

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16452

研究課題名（和文）CCL8によるPD-L2および免疫チェックポイント関連分子発現のメカニズム解析

研究課題名（英文）Analyzing the mechanism of CCL8 induce immune checkpoint molecules including PD-L2

研究代表者

岡留 一雄（OKADOME, KAZUO）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特定研究員

研究者番号：80867200

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：Public database及び食道癌臨床サンプルにおいて、ケモカインのCCL8は様々な免疫チェックポイント関連の分子と相関していたため、CCL8が免疫チェックポイントを制御する重要なメカニズムを持っているのではないかと仮説を立てた。CCL8は腫瘍関連マクロファージやリンパ球を活性化させ、それらが放出する様々なサイトカインの量を増加させることにより、癌細胞における様々な免疫チェックポイント関連分子を増加させている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な癌種で免疫チェックポイント阻害剤が適応となっているが、奏効率に関与するとされている免疫チェックポイント関連分子の発現には個人差があるため、それらの制御メカニズムを明らかにすることが重要である。ケモカインのCCL8が免疫チェックポイント関連分子を増強するメカニズムが明らかになったことで、ケモカインも腫瘍免疫を評価する上で重要であることが再確認された。またこれらのメカニズムをターゲットとした新たな免疫療法の開発に繋がる可能性も期待できる。

研究成果の概要（英文）：We found that the chemokine CCL8 correlated with various immune checkpoint molecules in the public database and our clinical samples. We hypothesized that CCL8 could have an important role to regulate immune checkpoint molecules. We found that CCL8 activate tumor-associated macrophages and lymphocytes and increased several cytokines they release, this activation could increase the expression of various immune checkpoint-associated molecules in cancer cells.

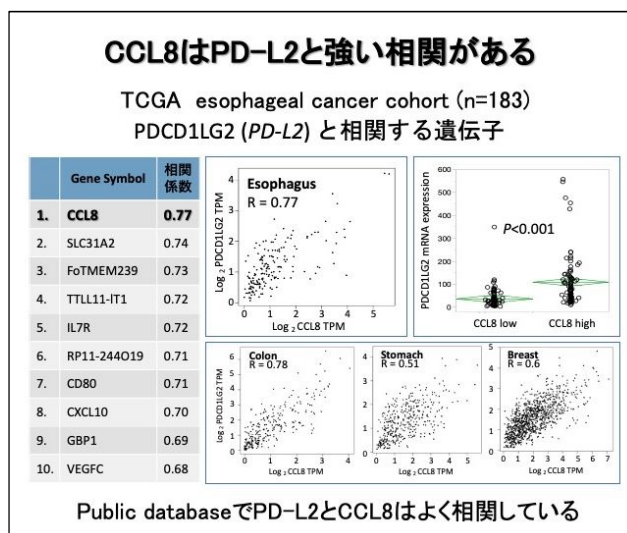
研究分野：消化器癌における腸内細菌と腫瘍微小環境

キーワード：CCL8 免疫チェックポイント PD-L1 PD-L2 腫瘍関連マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

様々な癌種で免疫チェックポイント阻害剤が適応となったが、癌種によって異なるものの、一般的に1~3割とされる奏功率の低さが問題である。治療効果予測マーカーとしてPD-L1/L2発現やMicro satellite instability-high(MSI-H)、体細胞変異の頻度等が報告されているが、PD-L1のみ陽性の症例よりもPD-L1/L2共に陽性の症例の方が免疫チェックポイント阻害剤の奏功率が高いとの報告もあり(Yearley et al. *Clin Cancer Res*, 2017)、PD-L1とPD-L2の発現がどのような状況で共発現し、または異なるのかについて明らかにする事が重要である。

我々は食道癌においてPD-L2高発現症例は予後不良であり、PD-L1とPD-L2を発現する癌細胞は必ずしも一致せず、PD-L1およびPD-L2発現の差異として発現時期や化学療法による影響の違いを明らかにした(Okadome K et al. *Br J Cancer*, 2020)。そしてPublic databaseを用いた解析により、ケモカインのCCL8がPD-L2を始め、様々な免疫チェックポイント関連の分子と相関している結果を得た。そこでCCL8が様々な免疫チェックポイント分子およびそのリガンドを制御する重要な因子ではないかと仮説を立てた。CCL8とPD-L2との関係を解明することでPD-L1とPD-L2の発現の差異を生じる要因が明らかとなる可能性がある他、ケモカインによる免疫チェックポイント誘導のメカニズムも明らかとなる可能性がある。また様々な免疫チェックポイント阻害剤の併用療法が開発されている現状を考えると、新たな免疫療法の開発に繋がるものと期待され、Translational researchとして臨床に直結する意義深いものになる可能性がある。



