

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501285

研究課題名(和文) 消化器癌患者における T 細胞機能低下メカニズムの検討とその制御による免疫治療の開発

研究課題名(英文) The development of new immunotherapy by regulating immune checkpoint molecules for the treatment of digestive cancers

研究代表者

齊藤 博昭 (SAITO, Hiroaki)

鳥取大学・医学部・講師

研究者番号：20335532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：わが国では癌で亡くなる患者がきわめて多い。癌に対する治療としては一般的には手術、化学療法、放射線治療が行われるが、依然として多くの患者が癌で亡くなっていることから、あらたな有効な治療法の確立が不可欠である。

今回のわれわれの研究は、現在、新たな癌に対する治療法として注目されている免疫治療を開発するために行った。その結果、消化器癌患者のリンパ球(生体内にある癌を攻撃する細胞)は、さまざまな分子を過剰発現して機能が低下していることが明らかとなり、その分子を制御することでリンパ球の機能を正常化させ、免疫治療が可能であることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：There are lots of patients who die due to cancer in Japan. The standard treatments for cancer are surgery, chemotherapy, and radiation therapy. Although recent progress in those therapies improve prognosis of cancer patients, many patients still die due to cancer. Therefore, the development of new effective therapy is indispensable to improve prognosis of cancer patients. Immunotherapy is considered to be a most promising candidate. We performed current study to develop new effective immunotherapy for the treatment of digestive cancer. In the current study, we found that the function of T cells was impaired and this phenomenon was induced by up-regulation of various immune checkpoint molecules. Furthermore, we have demonstrated that T cell function could be recovered by regulating these molecules. This approach may be the breakthrough for the treatment of cancer patients.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：免疫治療 消化器癌 T細胞 Tim-3 LAG-3

1. 研究開始当初の背景

消化器癌患者の予後は、近年の診断技術の向上による早期発見率の上昇、外科的治療技術の進歩や新規抗癌剤の開発などにより改善しているが、一方で依然として多くの再発例や切除不能例を経験する。これらの症例に対しては一般的には化学療法や放射線療法が行われるが、その治療成績は決して十分なものではない。したがって、消化器癌患者のさらなる予後向上のためには新しい治療方法の開発が不可欠である。

近年、癌患者に対する新たな治療法の一つとして免疫治療が注目されている。強力な抗原提示作用を有する樹状細胞を用いた細胞治療などが試みられ、一部の癌腫においてはその有効性が報告されているものの、消化器癌に対する有効性は期待するほどの結果は得られていない。その原因として癌患者において認められる、癌の免疫逃避機構の関与が考えられている。

癌免疫の中核をなす細胞はリンパ球であり、担癌患者においてリンパ球の機能異常が報告されている。最近ではリンパ球に発現する様々な表面分子が同定され、これらの分子がリンパ球の機能と密接に関連する事が明らかとなってきている。興味深いことにウイルス疾患で認められる免疫能の低下は、これらの表面分子が関与していることが明らかとなってきている。同時に担癌患者において認められる細胞性免疫能の低下も同様の機構による可能性が指摘されている。これらの表面分子として代表的なものが PD-1、Tim-3 および LAG-3 などである。しかしながら消化器癌患者の細胞性免疫能低下に、これらの分子がどの程度関与しているかは明らかではなかった。

重要なことは慢性ウイルス性感染症で Tim-3 や LAG-3 などの障害が T リンパ球の機能回復を誘導し、結果としてウイルス量の低下などの臨床所見の改善を認めたことで、もし、担癌患者のリンパ球にも同様の現象が認められれば、Tim-3 や LAG-3 をターゲットとした有効な免疫治療開発の可能性があると考えられる。そこで今回、消化器癌患者を対象に Tim-3、LAG-3 や PD-1 の解析を行い、その結果を踏まえて、あらたな免疫治療の開発を行うことを計画するに至った。

2. 研究の目的

慢性ウイルス性疾患 (AIDS や C 型肝炎) でリンパ球の機能低下との関連が報告されている Tim-3 や LAG-3 発現を、消化器癌患者の末梢血や腫瘍組織中のリンパ球で解析し、癌患者にみられるリンパ球の機能低下のメカニズムを解明するとともに、これらの分子を阻害することによるリンパ球の機能回復を調べ、全く新しい免疫治療の開発を目指

