



Title	口腔扁平上皮癌における腫瘍浸潤T細胞の免疫プロファイル解析
Author(s)	梶川, ひとみ
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/87947
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

口腔扁平上皮癌における腫瘍浸潤 T 細胞の免疫プロファイル解析

大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻

顎口腔病因病態制御学講座 (口腔外科学第二)

梶川 ひとみ

目次

I. 緒言

II. 材料と方法

1. 患者および腫瘍組織
2. 抗体
3. フローサイトメトリー (FACS) 解析
4. CITRUS (Cluster identification, characterization and regression) 解析
5. 多重蛍光免疫組織化学染色
6. 統計解析
7. 研究承認

III. 結果

1. 再発転移症例に特異的な T 細胞プロファイル
2. Heat map 解析における "Hot" 群に特異的な T 細胞プロファイル
3. 多重蛍光免疫組織化学染色を用いた腫瘍局所における ICOS⁺ Treg と細胞傷害性 T 細胞の発現の解析
4. CD4⁺ CD25^{high} T 細胞における ICOS 発現の予後への関与

IV. 考察

V. 文献

VI. 謝辞

VII. 図表

I. 緒言

口腔扁平上皮癌 (Oral squamous cell carcinoma; OSCC) は、頭頸部扁平上皮癌に属し、口腔に発生する最も一般的な悪性腫瘍である。2018 年の推定では、北アメリカの男性では 10 万人あたりの罹患率が 6.3、東南アジアの男性では 3.2 となっている [1-3]。OSCC の治療は外科的切除が基本となるが、切除標本を用いた病理組織学的検査により、浸潤の進達度や転移リンパ節の節外浸潤、病理学的な TNM ステージなどのリスク因子を判断して、術後治療の必要性を決定する [4-6]。最近では、患者の予後に関連する形態学的分析が進展し、budding、浸潤増殖様式 (infiltrative growth pattern; INF)、YK 分類、組織浸潤免疫関連細胞の免疫組織化学的分析など、さまざまな要素が報告されている [7-11]。

近年、免疫チェックポイント阻害剤 (Immune checkpoint inhibitors; ICIs) の成功により、腫瘍に浸潤している免疫関連細胞が注目されている。CD3 および CD8 T 細胞の浸潤が多いほど予後が良いという “Immunoscore” は、Galon が免疫組織化学染色を用いて提唱したものであり [12]、ICI による臨床効果が得られた症例でも、腫瘍微小環境 (tumor microenvironment; TME) における活性化された免疫グレードが病理組織学的に観察されることが明らかになっている [13-16]。これらの免疫グレードは、構成成分 (効果因子優勢/平衡状態/抑制因子優勢)、局所状態 (炎症状態/免疫除外/免疫枯渇)、T 細胞の活性化状態 (活性化/平衡状態/疲弊) に分類され、ICI の非奏効者はそれぞれ「抑制因子優勢」「免疫枯渇」「疲弊」の特徴を持つ TME を有する傾向がある。これらは一

一般的に、T細胞が活性化した”Hot”な TME とは対照的に”Cold”な TME と呼ばれている [16-22]。

ICI に対する治療効果の予測因子を探索する遺伝子ベースの包括的な研究も、治療前の腫瘍生検検体を用いて行われている。単一の因子を特定することが困難であるため、複数の因子を用いたプロファイル解析が ICI 奏効者のバイオマーカー研究にしばしば応用され、これまでに間葉転換、細胞接着、血管新生の制御など、いくつかの特徴的クラスターが特定されている [16, 17, 19]。また、遺伝子発現だけでなく、腫瘍浸潤細胞を用いてフローサイトメトリーで検出されたタンパク質発現に基づく免疫関連シグネチャー、特に腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes; TILs) 関連シグネチャーも研究対象とされている。CD8 が多く含まれるクラスターでは、免疫関連タンパク質の発現が一般的に強く、活性化 T 細胞クラスターを形成する傾向があり、ICI 奏効者の TILs に比較的多くみられるとされる [23]。一方、このような TILs の発現シグネチャーのプロファイル解析は、”immunoscore”のように、がん患者の普遍的な予後を予測する解析にも応用されている [12, 14, 21]。

転写因子として Foxp3 を発現する制御性 T 細胞 (regulatory T cell; Treg) は、免疫の恒常性維持に重要な役割を果たしている。腫瘍免疫においては、IL-2 の消費、CTLA-4 の結合、TGF- β , IL-10, TIGIT などの他の分子との複合的な免疫抑制機能により、腫瘍特異的に働く T 細胞の誘導、増殖、認識、反応を抑制し、その結果、腫瘍細胞の生存と増殖に適した環境が提供される [21, 24-28]。中でも強い免疫抑制機能を持つ effector Treg (eTreg) は、Foxp3 と CD25 を高発現していることから、Foxp3/CD25 高発現の eTreg 分画に特異的

なマーカーが探索され、inducible costimulatory receptor (ICOS), CCR4, CCR8
などが同定されている [29, 30]。

本研究では、OSCC において腫瘍進展や予後に影響を及ぼす分子を明らかに
することを目的とし、TIL における免疫関連分子の発現をフローサイトメトリ
ーで解析し、患者の臨床病理組織学的因子との関連を調査し、さらに新たな予
後予測因子となりうる分子を探索した。

II. 材料と方法

1. 患者および腫瘍組織

2018年12月から2021年2月の間に一次治療として外科的切除を選択した31名のOSCC患者より、新鮮腫瘍組織を採取した。製品プロトコールに則って、Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) と gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec) を用いて単細胞懸濁液を調整した。この細胞懸濁液を40µmのナイロン製セルストレーナー (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) に通して濾過した。濾過液にBD Pharm Lyse (BD Biosciences) を添加して赤血球を溶解した後、遠心分離してTILを精製した。

2. 抗体

フローサイトメトリー解析のために、表1の抗体を購入した。

3. フローサイトメトリー (FACS) 解析

FcR ブロック (Human TruStain FcX Receptor-blocking solution; BioLegend) の後、Live/Dead Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) と各蛍光標識抗体で細胞を染色し、4°Cで30分間培養した。染色した細胞はLSR Fortessa (BD Biosciences) で測定し、得られた細胞集団の発現頻度はDiVAソフトウェア (BD Biosciences) で解析した。染色陽性の評価のため、各蛍光体と結合した一次抗体のアイソタイプコントロールを用いた。

4. CITRUS (Cluster identification, characterization and regression) 解析

Cytobank (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) より提供される CITRUS は、シングルセル解析用の教師付き機械学習アルゴリズムであり、設定した 2 群間で有意に異なる細胞集団をクラスター化して特定する多変量解析手法である [31]。本研究では、1600 個以上の CD3 陽性細胞を測定し得た患者 24 症例の FACS データから得られた 10 種類の表面マーカー (CD4, CD8, CD45RA, CD25, PD-1, Tim-3, CD103, ICOS, 4-1BB, OX40) の素データを用いて、解析を実行した。

5. 多重蛍光免疫組織化学染色

FACS 解析と異なる症例を含む OSCC 患者 20 名のホルマリン固定パラフィン包埋 (Formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE) 標本を用い、製品プロトコールに則って Opal Fluorescent IHC Kit (Akoya Biosciences, Marlborough, MA, USA) を使用して蛍光多重標識を行った。組織切片は、一次抗体と二次抗体で染色した後、蛍光クロムで標識したシグナル増幅チラミドで染色した。その後熱媒によって一次抗体を除去し、他の抗原を別の一次抗体で標識した。使用した一次抗体は表 2 に示す。

共発現シグナルは、Vectra 自動定量病理組織イメージングシステム (Akoya Biosciences) を用いて検出、撮影した。定量分析のために、inForm ソフトウェア (Akoya Biosciences) を使用し、 $670 \times 500 \mu\text{m}$ の視野内の蛍光シグナル強度を測定した。DAPI の発現を元に細胞セグメンテーションアルゴリズムに沿って細胞をセグメント化し、各細胞における XY 座標と抗原の蛍光シグナル強

度を算出した。また、同ソフトウェアを使用して多重染色標本のイメージを各抗原の DAB 染色像とする疑似 IHC 染色画像を作成した。この画像と細胞の XY 座標を比較することにより、各標本において抗原の発現を陽性と規定する蛍光シグナル強度の Cut off 値を決定し、細胞のフェノタイピングを行った。

本研究では、リンパ球数を (CD4⁺ 細胞数 + CD8⁺ 細胞数 - CD4⁺CD8⁺ 細胞数) と概算し、Treg は CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 細胞、細胞傷害性 T 細胞は CD8⁺ Granzyme B⁺ 細胞と定義した。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本の腫瘍進展範囲と比較しながら、腫瘍組織中心部ならびに腫瘍浸潤先端部より 670 × 500 μm の視野をランダムに各 3 視野選択し、リンパ球における制御性 T 細胞ならびに細胞傷害性 T 細胞の発現割合を測定した。

6. 統計解析

各実験データセットの 2 群間の差の有意性の評価には、Kruskal-Wallis 検定、Fisher's exact 検定、Pearson's χ^2 検定を使用した。無病生存率 (Disease-free survival rate; DFS) は、Kaplan-Meier 法で解析し、Log-rank 検定で比較した。単変量ならびに多変量解析は、Cox 回帰分析により行った。T 細胞表面マーカーの発現プロファイルは、個々のデータを Z スコアに変換して標準化した後、Heat map によって可視化し、Ward 法を用いて階層的クラスタリングアルゴリズムを施行した。すべての統計解析は、JMP Pro 15 ソフトウェア (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。最適なカットオフ値の検出のために、ROC (receiver operating characteristic) 曲線下の面積を算出した。 $p < 0.05$ を有意水準とした。

7. 研究承認

本研究は、大阪大学歯学部附属病院倫理委員会（H30-E49-3）で承認されており、ヘルシンキ宣言に基づいて、各患者から書面によるインフォームドコンセントを得た。

III. 結果

1. 再発転移症例に特異的な T 細胞プロファイル

本研究では 31 名の OSCC 患者が登録された (表 3)。手術時の年齢中央値は 72 歳で、病理学的ステージは I/II 期が 15 名、III/IV 期が 16 名であった。外科的治療後、観察期間中に 6 名の患者に再発・後発転移を認めたため、非再発患者 25 名との間で病理学的ステージ、INF などの臨床病理組織学的因子を比較したが、いずれの因子においても有意な差は認めなかった。

次に、新鮮組織検体から精製された CD4⁺および CD8⁺ TIL の特徴を、活性化を表す CD45RA, CD103、免疫チェックポイント分子を表す PD-1, Tim-3, ICOS, 4-1BB, OX40、ならびに Treg を表す CD25 の発現によって評価した (図 1)。患者の予後を予測するマーカー候補を検索するために、生細胞、単細胞、CD45⁺ 細胞 (白血球共通抗原)、リンパ球、CD3⁺ 細胞 (T 細胞) の集団に順次ゲーティングし、そのうち CD3⁺ 細胞における CD4⁺, CD8⁺ の発現割合、CD4⁺/CD8⁺ 細胞における CD45RA⁺, PD-1⁺, Tim-3⁺, ICOS⁺, 4-1BB⁺, OX40⁺, CD25⁺, CD103⁺ の各発現割合を、再発患者と非再発患者で比較した。各マーカー単独では再発患者と非再発患者間に発現パターンに差は認められなかった (図 2)。

再発患者に特異的な細胞分画を特定するために、FACS 解析で得られた全マーカーの素データを用いて、CITRUS アルゴリズムによるプロファイリング解析を行った。その結果、Cluster 40119 が特定された (図 3A, B)。このクラスターの T 細胞は CD4, CD25, ICOS を強く発現しており、OX40, 4-1BB の比較

的高い発現を示した (図 3C, D)。FACS 解析の散布図より、OX40 と 4-1BB を共発現している CD4⁺ TIL のほとんどが、CD4⁺ CD25^{high} ICOS⁺ TIL の分画に含まれていた (図 3E)。さらに、CD4⁺ CD25^{high} TIL における % ICOS⁺ を再発患者と非再発患者で比較したところ、再発患者の方が % ICOS⁺ が高い傾向を認めた ($p = 0.117$, 図 3F)。また、OSCC 患者 31 名を CD4⁺ CD25^{high} TIL における % ICOS⁺ の中央値で二分したところ、再発した患者 6 名のうち 5 名が % ICOS⁺ の高い群に分類された (中央値; 82.1%, $p = 0.08$, 表 4)。

