Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | ICOS+ Foxp3+ TILs in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory T cells associated with Helicobacter pylori |
| Author(s) | 長瀬, 博次 |
| Citation | 大阪大学, 2017, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/61582 |
| rights | |
| Note | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

# 論　文　内　容　の　要　旨
# Synopsis of Thesis

| 氏　名<br>Name | 長瀬 博次 |
|---|---|
| 論文題名<br>Title | $ICOS^+$ $Foxp3^+$ TILs in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory T cells associated with *Helicobacter pylori*<br>(胃癌浸潤$ICOS^+$ $Foxp3^+$リンパ球はピロリ菌と関連した活性化制御性T細胞であり予後マーカーとなりうる。) |

論文内容の要旨

〔目　的〕

制御性T細胞(regulatory T cell；Treg) は癌微小環境において腫瘍免疫を抑制している。Tregのマーカーとして転写因子Foxp3が一般に用いられるが、強い抑制機能をもつ活性化Treg(effector Treg；eTreg) は$Foxp3^+CD4^+$T細胞の一分画であるとされ、その特異的なマーカーは存在しない。本研究では、T細胞活性化発現分子であるTCR-inducible costimulatory receptor(ICOS)に着目し、胃癌浸潤ICOS発現細胞がeTregであるという可能性を検討するとともに、$ICOS^+Foxp3^+CD4^+$T細胞の誘導につき検討した。

〔方法ならびに成績〕

胃癌新鮮組織40例より抽出した腫瘍浸潤リンパ球（tumor-infiltrating lymphocytes；TIL）をフローサイトメトリーにて解析した。$Foxp3^+$細胞分画はICOSを用いた場合明確な２分画に区別する事が可能であったため、そのうちの$ICOS^+Foxp3^+$細胞分画がeTregとなりうるのかを解析した。胃癌$Foxp3^+CD4^+$細胞中の$ICOS^+$細胞頻度($ICOS^+/Foxp3^+CD4^+$)は、患者病理病期の進行に伴い頻度が増加した。根治手術を行えた35症例の$ICOS^+/Foxp3^+CD4^+$を中央値で高値群と低値群に2分したところ、低値群では無再発生存期間が有意に延長した（$p=0.013$）。TIL中の$CD8^+$T細胞にはICOSの発現はほぼ認めなかったこと、$ICOS^+Foxp3^+CD4^+$細胞は他癌と比較して胃癌に有意に多いことより、$ICOS^+Foxp3^+$細胞は胃癌$CD4^+$T細胞に特徴的であることが認められた。次いで$ICOS^+Foxp3^+CD4^+$細胞の免疫抑制機能を検討した。Foxp3に代わりにCD25を用いると、$ICOS^+CD25^+CD4^+$細胞は抑制性サイトカインであるIL-10を有意に多く分泌していた一方で、$ICOS^-CD25^+CD4^+$細胞はIL17、TNFα、IFNγを多く分泌していた。また、CFSEラベル反応細胞の増殖を強く抑制したことから、$ICOS^+CD25^+CD4^+$細胞は強い免疫抑制機能を有することが明らかとなった。

次に、$ICOS^+Foxp3^+CD4^+$T細胞の誘導に際してのICOS-Ligand(ICOS-L)の関与につき検討を加えた。TGFβ存在下ではナイーブ$CD4^+$T細胞よりeTregが誘導される。そこで末梢血より精製したナイーブ$CD4^+$T細胞をTGFβ存在下で抗CD3/CD28抗体刺激する際に、組み換えICOS-L蛋白（rICOS-L)を加えることによるICOS発現細胞誘導への影響を検討した。誘導された$ICOS^+/Foxp3^+CD4^+$は、rICOS-Lを加えた場合11.5%であったのに対して、rICOS-Lを加えなかった場合の5.5%に比して多かった。さらに腫瘍抗原であるMelan-A特異的反応性CD8T細胞の誘導培養を行い、結合したテトラマー陽性細胞の発現頻度を比較したところ、rICOS-Lを付加した場合1.12%であり、加えなかった場合の5.25%に比べ誘導を抑制していた。胃癌局所におけるICOS-L発現細胞を調べたところ、形質細胞様樹状細胞（plasmacytoid dendritic cell;pDC)に高発現していた。胃癌浸潤pDC中の$ICOS\text{-}L^+$細胞頻度と$ICOS^+/Foxp3^+CD4^+$の関係には正の相関を認めた。pDCはtoll-like receptor(TLR)7、9の刺激により活性化される。そこで胃癌局所におけるpDC中のTLR7、TLR9の発現細胞頻度とICOS-L発現細胞頻度について解析したところ、$TLR9^+$pDCと$ICOS\text{-}L^+$pDCの発現に相関を認め、さらに$TLR9^+$pDCと$ICOS^+/Foxp3^+CD4^+$にも相関を認めた。

