

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011 年度

課題番号：21591648

研究課題名（和文）

消化器癌における獲得免疫機構の包括的解明と外科との融合を目指した新規癌治療戦略の開発

研究課題名（英文）

Development of novel anticancer strategy by combining immunotherapy and surgery in gastrointestinal tumors

研究代表者 庄 雅之 (SHO MASAYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50364063

研究成果の概要（和文）：

本研究では、消化器における腫瘍内浸潤メモリーT細胞発現の臨床的意義について検討した。膵癌、食道癌、胃癌の切除標本を用いて、メモリーT細胞のマーカーとしてCD45RO染色を行い、定量化を行った。メモリーT細胞高発現群と低発現群の2群に分けて検討した結果、メモリーT細胞腫瘍内浸潤の多寡と予後、再発形式、臨床病理学的因子との間に有意な関連を認め、各癌腫におけるメモリーT細胞の臨床的意義が明らかとなった。すなわち、腫瘍局所に浸潤したメモリーT細胞の多いものほど、術後の予後は良好であり、再発も有意に抑制されていることを示唆するデータが得られた。いくつかの癌腫においては、多変量解析にて、メモリーT細胞の多寡が独立予後因子となることも判明した。また腫瘍局所の免疫活性とも関連した。これらの臨床研究の結果を元に、T細胞Negative SignalであるCTLA-4、PD-1阻害による有意な抗腫瘍効果を確認し、新たな治療標的分子となり得ることを明らかとした。さらに同時阻害による相乗的な抗腫瘍効果についても確認し、臨床上の有用性も示唆された。また、術前抗体投与による再発抑制効果についても新たに確認した。なお、治療中の明らかな有害事象は認めなかった。さらにB7-H3の膵癌における臨床的意義ならびに新たな治療標的分子となり得る可能性についても新たに見出した。以上の結果から、T細胞、特にメモリーT細胞の能動的誘導が、癌治療において重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Memory T cells are well known to be critically important for host defence in humans. Although they have been also suggested to play a significant role in tumor immunity, their clinical importance remains largely unknown. In this study, we tried to reveal the clinical significance of tumor-infiltrating CD45RO+ memory T cells in several gastrointestinal malignancies. We performed immunohistochemistry on gastrointestinal cancer tissues including pancreatic, esophageal, and gastric cancer. Then we counted the cells stained positively for CD45RO+ infiltrating into cancer tissue. As a result, CD45RO+hi patients had a significantly better postoperative prognosis than CD45RO+lo patients. Furthermore, the CD45RO status correlated with local immune activation. We found that tumor-infiltrating CD45RO+ memory T cell has a significant independent prognostic value in human pancreatic cancer, and also our data suggested that adaptive immune response is functionally important in this fatal disease. Based on these clinical

data, we extended our study to examine several novel strategies targeting T cell negative pathway including PD-1 and CTLA-4. In murine tumor models, anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAb had a significant antitumor effect on the prevention of liver metastasis and established tumors. Interestingly, the combination of PD-1 and CTLA-4 blockade displayed significant synergistic antitumor effect and resulted in complete inhibition in almost all mice. Further studies indicated that the combined treatment of PD-1/CTLA-4 blockade induced long-lasting and antigen-specific antitumor effect with resistance to tumor rechallenge. Furthermore, we also evaluated the importance of a recently identified T cell negative costimulator, B7-H3 expression. In human pancreatic cancer, B7-H3 expression was observed in almost all patients. Interestingly, anti-B7-H3 blocking mAb had also significant antitumor effect in vivo, similar to PD-1 and CTLA-4 blockade. A series of our studies provide new insights into targeting T cell negative pathway in tumor immunity and suggest that these promising strategies are potentially effective in human cancers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：外科総論

