

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11日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591670

研究課題名（和文）

VEGF/VEGFR2 経路遮断による制御性 T 細胞誘導抑制と腫瘍内集積制御

研究課題名（英文）

Suppression of induction and accumulation at tumor site of regulatory T cells by inhibition of VEGF/VEGFR2 pathway

研究代表者

森崎 隆 (MORISAKI TAKASHI)

九州大学・大学院医学研究院・共同研究員

研究者番号：90291517

研究成果の概要（和文）：

免疫系を負に制御する制御性 T 細胞（Treg 細胞）は、種々の癌組織に集積し局所での抗腫瘍免疫を抑制していると考えられる。したがって、癌組織における Treg 細胞集積を抑制すれば抗腫瘍免疫が高まると期待される。しかし、治療標的となる特異性の高い細胞表面発現分子は見当たらない。我々は、（1）免疫抑制機能の高い Treg 細胞に VEGFR2 が選択的に発現していること、（2）VEGFR2 陽性 Treg 細胞が末梢血より癌組織中に豊富に存在すること、（3）VEGFR2 抗体であるアバスタチンが *in vitro* の系において VEGFR2 陽性 Treg 細胞の遊走を抑制すること、（4）大腸癌組織における VEGFR2 陽性 Treg 細胞が無病生存期間および全生存期間の独立した予後不良因子であることなどを明らかにした。これら結果は、VEGFR2 陽性 Treg 細胞が抗腫瘍免疫を負に制御しており、免疫療法の効果を高めるための治療標的となることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Regulatory T cells (Treg cells) is one of negative regulators in human immune system. Thus, it is supposed that tumor tissue-infiltrating Treg cells suppress the anti-tumor immunity at the tumor site. If so, suppression of accumulation of Treg cells into the tumor tissue may improve the antitumor immunity. However, only a few therapeutic target molecules for regulating Treg cells are available at present. We showed that vascular endothelial growth factor receptor2 (VEGFR2) is a useful therapeutic target against Treg cells. During this research periods, we acquired following new findings. (1) VEGFR2 is selectively expressed on highly-suppressive (FOXP3^{high}) Treg cells. (2) The number of VEGFR2-positive Treg cells is more rich in cancer tissues than in peripheral blood. (3) Chemotactic migration of VEGFR2-positive Treg cells against VEGF is suppressed by addition of an anti-VEGF antibody, Avastin. (4) The number of VEGFR2-positive Treg cells at the tumor site is an independent poor prognostic factor in the colon cancer. These data indicate that VEGFR2-positive Treg cells regulate negatively the antitumor immunity and that VEGF/VEGFR2 pathway may be a useful therapeutic target for improving tumor immunity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：

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：制御性 T 細胞、VEGFR2、VEGF、腫瘍内集積、遊走、予後因子

1. 研究開始当初の背景

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) は、腫瘍の産生する血管新生因子として理解され、腫瘍の新生血管形成阻害を目的とした多くの VEGF 阻害剤が臨床試験の段階にある。本邦においては、VEGF に対するヒト化モノクロナル抗体（商品名：アバスタチン）が、大腸癌に対する分子標的治療薬として 2007 年 4 月に承認された。

一方、VEGF は抗腫瘍免疫を抑制する因子としても理解されるようになり、現在、癌ワクチン療法の効果を高める目的で、VEGF 阻害剤に対する研究がスタートしている。特に、最近の研究は、VEGF が抗腫瘍免疫を負に制御している Treg 細胞の誘導に関与していることを示唆しており、機序不明のまま、動物レベルで、VEGF 阻害による Treg 細胞制御法の試みが散見されるようになった (Alshad BL et al. Clin Cancer Res 12:6808-6816, 2006; Manning EA. Clin Cancer Res 13:3951-3959, 2007)。我々は、固形腫瘍に対するワクチン療法開発中に、VEGF に対するレセプターである VEGFR2 が Treg 細胞に高発現していることを偶然見出した (論文 6)。このことは、VEGF による VEGFR2 陽性 CD4+T 細胞からの Treg 細胞誘導の可能性を示している。また、腫瘍血管新生には、VEGFR2 陽性血管内皮細胞の VEGF への遊走の関与が知られており、Treg 細胞の腫瘍局所への集積に VEGF/VEGFR2 機序が関与している可能性もある。すなわち、本研究は、我々の見出した「VEGFR2 が Treg 細胞に高発現している」という新知見を通して生まれた独自性の高いテーマであり、特に、Treg 細胞の腫瘍局所への集積の機序として腫瘍産生 VEGF と Treg 細胞上の VEGFR2 の連関を解析する研究は国際的にも新規性が高く、本研究の成果は、VEGF/VEGFR2 経路阻害剤開発に貴重な情報を提供しうるとともに、新規の VEGF 阻害療法開発へ道を開く可能性が高い。