2. 研究の目的

本研究では免疫チェックポイントの新たな制御メカニズムとしてケモカインのCCL8に注目し、どの細胞がCCL8を発現し、CCL8がどのような機序でPD-L2やその他の様々な免疫チェックポイント関連分子を誘導するのか、その制御メカニズムについて明らかにすることを目的とした。

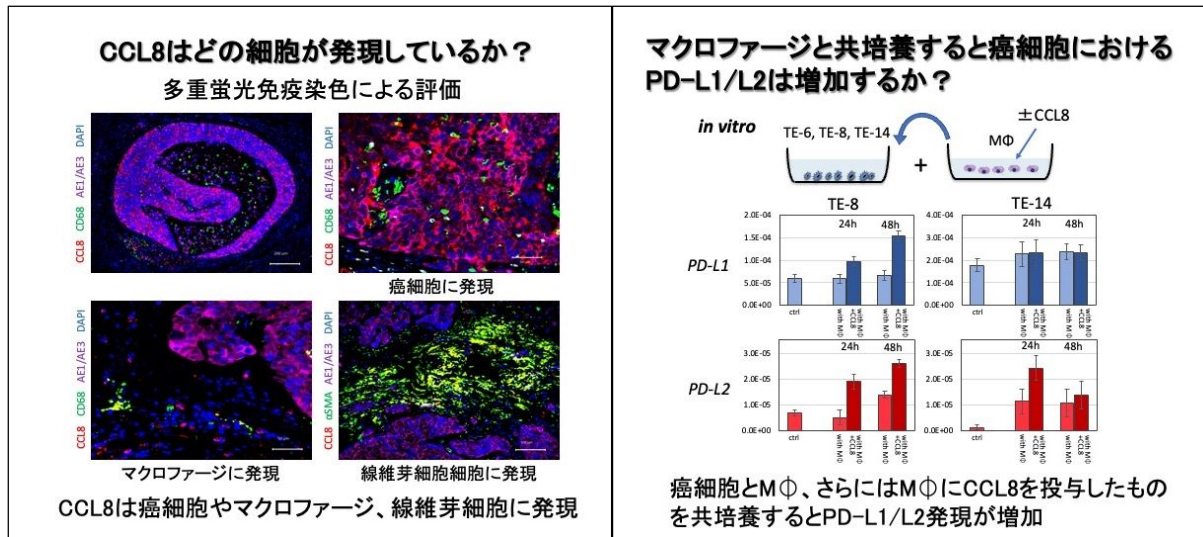
3. 研究の方法

食道癌切除標本を用いてCCL8抗体による免疫染色を行った他、CD68やAE1/AE3、SMA抗体等を用いた多重蛍光免疫染色によりCCL8発現細胞を同定した。また食道癌123症例においてCCL8発現とPD-L1/L2やPD-1、M2マクロファージ(CD163、CD204)等、様々な腫瘍免疫に関する分子発現との関連を調査した。

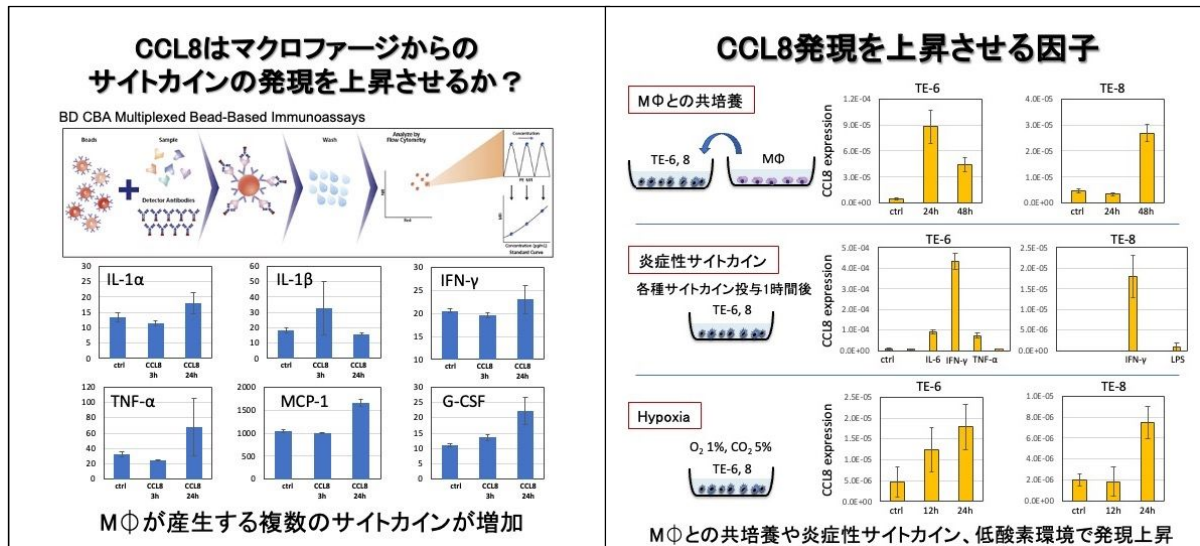
*in vitro*の実験で癌細胞株とヒト末梢血由来マクロファージや線維芽細胞との共培養実験を行い、qPCRでPD-L1/L2発現変化を確認した。Flow Cytometryで癌細胞株やマクロファージ、線維芽細胞におけるCCR1及びCCR5発現を評価した。recombinant CCL8を各細胞に投与し、PD-L1/L2発現変化をqPCRで確認した他、ヒト末梢血由来マクロファージやJurkat cellへ投与した際の様々なサイトカイン(IL-1、IL-1、IL-4、IFN-、TNF-、MCP-1、G-CSF、IL-6、IL-8、FGF、GM-CSF、IL-10)の発現量変化をMultiplex Immunoassayで評価した。癌細胞株におけるCCL8発現を変化させる因子として、マクロファージとの共培養や各種サイトカイン投与、Hypoxiaによる影響を評価した。