2. Heat map 解析における”Hot”群に特異的な T 細胞プロファイル

腫瘍組織における T 細胞の活性化状態を解析するため、CD3⁺ 細胞における CD4⁺, CD8⁺ の発現割合、CD4⁺/CD8⁺ 細胞における CD45RA⁺, PD-1⁺, Tim-3⁺, ICOS⁺, 4-1BB⁺, OX40⁺, CD25⁺, CD103⁺ の各発現割合、ならびに CD4⁺ 細胞における CD45RA⁻ CD25^{high} の発現頻度を用いて Heat map 解析を行った。31 症例を教師なしクラスタリング解析を行ったところ、免疫学的に不活性化した TIL を多く含む Cluster A と、免疫学的に活性化した TIL を多く含む Cluster B の 2 つのクラスターに分類された (図 4)。活性化した TIL プロファイルを有する Cluster B の 20 名の患者は、Cluster A の患者に比べ、PET-CT 画像における SUVmax (maximum standardized uptake value) が有意に高く、病理学的な INF のグレードは高く、DFS は短縮する傾向を認めた (表 5)。

次に、Cluster B を代表する特異的な細胞分画を調べるために、全マーカーの素データを用いて CITRUS アルゴリズムによるプロファイリングを行った。

Cluster B に高頻度に存在する細胞分画として Cluster 40129 と 40140 の 2 つの

クラスターと、Cluster A に高頻度に存在する細胞分画として Cluster 40118 と 40144 の 2 つのクラスターを同定した (図 5A-F)。Cluster 40129 の TIL は、CD4, CD25, ICOS を強発現し、OX40, 4-1BB を比較的強く発現しており、先ほどの予後分析で同定されたクラスターと類似した発現パターンであった。さらに、FACS による解析では、CD4⁺ CD25^{high} TIL における % ICOS⁺ は、Cluster B の方が Cluster A よりも有意に高値であった ($p = 0.03$, 図 5G)。また、Cluster 40140 の TIL は、CD4 を明確に発現し、CD25 と ICOS は中程度の発現であったが、OX40 や 4-1BB は発現していなかった (図 5C)。

3. 多重蛍光免疫組織化学染色を用いた腫瘍局所における ICOS⁺ Treg と細胞傷害性 T 細胞の発現の解析

FACS のデータより、ICOS⁺ Treg は eTreg を象徴している可能性が示唆されたため、多重蛍光免疫組織化学染色を用いて TME における ICOS⁺ Treg ならびに細胞傷害性 T 細胞の局在を調べ、二者の関係性を解析した。図 6A に多重蛍光免疫組織化学染色像と同症例の HE 染色像を示す。HE 染色像の青線は、腫瘍進展範囲を示す。また、図 6B に腫瘍浸潤先端部で撮影した画像の一例を示す。Merge 像の上部は浸潤先端方向、下部は腫瘍中心方向を示し、黄枠部分をさらに強拡大してフェノタイプごとに示した。白矢頭は ICOS⁺ Treg、灰矢頭は細胞傷害性 T 細胞を示す。いずれも腫瘍浸潤先端部においても豊富に発現していることが確認された。

次に、腫瘍浸潤先端部と腫瘍中心部における ICOS⁺ Treg と細胞傷害性 T 細胞の発現の相関を調べた。ランダムに選択された各 3 視野を集計し、リンパ球

における ICOS⁺ Treg の発現割合を x 軸、ならびに細胞傷害性 T 細胞の発現割合を y 軸に示した (図 6C)。また、腫瘍浸潤先端部 (赤) と腫瘍中心部 (青) における 95% 楕円図を示した。腫瘍中心部では ICOS⁺ Treg と細胞傷害性 T 細胞の発現割合に相関を認めないのに対し ($r = 0.003$)、腫瘍浸潤先端部では、ICOS⁺ Treg と細胞傷害性 T 細胞の発現に弱い逆相関を認めた ($r = -0.387$)。

4. CD4⁺ CD25^{high} T 細胞における ICOS 発現の予後への関与

これまでの結果より、CD4⁺ CD25^{high} TIL における % ICOS⁺ (平均値 ± 標準偏差; 78.0 ± 20.1 , 中央値; 82.1) が TME における免疫学的活性化にも再発にも強く関与していることが示唆されたため、この % ICOS⁺ と OSCC 患者の予後との関連性を再度検討した。31 名の患者を % ICOS⁺ 中央値で 2 分したところ、Log-rank 検定で算出された DFS に有意な差は認められなかったものの ($p = 0.095$, 図 7A)、ROC 解析を元にカットオフ値を再検討したところ (図 7B)、% ICOS⁺ が 95% 以上の高値を示す患者では、95% 未満の患者に比べ DFS の有意な短縮を認めた ($p = 0.0157$, 図 7C, 表 6)。

次に、既知の臨床病理組織学的予後因子と % ICOS⁺ を用いて予後との関連性を検討した。ROC 解析を用いて年齢、SUV_{max} のカットオフ値を決定し、各項目の単変量解析を行ったところ、% ICOS⁺ のみが有意差を認め ($p = 0.033$, 表 7)、さらに多変量解析を行っても、% ICOS⁺ は独立した予後予測因子であった ($p = 0.019$)。

IV. 考察

近年、本邦では頭頸部扁平上皮癌においても PD-1/PD-L1 経路阻害剤が認可され、再発癌に対する有用な治療法の一つとして選択されている。その効果を予測するバイオマーカーとしては PD-L1 陽性腫瘍細胞数より算出される TPS (Tumor Proportion Score) や、免疫担当細胞を含む PD-L1 陽性細胞数より算出される CPS (Combined Positive Score) など、免疫組織化学的解析による PD-L1 の発現が利用されることが多い。再発転移性頭頸部扁平上皮癌患者を対象とした KEYNOTE-048 試験において、pembrolizumab 単剤と 5-FU、cisplatin/ carboplatin との併用療法は EXTREME 療法と比べ有意に全生存期間を延長させ、その中で PD-L1 を発現している患者においては pembrolizumab 単剤でも臨床効果を示した[32]。その一方で、KEYNOTE-012 試験においては pembrolizumab 単剤が、そして CheckMate-141 試験では nivolumab 単剤で、PD-L1 発現の有無にかかわらず一定の臨床効果を示したとの報告があることから、PD-L1 発現はいまだ確立したバイオマーカーとは言えず、新たなバイオマーカー探索が継続されている[33, 34]。

高頻度マイクロサテライト不安性 (microsatellite instability-high; MSI-high) や“Hot”な TME も、ICI 療法の効果が期待できる免疫状態として、バイオマーカーとして報告されている。腫瘍細胞に高頻度に生じた遺伝子変異が新たな免疫原性タンパク質、いわゆるネオアンチゲンを産生し、強力な抗腫瘍免疫反応を引き起こす副産物として、MSI-high を示す[40-42]。強力な抗腫瘍免疫反応が誘導されるにもかかわらず患者に腫瘍が持続的に存在するということは、

その腫瘍免疫応答が機能していないことを示している。このような場合、T細胞の活性化が起こっている、すなわち”Hot”な TME を示しているにもかかわらず、PD-1/PD-L1 経路や Treg などの免疫抑制機構が、活性化したエフェクターT細胞を抑制することで、有効な腫瘍免疫応答を発揮できていない結果と考えられており、このような環境を持つ症例にこそ ICI 療法が有効である理由であろう。

本研究では、頭頸部扁平上皮癌の中でも OSCC 患者における予後予測マーカーの探索、さらには ICI に効果を示すとされる”Hot”な TME を特定する新たなマーカーの探索を、腫瘍免疫の最前線である TME の中で試みた。その結果として CD4⁺ CD25^{high} ICOS⁺ TIL 分画を同定しえた。

免疫抑制性細胞の代表とされる Treg は、当初 CD25⁺ CD4⁺ T細胞として定義され、その後 Forkhead/winged-helix ファミリーの転写因子の一つである Foxp3 をマスター遺伝子として有していることが明らかとなった。胸腺から産生された Foxp3⁺ natural Treg はその後、①naïve Treg; Foxp3^{low} CD45RA⁺ CD25^{low}, ②effector Treg (eTreg); Foxp3^{high} CD45RA⁻ CD25^{high}, ③non-Treg; Foxp3^{low} CD45RA⁻ CD25^{low} の3つのフラクションに分類されることが Miyara らにより報告された。末梢で活性化されていない naïve Treg は弱い免疫抑制機能しか有しておらず、T細胞受容体の刺激を受けて抑制性の高い真の免疫抑制機能を有する eTreg に分化し、エフェクターT細胞を直接的に、あるいは抗原提示細胞の成熟を抗原特異的に阻害している。この eTreg 分画では他の研究者らにより ICOS、OX40、4-1BB などの TNF 受容体スーパーファミリーメンバーを高発現していることが報告されてきた[29, 30, 35, 36]。一方、CD25 を中

程度に発現している non-Treg は、免疫抑制能が低い、もしくは全く有していないが、炎症性サイトカインを産生している細胞集団であると報告されている。本研究においては、図 2 における Cluster 40119 と、図 5 における Cluster 40129 はいずれも、CD25 を高発現し、ICOS, OX40, 4-1BB を共発現していることから、eTreg と見なすことができる。一方、図 5 の Cluster 40140 は、CD25 を中程度に発現し、弱い ICOS 発現を示すとともに、OX40, 4-1BB を発現していないことから、“non-Treg”である可能性がある。eTreg による IL-2 の消費は TME における IL-2 の欠乏を引き起こし、eTreg 周辺の T 細胞における抗腫瘍活性に影響を与えるため、IL-2 高親和性受容体である CD25 の著明な発現は、eTreg における免疫抑制機能に重要な役割を果たしていると考えられる [24, 25]。

ICOS は、CD28 スーパーファミリーに属する共刺激分子であり、T 細胞受容体によって誘導・活性化される表面分子として同定され、TIL、特に TME 内の eTreg に高発現している [26, 37]。eTreg 誘導時に ICOS-L との結合を阻害することで Foxp3 の発現レベルが低下したことにより、Foxp3 の転写活性に重要とされ、Foxp3⁺ Treg の生成を媒介することが報告されている。また、ICOS の共刺激は Treg の増殖、抗アポトーシスに影響するだけでなく、IL-10 産生をはじめとする免疫抑制機能に関与することが示唆されている。我々のグループでは、以前より胃癌と大腸癌に関する研究において、胃粘膜内で TLR9 を介して *Helicobacter pylori* により刺激された ICOS-L⁺ 形質細胞様樹状細胞によって ICOS⁺ Treg が腫瘍組織中に誘導されること、強い免疫抑制効果をもつ IL-10 を産生し、予後不良のバイオマーカーとなる一方で、TME 内エフェ

クターT細胞や末梢血中T細胞にはほぼ発現しないという特異性を示してきた [27, 38, 39]。

本研究では、OSCCのTMEにおけるICOS⁺eTregとエフェクターT細胞の位置的情報を多重蛍光免疫組織化学染色を用いて検索した。その結果、OSCCにおいてもCD25のみならずマスター遺伝子であるFoxp3を高発現しているICOS⁺eTregとGranzyme Bを発現する細胞傷害性T細胞が豊富に存在していた(図6A, B)。腫瘍中心部ではこのICOS⁺eTregと細胞傷害性T細胞との間に相関は認められなかったのに対し、腫瘍浸潤先端部においてこれらの細胞数は逆相関していた(図6C)。Heat map解析による”Hot”な患者群では、INFは有意に高値を示していた(表5)ことから、腫瘍浸潤傾向の強い患者の浸潤先端部では免疫抑制機能の強いICOS⁺eTregが細胞傷害性T細胞の存在を抑制することにより、腫瘍の進展にも寄与している可能性が示唆される。ICOS⁺Tregは、悪性黒色腫、頭頸部がん、乳がんなど多くの癌腫の腫瘍組織でも検出されている[26]。殊に頭頸部がんについては、TCGAデータセットを用いた解析において、ICOSとFoxp3のmRNAの共発現が各臓器由来の腫瘍と比較しても最も高いことが示されており、本研究の結果とも合致するとともに、さらにROC解析においてカットオフ値が95%と高値になったこととも関係している可能性がある(図7B)。現在、がん免疫療法として、TME内のICOS⁺eTregを標的とする抗ICOS抗体を用いた臨床試験が活発に行われている。臨床試験に向けて開発された抗体は、抗体依存性細胞傷害によりICOS^{high}eTregを枯渇させるとともに、ICOSの発現が低いエフェクターT細胞を活性化させる効果が報告されている[37]。

本研究において、CD3 T 細胞中の CD4, CD8 T 細胞の割合は予後と関連していないという結果や、Heat map 解析において CD3 T 細胞に含まれる CD8 T 細胞の割合が”Hot” cluster と ”Cold” cluster で明確に区別できないという点は非常に興味深い結果であった (図 4)。TIL の活性化状態は CD8 の発現頻度とは無関係である可能性があり、immunoscore 解析の活性化マーカーとして CD45RO を加えた Galon らの最近の研究からも、この仮説が支持される [12, 14]。限定された症例数であること、全生存率ではなく無病生存率による予後解析であるなどを考慮し、現在保存検体による免疫組織化学的解析やより多くの症例を集積した検討をさらに進めている。

結論として、OSCC 患者の手術後の再発予測や ICI の臨床効果を予測するためのバイオマーカーとして、ICOS⁺ eTreg を同定した。現在、頭頸部癌患者を対象に、ICOS アンタゴニストと PD-1/PD-L1 経路遮断薬を併用した臨床試験が実施されており、OSCC 患者の結果に注目するとともに、ICOS の測定がコンパニオン診断法となることが期待される。

V. 文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68:394-424.
- [2] Du M, Nair R, Jamieson L, Liu Z, Bi P. Incidence Trends of Lip, Oral Cavity, and Pharyngeal Cancers: Global Burden of Disease 1990-2017. *Journal of Dental Research*. 2020;99:143-51.
- [3] Almangush A, Makitie AA, Triantafyllou A, de Bree R, Strojan P, Rinaldo A, et al. Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. *Oral Oncology*. 2020;107.
- [4] Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumours*. Wiley-Blackwell; 2017.
- [5] Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Current Treatment Options in Oncology*. 2017;18.
- [6] Colevas AD, Yom SS, Pfister DG, Spencer S, Adelstein D, Adkins D, et al. NCCN Guidelines (R) Insights Head and Neck Cancers, Version 1.2018 Featured Updates to the NCCN Guidelines. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. 2018;16:479-90.
- [7] Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, et al. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on

the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016.