す。

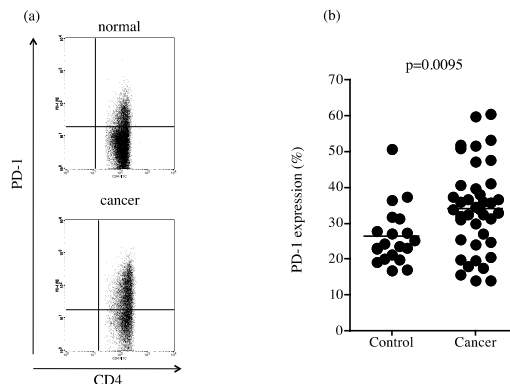
3. 研究の方法

- (1) 当院で胃癌にて胃切除が施行された患者の末梢血、癌組織、非癌部組織から採取した CD4 および CD8T リンパ球の Tim-3、PD-1 および NKG2D 発現を FACS にて検討する。
- (2) 上記と同じサンプルを用いてリンパ球の機能解析 (IFN- $\gamma$  産生を FACS にて解析)を行う。その結果をもとに Tim-3、PD-1、NKG2D などの分子がリンパ球の機能低下とどのように関係するかを詳細に検討する。
- (3) 術後1ヶ月にもリンパ球の Tim-3、PD-1、NKG2D 発現を解析して術前後の発現変化を検討する。
- (4) Tim-3 および PD-1 発現をもとに CD4 および CD8 リンパ球のソーティングを行い、各サブセットの機能を IFN- $\gamma$  産生能を測定することにより行う。
- (5) 単球を IL-4 と GM-CSF で培養することにより樹状細胞を培養する。同一個体から採取した CD8T リンパ球を Tim-3 および PD-1 の発現をもとにソーティングする。培養された樹状細胞に CEA ペプチドを負荷し、CD8T リンパ球を1週間ごとに3回刺激する。その後、CEA を負荷した T2 細胞に対する CD8T リンパ球の細胞障害活性を測定し、Tim-3 や PD-1 の発現の違いにより、CTL 誘導能がどのように異なるかを検討する。
- (6) Tim-3 および PD-1 の siRNA を用いて、これらの分子の発現をコントロールし、機能回復が得られるかどうかを IFN- $\gamma$  産生能にて評価する。

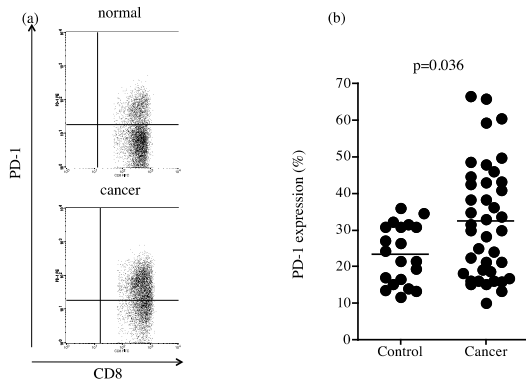
4. 研究成果

- (1) 胃癌患者の末梢血 CD4 および CD8T リンパ球の PD-1 発現を健常成人の末梢血 CD4 および CD8T リンパ球の PD-1 発現と比較したところ、胃癌患者において有意な上昇が認められた (図.1、図.2)

図.1 末梢血 CD4T リンパ球の PD-1 発現 (胃癌患者 vs. 健常成人)

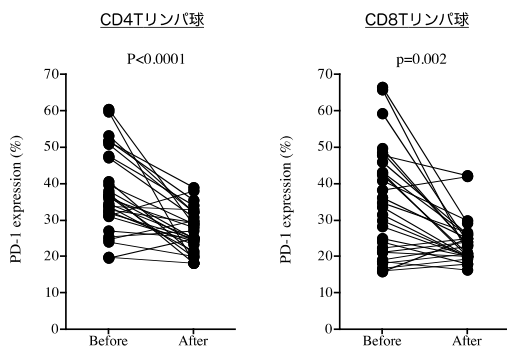


**図.2 末梢血 CD8T リンパ球の PD-1 発現 (胃癌患者 vs. 健常成人)**



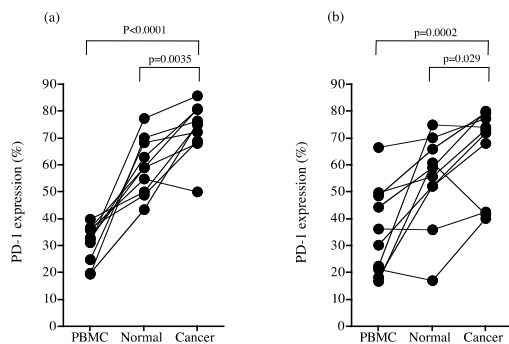
(2) 胃癌切除症例において術前および術後1ヶ月目に採血を行い CD4 および CD8T リンパ球の PD-1 発現を検討したところ、術後に有意な低下が認められた (図.3)

