

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791404

研究課題名(和文) ヒト食道癌における T-reg、Th17 細胞の遊走・分化と病態進行の検討

研究課題名(英文) Analysis of the relationships between migration and differentiation of regulatory T cells and helper T-17 cells and cancer staging in the esophageal cancer.

研究代表者

丸山 孝教 (MARUYAMA, Takanori)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号：30348221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000 円

研究成果の概要(和文)：食道癌の微小環境における T-reg と Th17 細胞の関与を明らかにするため、T-reg の動態について検討した。その結果、T-reg が酸化ストレスに抵抗性があり、癌微小環境における酸化ストレスの抑制が、腫瘍免疫の成立に極めて重要であることを明らかにした。

また、癌の免疫治療において negative factor である T-reg と positive factor である conventional T cell の比率を後者に多く持つてゆくためには、癌微小環境の中での過酸化水素を除去する必要があることが明らかになった。この結果は、新たな治療戦略となり得る。

研究成果の概要(英文)：An increase in regulatory T cells (Tregs) is observed in tumor microenvironments. Since it was suggested that Tregs showed a lower sensitivity toward oxidative stress in comparison with conventional T cells (Tcon), we investigated the H₂O₂ production and apoptosis of Tregs in esophageal cancer tissues, employing flow cytometric analysis and immunohistochemical analysis. The increased tumor-infiltrating Tregs coexisted with elevated H₂O₂ production according to disease progression. The grade of apoptosis in Tregs was less pronounced than that in Tcon, and there was a positive correlation between H₂O₂ production and the grade of apoptosis in Tcon, while there was no correlation between H₂O₂ production and the grade of apoptosis in Tregs. Moreover, Tregs were less sensitive to H₂O₂-induced apoptosis compared with Tcon in vitro. As conclusions, the increased prevalence of tumor-infiltrating Tregs closely related to their lower sensitivity to H₂O₂-induced apoptosis.

研究分野：食道外科学

キーワード：制御性T細胞 癌微小環境 過酸化水素 活性酸素 アポトーシス 癌免疫治療

1. 研究開始当初の背景

食道癌の手術療法はその侵襲の大きさから、手術の適応とならない症例も多く、そのような症例には放射線化学療法を選択しているのが現状である。一方近年、癌腫によっては、特に HER2 陽性乳癌や胃癌では分子標的治療薬が保険適用になり、いわゆる細胞シグナル伝達を制御することにより細胞増殖を抑制する治療法が浸透してきている。さらに腫瘍抗原を用いたペプチドワクチンの開発が急速に進み、いわゆる免疫療法が治療の選択肢として注目されている。

この免疫療法を施行し有効な結果を得るためにもっとも重要であるのは、いわゆる免疫逃避を防ぐことであり、従来、その機序は不明であった。

一般に CD4 陽性 T 細胞は Th1/Th2 に分類できることが知られており、腫瘍微小環境ではそのバランスは Th2 優位に傾くことが知られており、このことが免疫療法の効果を低下させると考えられてきたが、それだけでは説明できない病態が多く存在していることが予測されていた。その後、制御性 T 細胞 (regulatory T cell, T-reg) が発見され、T-reg が抗腫瘍免疫を抑制するということが明らかにされ、現在も免疫抑制機序として重要な働きを持つと考えられている。また最近、CD4 陽性 T 細胞の新たなサブセットである Th17 細胞が確認され、Th17 細胞が T-reg とは逆に免疫反応を亢進させていることが明らかにされた。T-reg ならびに Th17 細胞が腫瘍免疫に大きな役割を担っていることは明らかである。

これら CD4 陽性 T 細胞のサブセット、すなわち T-reg ならびに Th17 細胞を中心とする Th1/Th2 のバランスにより、腫瘍微小環境における抗腫瘍免疫が変化していることがわかる。したがって、それらを制御することにより抗腫瘍免疫を亢進させ、免疫治療の効果をあげることが可能と考えられる。

CD4 陽性 T 細胞はナイーブ T 細胞から分化するが、その際に様々なサイトカインが関与している。T-reg は TGF- β と IL-2 の存在下でナイーブ T 細胞から分化するが、Th17 細胞は IL-2 ではなく IL-6 の存在下でナイーブ T 細胞から分化する。また IL-6 はナイーブ T 細胞からの T-reg への分化を抑制し、逆に IL-2 はナイーブ T 細胞から Th17 細胞への分化を抑制する因子と考えられている。

Th1 と Th2 の間にも同様の関係が存在しており、さらにそれぞれの細胞が作り出すサイトカインが他の細胞の分化を抑制していることもわかってきた。このようにして各々のサブセットのバランスが保たれていると考えられる。腫瘍微小環境ではこのバランスが破綻することにより抗腫瘍免疫が低下するものと推測される。

