



Title	The impact of CCR8+ regulatory T cells on cytotoxic T cell function in human lung cancer
Author(s)	春名, 美弥
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/91786
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	春名 美弥
論文題名 Title	The impact of CCR8+ regulatory T cells on cytotoxic T cell function in human lung cancer (ヒト肺癌浸潤CCR8 ⁺ Tregの細胞傷害性T細胞に対する影響)
論文内容の要旨 〔目 的(Purpose)〕 肺癌は、世界的にも新規罹患者数が多い癌種であり、特に癌関連死亡者数では上位を占める。近年、PD-1/PD-L1抗体などの免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) の登場により肺癌患者の生存率は改善されたとはいえ、奏効症例は限られている。ICI不応の原因の1つとして、癌局所における免疫抑制性細胞の存在、特に制御性T細胞 (Treg) の関与が考えられる。FOXP3⁺CD4⁺T細胞で表されるTregは過剰な免疫応答を抑制し、生体の恒常性維持に重要な働きを担っている。一方で、肺癌患者においてはCD8⁺T細胞などの腫瘍免疫に関わるEffector細胞を抑制し、腫瘍を増悪させていると考えられている。我々は、様々な癌腫において腫瘍組織内Tregに選択的に発現するケモカイン受容体CCR8を同定した。マウス腫瘍モデルにおいて、CCR8⁺細胞除去により著明な腫瘍退縮を観察したことよりCCR8⁺Tregは癌免疫療法の新規標的としての可能性に着目している。一方で、CCR8⁺Tregの作用機序、特にCD8⁺T細胞に対する影響に関する報告は乏しい。本研究ではヒト肺癌において、腫瘍組織内浸潤CCR8⁺TregのプロファイルおよびCD8⁺T細胞に対する抑制機能を解析することで、CCR8⁺Tregを標的とした抗CCR8抗体の臨床応用の可能性を検討することを目的とした。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 (1) 各種細胞におけるCCR8発現様式を探るため、肺癌患者より採取した手術摘出組織及び末梢血を用い、腫瘍部・腫瘍近傍正常部の組織浸潤細胞および末梢血単核球を精製し、CD4、CD8、FOXP3、CD19、CD16、CD14、CD15、CD11c陽性細胞分画におけるCCR8発現をフローサイトメーター (FACS) にて解析した。その結果、CCR8は腫瘍組織内Tregに選択的に発現していることが明らかとなった。また、腫瘍組織内浸潤CCR8⁺Treg頻度と臨床情報を比較したところ、CCR8⁺Treg頻度は臨床ステージとは関連が見られなかったのに対して、CCR8⁺Treg頻度の高い患者では低い患者に比して有意に予後が悪かった (P=0.011)。 (2) CCR8⁺Tregの特徴を探るため、免疫関連分子発現プロファイルをFACS (n=7-22)、および次世代シーケンサーを用いて (n=3) 解析した。CCR8⁺TregはCCR8⁺Tregと比較して、Treg関連分子、免疫抑制関連分子の発現が強く、さらにはケモカイン関連遺伝子群発現が強いことが示された。 (3) 腫瘍組織内CCR8⁺TregのCD8⁺T細胞活性化への影響を観察するため、公開されている肺腺癌 (N=510)、肺扁平上皮癌 (N=484) のTCGAデータベースを用い、CD8⁺T細胞のNaïve、Effector、Exhaustを表すSignature遺伝子群によるエンリッチメント解析を実施した。CCR8高発現肺癌群では低発現群に比してEffector CD8⁺T細胞関連遺伝子スコアが有意に低く (P<0.001)、CCR8高発現癌において腫瘍免疫が抑制されていることが示唆された。 (4) 腫瘍組織内におけるCCR8⁺TregのCD8⁺T細胞機能に対する影響を <i>ex vivo</i> 培養により検討した。肺癌組織より精製した免疫細胞からCCR8⁺細胞を除去し、4日間培養した後にCD8⁺T細胞における機能分子の発現変化をFACSで測定したところ、CCR8⁺細胞除去によりIFN-γ (P<0.001)、細胞傷害因子Granzyme B (P<0.05) の発現が有意に増強された。一方、対照として用いたCCR4⁺細胞除去細胞群ではこのような増強作用は確認されなかった。 (5) CCR8⁺TregのCD8⁺T細胞機能に対する影響を <i>in vitro</i> 解析した。この解析では、Treg Expander Beadsによって健康人naïve Tregより誘導したCCR8⁺Tregを用いた。健康人CD8⁺T細胞を誘導CCR8⁺Tregと4日間共培養し、CD8⁺T細胞の機能分子の発現変化を測定したところ、CCR8⁺Tregと共培養した場合に比してCD8⁺T細胞のGranzyme B、Perforinの発現が減弱していた。また、この培養後CD8⁺T細胞の抗原非特異的細胞傷害活性の測定のため、CD3scFv発現BALL細胞を標的とした。12時間共培養後の標的細胞死率を測定すると、CCR8⁺Treg共培養CD8⁺T細胞では細胞傷害能の著大な低下が観察された (P<0.05)。Mart-1特異的CTL培養中への誘導CCR8⁺Treg添加では、Mart-1発現標的細胞への抗原特異的細胞傷害能は著明に減弱した (P<0.01)。 (6) H-2Kb導入LLC細胞を用いた肺癌マウスモデルにおける抗CCR8抗体投与による抗腫瘍効果を観察した。LLC細胞移植後3、8日目に抗CCR8抗体を投与したところ、抗体投与群は対照群と比較して腫瘍増殖は有意に抑制され (P<0.001)、10匹中5匹のマウスにおいて腫瘍が完全退縮を示した。腫瘍内Tregは著明に減少していた。 まとめると、CCR8はヒト腫瘍内Tregに選択的に発現していた。腫瘍組織内CCR8⁺Tregは、免疫抑制性分子・ケモカイン分子を高発現し活性化状態にあった。CCR8⁺Treg高浸潤肺癌は予後不良であり、Effector CD8⁺T細胞遺伝子スコアが低かった。CCR8⁺細胞除去によりCD8⁺T細胞のIFN-γ・Granzyme B発現は増強し、CCR8⁺Treg添加によりCD8⁺T細胞のIFN-γ・Perforin発現と細胞傷害活性は抑制された。抗CCR8抗体はマウス移植腫瘍の拒絶が観察された。 〔総 括(Conclusion)〕 肺癌において、腫瘍組織内浸潤CCR8⁺Tregは非常に強い免疫抑制能を持つTregであり、腫瘍免疫のEffector細胞であるCD8⁺T細胞の抑制を介しての腫瘍の増悪促進が示唆された。今回CCR8⁺Tregを除去することで抗腫瘍効果の増強が様々な方法により観察されたことは、肺癌患者に対するCCR8を標的とした新規癌免疫療法への抗体医薬の臨床応用の可能性を示していると考えられた。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		春名美弥	
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	大阪大学特任教授	和田 尚 署名
	副 査	大阪大学教授	土岐 祐一郎 署名
	副 査	大阪大学教授	山本 浩文 署名

論文審査の結果の要旨

制御性T細胞（Treg）は腫瘍免疫に関わるEffector細胞を抑制し、腫瘍を増悪させていると考えられている。我々は、様々な癌腫において腫瘍組織内Tregに選択的に発現するケモカイン受容体CCR8を同定した。

本研究では、CCR8⁺Tregは肺癌腫瘍組織内において強い免疫抑制能を持ち、CD8⁺T細胞の機能抑制を介して腫瘍の増悪促進に原因となっている可能性を示した。そして、CCR8⁺Treg除去による抗腫瘍効果の増強を多方面よりの解析にて観察し得たことは、肺癌患者に対する新規癌免疫療法としてCCR8を標的とした抗体医薬の臨床応用の可能性を強く示唆していると考ええる。本研究は肺癌患者に対する新たな腫瘍免疫療法の確立に、重要な役割を果たすと考えられ、博士（医学）の学位授与に値すると認める。