**図.3 胃癌患者における末梢血リンパ球の PD-1 発現 (術前・後の比較)**



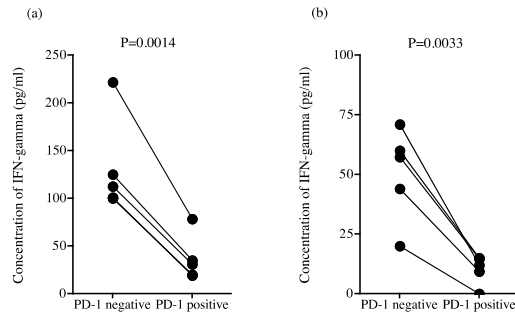
(3) 末梢血、非癌部および癌部から採取した CD4 および CD8T リンパ球の PD-1 発現を検討したところ、癌部において著明な PD-1 発現の上昇が確認された (図.4)

**図.4 胃癌患者における CD4 および CD8T リンパ球の PD-1 発現 (末梢血、非癌部、癌部の比較)**



(4) PD-1 発現により CD4 および CD8T リンパ球をソーティングし、固相化した抗 CD3 抗体で刺激後に、培養液中の IFN- $\gamma$  濃度を測定したところ、CD4 および CD8T リンパ球ともに、PD-1 陰性リンパ球のほうが PD-1 陽性リンパ球に比較して IFN- $\gamma$  濃度が有意に高値であった (図.5)

**図.5 CD4 および CD8T リンパ球の PD-1 発現と IFN- $\gamma$  産生**

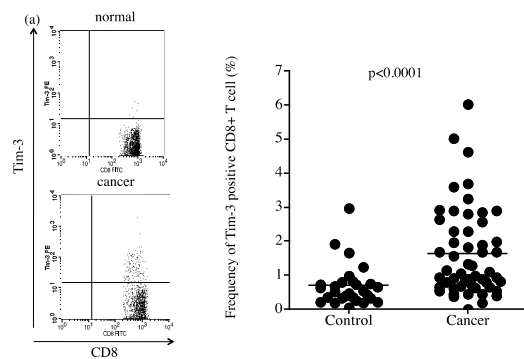


以上の結果から、胃癌患者における CD4 および CD8T リンパ球の PD-1 発現は上昇しており、この発現がリンパ球の IFN- $\gamma$  産生能の低下、すなわち機能障害に関与していることが明らかとなった。

次に Tim-3 発現について検討を行った。

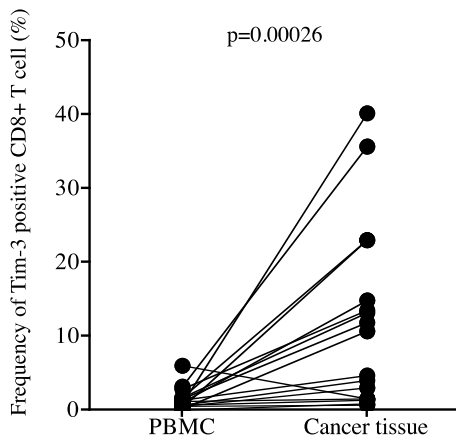
(5) まず胃癌患者の末梢血 CD4 および CD8T リンパ球の Tim-3 発現を FACS にて解析し、健常成人と比較したところ、CD8T リンパ球において胃癌患者は健常成人より有意に高値であった (図.6)。CD4T リンパ球においても Tim-3 発現は胃癌患者において高値であったが、有意差は認められなかった。

**図.6 末梢血 CD8T リンパ球の Tim-3 発現 (胃癌患者 vs. 健常成人)**



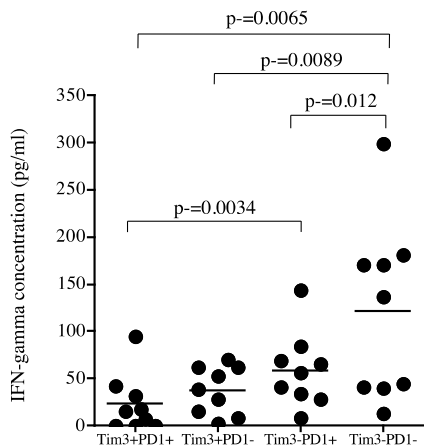
(6) CD8T リンパ球の Tim-3 発現を胃癌患者末梢血と癌組織で比較すると、胃癌組織において有意な上昇が確認された (図.7)

図.7 胃癌患者における CD8T リンパ球の Tim-3 発現 (末梢血と癌部の比較)



- (7) Tim-3 と PD-1 発現をもとに CD8T リンパ球を Tim-3<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>、Tim-3<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>、Tim-3<sup>-</sup>PD-1<sup>+</sup>、Tim-3<sup>-</sup>PD-1<sup>-</sup>の4つのポピュレーションにソーティングし、固相化した抗 CD3 抗体で刺激した後に培養液の IFN- $\gamma$  濃度を測定した。Tim-3<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup>CD8 T リンパ球が他のグループに比較して有意に多い IFN- $\gamma$  を産生し、PD-1 および Tim-3 の発現が CD8T リンパ球の機能低下に関連していることが明らかとなった (図.8)