Modern Pathology. 2017;30:1299-311.

[8] Almangush A, Pirinen M, Heikkinen I, Makitie AA, Salo T, Leivo I. Tumour budding in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis. British Journal of Cancer. 2018;118:577-86.

[9] Makitie AA, Almangush A, Rodrigo JP, Ferlito A, Leivo I. Hallmarks of cancer: Tumor budding as a sign of invasion and metastasis in head and neck cancer. Head and Neck-Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck. 2019;41:3712-8.

[10] Yamamoto E, Miyakawa A, Kohama GI. MODE OF INVASION AND LYMPH-NODE METASTASIS IN SQUAMOUS-CELL CARCINOMA OF THE ORAL CAVITY. Head & Neck Surgery. 1984;6:938-47.

[11] Shimizu S, Miyazaki A, Sonoda T, Koike K, Ogi K, Kobayashi J, et al. Tumor budding is an independent prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma: With special reference to the mode of invasion and worst pattern of invasion. Plos One. 2018;13.

[12] Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. Journal of Pathology. 2014;232:199-209.

[13] Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. Nature. 2014;515:568-71.

- [14] Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313:1960-4.
- [15] Giraldo NA, Becht E, Vano Y, Petitprez F, Lacroix L, Validire P, et al. Tumor-Infiltrating and Peripheral Blood T-cell Immunophenotypes Predict Early Relapse in Localized Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2017;23:4416-28.
- [16] Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song CY, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell*. 2016;165:35-44.
- [17] Lizotte PH, Ivanova EV, Awad MM, Jones RE, Keogh L, Liu HY, et al. Multiparametric profiling of non-small-cell lung cancers reveals distinct immunophenotypes. *Jci Insight*. 2016;1.
- [18] Chen PL, Roh W, Reuben A, Cooper ZA, Spencer CN, Prieto PA, et al. Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Discovery*. 2016;6:827-37.
- [19] Cristescu R, Mogg R, Ayers M, Albright A, Murphy E, Yearley J, et al. Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science*. 2018;362:197-206.
- [20] Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science*. 2015;348:56-61.

- [21] Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2019;18:197-218.
- [22] Galluzzi L, Chan TA, Kroemer G, Wolchok JD, Lopez-Soto A. The hallmarks of successful anticancer immunotherapy. *Science Translational Medicine*. 2018;10.
- [23] Kumagai S, Togashi Y, Kamada T, Sugiyama E, Nishinakamura H, Takeuchi Y, et al. The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies. *Nature Immunology*. 2020;21:1346-58.
- [24] Wing JB, Tanaka A, Sakaguchi S. Human FOXP3(+) Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer. *Immunity*. 2019;50:302-16.
- [25] Tanaka A, Sakaguchi S. Targeting Treg cells in cancer immunotherapy. *European Journal of Immunology*. 2019;49:1140-6.
- [26] Li DY, Xiong XZ. ICOS(+)Tregs: A Functional Subset of Tregs in Immune Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2020;11.
- [27] Nagase H, Takeoka T, Urakawa S, Morimoto-Okazawa A, Kawashima A, Iwahori K, et al. ICOS+ Foxp3(+) TILs in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory T cells associated with *Helicobacter pylori*. *International Journal of Cancer*. 2017;140:686-95.
- [28] Saito T, Nishikawa H, Wada H, Nagano Y, Sugiyama D, Atarashi K, et al.

Two FOXP3(+)CD4(+) T cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. *Nature Medicine*. 2016;22:679-86.

[29] Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, et al. Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4(+) T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity*. 2009;30:899-911.

[30] Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3(+) regulatory T cells in the human immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10:490-500.

[31] Bruggner RV, Bodenmiller B, Dill DL, Tibshirani RJ, Nolan GP. Automated identification of stratifying signatures in cellular subpopulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111:E2770-E7.

[32] Cramer JD, Burtneß B, Ferris RL. Immunotherapy for head and neck cancer: Recent advances and future directions. *Oral Oncology*. 2019;99:1405-16.

[33] Mehra R, Seiwert TY, Gupta S, Weiss J, Gluck I, Eder JP, et al. Efficacy and safety of pembrolizumab in recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma: pooled analyses after long-term follow-up in KEYNOTE-012. *British Journal of Cancer*. 2018;119:153-9.

[34] Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *New England Journal of Medicine*. 2016;375:1856-67.

[35] Freeman ZT, Nirschl TR, Hovelson DH, Johnston RJ, Engelhardt JJ, Selby

MJ, et al. A conserved intratumoral regulatory T cell signature Identifies 4-1BB as a pan-cancer target. *Journal of Clinical Investigation*. 2020;130:1405-16.

[36] Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells: a potential target in cancer immunotherapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2018;1417:104-15.

[37] Sainson RCA, Thotakura AK, Kosmac M, Borhis G, Parveen N, Kimber R, et al. An Antibody Targeting ICOS Increases Intratumoral Cytotoxic to Regulatory T-cell Ratio and Induces Tumor Regression. *Cancer Immunology Research*. 2020;8:1568-82.

[38] Urakawa S, Yamasaki M, Makino T, Kurokawa Y, Yamamoto K, Goto K, et al. The impact of ICOS(+)regulatory T cells and *Helicobacter pylori* infection on the prognosis of patients with gastric and colorectal cancer: potential prognostic benefit of pre-operative eradication therapy. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2021;70:443-52.

[39] Kawashima A, Kanazawa T, Goto K, Matsumoto M, Morimoto-Okazawa A, Iwahori K, et al. Immunological classification of renal cell carcinoma patients based on phenotypic analysis of immune check-point molecules. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 2018;67:113-25.

[40] Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *New England Journal of Medicine*. 2015;372:2509-20.

[41] Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al.

Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade.

Science. 2017;357:409-13.

[42] Overman MJ, McDermott R, Leach JL, Lonardi S, Lenz HJ, Morse MA, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair-deficient or microsatellite instability-high colorectal cancer (CheckMate 142): an open-label, multicentre, phase 2 study. Lancet Oncology. 2017;18:1182-91.

VI. 謝辞

本研究を行う機会を与えていただき、多大なるご指導とご鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第二教室）鶴澤 成一 教授、ならびに本研究計画の立案と実施に際し、始終ご懇篤なるご指導を賜りました医学系研究科 臨床腫瘍免疫学講座 和田 尚 特任教授に心より感謝し、厚く御礼申し上げます。多大なるご教示とご高閲を賜りました顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第二教室）松永 和秀 准教授に心より感謝申し上げます。また、本研究を行うに際し、様々なご助言を賜りました塩野義製薬株式会社 平田 道也 研究員、春名 美弥 研究員、上山 あずみ 研究員、東京医科大学 病理診断科 佐藤 永一 准教授、医学系研究科 泌尿器科 河嶋 厚成 助教、医学系研究科 臨床腫瘍免疫学講座 岩堀 幸太 特任講師に感謝申し上げます。

病理組織学的診断につきましてご指導いただきました、歯学研究科 口腔病理学教室 豊澤 悟 教授、廣瀬 勝俊 助教に心より御礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行にあたり、特別のご配慮とご協力を頂戴いたしました顎口腔病因病態制御学講座（口腔外科学第二教室）の皆様には厚く御礼申し上げます。

表 1. FACS 解析に使用した染色抗体

抗体名	蛍光色素	クローン名	購入先	
CD45RA	FITC	HI100	BioLegend	San Diego, CA, USA
CD25	PE	BC96		
4-1BB	BV421	4B4-1		
CD8	BV510	RPA-T8		
CD103	BV605	Ber-ACT8		
CD4	BV711	OKT4		
CD45	BV786	HI30		
Tim-3	APC	F38-2E2		
CD3	Alexa Fluor 700	UCHT1		
IgG1	(isotype control)	MOPC-21		
ICOS	PerCP eFluor 710	ISA-3	eBioscience	San Diego, CA, USA
IgG1	(isotype control)	P3.6.2.8.1		
OX40	PE-CF594	ACT35	BD Bioscience	Franklin Lakes, NJ, USA
PD-1	PE Cy7	EH12.1		
IgG1	(isotype control)	X40		

表 2. 多重蛍光免疫組織化学染色に使用した染色抗体

蛍光色素	抗体名		クローン	購入先	
DAPI	DAPI	Spectral DAPI solution		Akoya Biosciences	Marlborough, MA, USA
Opal 520	CD4	Mouse monoclonal (IgG1, kappa)	4B12	Invitrogen	Waltham, MA, USA
Opal 540	Foxp3	Mouse monoclonal (IgG1)	236A/E7	Abcam	Cambridge, UK
Opal 570	ICOS	Rabbit monoclonal (IgG)	SP98	Thermo Scientific	Waltham, MA, USA
Opal 620	CD8	Mouse monoclonal (IgG1, kappa)	C8/144B	DAKO	Glostrup, Denmark
Opal 650	CD25	Mouse monoclonal (IgG2b)	4C9	Vector laboratories	Burlingame, CA, USA
Opal 690	Granzyme B	Mouse monoclonal (IgG2b)	GRB7	Santa Cruz biotechnology	Dallas, TX, USA

表 3. 再発/非再発患者における臨床病理組織学的情報

	全患者 (n=31)	非再発転移患者 (n=25)	再発転移患者 (n=6)	<i>p</i>
Age, median (range)	72 (52-89)	72 (52-89)	74.5 (62-84)	0.89
Sex, n (%)				0.92
Male	16 (51.6)	13 (52.0)	3 (50.0)	
Female	15 (48.4)	12 (48.0)	3 (50.0)	
Parts, n (%)				0.52
Tongue	12 (38.7)	9 (36.0)	3 (50.0)	
Gum	15 (48.4)	13 (52.0)	2 (33.3)	
Floor of mouth	2 (6.5)	2 (8.0)	0 (0.0)	
Buccal mucosa	2 (6.5)	1 (4.0)	1 (16.7)	
SUVmax, median (range)	7.6 (0-29.3)	7.52 (0-29.3)	10.7 (4.3-19.9)	0.43
pT, n (%)				0.66
1+2	18 (58.1)	15 (60.0)	3 (50.0)	
3+4a+4b	13 (41.9)	10 (40.0)	3 (50.0)	
pN, n (%)				0.21
0	22 (71.0)	19 (76.0)	3 (50.0)	
1+2+3	9 (29.0)	6 (24.0)	3 (50.0)	
pStage, n (%)				0.93
I+II	15 (48.4)	12 (48.0)	3 (50.0)	
III+IVA+IVB	16 (51.6)	13 (52.0)	3 (50.0)	
Tumor grade, n (%)				0.08
1	15 (48.4)	14 (56.0)	1 (16.7)	
2+3	16 (51.6)	11 (44.0)	5 (83.3)	
INF, n (%)				0.21
a+b	22 (71.0)	19 (76.0)	3 (50.0)	
c	9 (29.0)	6 (24.0)	3 (50.0)	

SUVmax; the maximum standardized uptake value, pT; pathological T grade, pN; pathological N grade, pStage; pathological Stage, tumor grade by the WHO classification, INF; infiltrative growth pattern

表 4. CD4⁺ CD25^{high} TIL における ICOS⁺ の発現割合と再発

	% ICOS ⁺ < median	% ICOS ⁺ ≥ median	<i>p</i>
Patients with recurrence	1	5	
Patients without recurrence	14	11	
			0.0834