1. 研究開始当初の背景

最近の新規化学療法の導入により、消化器癌においても予後の向上がみられている。一方、未だに消化器癌に対する外科切除は、癌治療の根幹をなしていることも事実である。しかしながら、今なお全ての消化器癌に切除不能症例や進行症例がみられ、それらの予後は不良である。特に、膵癌、胆道癌、食道癌などの難治性消化器癌は、根治手術後であっても転移および再発の頻度が高く、再発後の治療は困難である。したがって、さらなる予後向上のためには、新たな観点からの癌治療法の開発、特に集学的治療戦略の確立が必須である。応募者は、これまで消化器癌に関する基礎的・臨床的研究とともに、腫瘍免疫および移植免疫の研究を精力的に行い、論文発表を行ってきた。特に最近、T細胞の不活化・抑制経路である B7/CTLA-4 や

PD-L/PD-1 経路に関する新たな知見を見だし、臨床的意義および新規免疫療法の可能性につき報告した。これら PD-1 や CTLA-4 といった T 細胞上の負の受容体の存在は、T 細胞を機能不全に陥らせ、ワクチンや細胞療法などの既存免疫治療によっても、腫瘍抗原応答性 T 細胞が十分に活性化されずに、腫瘍が宿主免疫を回避する機序の一つとして考えられる。したがって、これら分子・経路を標的とした新たな免疫療法は、これまでにはない抗腫瘍効果をもたらす可能性がある。また最近の免疫学の進歩は、調節 T 細胞やメモリー T 細胞といった T 細胞サブセットが、生体の様々な生理・病態にとって極めて重要な役割を担っていることを示している。しかし、これらの腫瘍における役割、機能については未だ十分には明らかとはなっていない。最近、腫瘍内浸潤メモリー T 細胞が、大腸癌において従

来の TNM 分類による Stage とは無関係に、患者の予後や再発を規定するとの画期的な報告がなされ、非常に興味深い。しかし、機序の詳細は不明である。我々がこれまで蓄積してきた研究成果から鑑みると、(1)メモリーT細胞誘導にも、腫瘍とT細胞とに間に介在する不活化・抑制経路が重要な関与を果たしている可能性、(2)抗体治療、特に術前処置によって、メモリーT細胞を能動的に誘導できれば、革新的な術後再発抑制効果および予後の改善がもたらされる可能性 があるのではないかと の着想に至った。

2. 研究の目的

消化器癌臨床検体を用いた分子生物学的および免疫学的検討により、各癌腫のメモリーT細胞発現の臨床的意義およびその機序について検討する。具体的には、膵癌、胆道癌、食道癌、胃癌等の切除標本を用いて、CD45RO染色による腫瘍内浸潤メモリーT細胞の発現の多寡と、術後予後、再発形式、臨床病理学的因子との相関を検討する。さらにその機序を明らかにするために、T細胞 Negative Signal である PD-L 発現、宿主免疫回避に関わると最近報告された Endothelin B receptor (ETBR) 発現、腫瘍局所免疫活性との相関についても検討する。さらに腫瘍内浸潤調節 T細胞、CD4+、CD8+T細胞との比較検討により、各消化器癌における獲得免疫機構を包括的に明らかにすることを第一の目標とした。得られた結果を基盤として、動物腫瘍モデルを用いて、各モノクロナール抗体治療による抗腫瘍効果および術前治療による再発および転移抑制効果を検討し、臨床導入に向けて、有用性と安全性を検証する。次世代の新規集学的癌治療戦略を立案することを最終目標とする。

3. 研究の方法

■ 消化器における腫瘍内浸潤メモリーT細胞発現の臨床的意義

膵癌、食道癌、胃癌の切除標本を用いて、メモリーT細胞のマーカーとして CD45RO 染色を行い、定量化を行う。メモリーT細胞腫瘍内浸潤と予後、再発形式、臨床病理学的因子との関連について解析した。各癌腫における生体内の獲得免疫機構を包括的に解明し得るものと思われた。

■ 消化器における T細胞 Negative Signal 分子発現の臨床的意義

新規 T細胞 Negative Signal 分子である TIM-3/Galectin-9, B7-H3 についても切除標本を用いた上記と同様の検討を行う。有意な結果

