用いて実際のヒト大腸癌に存在する腫瘍免疫環境を把握する研究は非常に重要である。当教室では、ヒト腸管および大腸癌組織より生きた免疫細胞を採取して解析する技術を確立し、腸管特異的な免疫細胞やそれらの作り出す特殊な免疫環境を示してきた (Ogino T et al. Gastroenterology 2013, Saito T et al. Nat Med 2016, Matsuno H et al. Inflamm Bowel Dis 2017)。

近年、新たな腫瘍免疫療法の標的として、三次リンパ組織 (tertiary lymphoid structure: TLS) が着目されている。TLS は、慢性感染症や自己免疫疾患などの慢性炎症組織で観察される異所性リンパ組織で、リンパ節や腸管パイエル板などの二次リンパ組織と同様の構造を有する。TLS は腫瘍組織にも観察され、複数の癌種において、TLS の存在が良好な予後と強く相関することが相次いで報告されている (Sautès-Fridman C et al. Nat Rev Cancer 2019, Cabrita R et al. Nature 2020)。大腸癌においても TLS は良好な予後と関連することが報告されている (Di Caro G et al. Clin Cancer Res 2014)。腫瘍内の TLS は、胚中心を有し、T 細胞・B 細胞へのがん抗原提示ならびに記憶細胞への分化誘導が行われる場と考えられているが、腫瘍微小環境における TLS 形成および抗腫瘍免疫誘導の詳細なメカニズムは解明されていない。

胎生期における二次リンパ組織の形成は、LTi (lymphoid tissue inducer) 細胞によって誘導される。ヒト肺癌組織においては、3 型自然リンパ球 (group 3 innate lymphoid cell: ILC3) の NKp44⁺ ILC3 という分画が、LTi 細胞様のリンパ組織誘導能を有することがわかり、TLS 形成ならびに抗腫瘍効果への関与の可能性が示唆された (Correia P et al. Nat Commun 2015)。当教室ではこれまでに、大腸癌切除標本を用いた解析により、ヒト大腸癌組織においても同様に NKp44⁺ ILC3 が存在することを発見した。しかし、大腸癌における TLS 形成のメカニズムおよび、抗腫瘍免疫効果との関連は、解明されていない。

2. 研究の目的

ヒト大腸癌における TLS 形成のメカニズムを明らかとし、抗腫瘍免疫促進を利用した治療への応用の可能性を模索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 正常大腸粘膜および大腸癌組織に存在する ILC 分画の解析

大腸癌手術症例の切除標本より、正常粘膜部および腫瘍部を採取し、Collagenase、DNase を用いた酵素処理にて細胞を単離した。採取し細胞を flow cytometry にて解析し、ILC 分画の分布を評価した。また、ソーティングにより回収した ILC 分画の遺伝子発現を RNA シークエンスならびに RT-PCR により評価した。

(2) リンパ組織誘導能の評価

大腸癌組織における NKp44⁺ ILC3 のリンパ組織誘導能は、flow cytometry を用いて単離・採取した NKp44⁺ ILC3 と間質細胞 (CD45⁺ CD31⁻ CD90⁺ cells) を共培養し、間質細胞におけるリンパ組織誘導能に関与するケモカイン (CXCL13, CCL19, CCL21) や接着分子 (ICAM-1, VCAM-1) の遺伝子発現の変化を RT-PCR で評価することで検討した。

(3) 大腸癌 TLS の評価

大腸癌組織における TLS の評価は、HE 染色ならびに抗 CD3, CD20, CD21 抗体を用いた免疫組織化学染色で行った。また、TLS における ILC3 の局在の評価は、抗 CD3, Ror γ t 抗体を用いた二重免疫組織化学染色で行った。

4. 研究成果

(1) 正常大腸粘膜および大腸癌組織に存在する NKp44⁺ ILC3 の解析

正常大腸粘膜には、ILC1、NKp44⁺ ILC3、NKp44⁻ ILC3 の 3 分画が存在しており、ILC2 はこれらと比較し非常に少ない分画であった。この中で、NKp44⁺ ILC3 が正常大腸に最も多く存在する ILC 分画であり (ILC1: 18.3% \pm 1.5%, NKp44⁺ ILC3: 49.3% \pm 1.9%, NKp44⁻ ILC3: 25.4% \pm 1.7%)、末梢血などの他臓器にはほとんど存在しない分画であることがわかった。続いて、大腸癌組織における ILC 分画を評価したところ、正常粘膜と同様の 3 分画 (ILC1、NKp44⁺ / NKp44⁻ ILC3) が存在しており、ILC2 は大腸癌組織においてもほとんど存在しなかった。

(2) 大腸 NKp44⁺ ILC3 のリンパ組織誘導能の評価

正常大腸粘膜において ILC 分画の中で最も豊富に存在し、肺癌組織において TLS 誘導能が示唆されている NKp44⁺ ILC3 に着目して実験を進めた。正常大腸粘膜に存在する NKp44⁺ ILC3

は、既知の *IL22* に加え、リンパ組織形成に関連する遺伝子 (*LTA*, *LTB*, *TNF*, *CXCR5*, *NRP1*) を高発現する分画であることがわかった (図 1)。