% ICOS⁺ in CD4⁺ CD25^{high} : mean ± SD; 78.0 ± 20.1, median; 82.1

表 5. Heat map 解析により定義した Cluster A/B 患者における臨床病理組織学的情報

	全患者 (n=31)	Cluster A (n=11)	Cluster B (n=20)	<i>p</i>
Age, median (range)	72 (52-89)	72 (52-87)	73 (53-89)	0.66
Sex, n (%)				0.21
Male	16 (51.6)	4 (36.4)	12 (60.0)	
Female	15 (48.4)	7 (63.6)	8 (40.0)	
Parts, n (%)				0.68
Tongue	12 (38.7)	5 (45.5)	7 (35.0)	
Gum	15 (48.4)	5 (45.5)	10 (50.0)	
Floor of mouth	2 (6.5)	1 (9.1)	1 (5.0)	
Buccal mucosa	2 (6.5)	0 (0.0)	2 (10.0)	
SUVmax, median (range)	7.61 (0-29.29)	4.37 (0-29.29)	9.8 (4.1-24.6)	0.0364
pT, n (%)				0.77
1+2	18 (58.1)	6 (54.5)	12 (60.0)	
3+4a+4b	13 (41.9)	5 (45.5)	8 (40.0)	
pN, n (%)				0.07
0	22 (71.0)	10 (90.9)	12 (60.0)	
1+2+3	9 (29.0)	1 (9.1)	8 (40.0)	
pStage, n (%)				0.61
I+II	15 (48.4)	6 (54.5)	9 (45.0)	
III+IVA+IVB	16 (51.6)	5 (45.5)	11 (55.0)	
Grade, n (%)				0.21
1	15 (48.4)	7 (63.6)	8 (40.0)	
2+3	16 (51.6)	4 (36.4)	12 (60.0)	
INF, n (%)				0.0083
a+b	22 (71.0)	11 (100.0)	11 (55.0)	
c	9 (29.0)	0 (0.0)	9 (45.0)	
1 year DFS rate (%)		90	75	0.255

SUVmax; the maximum standardized uptake value, pT; pathological T grade, pN; pathological N grade, pStage; pathological Stage, tumor grade by the WHO classification, INF; infiltrative growth pattern, DFS; disease free survival

表 6. ICOS の発現による臨床病理組織学情報

	All (n=31)	≥ 95% ICOS ⁺ (n=5)	< 95% ICOS ⁺ (n=26)	<i>p</i>
Age, median (range)	72 (52-89)	81 (70-85)	72 (52-89)	0.088
Sex, n (%)				0.57
Male	16 (51.6)	2 (40.0)	14 (53.8)	
Female	15 (48.4)	3 (60.0)	12 (46.2)	
Parts, n (%)				0.43
Tongue	12 (38.7)	1 (20.0)	11 (42.3)	
Gum	15 (48.4)	3 (60.0)	12 (46.2)	
Floor of mouth	2 (6.5)	0 (0)	2 (7.7)	
Buccal mucosa	2 (6.5)	1 (20.0)	1 (3.8)	
SUVmax, median (range)	7.61 (0-29.29)	6.32 (5.52-19.9)	8.08 (0-29.29)	0.65
pT, n (%)				0.37
1+2	18 (58.1)	2 (40.0)	16 (61.5)	
3+4a+4b	13 (41.9)	3 (60.0)	10 (38.5)	
pN, n (%)				0.56
0	22 (71.0)	3 (60.0)	19 (73.1)	
1+2+3	9 (29.0)	2 (40.0)	7 (26.9)	
pStage, n (%)				0.68
I+II	15 (48.4)	2 (40.0)	13 (50.0)	
III+IVA+IVB	16 (51.6)	3 (60.0)	13 (50.0)	
Grade, n (%)				0.68
1	15 (48.4)	2 (40.0)	13 (50.0)	
2+3	16 (51.6)	3 (60.0)	13 (50.0)	
INF, n (%)				0.096
a+b	22 (71.0)	2 (40.0)	20 (76.9)	
c	9 (29.0)	3 (60.0)	6 (23.1)	

SUVmax; the maximum standardized uptake value, pT; pathological T grade, pN; pathological N grade, pStage; pathological Stage, tumor grade by the WHO classification, INF; infiltrative growth pattern

表 7. OSCC の無病生存期間に対する予後予測因子としての単変量および多変量解析

	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	HR (95% CI)	<i>p</i>	HR (95% CI)	<i>p</i>
Age	1.29 (0.24-7.05)	0.77	-	-
≥72 vs <72 years				
Sex	1.01 (0.20-5.00)	0.99	-	-
male vs female				
pT	1.45 (0.29-7.20)	0.65	0.25 (0.03-2.41)	0.23
T3-4 vs T1-2				
pN	2.83 (0.57-14.12)	0.20	1.84 (0.15-22.76)	0.63
N1-3 vs N0				
SUVmax	3.32 (0.61-18.19)	0.17	11.51 (0.77-171.78)	0.08
≥9.7 vs < 9.7				
INF	2.83 (0.55-14.12)	0.20	0.50 (0.04-6.27)	0.59
c vs a-b				
% ICOS ⁺ in CD4 ⁺ CD25 ^{high}	5.77 (1.16-28.77)	0.033	14.21 (1.54-131.43)	0.019
≥ 95 vs < 95				

pT; pathological T grade, pN; pathological N grade, SUVmax; the maximum standardized uptake value,

INF; infiltrative growth pattern

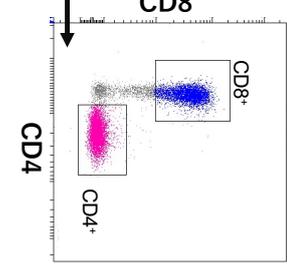
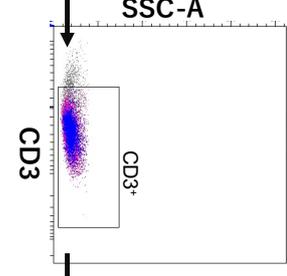
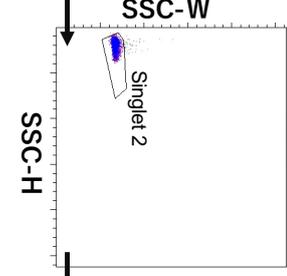
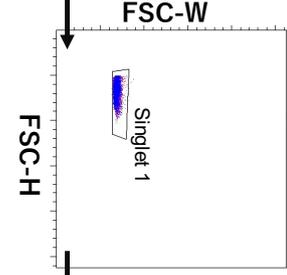
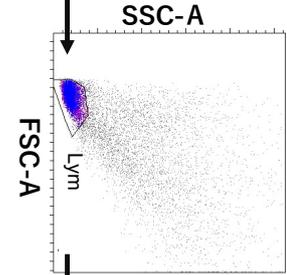
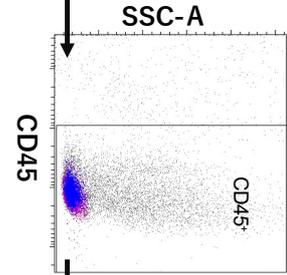
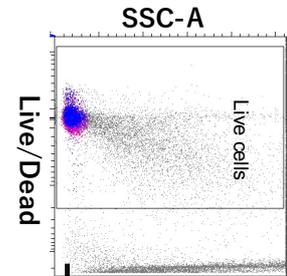
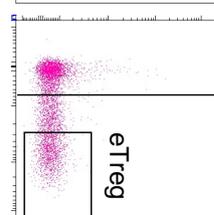
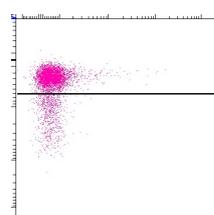
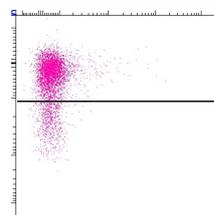
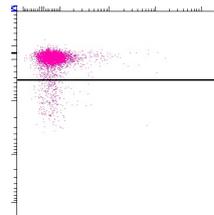
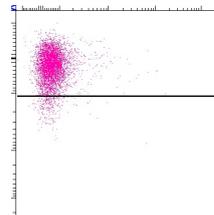
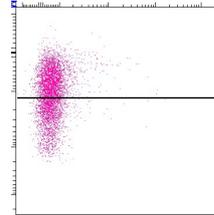
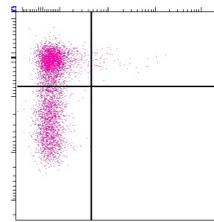
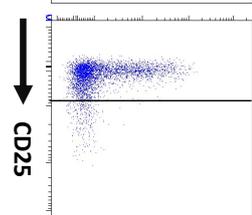
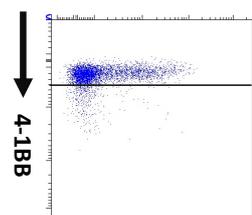
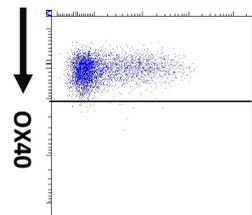
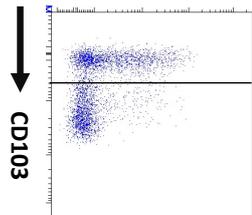
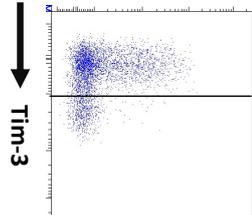
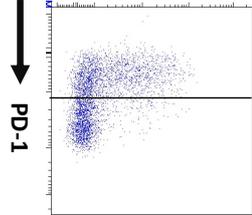
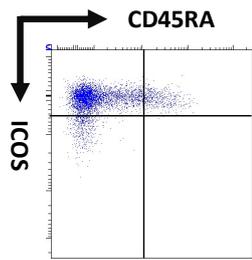
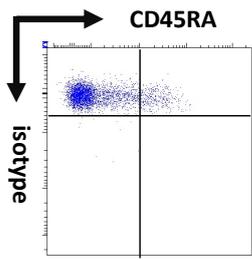
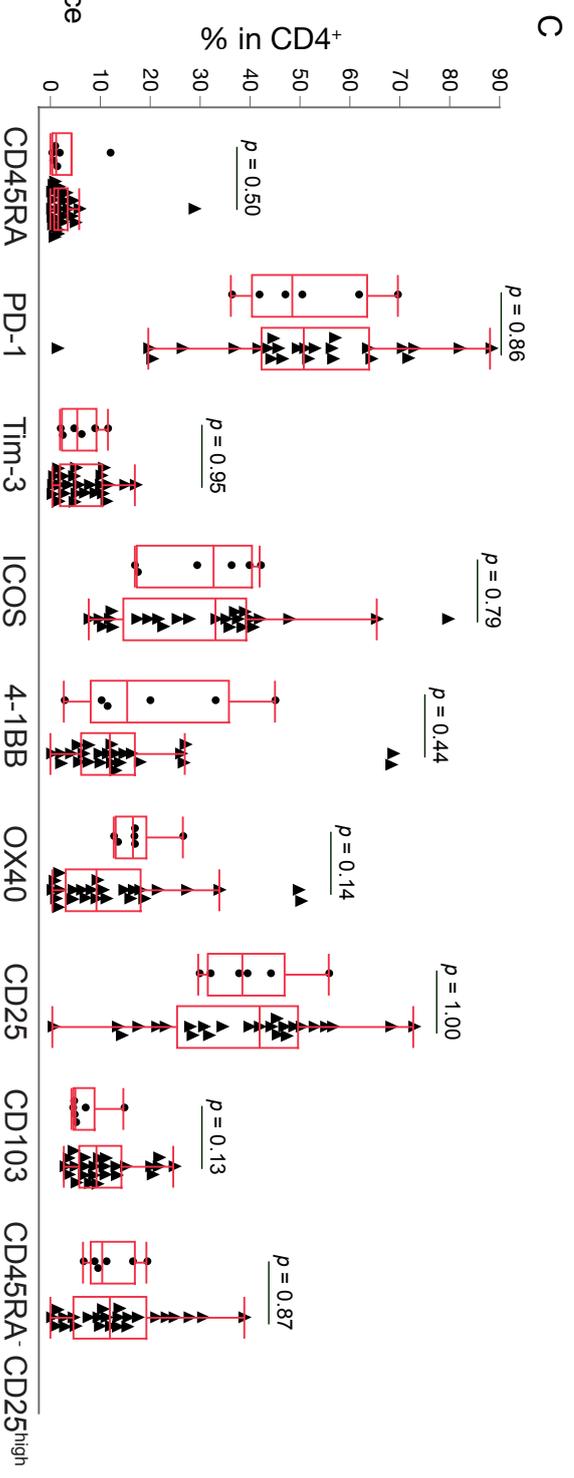
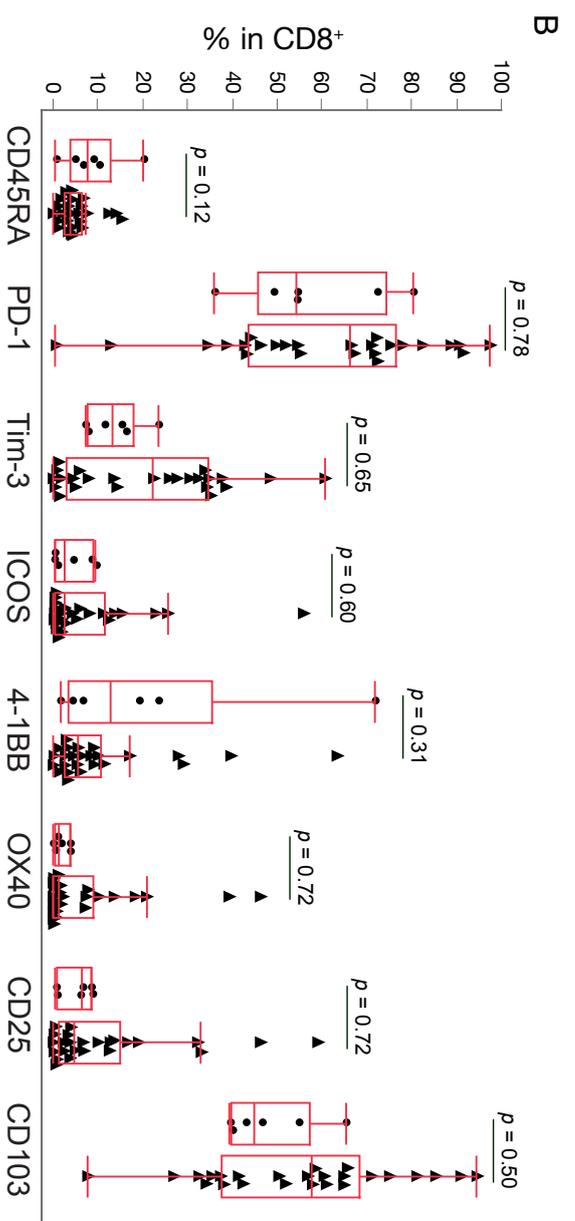
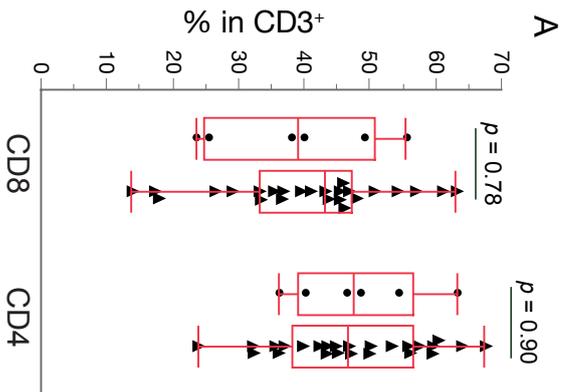


