

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592079

研究課題名(和文) 肺癌所属リンパ節における制御性T細胞の意義と免疫抑制機構の解除

研究課題名(英文) Clinical Significance of Regulatory T Cells in Regional Lymph Node Lymphocytes of Non-Small-Cell Lung Cancer and overcoming immune-escape mechanism

研究代表者

花桐 武志 (HANAGIRI, Takeshi)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：30299614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌患者の所属リンパ節における制御性T細胞(Treg)のFoxp3発現を解析し、その臨床的意義を検討した。非小細胞肺癌の所属リンパ節において、Tregの増加は有意な予後不良因子であった。またTregによるCTL誘導の抑制にはTGF- β が関与しており、Tregを除去することで腫瘍特異的CTLの誘導効率が改善した。Tregに関連する免疫応答を明らかにすることは、肺癌の再発リスクの予測の上で有用である。

研究成果の概要(英文)：Regulatory T cells (Tregs) are potent immunosuppressive cells that play a crucial role in tumor immune escape. The purpose of the present study was to evaluate the prognostic significance of CD4+ CD25+ Foxp3+ Tregs in the regional lymph node lymphocytes (RLNL) in patients who underwent surgical resection of non-small cell lung cancer (NSCLC). The proportions of Tregs in the RLNL were determined by flow cytometry and quantitative RT-PCR. The 5-year survival rate was significantly better in patients with the lower proportion of Tregs than that in the higher patients. The higher proportion of Tregs in the RLNL was a significant unfavorable prognostic factor in NSCLC. The information about the proportion of Tregs in the RLNL is considered to be important to overcome the tumor immune escape for development of the effective adjuvant immunotherapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺癌 制御性T細胞 腫瘍免疫 免疫逃避 細胞障害性T細胞

1. 研究開始当初の背景

肺癌は我が国の癌死因の第一位であり、現在でも手術不能な進行肺癌や再発肺癌における治療における成績は満足いくものとは言えない。肺癌は、診断時には進行期であることが多く、手術適応となるのは半数以下である。しかし、完全切除を施行できても、なお再発する症例は少なくない。さらに、術後補助化学療法における有害事象の患者に対する負担は無視できるものではない。

我々は、肺癌の外科治療時の局所の免疫応答を解析し、主に腫瘍の免疫逃避を克服する手段の検討を行い、新たな術後補助療法としての免疫治療法を開発することを目的として研究を行っている。これまでに、前立腺癌に対する癌ワクチン療法 (sipuleucel-T) を行ない、生存期間の延長が報告され、肺癌の領域でも Vansteenkiste らが肺癌の術後補助療法で癌ワクチン療法を行ない、癌の再発リスクが 27% 軽減したことを報告している。しかしながら、実際には癌免疫療法で効果がみられる症例は依然として限られており、その治療効果を抑えている原因の一つが、癌の免疫逃避機構と考えられている。制御性 T 細胞 (Treg) は抗腫瘍免疫応答を抑制し、癌の進展、転移を促進する可能性が指摘されている。この Treg の関与する免疫逃避機構を解明し、克服することができれば、癌免疫療法は標準療法のひとつとなりえると考えられる。

2. 研究の目的

Treg は、CD4 陽性 CD25 陽性および Foxp3 発現を特徴とする T 細胞であり免疫応答に対して抑制的に働き、本来は自己免疫疾患やアレルギー疾患を抑制する。一方、担癌患者においては、末梢血で Treg が増加しており、抗腫瘍免疫を抑制しているという報告がある。一方、肺癌の所属リンパ節における宿主の免疫応答の解析に関する研究は少なく、とくに Treg の臨床的意義は不明な点が多い。本研究においては、肺癌の所属リンパ節における

Treg を解析することで、その機能を解析し、免疫応答のコントロールを行うことで、より有効な癌免疫を誘導できる可能性がある。そこで本研究は、癌の免疫逃避メカニズムを解明し、その克服法を検討することで免疫療法の有効性を改善することを目的としている。