が得られたものについては、患者末梢血中の発現についても FACS により解析し、再発、転移、予後等に関する評価を行い、臨床的意義を明らかにする。腫瘍内メモリーT細胞の浸潤程度がこれらの分子の発現と逆相関するかを検証した。

■ 腫瘍内免疫活性との関連

凍結標本を用いて Real-time PCR を行い、Perforin, Granzyme B, IFN-g, CCR7, 各種サイトカイン、ケモカイン、接着因子等の発現を解析する。上述の腫瘍内浸潤 T細胞サブセットや T細胞 Negative Signal 分子とこれらの局所免疫活性との関連について検討し、データの裏付けを行った。

以上の項目につき、臨床検体を用いて、順次研究をすすめる。消化器癌患者における生体の獲得免疫機構および腫瘍の宿主免疫回避機構を体系的に検討する。それにより、現時点でのその全容を包括的に明らかにすることを目指した。その結果から、治療標的となり得る因子を拾い上げ、研究対象の絞り込みを行った。

4. 研究成果

■ 消化器における腫瘍内浸潤メモリーT細胞発現の臨床的意義

膵癌、食道癌、胃癌の切除標本を用いて、メモリーT細胞のマーカーとして CD45RO 染色を行い、メモリーT細胞高発現群と低発現群の2群に分けて検討した結果、メモリーT細胞腫瘍内浸潤の多寡と予後、再発形式、臨床病理学的因子との間に有意な関連を認め、各癌腫におけるメモリーT細胞の臨床的意義が明らかとなった。すなわち、腫瘍局所に浸潤したメモリーT細胞の多いものほど、術後の予後は良好であり、再発も有意に抑制されていることを示唆するデータが得られた。いくつかの癌腫においては、多変量解析にて、メモリーT細胞の多寡が独立予後因子となることも判明した。また腫瘍局所の免疫活性とも相関した。

具体的には、食道癌においては、年齢、性別、進行度、深達度、リンパ節転移の有無、遠隔転移、リンパ管侵襲、脈管侵襲の各臨床病理学的因子において両群間に有意な差を認めなかった。術後全生存率および無再発生存率において、両群間に有意な相関がみられ、CD45RO+hi群の予後は有意に良好であった(P=0.006)。1, 3, 5年の生存率は、CD45RO+hi群では86.8%, 60.3%, 45.1%であるのに対してCD45RO+lo群では、62.7%, 32.8%, 24.3%であった。CD45RO+hi群では、lo群に比較し、無再発症例が有意に多かった(P=0.036)。再発部位別では、リンパ節再

発症例, 肺転移再発症例において同様の結果であった(P=0.048, 0.039). 多変量解析では, T 因子, N 因子, CD45RO+ status が独立予後因子であった. 食道癌において腫瘍内浸潤 CD45RO 陽性メモリーT 細胞数の多寡が, 従来の TNM 因子とは独立した予後因子であった. メモリーT 細胞を中心とした獲得免疫機構が, 食道癌の転移, 再発などの臨床経過に重要な関与を果していることが示唆された. さらに胃癌においては, 当科で経験した胃癌切除症例 101 例を対象として同様の検討を行った結果, 早期癌においては, 2 群間に明らかな予後における差はみられなかった. 一方, 進行癌では, 全生存率および無再発生存率とも, CD45RO+hi 群が lo 群と比較して有意に良好であった(P=0.01, P=0.02). 多変量解析において CD45RO+発現が T および N 因子とともに有意な独立予後因子であった(P=0.04). また, CD45RO+メモリーT 細胞と腫瘍の進展および臨床経過との関連を検討したところ, 進行癌では Stage, 深達度, リンパ節転移, リンパ管侵襲および腹膜再発と有意な相関を認めた. さらに Real-time PCR を用いて CD45RO+メモリーT 細胞と腫瘍局所の免疫応答について検討したところ, hi 群が lo 群と比較して有意に IFN- γ 発現量の増加を認めた(P=0.02). ヒト進行胃癌において腫瘍浸潤 CD45RO 陽性メモリーT 細胞および獲得免疫機構が重要な意義をもつことが明らかとなった. 膵癌においてもほぼ同様の結果, 知見が得られた.