図 1. フローサイトメトリーにおける腫瘍浸潤 T 細胞の解析手順

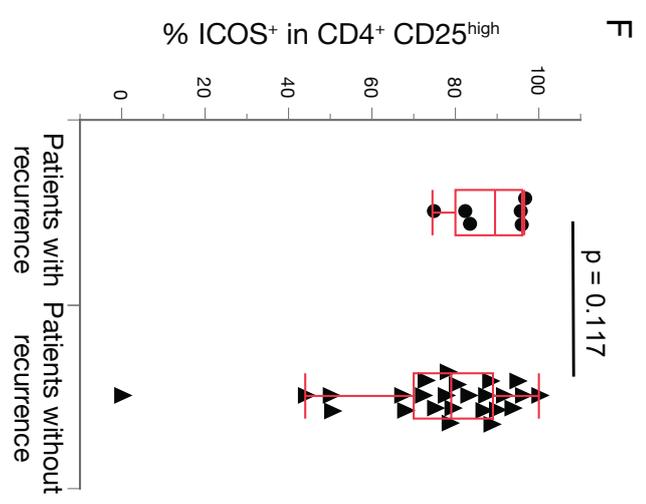
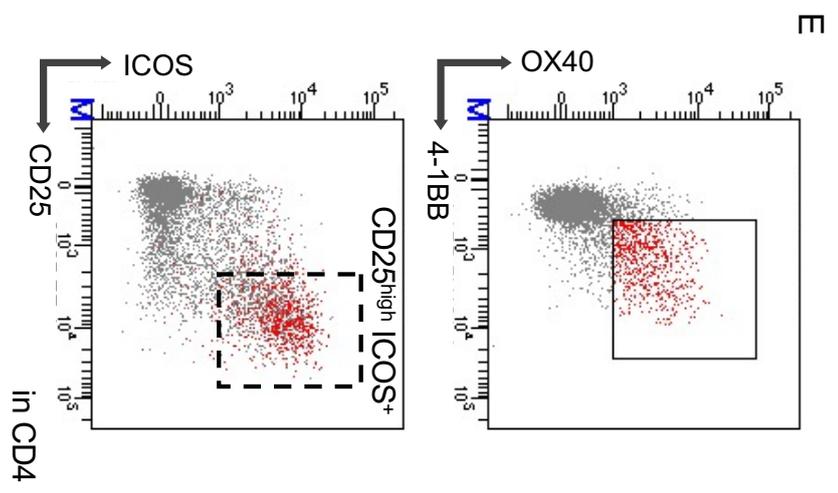
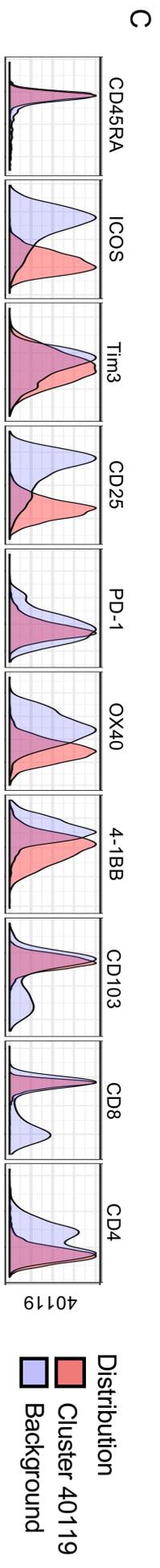
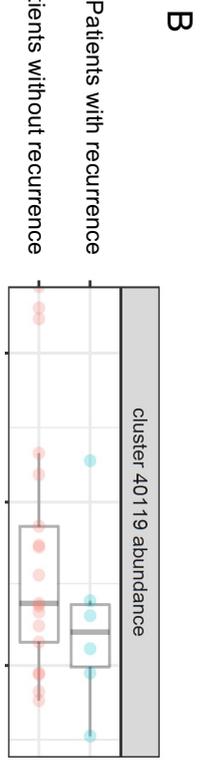
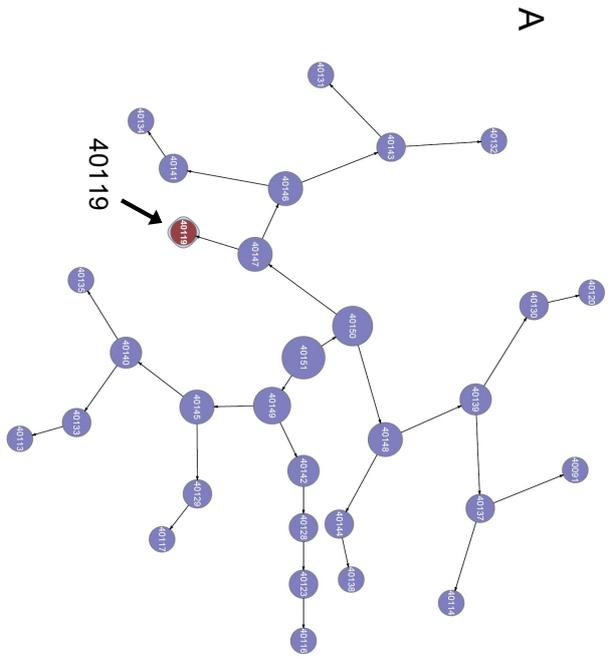
精製したサンプルは、生細胞、単細胞、CD45⁺ 細胞（白血球共通抗原）、リンパ球、CD3⁺ 細胞(T 細胞)の集団にゲーティングし、さらに isotype コントロールと比較しながら、CD4⁺/CD8⁺ 細胞における CD45RA⁺, PD-1⁺, Tim-3⁺, ICOS⁺, 4-1BB⁺, OX40⁺, CD25⁺, CD103⁺ の各発現割合を測定した。



● Patients with recurrence
 ▲ Patients without recurrence

図 2. 再発転移と腫瘍浸潤 T 細胞における表面抗原の発現との関連性

CD3⁺ T 細胞における CD4, CD8 (A)、ならびに CD8⁺ T 細胞 (B)、CD4⁺ T 細胞 (C) における CD45RA, PD-1, Tim-3, ICOS, 4-1BB, OX40, CD25, CD103, CD45RA⁻CD25^{high} の発現割合を、再発転移の有無で比較した。いずれの項目においても、再発転移症例と非再発転移症例の間で有意な差は認めなかった。



D

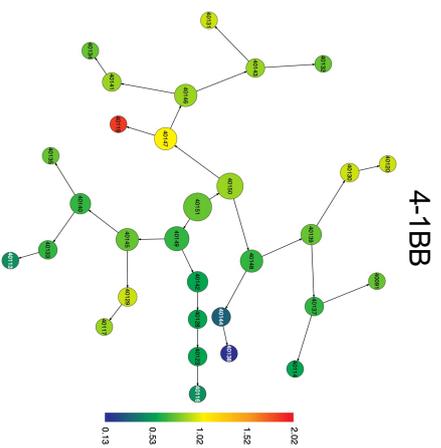
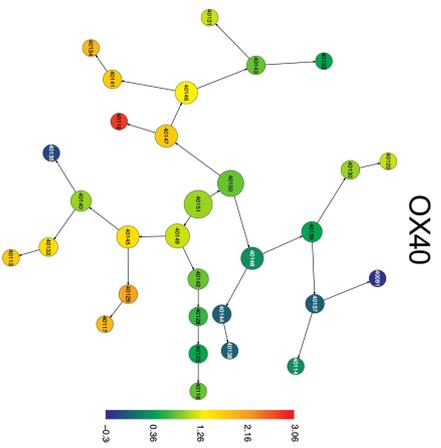
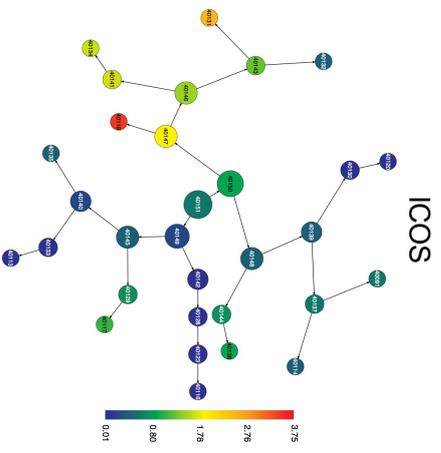
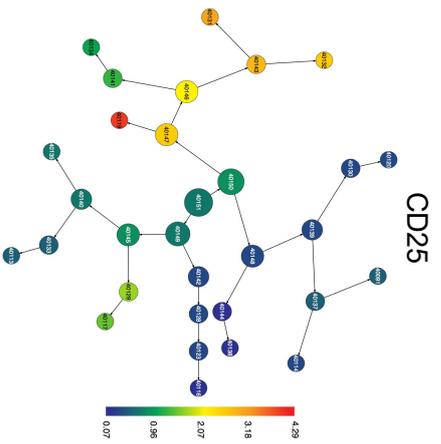
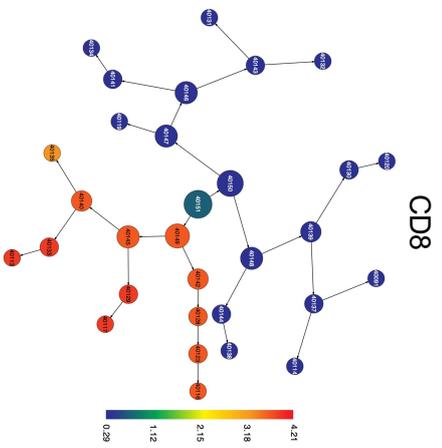
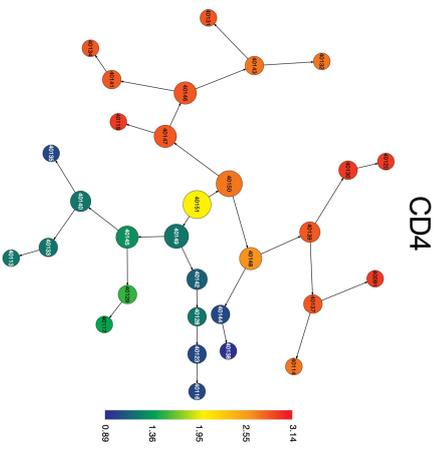
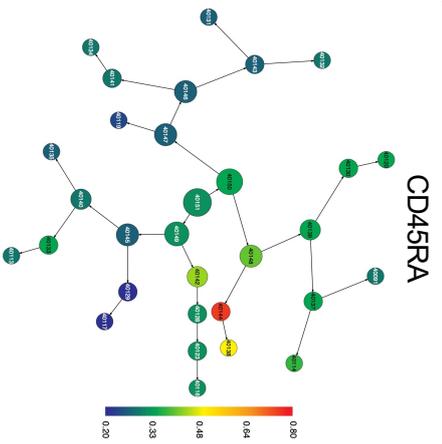