3. 研究の方法

肺癌の免疫逃避機構の解明と克服について、(1) 肺癌患者の末梢血および癌所属リンパ節における Treg の頻度を解析し、臨床因子との関連を検討する。(2) 所属リンパ節における Treg の細胞障害性 T リンパ球 (CTL) の誘導への関与を検討する。(1) については、肺癌患者の末梢血および癌所属リンパ節における Treg の頻度を、CD4 および Foxp3 をマーカーとして、フローサイトメトリにて解析した。さらに、病理病期 I 期症例の外科切除された肺門縦隔の所属リンパ節を混合し、mRNA を抽出、cDNA に変換し、Treg の指標として Foxp3 を用い、一方肺癌微小転移の指標として cytokeratin 19 (CK19) を用いて、それぞれの発現を real-time PCR にて評価した。(2) については、所属リンパ節のリンパ球より Treg を分離し、肺癌細胞に対する CTL 誘導時における Treg の影響について報告した。

4. 研究成果

非小細胞肺癌に対して、2003-06 年に完全切除がなされた手術検体 (176 例) の所属リンパ節および末梢血リンパ球を用いて、細胞内 FACS にて制御性 T 細胞を検出した。この中で、術前治療の行われていない、また免疫抑制剤の使用のない症例を除き、残りの 158 例を解析の対象とした。男性 103 例、女性 55 例、平均年齢 69 歳であった。組織型は、腺癌 110 例、扁平上皮癌 33 例、大細胞癌 11 例、その他 4 例であった。CD4 陽性細胞の中の Treg の比率は、リンパ節および末梢血リンパ球では、それぞれ 1.26% と 0.86% であり、制御性 T 細胞の比

率は、リンパ節において、末梢血リンパ球よりも有意に高頻度であった。組織型別のリンパ節リンパ球の Treg の割合は、腺癌で 1.24% 扁平上皮癌 1.42% であった。病理病期別のリンパ節リンパ球では、IA 期 1.29%、IB 期 1.15%、II 期 1.31%、III 期 1.37% であった。リンパ節リンパ球において CD4 陽性細胞の中の制御性 T 細胞の割合が、1% より低い群を低値群、1% 以上を高値群とした場合、5 年生存率は低値群で 84.4%、高値群 63.5% であり、有意に高値群の予後が不良であった (図 1)。病理病期 I 期においても、5 年生存率は低値群で 91.4%、高値群 84.8% であり、高値群の予後が有意に不良であることを明らかとした。

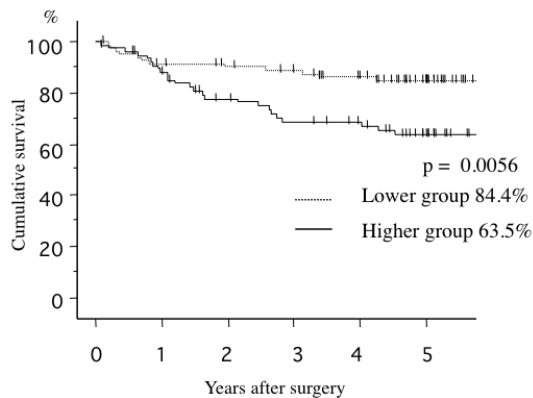


図 1. 肺癌所属リンパ節における制御性 T 細胞の多寡による予後の比較 (FACS による解析)

次に、2005-07 年に外科切除がなされた病理病期 I 期非小細胞肺癌 131 例について、肺門縦隔リンパ節を混合したサンプルより、mRNA を抽出、cDNA に変換し、Treg の指標として Foxp3 を用い、微小転移した肺癌細胞の指標として cytokeratin 19 (CK19) を用いて、それぞれの発現を real-time PCR にて評価した。対象は男性 75 例、女性 56 例、平均年齢 71 歳であった。組織型は、腺癌 99 例、扁平上皮癌 21 例、大細胞癌 5 例、その他 6 例であった。internal control の基準としては β -actin を使用し、 β -actin との発現比で、Foxp3 および CK19 の発現量を相対的に定量した。Foxp3 の発現

が、 β -actin に比較して 0.06 より低い群を低値群、0.06 以上を高値群とし、CK 19 では 0.011 より低い群を低値群、0.011 以上を高値群とした。5 年生存率は Foxp3 低値群で 90.3%、高値群 79.3% であり、低値群で有意に良好であった ($p = 0.047$) (図 2)。また、CK19 についての 5 年生存率は、低値群で 88.9%、高値群 83.6% であったが、有意差は認めなかった。肺癌所属リンパ節における CK19 と Foxp3 発現は、弱い相関関係を認めた (図 3)。非小細胞肺癌の所属リンパ節において、Foxp3 の高発現は有意な予後不良因子であった。非小細胞肺癌の所属リンパ節における宿主の抗腫瘍免疫応答を明らかにすることは、再発リスクの予測の上で有用であると考えられた。