■ 消化器における T 細胞 Negative Signal 阻害による癌治療戦略

CT26 マウス消化器癌モデルを用いて, 抗 PD-1 および抗 CTLA-4 阻害抗体の抗腫瘍効果およびメモリー細胞誘導能を検討した. マウス in vivo モデルでは, PD-1 および CTLA-4 抗体の各単独投与により, 有意な肝転移抑制効果がみられ, さらに同時阻害により相乗的抗腫瘍効果が認められた. また PD-1/CTLA-4 同時阻害は, 確立した腫瘍においても強力な効果を示し, 80%以上のマウスにおいて完全退縮(CR)を誘導し得た. 免疫染色や Real-time PCR により検討した結果, 抗体投与は CD8+T 細胞腫瘍内浸潤を促進させ, 局所の IFN- γ , Perforin 等を有意に上昇させた. その結果, 抗体の抗腫瘍効果と局所免疫応答の活性化との関連が示唆された. また, CR が得られたマウスにおいて, 100 日後に再度腫瘍を接種したところ, CT26 再接種は 100%生着しなかったにもかかわらず, 3rd party 腫瘍は対照群と同様に生着し, 腫瘍抗原特異的なメモリーT 細胞が in vivo において誘導されたことが示唆された. さらに術前の PD-1/CTLA-4 阻害が腫瘍切除後の再発を有意に抑制し, 抗体単回投与によ

りメモリーT 細胞が能動的に誘導されたことが示唆された. 我々がこれまで行ってきたこれらトランスレーショナルリサーチとしての一連の研究成果は, ヒト型抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-1 抗体による新規消化器癌治療戦略の有用性を, メモリー細胞の新たな観点から支持するものである.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Enomoto K, Sho M, Wakatsuki K, Takayama T, Matsumoto S, Nakamura S, Akahori T, Tanaka T, Migita K, Ito M, Nakajima Y. Prognostic importance of tumour-infiltrating memory T cells in oesophageal squamous cell carcinoma. *Clin Exp Immunol*. 2012;168(2):186-91. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04565.x. 査読有.
2. Yamato I, Sho M, Nomi T, Akahori T, Shimada K, Hotta K, Kanehiro H, Konishi N, Yagita H, Nakajima Y. Clinical importance of B7-H3 expression in human pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2009;101(10):1709-16. 査読有.

[学会発表] (計 7 件)

1. 庄 雅之, 最新の知見に基づいたT細胞制御による新規消化器癌治療の可能性, 第 18 回日本消化器関連学会週間, 2010.10.15, 横浜
2. 庄 雅之, 腫瘍特異的メモリー細胞誘導による新たな癌免疫療法の可能性とその臨床的意義, 第 65 回日本消化器外科学会総会, 2010.7.14, 下関
3. 庄 雅之, 難治性消化器癌に対する新規癌治療戦略としてのメモリーT細胞の意義, 第 110 回日本外科学会定期学術集会, 2010.4.8, 名古屋
4. Sho M et al. Prognostic significance of CD45RO+ memory T cell in pancreatic cancer, 40th Anniversary Joint Meeting of the American Pancreatic Association and Japan Pancreas Society, 2009.11.4, Hawaii, USA
5. 庄 雅之, 消化器癌における腫瘍, 内浸潤メモリーT細胞の臨床的意義と新規癌治療

戦略の可能性, 第 47 回日本癌治療学会学術集会, 2009.10.22, 横浜

6. 庄 雅之, 消化器癌における腫瘍内浸潤メモリーT細胞の臨床的意義, 第 95 回日本消化器病学会総会, 2009.5.7, 札幌

7. Yamato I, Sho M et al. Clinical importance and therapeutic potential of targeting B7-H3 in pancreatic cancer. American Association for Cancer Research. 2009.4.18, Denver, CO, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄 雅之 (SHO MASAYUKI)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 50364063