癌微小環境において、癌免疫逃避機構が成立するためには腫瘍周囲に多くの T-reg が浸潤する必要がある。そこには T 細胞の

遊走という機序が必須となる。特に T-reg には遊走因子であるケモカイン CCL17/CCL22 のレセプターである CCR4 が発現しており、腫瘍部に存在する単球やマクロファージから分泌される CCL17/CCL22 により腫瘍部へ遊走してることが明らかになっている。さらに、CCL17/CCL22 ケモカインのレセプター CCR4 に対するモノクローナル抗体の投与によりその遊走を抑制することにより、腫瘍環境における T-reg の腫瘍微小環境への遊走を抑制し抗腫瘍免疫を亢進させることが可能だと考える。Th17 細胞にも同様に遊走という機序が存在する可能性があるが解明されていない。Th17 細胞の遊走因子を解明し、T-reg とは逆に Th17 細胞を腫瘍微小環境へ集積させることにより抗腫瘍免疫を強化させることにつながる可能性がある。

2. 研究の目的

食道癌患者において、腫瘍微小環境における CD4 陽性 T 細胞のサブセットである、T-reg と Th17 細胞のバランスを検討する。また、それらの細胞が腫瘍部へ集積するメカニズムを解明することにより、食道癌の病態進行の過程を明らかにすることが、研究の目的である。癌の進行には T-reg が関与しており、癌の進行抑制には Th17 細胞が関与していると考えられ、これらをコントロールすることにより病態の進行を抑制するという新たな治療法を開発することができると考える。

3. 研究の方法

- (1) 当院で行われた食道癌手術切除新鮮標本検体から腫瘍部と正常粘膜部を採取し、そこから TIL、IEL を分離した。Flow cytometry を用いて CD4 陽性 T 細胞中の Foxp3 陽性細胞比率と IL-17A 陽性細胞比率を測定し T-reg/Th17 細胞の割合を検討した。
- (2) 手術検体パラフィンブロックから標本を作成し、T-reg および Th17 細胞に対する抗体を用いて免疫染色を行い、腫瘍内と正常粘膜内に存在する T-reg と Th17 細胞数ならびにその分布を検討した。
- (3) (1) と同様に腫瘍組織と正常粘膜を採取し、PCR を用いて組織内の Foxp3 mRNA および ROR γ mRNA を測定した。
- (4) 患者および健常者末梢血から magnetic bead separation 法にて T-reg を分離し、CCL17/CCL22 を用いて chemotaxis chamber assay を行い、遊走した T-reg の個数を MTT assay を用いて測定した。
- (5) 患者および健常者末梢血から FACS セルソーターを用いて Th17 細胞を分離した。

Th17 細胞の遊走に関し、(4)と同様の実験を行った。

- (6) CCR4 に対する抗ヒトモノクローナル抗体を用いて、T-reg の遊走を抑制できるのかを chemotaxis chamber assay で検討した。

4. 研究成果

- (1) 食道癌手術切除新鮮標本検体から TIL と IEL を採取し T-reg/Th17 細胞の割合を測定したところ、全症例で正常粘膜に比較して腫瘍部で T-reg/Th17 細胞比が増加していることが確認できた。TNM による癌の進行度ごとの T-reg/Th17 細胞比を検討すると、Stage と比較し Stage の 2 例と Stage の 2 例では、T-reg が増加して Th17 細胞が減少している傾向が確認できた。しかし、残りの Stage / の 3 例では、T-reg/Th17 細胞比が Stage とあまり変わらず、細胞数も比較的少なかった。これが術前化学療法によるものかどうかは不明であり、今後、術前化学療法の治療効果と合わせて検討が必要と思われる。
- (2) PCR を用いて組織内の Foxp3 m-RNA および ROR t m-RNA を測定したところ (1) の結果と照合させたところ Stage も含め半数以上の症例で一致しなかった。これは細胞膜表面のタンパク質発現と遺伝子発現の不一致によるものと考えられる。
- (3) 免疫染色法を用いて食道癌切除標本内の T-reg と Th17 細胞の分布と数を測定したところ、(1)と同様全症例で正常粘膜に比較して腫瘍部で T-reg/Th17 細胞比が増加していることが確認できた。しかしその分布に特徴的な所見は認められなかった。
- (4) 末梢血から T-reg を分離し、CCL17/CCL22 の存在下で遊走するか否かを確認したところ、食道癌患者 5 症例、健常者 5 症例についてすべて CCL17/CCL22 が T-reg の遊走因子であることを示す結果であった。
- (5) 末梢血から Th17 細胞を分離し、ケモカインの存在下で遊走することを確認する検討では (4)と同様の実験方法で、ケモカイン MCP-1 と I-309 に Th17 細胞の遊走能があるか否かを検討したがいずれも Th17 細胞の遊走を誘導できなかった。引き続き他のケモカインに関し検討を行う必要がある。
- (6) 食道癌の腫瘍微小環境という点に注目し T-reg の動態について検討した。その