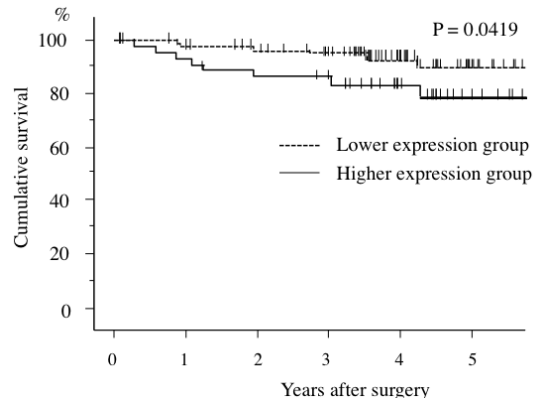


図 2. 病理病期 I 期肺癌所属リンパ節における制御性 T 細胞の多寡による予後の比較 (real-time PCR による解析)

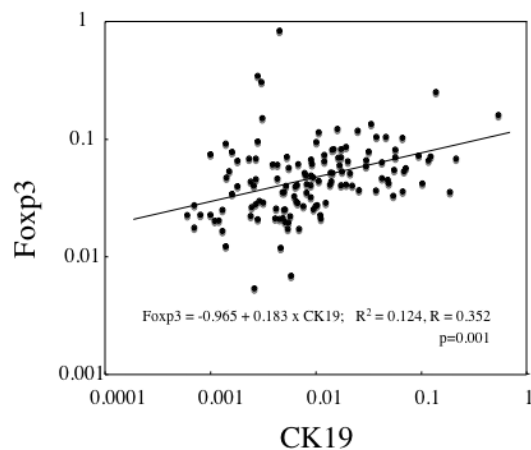


図 3. 肺癌所属リンパ節における制御性 T 細胞の微小リンパ節転移との関連性

また、腫瘍における Foxp3 の発現は、病期が進行するに従い増加し、免疫応答の抑制を促すIDO(Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase)IDOの発現と弱い相関を認めた。

in vitroの実験系においては、所属リンパ節リンパ球における CTL 誘導時に、TGF- β を添加すると、CTL 誘導が阻害され、制御性 T 細胞の増加を認めた。さらに CTL 誘導時に制御性 T 細胞を除去することで、CTL の誘導効率が上がることを示した。制御性 T 細胞による、CTL 誘導の抑制には TGF-

β が関与しており、制御性 T 細胞を除去することで、腫瘍特異的 CTL の誘導効率が改善することを報告した。

結論

癌の微小環境には、癌に対する免疫応答を妨げる種々の免疫逃避機構が存在している。このことがこれまでに、さまざまな免疫療法が失敗に終わった最大の原因と考えられている。すなわち、抗腫瘍免疫応答には数々の免疫を制御するチェックポイントがあり、とくに CTLA-4 や PD-1 (Programmed cell death 1) などの受容体は免疫応答の重要なチェックポイント分子として、近年注目されている。

CTLA-4 に対する抗体 (Ipilimumab) は、未治療の悪性黒色種の進行例を対象とした第 III 相試験の結果、Ipilimumab と標準的な化学療法の併用療法が化学療法単独に比較して全生存率が改善することが示された。この抗体は、免疫抑制を解除することにおいて 宿主抗腫瘍免疫を増強するというユニークな戦略であり、患者本来の抗腫瘍免疫をコントロールし治療効果を発揮するという点で画期的な治療法である。この Ipilimumab は、Treg の発現する CTLA-4 による抑制シグナルを特異的に遮断し、T 細胞の活性化状態を維持する作用を待つ抗体である。このように Treg が癌免疫治療における重要なターゲットであることが示され、Treg を標的とした免疫治療などが、新たな局面を