図 3. CITRUS アルゴリズムによるプロファイル解析の結果同定された、再発転移症例に特異的な細胞分画

(A) CITRUS 解析により再発転移症例に特異的な分画として Cluster 40119 が同定された。(B) Cluster 40119 に含まれる T 細胞の発現割合は、再発転移症例で有意に高値であった。(C) 全 TIL における発現パターン (Background) と比較した、再発転移症例における Cluster 40119 の T 細胞における発現パターン。(D) 解析に用いた CITRUS tree は、CD4, CD8, CD45RA, CD25, ICOS, OX40, 4-1BB のチャンネルごとに色別された。カラースケールバーは、各マーカー発現強度を示す。(E) OX40 ならびに 4-1BB を共発現する CD4⁺ TIL のほとんどは、CD4⁺ CD25^{high} ICOS⁺ TIL の細胞集団の一部に含まれていた。代表的な 1 症例を示す。(F) CD4⁺ CD25^{high} TIL における % ICOS⁺ を、再発転移症例 (平均 ± SD; 87.9 ± 9.2) と非再発転移症例 (75.7 ± 21.4) で比較した ($p = 0.117$)。

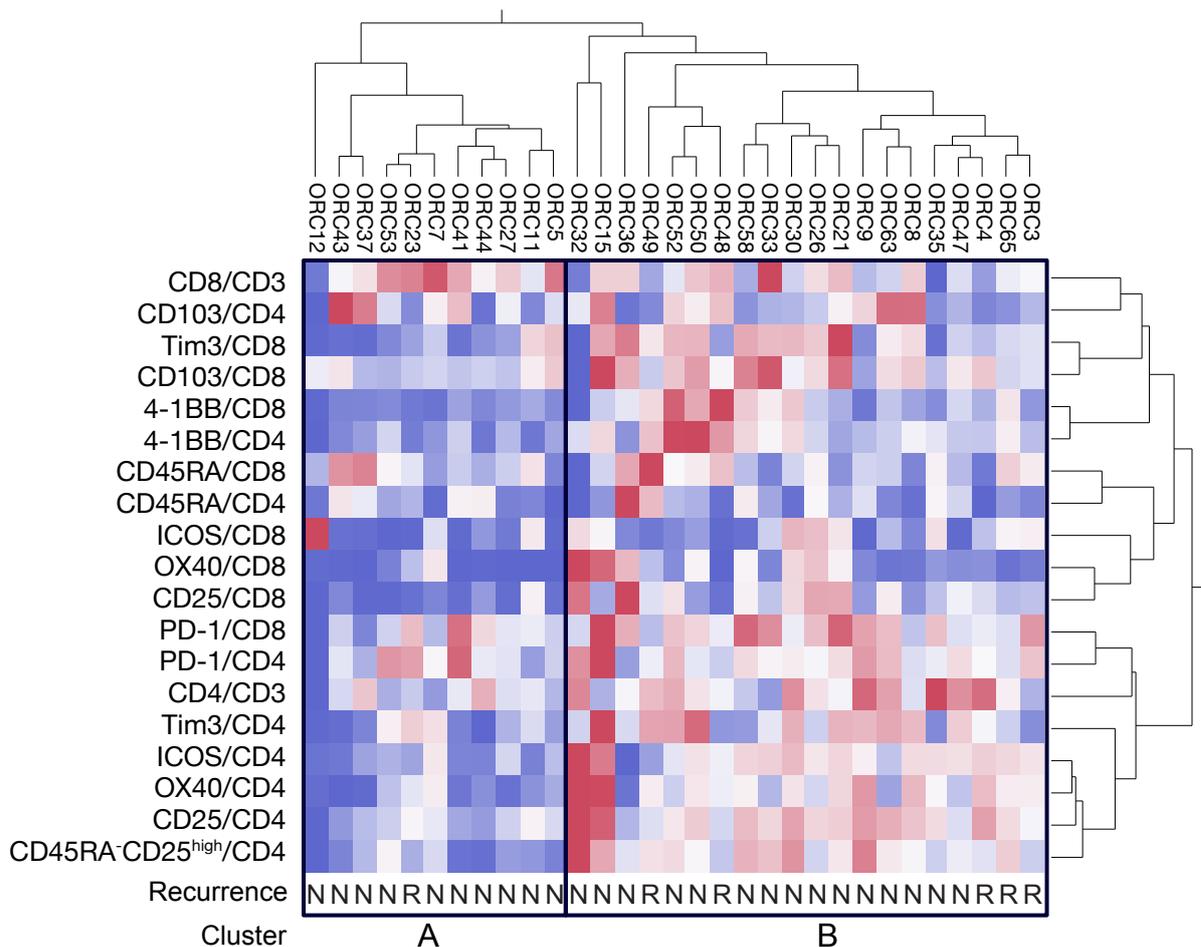
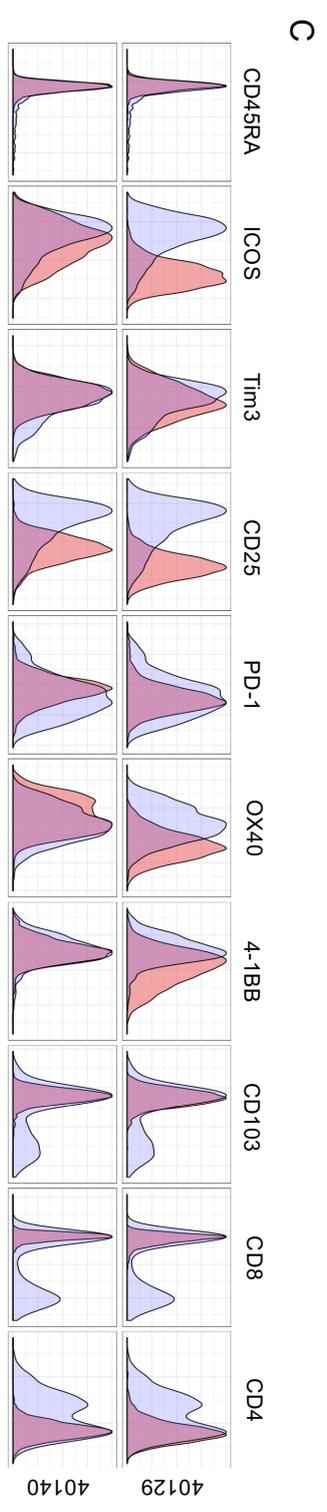
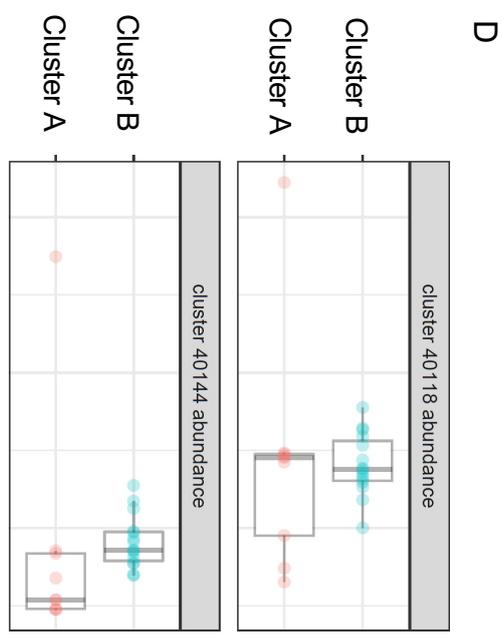
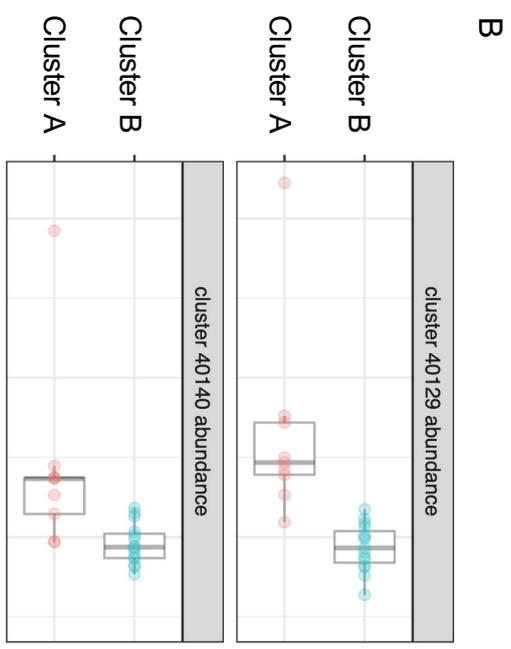
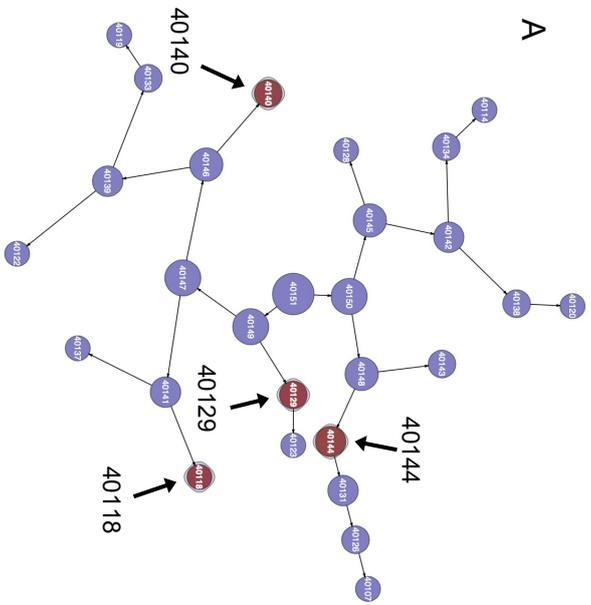


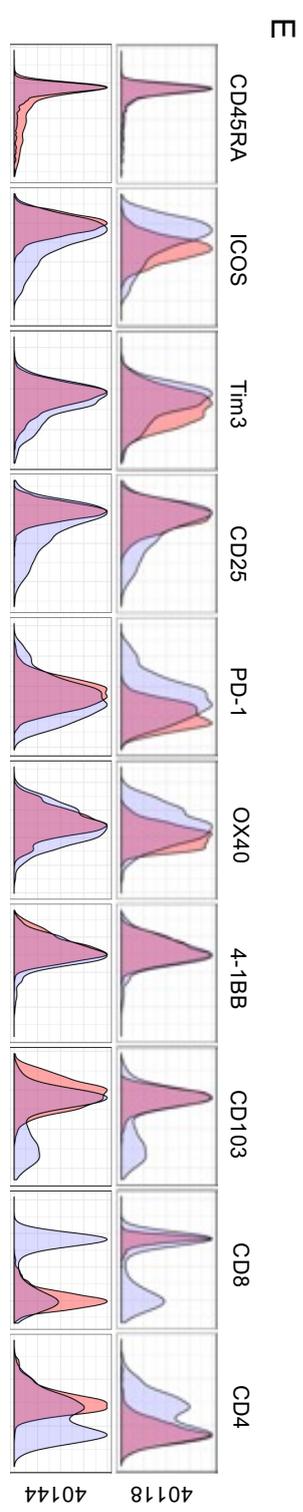
図 4. 腫瘍浸潤 T 細胞の免疫プロファイリングと、Heat map を用いたクラスタリング解析

TIL の活性化状態は、31 症例（識別番号として ORC No. を記載）と 19 種の表面マーカーの発現頻度を用いた Heat map 解析により行った。Ward 法による階層型クラスタリングアルゴリズムにより、A と B の 2 つのクラスターに分類された。Heat map 図の下には再発転移を示す。