2. 研究の目的

血管新生因子 VEGF は、腫瘍の増殖・転移の重要な制御因子であり、多くの腫瘍が VEGF

を産生していることが知られている。我々は、抗腫瘍免疫を負に制御している制御性 T 細胞 (Treg 細胞) が VEGF に対するレセプター VEGFR2 を高発現していることを偶然見出した (論文 6)。したがって、「腫瘍の産生する VEGF が Treg 細胞の誘導および Treg 細胞の腫瘍局所への集積に関与しており、結果として、抗腫瘍免疫誘導を抑制している」と仮定し、本研究においては、1) VEGF による Treg 細胞の誘導および腫瘍局所への集積機序を解析し、2) 腫瘍増殖抑制 (新生血管形成阻害) および腫瘍局所の免疫環境改善 (Treg 細胞集積阻害) という二経路を視野にいたした VEGF 阻害療法の可能性を検証する。

3. 研究の方法

「Treg 細胞が VEGFR2 を高発現している」という新知見に基づき、1) VEGF による Treg 細胞誘導と VEGF への Treg 細胞遊走を解析し、2) VEGF/VEGFR2 経路の阻害による Treg 細胞制御療法の可能性を検証することである。そのための、基本的手法は次の三つである。1) Flow cytometry および免疫組織染色による末梢血および手術時摘出大腸癌組織における Treg 細胞上の VEGFR2 発現の確認。2) セルソーターあるいはビーズ法により純化した CD4+T 細胞を標的細胞として用いる。3) 免疫不全マウスモデルおよび大腸癌患者による VEGF 阻害剤 (アバスタチン) 投与による Treg 細胞の変動を確認し、臨床展開の可能性を検証する。また、免疫不全マウスモデルでの検証に予想外の時間を要した場合を想定し、大腸癌患者によるアバスタチン投与症例の Treg 細胞解析を早期より開始する。

4. 研究成果

研究期間中の成果について、年次に沿って概要を記載する。

1) リンパ球における VEGFR2 発現プロファイル作成：

末梢リンパ球、癌性胸腹水リンパ球、大腸癌組織浸潤リンパ球において、VEGFR2 が CD4+T

細胞、特にFOXP3陽性およびCD25高発現CD4+T細胞に選択的に発現していることを明らかにし、新知見として発表した(論文5)。癌性胸腹水におけるVEGFR+リンパ球比率は、末梢血リンパ球より高かった。

2) 各種組織におけるVEGFR2がCD4+T細胞プロフィール作成

われわれが開発した半定量的な蛍光免疫組織染色法(Kai et al, Cancer Science 102: 2132-2138, 2011)を用いて、大腸癌組織に加え、胸腺、リンパ節におけるVEGFR2陽性Treg細胞の分布を解析した。その結果、末梢血中のTreg細胞に比べ胸腺、リンパ節および大腸癌組織においてVEGFR2陽性Treg細胞比は有意に高いという結果を得た。これは、Treg細胞の大腸癌組織への集積におけるVEGFR2の関与を支持するデータである。一方、組織においても末梢血同様、FOXP3陽性Tリンパ球に占めるVEGFR2がCD4+T細胞比率は30-60%であり、癌組織およびリンパ節中で高い傾向を示した。しかしながら組織の違いによる有意差は得られなかった。胸腺においてもVEGFR2がCD4+T細胞が存在したことは、VEGFR2がCD4+T細胞の由来を考える上で貴重なデータである(学会発表3)。