自然免疫の担い手であるTLRの関与が考えられたことから、胃への感染が多いことで知られるピロリ菌の$ICOS\text{-}L^+$pDCへの関与、さらにはICOS発現TIL誘導への関与の可能性を検討した。ピロリ菌陽性患者(n=16)と陰性患者(n=4)の胃癌組織において、pDC中のTLR9、ICOS-L発現細胞頻度と、$ICOS^+/Foxp3^+CD4^+$を比較した。ピロリ菌陽性患者の胃癌組織では陰性患者に比して$TLR9^+$pDC、$ICOS\text{-}L^+$pDC、$ICOS^+Foxp3^+$のすべてが高発現していた。さらにピロリ菌陽性患者（n=10)と陰性患者(n=4)の胃癌組織に浸潤する$ICOS^+$細胞, $Foxp3^+$細胞, pDCを多重蛍光免疫染色法にて解析したところ、ピロリ菌陽性患者の胃癌組織中では、$ICOS^+Foxp3^+$細胞が陰性患者に比して有意に多く、$ICOS^+Foxp3^+$細胞とpDCが近接して存在する部位も観察された。$Foxp3^+$細胞、pDC細胞数は両群で有意差を認めなかった。

〔総　括〕胃癌組織中においてICOSは活性化Tregの特異マーカーであり、その発現にはpDCのTLR9, ICOS-Lを介したピロリ菌の感染が関連していることが強く示唆された。将来ICOSがピロリ菌関連胃癌に対する分子標的療法の有望な標的となる可能性があることが考えられた。

# 論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）長瀬博次

| | | （職） | 氏　名 |
|---|---|---|---|
| 論文審査担当者 | 主　査 | 大阪大学教授 | 土岐祐一郎 |
| | 副　査 | 大阪大学教授 | 竹原徹郎 |
| | 副　査 | 大阪大学教授 | 竹田潔 |

## 論文審査の結果の要旨

制御性T細胞（regulatory T cell；Treg）は癌微小環境において腫瘍免疫を抑制している。しかし、強い抑制機能を持つ腫瘍局所の活性化Tregに特異的なマーカーは存在しない。本研究では、T細胞活性化発現分子であるTCR-inducible costimulatory receptor（ICOS）に着目し、胃癌浸潤ICOS発現細胞が活性化Tregであるという可能性を検討した。胃癌浸潤ICOS$^{+}$細胞は抑制性サイトカインであるIL-10を有意に多く分泌しており、反応細胞の増殖を強く抑制した。また胃癌組織中のICOS$^{+}$細胞頻度が高いと無再発生存期間が有意に増悪した。さらにICOSの発現には胃癌組織浸潤形質細胞様樹状細胞（plasmacytoid dendritic cell;pDC）が関与しており、その発現にはtoll-like receptor（TLR）9の刺激が重要であった。さらにピロリ菌のpDCへの関与を検討したところ、ピロリ菌陽性患者の胃癌組織ではTLR9$^{+}$pDC、ICOS-L$^{+}$pDC、ICOS$^{+}$Foxp3$^{+}$のすべてが高発現していた。以上より、胃癌組織中においてICOSは活性化Tregの特異マーカーであり、その発現にはpDCのTLR9, ICOS-Lを介したピロリ菌の感染が関連していることが強く示唆された。本研究は、これまで明らかでなかった腫瘍局所の活性化Tregのマーカーとして ICOSを同定したこと、また将来ICOSがピロリ菌関連胃癌に対する分子標的療法の有望な標的となる可能性があり、学位に値すると考える。