

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460936

研究課題名(和文) GIST腫瘍血管周細胞を標的とした新規癌ワクチン療法の開発

研究課題名(英文) Cancer vaccines targeting tumor blood vessels in GIST

研究代表者

込田 英夫 (KOMITA, HIDEO)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：90534561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：GISTは、WT1を強発現し、CD8+T細胞も多数浸潤しているが、Tim-3(T cell immunoglobulin and mucin protein 3)/CD56+NK細胞とGalectin-9を介した免疫チェックポイント機構によりNK細胞の不活性化がおり、さらにCD8+T細胞の不活性化により獲得免疫の不活性化が起きている可能性が考えられた。Tim-3/Galectin-9の免疫チェックポイント阻害剤によりGISTに対する抗腫瘍免疫の誘導を惹起出来る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that human gastrointestinal stromal tumor (GIST) has immunogenic features but the antitumor immunity to GIST seems to be suppressed in vivo. In the present study, immune cell types infiltrated into the 19 GIST tissues and immune checkpoint molecules were identified by immunohistochemistry. All the GIST tissues were from local gastric lesions and obtained by the surgical procedure. Nineteen and 8 GIST tissues showed CD8+ T cell and CD56+ natural killer (NK) cell infiltration, respectively, and their infiltrations were strongly correlated. T cell immunoglobulin and mucin protein 3 (Tim-3) expression was seen in 6/8 (75%) of NK cells. Galectin-9 expression was observed in 13/19 (68.4%) of GIST tissues, and all the GIST tissues with Tim-3+NK cell infiltration showed positive galectin-9 expression. Tim-3/galectin-9 interaction between NK cells and GIST tumor cells might be involved in the suppression of antitumor immunity in GIST.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：GIST 免疫チェックポイント分子 Tim-3 Galectin-9 NK細胞 immunotherapy

## 1. 研究開始当初の背景

消化管間葉系腫瘍(Gastrointestinal Stromal Tumor;GIST)は、消化管筋層の介在細胞に由来する c-kit 及び CD34 蛋白陽性の腫瘍で、予後の悪い疾患である。外科手術ができない症例や術後再発した場合は分子標的薬 Imatinib mesylate が有効であるが、効果不十分な症例に対して、Sunitinib malate が GIST 治療の第二選択薬として用いられる。Sunitinib malate は、KIT,PDGFR,Flt3 などのシグナル阻害による抗腫瘍効果と Vascular Endothelial Growth Factor Receptor(VEGFR)阻害による抗腫瘍血管作用を有するが、二次治療における Sunitinib malate の治療成績はきわめて不良で、副作用も大きい。一方で腫瘍血管を標的とした免疫治療が注目されており、腫瘍血管を障害するような抗腫瘍免疫が誘導出来れば、効果的に腫瘍組織障害を引き起こすことが可能となる。われわれは、腫瘍血管新生に際して、腫瘍血管を構成する周細胞(Pericyte)に注目し、これに対する新規治療標的抗原の開発をめざし、研究開始となった。

## 2. 研究の目的

われわれは、腫瘍血管を構成する周細胞に発現しがん免疫治療の標的となりうる抗原として HBB1, EphA2, TEM1, RGS5, NRP1, DLK1 などを同定した。(Zhao X.,Bose A, Komita H. et al. *Mol Ther.* 2011 and *J Immunol* 2012.) これらの抗原を標的とした免疫療法と腫瘍血管を標的とした分子標的薬 Sunitinib malate の併用療法は難治性消化管間葉系腫瘍に対する新規治療法となる可能性が期待出来る。本研究では前述の抗原のうち最も強く抗腫瘍効果を誘導する抗原を同定し、ヒト GIST モデルマウスを使用して免疫療法と分子標的薬の併用効果を検討する。さらに、日本人に多数を占める HLA-A24 における上記抗原の免疫反応性を検討し、ヒト GIST 治療に向けての基礎的知見を得る。

## 3. 研究の方法

本院附属病院病理部または病理学講座で保管されている過去の GIST ホルマリン固定標本を用いて、免疫組織染色を行う。

GIST 症例における周細胞上の治療標的抗原の発現と臨床的特徴の解析:GIST における腫瘍血管周細胞上に発現し、免疫原性が高いと推測される EphA2, TEM1, DLK1, NRP1, RGS5, HBB1 の腫瘍血管上での発現と臨床的特徴の相関について検討する。