結果、T-reg が酸化ストレスに抵抗性であることが明らかになった。このことは、癌微小環境における酸化ストレスの抑制が腫瘍免疫の成立に極めて重要であること示している。

- (7) CD4 陽性 T 細胞のサブセットである Treg は癌の微小環境において、腫瘍免疫を制御、すなわち免疫抑制的に働くことが明らかになった。生体ではエネルギー代謝の際、細胞内に過酸化水素が発生し、エネルギー代謝の亢進している癌細胞からは多量の過酸化水素が産生されている。過酸化水素は活性酸素の一種であり細胞障害性を有しており、過酸化水素が制御性 T 細胞を含む T 細胞に障害を与えている可能性がある。一方、制御性 T 細胞が癌微小環境において増加していることが知られている。このことは制御性 T 細胞の過酸化水素に対する感受性が低いことを示唆する。この癌微小環境の中で過酸化水素と制御性 T 細胞の関連を検討した。その結果、制御性 T 細胞は conventional T cell に比較して、癌腫が産生する過酸化水素に対して感受性が極めて低いことが明らかになった。癌の免疫治療において negative factor である制御性 T 細胞と positive factor である conventional T cell の比率を後者に多く持ってゆくためには、癌微小環境の中での過酸化水素を除去する必要があり、新たな治療戦略となり得る。

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)

Yoshimoto Y, Suzuki Y, Mimura K, Ando K, Oike T, Sato H, Okonogi N, Maruyama T, Izawa S, Noda SE, Fujii H, Kono K, Nakano T. Radiotherapy-induced anti-tumor immunity contributes to the therapeutic efficacy of irradiation and can be augmented by CTLA-4 blockade in a mouse model. PLoS One. 9(3). 2014 (査読有)(DOI: 10.1371/journal.pone.0092572)

Shiraishi K, Mimura K, Izawa S, Inoue A, Shiba S, Maruyama T, Watanabe M, Kawaguchi Y, Inoue M, Fujii H, Kono K. Lapatinib acts on gastric cancer through both antiproliferative function and augmentation of trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity. Gastric Cancer. 16(4):571-80. 2014 (査読有)(DOI: 10.1007/s10120-012-0219-5)

Izawa S, Mimura K, Watanabe M, Maruyama T, Kawaguchi Y, Fujii H, Kono K. Increased prevalence of tumor-infiltrating regulatory T cells is closely related to their lower sensitivity to H2O2-induced apoptosis in gastric and esophageal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 62(1):161-70. 2013 (査読有)(DOI: 10.1007/s00262-012-1327-0)

Inoue M, Mimura K, Izawa S, Shiraishi K, Inoue A, Shiba S, Watanabe M, Maruyama T, Kawaguchi Y, Inoue S, Kawasaka T, Choudhury A, Katoh R, Fujii H, Kiessling R, Kono K. Expression of MHC Class I on breast cancer cells correlates inversely with HER2 expression. *Oncoimmunology.* 1(7):1104-1110. 2012 (査読有)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23170258>)

Kawasaki T, Mochizuki K, Yamauchi H, Inoue S, Kondo T, Oishi N, Nakazawa T, Yamane T, Koshimizu Y, Tsunoda H, Yagata H, Inoue M, Inoue A, Maruyama T, Fujii H, Katoh R. Neuroendocrine cells associated with neuroendocrine carcinoma of the breast: nature and significance. *J Clin Pathol.* 65(8):699-703. 2012 (査読有)(DOI: 10.1136/jclinpath-2012-200765)

Kawasaki T1, Mochizuki K, Yamauchi H, Yagata H, Kondo T, Tsunoda H, Nakamura S, Oishi N, Nakazawa T, Yamane T, Inoue A, Maruyama T, Inoue M, Inoue S, Fujii H, Katoh R. High prevalence of neuroendocrine carcinoma in breast lesions detected by the clinical symptom of bloody nipple discharge. *Breast.* 21(5):652-6. 2012 (査読有)(DOI: 10.1016/j.breast)

[学会発表](計 2件)

丸山孝教, 三村耕作, 河野浩二, 白石謙介, 井澤伸一郎, 渡邊光章, 藤井秀樹: 食道癌細胞株における Lapatinib 投与後の Trastuzumab 効果の増強, 第 113 回日本外科学会定期学術集会, 2013.4.11 ~ 4.13, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

井澤伸一郎, 河野浩二, 井上亜矢子, 柴修吾, 丸山孝教, 渡邊光章, 河口賀彦, 三村耕作, 藤井秀樹: 胃癌・食道癌微小環境における Reactive Oxygen Species と regulatory T cell (T-reg) の関係,

第 33 回癌免疫外科研究会, 2012.5.17 ~ 5.18, 新横浜プリンスホテル(神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 孝教 (MARUYAMA, Takanori)

山梨大学・総合研究部・医学研究員

研究者番号: 30348221