R: 再発転移症例、N: 非再発転移症例。



Distribution
■ Cluster 40129, 40140
■ Background



Distribution
■ Cluster 40118, 40144
■ Background

F

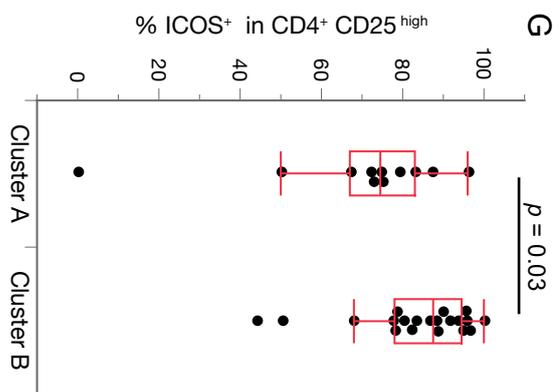
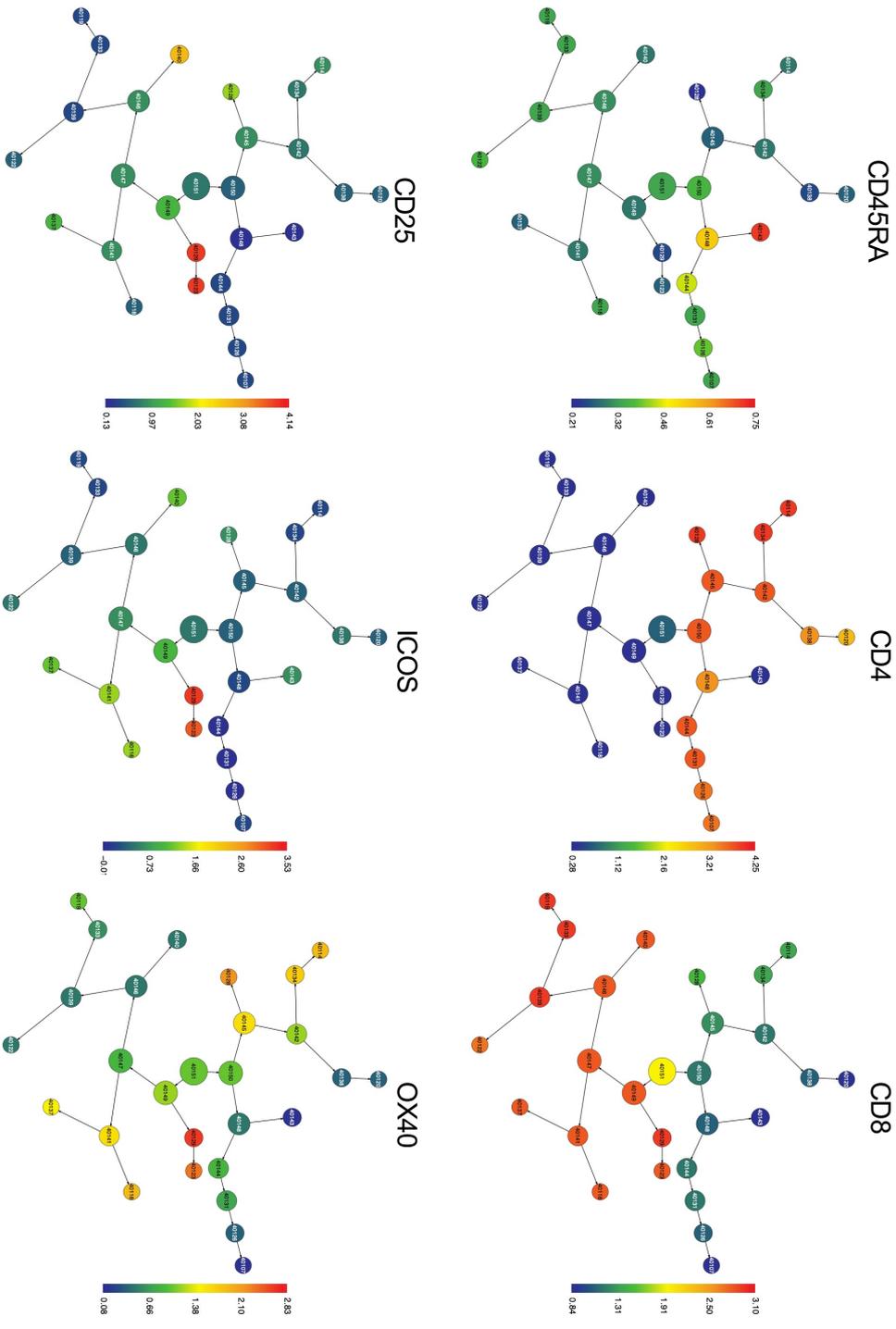
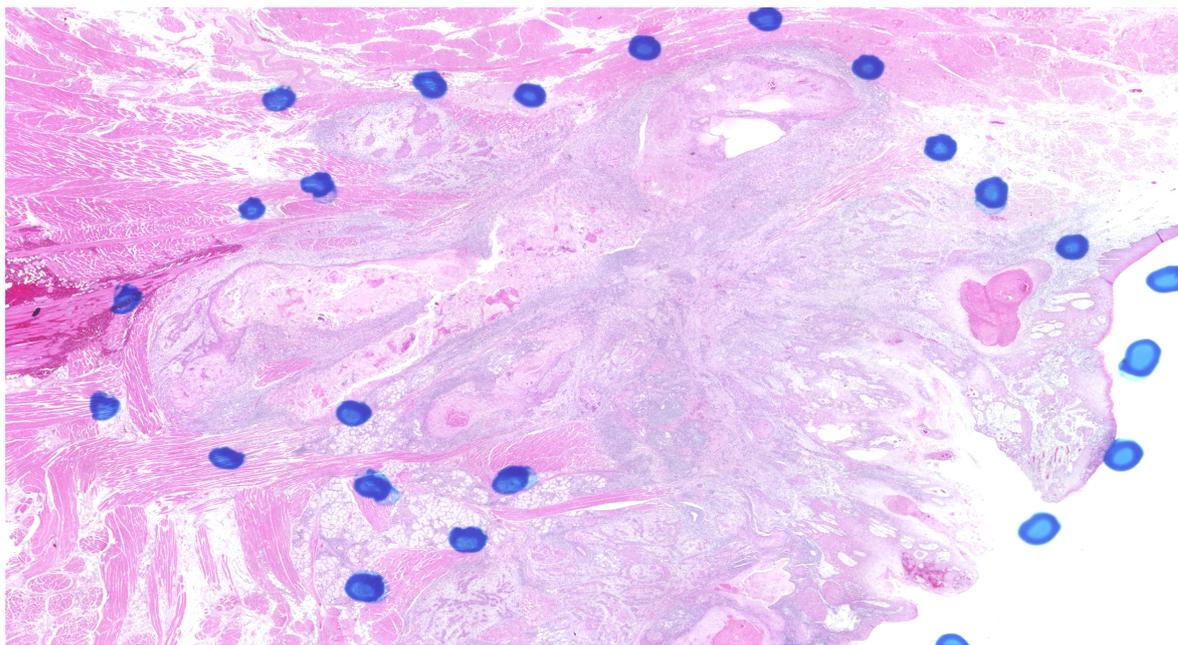
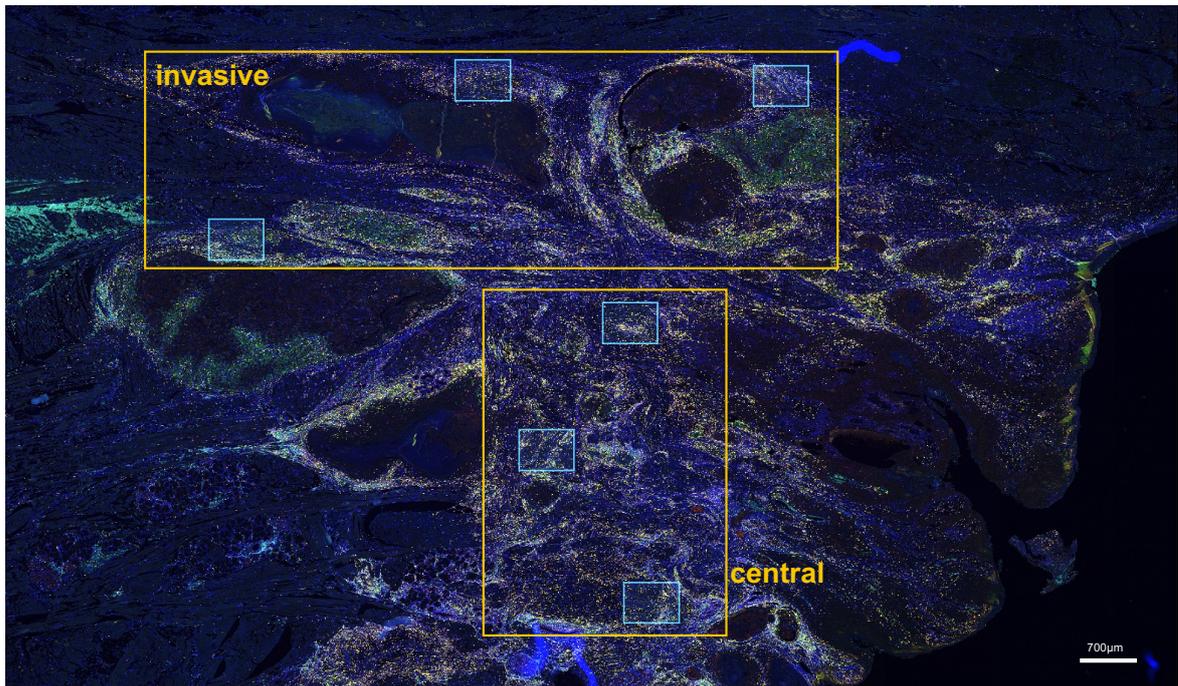


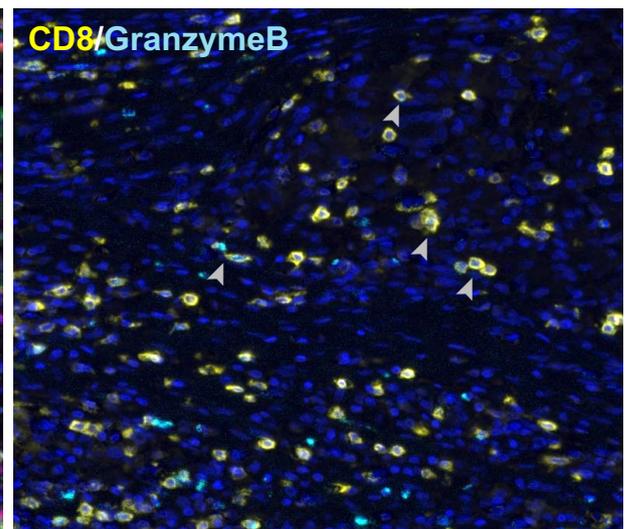
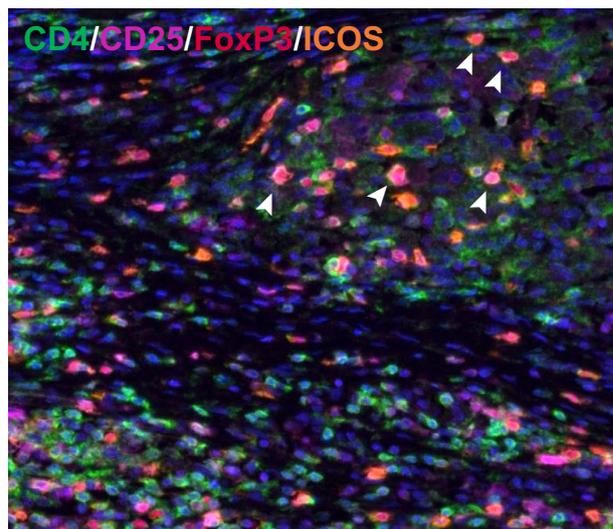
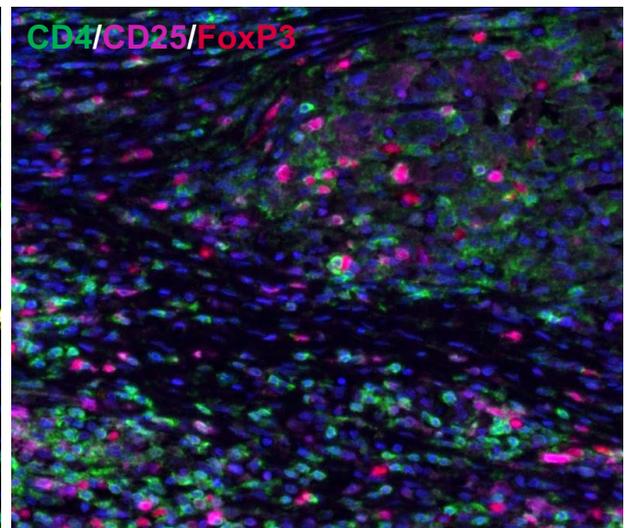
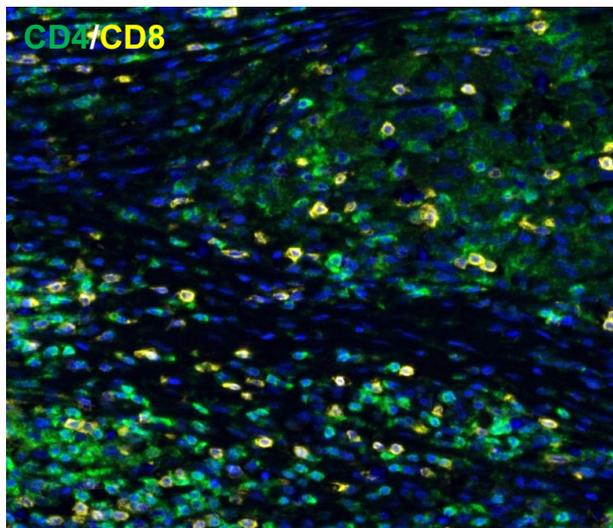
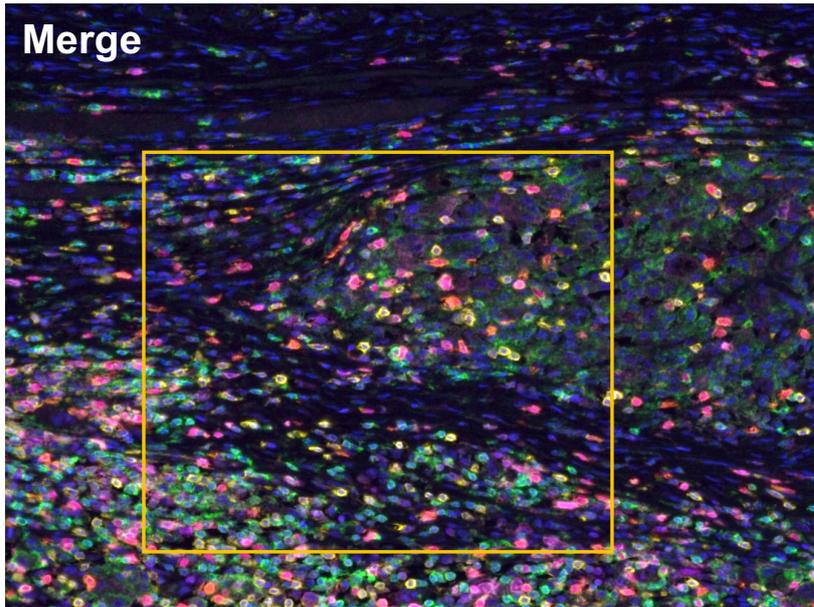
図 5. CITRUS アルゴリズムによるプロファイル解析の結果同定された、Cluster B に特異的な細胞分画