GIST モデルマウスを用いて、腫瘍血管周細胞上で発現する抗原(HBB1, EphA2, RGS5, DLK1, TEM1, NRP1)の抗原ペプチドをパルスした樹状細胞を腫瘍内に投与し、最も強い抗腫瘍効果が得られる抗原を決定する。

GIST モデルマウスに対して上記で決定した抗原ペプチドを用いた免疫療法と Sunitinib malate 併用療法を行い、抗腫瘍効果の相乗効果がえられるかを検討する。

## 4. 研究成果

本院病院病理部と病理学講座で保管されている外科術後 GIST ホルマリン固定標本を用いて、腫瘍血管に対する免疫組織染色(ABC法)を行った。腫瘍血管上に HBB1 の発現が認められたが、正常胃粘膜,大腸癌の腫瘍血管上では HBB1 の発現が認められなかった。腫瘍血管周細胞上に HBB1 の発現があるかどうか免疫二重染色で確認したところ、周細胞の細胞マーカーである NG2 または  $\alpha$  SMA と HBB1 の共発現が示唆された。また、HBB1 の発現局在を同定する目的で HBB1 を免疫染色後に電子顕微鏡で GIST 腫瘍組織を観察したところ腫瘍血管周細胞上に HBB1 の発現が示唆された。

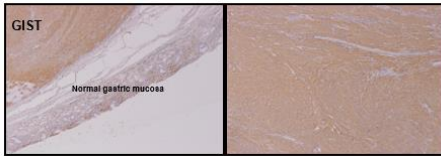
他に EphA2 は腫瘍血管上ばかりでなく腫瘍組織にも発現が散見されたが、DLK1, RGS5, NRP1 の発現は認められなかった。

一方で、腫瘍免疫治療の分野で、Wilm's tumor1 (WT1) 抗原が注目されている。*Clin Cancer Res.* 2009 によれば、Cancer antigen

pilot prioritization ranking で、NO.1 抗原として WT1 ペプチドが選ばれた (Cheever MA. et al. *Clin Cancer Res.* 2009;15: 5323-37.)

上記の知見に基づき GIST における WT1 発現を免疫組織染色を行ったところ 19 症例 GIST 全例で WT1 の発現陽性が認められた。免疫染色の染色パターンは、cytoplasmic pattern であった。WT1 の染色パターンはいずれも強発現しており、染色パターンと臨床的特徴(性差、臨床病期、悪性度)と相関は見られなかった (未発表データ, Fig.1)、

Fig. 1



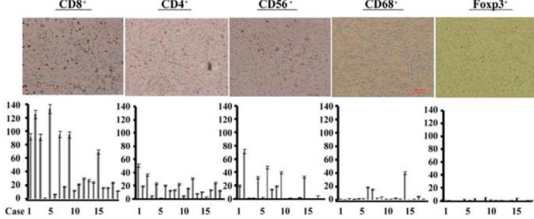
並行して行われた免疫組織染の結果では、腫瘍内には免疫細胞の浸潤がみられた。

手術摘出後新鮮 GIST 組織を用いた検討では、腫瘍浸潤性 CD8<sup>+</sup>T 細胞は、WT1 tetramer 陽性のものが認められた。(未発表データ)

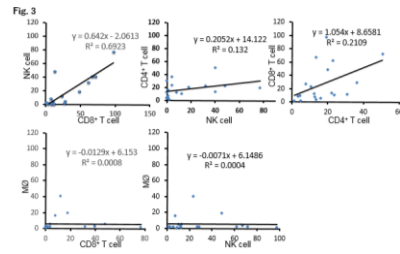
GIST 浸潤性免疫細胞は、免疫組織染色による検討(GIST 19 症例)では、CD8<sup>+</sup>T 細胞の浸潤が全例で認められた。CD4<sup>+</sup>T 細胞も浸潤も CD8<sup>+</sup>T 細胞数ほどではないが全例で認められた。

(Fig. 2)