切り開く可能性がある。

本研究は、臨床検体が得られにくいこともあり、これまでの研究においてあまり解析されてこなかった所属リンパ節における免疫応答や臨床的意義について焦点をあてたものである。非小細胞肺癌の所属リンパ節における Treg の多寡は予後不良因子であり、肺癌所属リンパ節における微小リンパ節転移の指標とした CK19 の発現には、弱い相関関係を認めた。また、肺癌所属リンパ節における CTL の誘導において、Treg は抑制的な効果を示すことを明らかにした。癌免疫療法の効果を増強する上で、Treg の機能を制御することは重要な課題と言える。

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 4 件)

Clinical significance of expression of cancer/testis antigen and down-regulation of HLA class-I in patients with stage I non-small cell lung cancer.

Hanagiri T, Shigematsu Y, Shinohara S, Takenaka M, Oka S, Chikaishi Y, Nagata Y, Baba T, Uramoto H, So T, Yamada S. Anticancer Res. 2013 33: 2123-8.

Clinical significance of the frequency of regulatory T cells in regional lymph node lymphocytes as a prognostic factor for non-small-cell lung cancer.

Hanagiri T, Shigematsu Y, Shinohara S, Takenaka M, Oka S, Chikaishi Y, Nagata Y, Iwata T, Uramoto H, So T, Tanaka F. Lung Cancer. 2013 81: 475-9

Prognostic implications of human leukocyte antigen class I expression in patients who underwent surgical resection for non-small-cell lung cancer.

Hanagiri T, Shigematsu Y, Kuroda K, Baba T, Shiota H, Ichiki Y, Nagata Y, Yasuda M, Uramoto H, So T, Takenoyama M, Tanaka F. J Surg Res. 2013 181: e57-63.

Immunosuppressive effect of regulatory T lymphocytes in lung cancer, with special reference to their effects on the induction of autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes.

Shigematsu Y, Hanagiri T, Shiota H, Kuroda K, Baba T, Ichiki Y, Yasuda M, Uramoto H, Takenoyama M, Yasumoto K, Tanaka F. Oncol Lett. 2012 4: 625-630.

〔学会発表〕(計7件)

非小細胞肺癌における Foxp3 および IDO 発現の臨床病理学的意義

産業医科大学 第2外科

花桐武志、重松義紀、平井文子、竹中賢、岡壮一、近石泰弘、岩浪崇嗣、下川秀彦、永田好香、浦本秀隆、宗知子、田中文啓

日本肺癌学会 2013.11.21-22

肺癌所属リンパ節における制御性 T 細胞および微小リンパ節転移の意義

産業医科大学 第2外科

花桐武志、重松義紀、竹中賢、岡壮一、近石泰弘、下川秀彦、中川誠、永田好香、岩田輝男、浦本秀隆、宗知子、田中文啓

日本呼吸器外科学会 2013.5.9-10

肺癌所属リンパ節における制御性 T 細胞の臨床病理学的意義

花桐武志、重松義紀、竹中賢、岡壮一、近石泰弘、下川秀彦、中川誠、永田好香、岩田輝男、浦本秀隆、宗知子、田中文啓

日本肺癌学会 2012.11.8-9

肺癌所属リンパ節における制御性 T 細胞および

微小リンパ節転移の解析

花桐武志、重松義紀、竹中賢、岡壮一、近石泰弘、下川秀彦、中川誠、永田好香、浦本秀隆、宗知子、田中文啓

日本癌治療学会 2012.10.25-27

非小細胞肺癌における腫瘍抗原および HLA class I の発現；癌特異的免疫療法への基盤的研究
花桐武志、黒田耕志、重松義紀、永田好香、馬場哲郎、浦本秀隆、宗知子、竹之山光広、田中文啓

日本呼吸器外科学会 2012.5-17/18

非小細胞肺癌における癌精巢抗原発現とワクチン療法への応用

重松義紀、竹中賢、岡壮一、近石泰弘、馬場哲郎、下川秀彦、中川誠、浦本秀隆、宗知子、花桐武志、田中文啓

日本外科学会 2012.4.12-14

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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〕

6. 研究組織
(1) 研究代表者

花桐武志 (HANAGIRI Takeshi)

産業医科大学・医学部・非常勤医師
研究者番号：30299614

(2)研究分担者
研究者番号：

(3)連携研究者
研究者番号：