

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Cancer-Associated Fibroblasts Affect Intratumoral CD8⁺ and FoxP3⁺ T Cells via Interleukin 6 in the Tumor Microenvironment

(癌関連線維芽細胞は、癌微小環境において IL6 を介して腫瘍内 CD8⁺ と FoxP3⁺ T 細胞に影響を与える)

加藤卓也、野間和広、大原利章、賀島 肇、桂 佑貴、佐藤浩明、河本 慧、勝部亮一、
二宮卓之、田澤 大、白川靖博、藤原俊義

Clinical Cancer Research 24(19):4820-4833,2018

主 論 文

Cancer-Associated Fibroblasts Affect Intratumoral CD8⁺ and FoxP3⁺ T Cells Via IL6 in the Tumor Microenvironment

(癌関連線維芽細胞は、癌微小環境において IL6 を介して腫瘍内 CD8⁺と FoxP3⁺T 細胞に影響を与える)

【緒言】

食道癌は悪性度の高い癌種として知られており、5 年生存率は近年の集学的治療を行ってもわずかに 16.9%である。そのため食道癌予後延長のため、新規標的治療法の探索が必要である。

近年、腫瘍免疫を標的とした治療の発展により、がん患者の予後が劇的に改善している報告がある。しかしながら、特に免疫チェックポイント阻害薬の副作用軽減と、治療効果の改善ならびに、予め治療効果を予測できるバイオマーカーの発見・開発については急務であり注目されている分野である。さらに、近年腫瘍免疫抑制は癌だけでなく、微小環境によっても影響受けるのではないかと考えられるようになってきた。我々はがん微小環境、特にがん関連線維芽細胞 (Cancer associated fibroblasts: CAFs) が腫瘍に対して様々影響を与え、癌の進行を助長させていることを示してきた。近年、CAFs もがん微小環境において、腫瘍免疫に関与するという報告も認められる。CAFs は腫瘍微小環境において免疫抑制性として働いているという報告がいくつかあるものの、現状としては CAF と腫瘍免疫の関連の重要性についてはまだ一定の見解が解明されておらず、さらなる検証が望まれている。

一方で、宿主腫瘍免疫を評価する方法として、腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor infiltrating lymphocytes: TILs) が注目されている。CD8⁺T 細胞 (細胞障害性 T 細胞) はアポトーシスを誘発することで腫瘍細胞障害を引き起こす一方、FoxP3⁺ T 細胞 (抑制性 T 細胞) は腫瘍免疫を抑制する上で重要な役割を担っている。それぞれの TILs と予後との関連について多々の癌種で報告されているものの、食道癌については少数のみである。また腫瘍内への T 細胞の遊走・浸潤については多段階のプロセスが必要であり、どのように癌微小環境、特に CAFs が腫瘍免疫抑制に関わっているのかはいまだ不明なままである。

本研究では、我々は特に CD8⁺/FoxP3⁺ TILs に関して、CAFs が食道癌における腫瘍免疫に影響を与えているという仮説のもと、食道癌切除標本を用いた臨床病理学的検討、マウスモデルを用いて CAFs が与える腫瘍免疫抑制の有無について、ならびに In vitro におけるこれら相互関与のメカニズムの解明についての検証を行った。

【材料と方法】

患者ならびに臨床情報

岡山大学病院消化器外科で 2008 年から 2010 年に施行した根治的食道癌手術を実施された 149 名のうち、除外基準例を除いた 140 例を研究対象とした。臨床病理学的因子を UICC 第 7 版に従って検討した。

マウスならびに cell line について

マウスは免疫不全マウスとして BALB/c-*nu/nu* を、免疫 Wild マウスとして BALB/c マウスと C57BL/6 マウスを購入し使用した。マウス由来の大腸癌 (Colon26)、ルシフェラーゼ発現大腸癌 (Colon26-luc)、乳癌 (4T1)、皮膚扁平上皮癌 (SCCVII)、膵癌 (Pan02) ならびに線維芽細胞 (NIH/3T3, BALBc/3T3 ならびに MEF) を使用した。ヒト由来の細胞として、食道癌 (TE4)、乳癌 (MCF-7)、膵癌 (Panc-1)、大腸癌 (DLD-1) ならびに線維芽細胞 (FEF3、WI-38 ならびに NHLF) を使用した。