Fig. 2



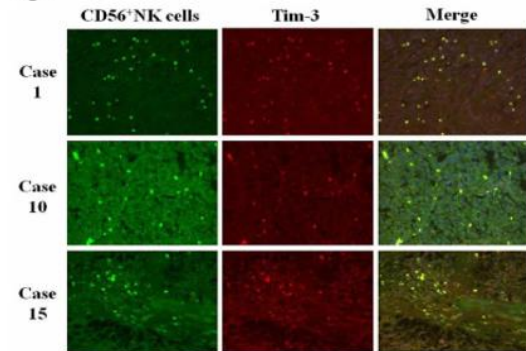
CD56<sup>+</sup>NK 細胞は、19 症例中 8 例で組織浸潤を認められ、CD8<sup>+</sup>T 細胞と CD56<sup>+</sup>NK 細胞の組織内浸潤は互いに相関関係にあった(相関係数 0.6923)。(Fig. 3)



CD68<sup>+</sup>Macrophage や Foxp3<sup>+</sup>細胞は、腫瘍組織内浸潤は、ほとんど認められなかった。また、リンパ球について活性化マーカーCD69 を用いて、免疫二重染色で調べたところ、陽性所見は認められなかった。

CD56<sup>+</sup>NK 細胞を Tim-3 で染色したところ 8 症例中 6 例で陽性の所見が見られた。(Fig. 4)

Fig. 4



一方で CD8<sup>+</sup>T 細胞は、Tim-3 陽性所見は、ほとんどみられなかった。

GIST 腫瘍組織に Galectin-9 の発現は、19 症例中 13 例で発現が認められ、(Fig. 5, Table1)

Fig. 5

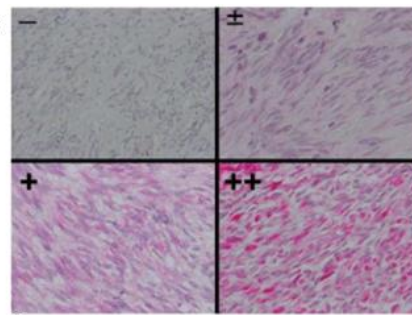


Table 1

	Galectin-9				Total
	-	+/-	+	++	
No. of tissues	2	4	8	5	19

上記の Tim-3/CD56<sup>+</sup>NK 細胞と Galectin-9 の強発現は相関する結果となった。(Table2)

Table 2

	Case							
	1	2	5	7	8	9	10	15
Galectin-9	+	+	++	++	+	++	++	+
Tim-3	+	+	-	+	+	-	+	+

上記の結果より、GIST 腫瘍組織は、WT1 の強発現が認められ、CD8<sup>+</sup>T 細胞が浸潤している、が、同時に浸潤している Tim-3(+)/CD56<sup>+</sup>NK 細胞と GIST に発現している Galectin-9 を介した免疫チェックポイント機構により NK 細胞が活性化できず、それに引き続き、CD8<sup>+</sup>T 細胞が不活性化(獲得免疫の不活性化)している可能性が考えられる。よって、Tim-3 または Galectin-9 の免疫チェックポイント阻害剤により抗腫瘍効果を誘導できる可能性が示唆された。(Komita H. et al *Oncology rep.* 34. 2099-105. 2015.)

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 7 件)

1. Expression of immune checkpoint molecules of T cell immunoglobulin and mucin protein 3/galectin-9 for NK cell suppression on human gastrointestinal stromal tumors. Komita H., Koido S, Hayashi K, Kan S, Ito M, Kamata Y, Suzuki M, Homma S *Oncology Rep.* 34. 2099-105. 2015. DOI:10.3892/or.2015.4149.
2. Up-regulation of HER2 by gemcitabine enhances the antitumor effect of combined gemcitabine and trastuzumab treatment on pancreatic adenocarcinoma cells. Kan S, Koido S, Okamoto M, Hayashi K, Ito M, Kamata Y, Komita H., Nagasaki E, Homma S. *BMC cancer.* 15. 726.2015. DOI:10.1186/s12885-015-1772-1.
3. Gemcitabine treatment enhances HER2 expression in low HER2-expressing breast cancer cells and enhances the anti tumor effects of trastuzumab treatment. Kan S, Koido S, Okamoto M, Hayashi K, Ito M, Kamata Y, Komita H., Nagasaki E, Homma S. *Oncology Rep.* 34. 504-10. 2015. DOI:10.3892/or.2015.3974.
4. Treatment with chemotherapy and