LTA や *LTB* にコードされる lymphotoxin は、間質細胞に作用して接着分子やケモカインの発現を亢進させることで、異所性リンパ組織を誘導することが知られているため、大腸癌組織中の間質細胞を採取し解析した。正常大腸の *NKp44+* ILC3 と T4 腫瘍の間質細胞を共培養すると、間質細胞における接着分子 (*ICAM-1*) ならびにケモカイン (*CXCL13*, *CCL21*) の発現亢進が見られ、*NKp44+* ILC3 が間質細胞への作用を介してリンパ組織誘導に関与している可能性が示された (図 2)。

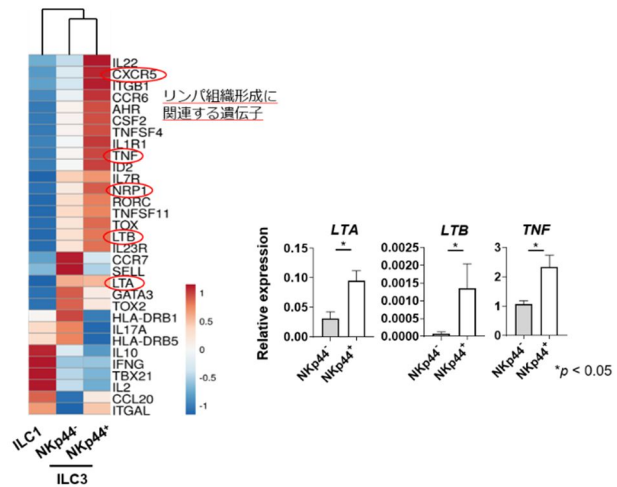


図1 正常大腸におけるNKp44+ ILC3の遺伝子発現

(2) 大腸癌組織に存在する TLS の評価

抗 CD3、CD20 抗体を用いた免疫化学染色にて大腸癌腫瘍組織に存在する TLS を同定し、腫瘍深達度に伴う TLS の量の変化を解析した。腫瘍組織の単位面積あたりの TLS の量は、Tis/T1 腫瘍で最も多く ($0.25 \pm 0.05 / \text{mm}^2$)、T3/T4 腫瘍においては大きく減少していた (T3: $0.05 \pm 0.01 / \text{mm}^2$, $P < 0.0001$) (T4: $0.03 \pm 0.15 / \text{mm}^2$, $P < 0.0001$) (図 3)。また、二重染色を用いた免疫組織化学染色にて、TLS 内に CD3 陰性 Ror γ t 陽性である ILC3 が存在することを確認した (図 4)。

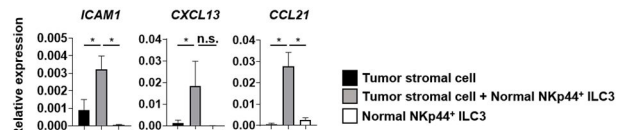


図2 NKp44+ ILC3による間質細胞の接着分子およびケモカイン発現促進

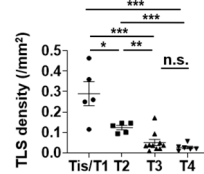


図3 腫瘍進行に伴うTLS分布の変化

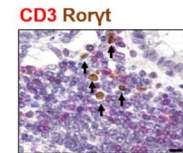


図4 大腸癌に存在する ILC3

(3) 大腸癌組織に存在する TLS と NKp44+ ILC3 の相関の評価

大腸癌腫瘍組織における TLS と NKp44+ ILC3 の相関を検討した結果、TLS 密度は腫瘍 ILC における NKp44+ ILC3 の割合 ($R = 0.62$; $P < 0.005$) および NKp44+ ILC3 の腫瘍単位重量あたりの細胞数 ($R = 0.64$; $P < 0.005$) と有意な相関を示した (図 5)。

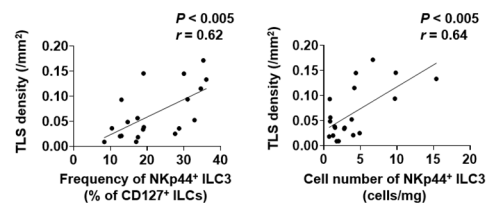


図5 大腸癌組織におけるNKp44+ ILC3とTLSの相関

(4) 今後の展望

本研究では、ヒト大腸正常粘膜および大腸癌組織に存在する ILC の解析を行い、ヒト大腸 *NKp44+* ILC3 がリンパ組織誘導能を有すること、ならびに腫瘍組織において TLS と *NKp44+* ILC3 が相関して存在することを明らかとし、*NKp44+* ILC3 が TLS 形成誘導を介して抗腫瘍免疫に関与する可能性が示唆された。当初の計画では、大腸癌モデルマウスを用いた評価を行う予定であったが、臨床検体を用いた症例の蓄積に時間を要した。大腸癌における免疫細胞による TLS 形成ならびに抗腫瘍免疫誘導が明らかとなれば、TLS を賦活し、腫瘍局所で効率的に抗腫瘍免疫を促進させることで、既存の免疫チェックポイント阻害剤などの併用による治療効果の増大が期待できる。今後、動物実験を追加し、TLS を利用した免疫治療の模索を継続する。

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