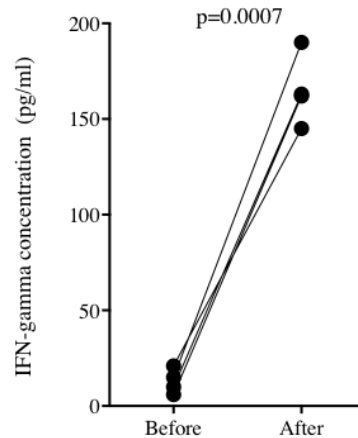
図.8 CD8T リンパ球の Tim-3 発現と IFN- $\gamma$  産生



- (8) さらに Tim-3 および PD-1 発現が CD8T リンパ球の機能にどのように影響を及ぼすかを検討することを目的に、細胞傷害性 CD8T リンパ球 (CTL) の誘導実験を行った。その結果、図.9 に示すように Tim-3-PD-1-CD8T リンパ球から最も多くの CTL が誘導され、Tim-3+PD-1+CD8T リンパ球からが CTL 誘導が最も少なかった。

したがって IFN- $\gamma$  産生の結果とあわせて、Tim-3 と PD-1 が CD8T リンパ球の機能低下に強く関与していることが確認された。この両分子は胃癌患者において上昇しており、この上昇は腫瘍組織において極めて有意であった。このことから、胃癌患者に認められる細胞性免疫能の低下はこの両分子が極めて深く関与していることが示唆され、これら両分子が胃癌に対する有効な免疫治療を開発するうえで有望なターゲットとなりうる可能性が示された。そこで siRNA を用いて CD4T リンパ球の PD-1 発現を抑制し、IFN- $\gamma$  産生能を比較した。その結果、PD-1 発現を抑制することにより CD4T リンパ球の IFN- $\gamma$  産生が有意に増加することが確認された (図.9)

図.9 PD-1 発現制御による CD4T リンパ球の IFN- $\gamma$  産生



以上の結果から、胃癌患者のリンパ球には PD-1 や Tim-3 などの免疫チェックポイント分子が高発現し、そのことが胃癌患者に認められる細胞性免疫能低下に関与していることが明らかとなった。また、この免疫チェックポイント分子を制御することにより免疫能の回復が認められたことから、これらは治療ターゲットとしてきわめて有望であり、これらの分子を制御することにより、消化器癌に対してより有効な免疫治療が開発可能であり、今後、さらなる研究を継続する予定である。

## 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)

Increased PD-1 expression on CD4+ and CD8+ T cells is involved in immune

evasion in gastric cancer. Saito H, Kuroda H, Matsunaga T, Osaki T, Ikeguchi M. J Surg Oncol. 2013; 107: 517-22. doi:10.1002/jso.23281. 査読あり

Upregulation of TIM-3 and PD-1 on CD4+ and CD8+ T Cells Associated with Dysfunction of Cell-Mediated Immunity after Colorectal Cancer Operation. Arai Y, Saito H, Ikeguchi M. Yonago Acta Med. 2012;55:1-9. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

リンパ球に発現する負の制御因子から見た胃癌患者の細胞性免疫能低下のメカニズム

齊藤博昭、高屋誠吾、福本陽二、尾崎知博、建部茂、池口正英  
日本バイオセラピー学会  
倉敷 ( 倉敷芸文館 )

2012年12月13日～2012年12月14日

PD-1/TIM-3 発現から見た大腸癌術後の細胞性免疫能低下のメカニズム

荒井陽介、齊藤博昭、花木武彦、宮谷幸造、渡邊浄司、前田佳彦、蘆田啓吾、池口正英

日本外科学会 千葉 ( 幕張メッセ )

2012年04月12日～2012年04月14日

リンパ球に発現する制御分子から見た胃癌患者の細胞性免疫能低下のメカニズム

齊藤博昭、高屋誠吾、福本陽二、尾崎知博、建部茂、池口正英  
日本癌治療学会

横浜 ( パシフィコ横浜 )

2012年10月25日～2012年10月27日

胃癌患者における PD-1-PD-L1 免疫抑制経路の検討

齊藤博昭、黒田博彦、高屋誠吾、福本陽二、尾崎知博、建部茂、池口正英

日本消化器病学会

鹿児島 ( 城山観光ホテル )

2013年3月21日～2013年3月23日(土)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 博昭 (SAITO, Hiroaki)

鳥取大学医学部・講師

研究者番号：20335532

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：