dendritic cells pulsed with multiple Wilm's tumor1 (WT1)-specific MHC class II-restricted epitopes for pancreatic cancer. Koido S, Homma S, Okamoto M, Takakura K, Mori M, Yoshizaki S, Tsukinaga S, Odahara S, Koyama S, Imazu H, Uchiyama K, Kajihara M, Arakawa H, Misawa T, Toyama Y, Yanagisawa S, Ikegami M, Kan S, Hayashi K, Komita H. Kamata Y, Ito M, Ishidao T, Yusa S, Shimodaira S, Gong J, Sugiyama H, Ohkusa T, tajiri H. *Clin Cancer Res.* 20. 4228-39. 2014. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0314.

5. Vaccination with vascular progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells elicits anti tumor immunity targeting vascular and tumor cells. Koido S, Ito M, Sagawa Y, Okamoto M, Hayashi K, Nagasaki E, Kan S, Komita H. Kamata Y, Homma S. *Cancer Immunol immunother.* 63. 459-68. 2014. DOI:10.1007/s00262-014-1531-1.
6. Wilm's tumor gene (WT1) peptide-based cancer vaccine combined with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer. Nishida S, Koido S, Takeda Y, Homma S, Komita H., Takahara A, Morita S, Ito T, Morimoto S, Hara K, Tsuboi A, Oka Y, Yanagisawa S, Toyama Y, Ikegami T, Kitagawa T, Eguchi H, Wada H, Nagano H, Nakata J, Nakae Y, Hosen N, Oji Y, Tanaka T, Kawase I, Kumanogoh A, Sakamoto J, Doki Y, Mori M, Ohkusa T, Tajiri H, Sugiyama H. *J immunother.* 37. 105-14. 2014. DOI: 10.1097/CJI.000000000000020.
7. Strategies to improve the immunogenicity of anticancer vaccines based on dendritic cell/malignant cell fusions. Koido S, Homma S, Okamoto M, Namiki Y, Takakura K, Uchiyama K, Kajihara M, Arihiro S, Imazu H, Arakawa H, Kan S, Komita H., Kamata Y, Ito M, Ohkusa T, Gong J, tajiri H. *Oncoimmunology* 2(9). E25994. 2013.

[学会発表] (計 5 件)

- 1、 GIST における免疫チェックポイント関連分子 Tim-3/galectin-9 の発現 込田英夫、小井戸薫雄、林和美、伊藤正紀、鎌田裕子、田尻久雄、鈴木正章、本間定 第 74 回日本癌学会 2015 年 10 月名

- 古屋
- 2、 Tim-3/galectin-9interaction might be associated with the immunosuppression of Gastrointestinal stromal tumor(GIST) **Hideo Komita**, Shigeo Koido, Hisao Tajiri, Masafumi Suzuki, Sadamu Homma AACR annual meeting 2015April Philadelphia, U.S.A.
- 3、 難治性消化管間葉系腫瘍(GIST)に対する癌免疫療法の検討 **込田英夫**、小井戸薫雄、カン シン、小林由紀子、林和美、鎌田裕子、伊藤正紀、鈴木正章、田尻久雄、本間定 第27回日本バイオセラピー学会学術集会 2014年12月大阪
- 4、 Gastrointestinal Stromal tumor might be immunogenic to become a new target of cancer immunotherapy. **Hideo Komita**, Shigeo Koido, Shin Kan, Masaki Ito, Yuko Kamata, Yukiko Kobayashi, Kouji Nakata, Norio Mitsumori, Naoto Takahashi, Kazuto Tsuboi, Masafumi Suzuki, Hisao Tajiri, Sadamu Homma. 第73回日本癌学会 2014年9月 横浜
- 5、 消化管間葉系腫瘍に対するWT1発現の検討 **込田英夫**、小井戸薫雄、鈴木正章、田尻久雄、本間定 WT1研究会 2014年2月大阪
- [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

込田 英夫 (HIDEO KOMITA)

東京慈恵会医科大学消化器・肝臓内科

研究者番号：90534561

(2) 研究分担者  
なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
なし ( )

研究者番号：