4. 研究成果

食道癌切除標本を用いた多重蛍光免疫染色の結果から、CCL8 は癌細胞や線維芽細胞、マクロファージに発現していることを確認した。次に *in vitro* の実験で食道癌細胞株とヒト末梢血由来マクロファージとの共培養を行うと食道癌細胞株の PD-L1/L2 発現が増加した。



そして recombinant CCL8 を食道癌細胞株の medium に添加しただけでは PD-L1/L2 発現に変化を認めなかった。このことから、CCL8 が直接的に癌細胞の PD-L1/L2 発現を増加させるのではなく、CCL8 が影響を及ぼすとされているマクロファージやリンパ球を活性化させることが必要である可能性を考えた。Flow Cytometry で CCL8 の受容体である CCR1 及び CCR5 を評価したが、癌細胞株 (TE-6, TE-8, TE-14) には発現していなかった。食道癌細胞株とヒト末梢血由来マクロファージとの共培養中の medium 中へ CCL8 を添加すると、単に癌細胞株とマクロファージを共培養した時よりも、癌細胞の PD-L1/L2 発現量がさらに増加した。そしてヒト末梢血由来マクロファージや Jurkat cell に CCL8 を投与すると様々なサイトカインの放出量が増え、IFN- γ や IL-4 等で癌細胞の PD-L1/L2 発現が上昇した。癌細胞における CCL8 発現はマクロファージとの共培養や炎症性サイトカイン、Hypoxia により発現上昇した。



食道癌 123 例での検討では、癌細胞における CCL8 発現が陽性の症例は癌細胞における PD-L1 陽性症例が多く、また CD163 陽性の腫瘍関連マクロファージが多いことが明らかとなった。しかし、癌細胞における PD-L2 発現とは有意な関係を認めなかった。マクロファージ等の免疫担当細胞における PD-L2 発現との関連については未評価である。

以上より癌細胞における CCL8 発現は腫瘍関連マクロファージやリンパ球を活性化させ、それらが放出するサイトカインの量を増加させることにより、様々な免疫チェックポイント関連分子をさらに増加させる可能性が考えられた。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okadome Kazuo, Baba Yoshifumi, Yasuda Yoshihara Noriko, Nomoto Daichi, Yagi Taisuke, Toihata Tasuku, Ogawa Katsuhiro, Sawayama Hiroshi, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Iwagami Shiro, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Watanabe Masayuki, Komohara Yoshihiro, Baba Hideo	4. 巻 113
2. 論文標題 PD L1 and PD L2 expression status in relation to chemotherapy in primary and metastatic esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 399 ~ 410
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15198	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 -
1. 著者名 Nomoto Daichi, Baba Yoshifumi, Liu Yang, Tsutsuki Hiroyasu, Okadome Kazuo, Harada Kazuto, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Iwagami Shiro, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Watanabe Masayuki, Moroishi Toshiro, Komohara Yoshihiro, Sawa Tomohiro, Baba Hideo	4. 巻 530
2. 論文標題 Fusobacterium nucleatum promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via the NOD1/RIPK2/NF- B pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 59 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2022.01.014	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 Kosumi Keisuke, Baba Yoshifumi, Yamamura Kensuke, Nomoto Daichi, Okadome Kazuo, Yagi Taisuke, Toihata Tasuku, Kiyozumi Yuki, Harada Kazuto, Eto Kojiro, Sawayama Hiroshi, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Iwagami Shiro, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Watanabe Masayuki, Baba Hideo	4. 巻 128
2. 論文標題 Intratumour Fusobacterium nucleatum and immune response to oesophageal cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1155 ~ 1165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-022-02112-x	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
---------	---------