(A) CITRUS 解析により Cluster B に特異的な分画として Cluster 40129, 40140, 40118, 40144 が同定された。(B) Cluster 40129 および 40140 に含まれる T 細胞の発現割合は、Cluster A に比べ Cluster B で有意に高値であった。(C) 全 TIL における発現パターン (Background) と比較した、Cluster B における Cluster 40129 および 40140 の T 細胞における発現パターン。(D) Cluster 40118 および 40144 に含まれる T 細胞の発現割合は、Cluster A に比べ Cluster B で有意に低値であった。(E) 全 TIL における発現パターン (Background) と比較した、Cluster B における Cluster 40118 および 40144 の T 細胞における発現パターン。(F) 解析に用いた CITRUS tree は、CD4, CD8, CD45RA, CD25, ICOS, OX40, 4-1BB のチャンネルごとに色別された。カラースケールバーは、各マーカー発現強度を示す。(G) CD4⁺ CD25^{high} TIL における % ICOS⁺ を、Cluster A (平均±SD; 68.8±25.7) と Cluster B (83.1±14.7) で比較したところ、Cluster B で有意に高値であった ($p = 0.03$)。

A



B



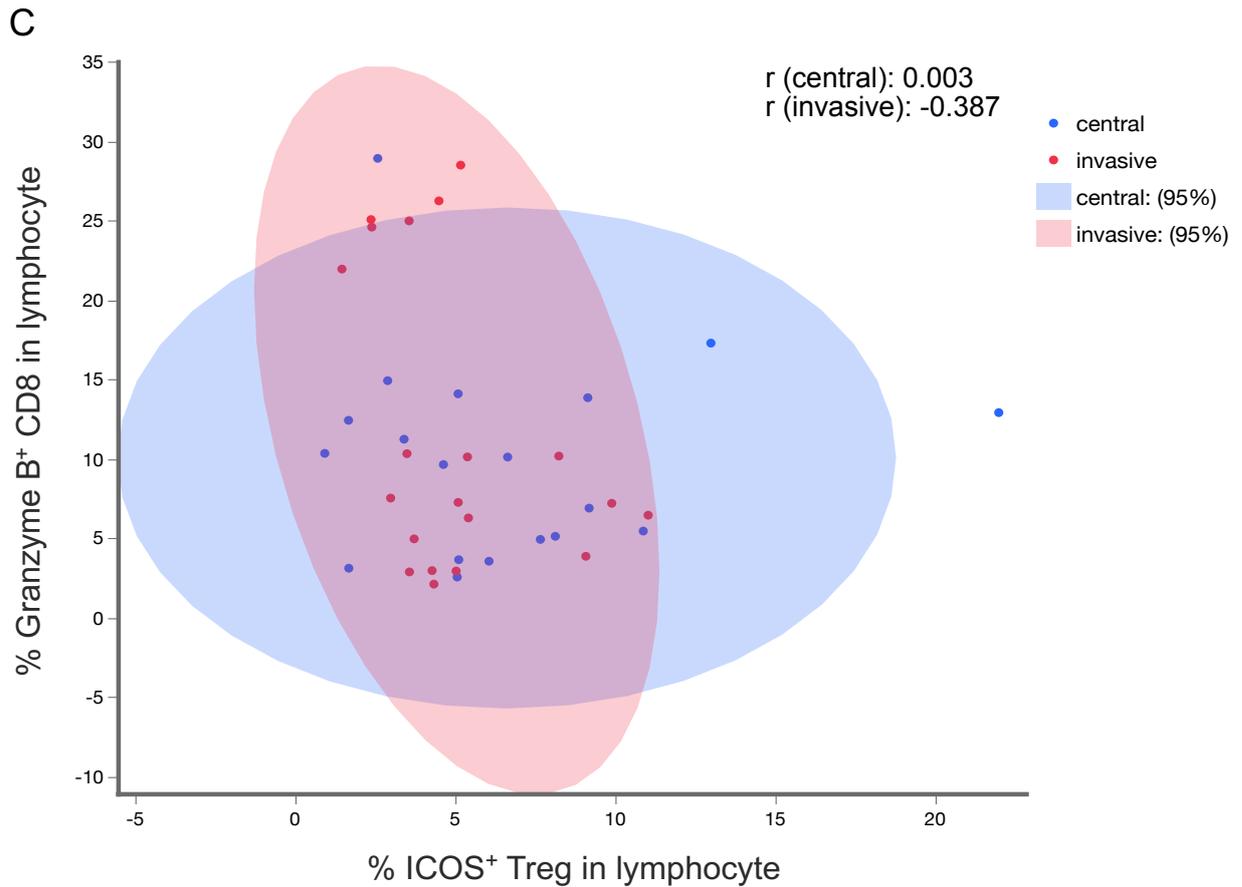


図 6. 多重蛍光免疫染色による ICOS⁺ Treg と細胞傷害性 T 細胞の発現解析

(A) 多重蛍光免疫染色と同症例の HE 染色像の一例。HE 染色像と比較しながら、腫瘍浸潤先端部ならびに腫瘍中心部からランダムに各 3 視野選択した。HE 染色像の青線は腫瘍進展範囲を示す。(B) 腫瘍浸潤先端部で撮影した画像の一例。CD4, CD8, CD25, FoxP3, ICOS, Granzyme B, DAPI の染色像を示す。Merge 像の上部は浸潤先端方向、下部は腫瘍中心方向を示し、黄枠部分をさらに強拡大して各フェノタイプごとに示す。白矢頭は ICOS⁺ Treg、灰矢頭は細胞傷害性 T 細胞を示す。(C) 腫瘍浸潤先端部 (赤) と腫瘍中心部 (青) における ICOS⁺ Treg と細胞傷害性 T 細胞の発現の相関。95% 楕円図を示す。腫瘍中心部では相関を認めないのに対し、腫瘍浸潤先端部では ICOS⁺ Treg と細胞傷害性 T 細胞の発現に弱い逆相関を認めた ($r = -0.387$)。

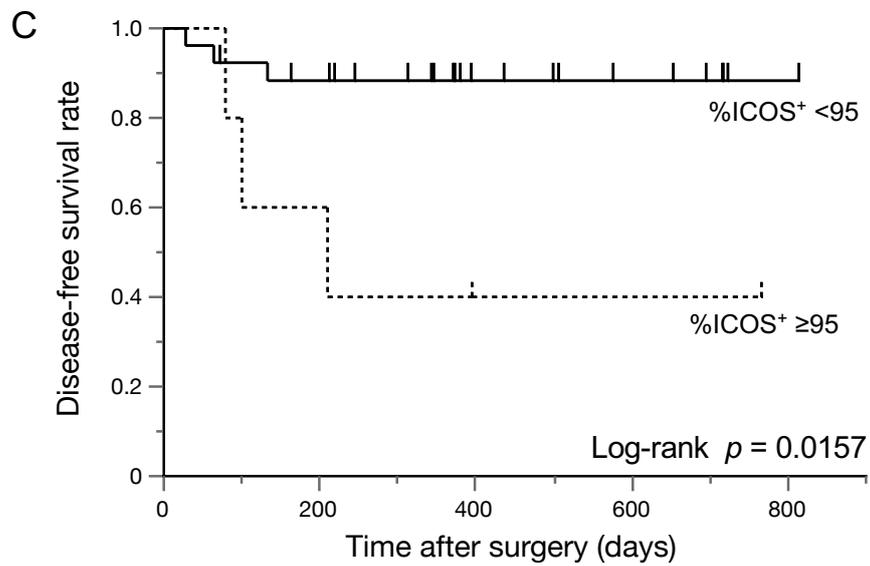
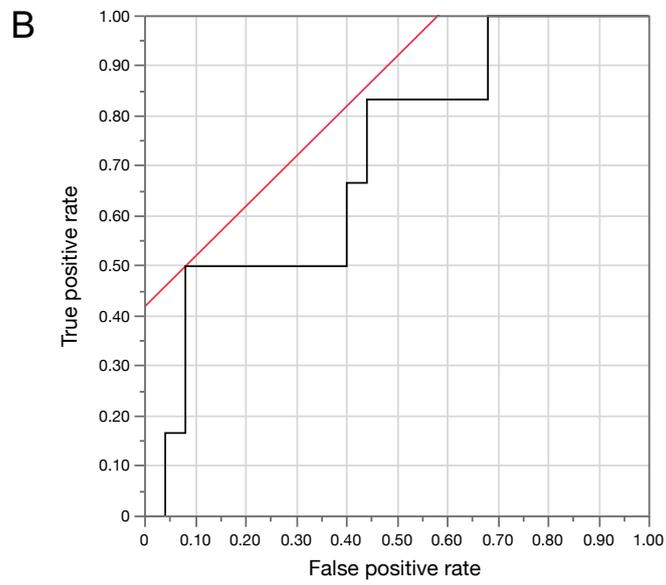
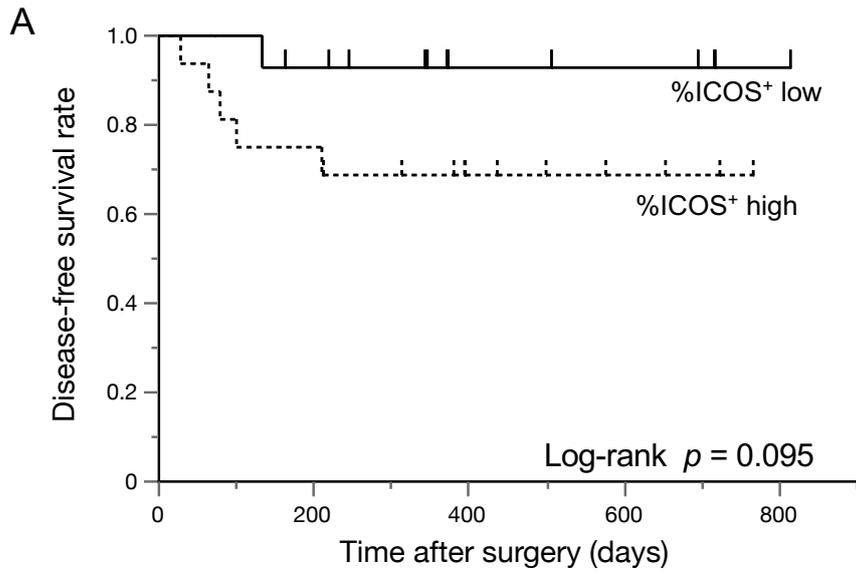


図 7. CD4⁺ CD25^{high} TIL における % ICOS⁺ と無病生存率の関係

CD4⁺ CD25^{high} TIL 中の ICOS⁺ の発現が高値の患者と低値の患者の 2 群間で、無病生存率を元に Kaplan-Meire 曲線を描き比較した。(A) CD4⁺ CD25^{high} TIL における % ICOS⁺ の中央値(82%) で患者を 2 群に分類し、DFS を比較したところ、% ICOS⁺ の高い群で予後不良となる傾向を認めた ($p = 0.095$)。 (B) DFS の最適なカットオフ値を算出するために ROC 解析を行い、95% ICOS⁺ を同定した (AUC = 0.713, 感度 = 50%, 特異度 = 92%)。 (C) CD4⁺ CD25^{high} TIL における ICOS⁺ の発現割合が 95% 以上の患者と 95% 未満の患者で 2 群に分類し DFS を比較したところ、% ICOS⁺ \geq 95% の群で有意に予後不良であった ($p = 0.0157$)。