3) VEGFによるTreg細胞の誘導:

VEGFR2陽性および陰性CD4+T細胞をセル・ソーターにより分離し、遺伝子組み換えVEGFによるTreg細胞誘導に及ぼす影響を解析した。用いたVEGF濃度(50-200 mg/mL)では、VEGFR陰性細胞からのTreg細胞の誘導は確認されなかった。また、VEGFR2陽性細胞数の有意な増加は認められなかった。しかし、VEGF産生肝癌細胞との共培養でVEGFR2陽性T細胞が増加し、抗VEGF抗体であるアバスタチン投与により末梢血あるいは癌性胸腹水中のリンパ球におけるVEGFR2がCD4+T細胞数が減少する症例があることから、現在、内因性VEGFの系を用いて追加実験中である。

4) VEGFによるVEGFR2陽性Treg細胞の遊走試験:

セル・ソーターによる分離したVEGFR2陽性CD4+T細胞および陰性CD4+T細胞を用いて、チャンパー法にて遊走試験を繰り返しているが、VEGFによる遊走能は亢進を示す場合と抑制を示す場合があり、一定の結果が得られていない。しかし抗VEGF抗体であるアバスタチンによる遊走能の抑制を確認しており、VEGFおよび抗VEGF抗体による結果の差異が何によるのかを検討中である。

5) 大腸癌組織におけるVEGF発現とTreg細胞数の相関関係:

大腸癌組織におけるVEGF発現症例のVEGFR2発

現の程度(発現面積、発現強度)とVEGFR2陽性Treg細胞数との関連を解析したが、現時点において有意の相関は得られていない。

6) アバスタチン投与患者によるTreg細胞数の変化:

10症例の集積を想定していたアバスタチン投与大腸がん症例数は予想数を越えたが、免疫療法などの併用症例の増加により、評価可能症例が4症例に留まり当初の本年度計画は達成できなかった。具体的には、解析可能であった4例中3例の末梢血Treg細胞に明らかなVEGFR2発現が確認され、うち2例においてアバスタチン投与後末梢血Treg細胞数の減少が認められた。しかし、治療経過との関連解析はできなかった。

7) 大腸癌組織におけるVEGFR2陽性Treg細胞の臨床病理学意義:

大腸がん治癒手術症例における腫瘍局所VEGFR2発現Treg細胞数と予後との関連解析を実施した。その結果、FOXP3+Treg細胞数は、大腸癌患者の予後予測因子とは成りえなかった(Suzuki H, Morisaki et al. Cancer Immunology Immunotherapy 59:653-661, 2010)が、大腸癌組織局所のVEGFR2+FOXP3+Treg細胞数は、リンパ節転移や病期といった病理学的因子とは相関を示さないにもかかわらず、無病生存期間および全生存期間の独立した予後予測因子であるといった興味深い結果を得た(現在論文再投稿準備中: Intratumoral FOXP3+VEGFR2+ regulatory T cells are predictive markers for recurrence and survival in patients with colorectal cancer)。このことは、VEGFR2+FOXP3+Treg細胞が大腸癌細胞に対する生体側の負の因子として働いていることを強く示唆している。

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6件)

(1) Onishi H, Morisaki T, Katano M. Immunotherapy approaches targeting regulatory T-cells. Anticancer Research 査読有 32:997-1003, 2012

(2) Ogino T, Onishi H(6人中2番目), Morisaki T(4番目), Katano M(6番目) et al. Inclusive estimation of complex antigen presentation functions of monocyte-derived dendritic cells differentiated under normoxia and hypoxia conditions. Cancer Immunology Immunotherapy 査読有

61:409-424, 2012

(3) Morisaki T(9人中1番目), Onishi H(2番目), Katano M(9番目) et al.

Combinatorial cytotoxicity of gemcitabine and cytokine-activate killer cells in hepatocellular carcinoma via the NKG2D-MICA/B system. Anticancer Research 査読有 31:2505-2510, 2011

(4) 片野光男、大西秀哉、森崎 隆、鈴木宏往、荻野利達. Treg 制御による癌免疫療法.

Surgery Frontier 査読無 17(3):61-64, 2010

(5) Suzuki H, Onishi H, Wada J, Yamasaki A, Tanaka H, Nakano K, Morisaki T, Katano M. VEGFR2 is selectively expressed by FOXP3high CD4+ Treg. European Journal of Immunology 査読有 40:197-203, 2010

(6) Wada J, Suzuki H, Fuchino R, Yamasaki A, Nagai S, Yanai K, Koga K, Nakamura M, Tanaka M, Morisaki T, Katano M. The contribution of vascular endothelial growth factor to the induction of regulatory T-cells in malignant effusions. Anticancer Research 査読有 29:881-888, 2009

[学会発表] (計 12 件)

(1) 大西秀哉: VEGFR2+ Treg 細胞は大腸癌における再発および予後予測因子となり得る。第 49 回日本癌治療学会学術集会。2011 年 10 月 29 日、名古屋国際会議場

(2) 近沢信人: 癌局所への制御性 T 細胞の集積機序の解析と臨床応用の可能性。第 111 回日本外科学会定期学術集会。2011 年 5 月、誌上開催

(3) 鈴木宏往: VEGFR2 を標的とした制御性 T 細胞 (Treg 細胞) 制御法開発のための各種臓器における VEGFR2 陽性 Treg 細胞の分布解析。第 111 回日本外科学会定期学術集会。2011 年 5 月、誌上開催

(4) 永松伊織: 腫瘍組織での制御性 T 細胞増加への低酸素微小環境および Vascular endothelial growth factor の関与。第 111 回日本外科学会定期学術集会。2011 年 5 月、誌上開催

(5) 鈴木宏往: VEGFR2 を標的とする Treg 細胞制御を目的とした各種臓器での VEGFR2 陽性 Treg 細胞分布の解析。第 23 回日本バイオセラピー学会学術集会総会。2010 年 12 月 10 日、大阪国際会議場

(6) 永松伊織: 制御性 T 細胞増加への低酸素微小環境および Vascular endothelial growth factor の関与。第 23 回日本バイオセラピー学会学術集会総会。2010 年 12 月 10 日、大阪国際会議場

(7) 大西秀哉: 新たな癌免疫療法: 制御性 T 細胞制御療法。第 48 回日本癌治療学会学術集会。2010 年 10 月 29 日、国立京都国際会館

(8) 荻野利達: 低酸素環境を考慮した癌免疫療法の可能性。第 20 回日本樹状細胞研究会。2010 年 6 月 19 日、朱雀メッセ 新潟コンベンションセンター

(9) 鈴木宏往: Treg 細胞に発現する VEGFR2 を標的とした癌免疫環境改善の可能性。第 31 回癌免疫外科研究会。2010 年 5 月 20 日、ホテルニューオータニ大阪

(10) 鈴木宏往: 癌免疫療法効果増強のための制御性 T 細胞に対する新規治療標的分子の同定: VEGFR2。第 110 回日本外科学会定期学術集会。2010 年 4 月 8 日、名古屋国際会議場

(11) 大西秀哉: 癌局所の抗腫瘍免疫抑制における癌細胞分泌エキソゾームの関与と免疫抑制機序の解析。第 110 回日本外科学会定期学術集会。2010 年 4 月 8 日、名古屋国際会議場

(12) 鈴木宏往: 低酸素環境における制御性 T 細胞誘導の可能性。第 22 回日本バイオセラピー学会学術集会総会。2009 年 11 月 26 日、スイスホテル南海大阪

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tumor.med.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森崎 隆 (MORISAKI TAKASHI)

九州大学・大学院医学研究院・共同研究員
研究者番号: 9 0 2 9 1 5 1 7

(2) 研究分担者

片野 光男 (KATANO MITSUO)

九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 1 0 1 4 5 2 0 3

久保 真 (KUBO MAKOTO)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：60403961
(H21→H22.5)

大西 秀哉 (ONISHI HIDEYA)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：30553276
(H22.6→)

中村 勝也 (NAKAMURA KATSUYA)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：60585743
(H22.6→)

(3)連携研究者
なし