臨床検体における CD8, FoxP3 ならびに α SMA の免疫組織学的染色について

切片を脱パラフィン化させ、内因性ペルオキシダーゼ処理した後に、クエン酸バッファーを用いて抗原賦活化を施行した。1 次抗体を適切な希釈率にて 30 分間常温で反応させる (CD8 (Dako, clone C8/144B, 1:100 dilution) or FoxP3 (Abcam, ab20034, clone 236A/E7, 1:100 dilution) or α SMA (SIGMA, A2547, clone 1A4, 1:1,000 dilution)。PBS で洗浄した後に、適切な 2 次抗体にて 30 分間常温で反応。DAB で発色させた後、対比染色を施行した。

臨床検体における CD8, FoxP3 ならびに α SMA の免疫蛍光顕微鏡検査について

切片を脱パラフィン化、タンパクブロッキングを施行した後に、 α SMA conjugated to FITC (Abcam, ab8211, clone 1A4, 1:100 dilution) にて 4 度 overnight で反応させる。その後、CD8 もしくは FoxP3 に対する抗体を反応させたのち、Alexa flour 568 で二次抗体を反応させる。Mounting medium で封入ならびに核染色を行い、鏡検した。

培養細胞の α SMA の免疫蛍光顕微鏡検査について

NIH/3T3 を 4well plate を用いて、がんの Conditioned media もしくは通常の培養液で培養する。その後、固定・透過処理後、一次抗体として α SMA (Abcam, ab5694, 1:250 dilution) を用いて 4°C overnight にて反応させる。共焦点顕微鏡にて観察した。

TILs の定量ならびに α SMA area aindex の評価について

腫瘍の境界を HE 染色で確認した後に、高倍率視野で腫瘍内・腫瘍周辺でもっとも染色されたリンパ節が多い部分を 4 カ所ずつ選択した。解析は ImageJ software を用いて機械的に算出した。 α SMA area index についても同様に ImageJ を用いて染色域の割合を計算した。

Western blotting について

線維芽細胞と癌によって刺激された線維芽細胞の α SMA の発現量を検討した。細胞をホモジネートし遠心分離してタンパクを回収した。タンパク質を 30mg ずつ含むサンプルを用いて、電気泳動を行い、メンブレンに転写。一次抗体として α SMA (Abcam, ab5694, 1:500 dilution) を反応させた後に、二次抗体を反応させ、最終的にメンブレンを発光させて評価した。

ELISAによるIL6の定量について

Colon26、NIH/3T3 単独もしくはそれぞれを共培養した上清を用いて（様々な播種細胞数の組み合わせ）IL6を測定した。測定についてはR&D SystemsのKitを用いて行った。次に、共培養モデルにおいて、トランスウェルチャンバーを用いて、それぞれの細胞が直接接着しないようにしてIL6濃度を測定した。加えて、マウスの他の癌種（4T1, SCCVII, Pan02）と他の線維芽細胞（BALBc/3T3, MEF）の組み合わせについてもIL6濃度を測定した。最後に、ヒトの癌細胞（TE4, DLD-1, Panc-1, MCF-7）と線維芽細胞（FEF3, WI-38, NHLF）の組み合わせで培養された上清を用いてIL6の濃度を測定した（R&D SystemのKitを同様にヒトの細胞についても使用した）

In vivoの実験について

CAFによる免疫抑制を評価するために、BALB/cとBALB/c-nu/nuマウスを用意した。麻酔下に、それぞれのマウスの右背部に、Colon26-luc単独もしくはColon26-luc+NIH/3T3の共接種を行った。腫瘍増殖については生物学的発光によるIVIS Lumina imaging systemを使用して評価した。4日毎に評価し16日目にIVISで評価後、腫瘍を摘出した。次に、IL6の効果を調べるためにマウス大腸癌であるColon26をBALB/cとBALB/c-nu/nuマウスの右背部に接種させた。片方の群は皮下腫瘍にRecombinant IL6を直接注入し人工的にIL6高濃度状態を作成した。それぞれ3日毎にIL6を注入しかつ腫瘍を3日おきに測定した。測定最終日に腫瘍を摘出した。同様の実験をC57BL/6マウスとマウス由来膵癌Pan02を用いて施行した。最後に、CAFによる腫瘍免疫抑制とIL6 Blockadeによる免疫抑制の改善を評価するために、Colon26単独接種群とColon26+NIH/3T3共接種群、さらにColon26+NIH/3T3共接種群に抗IL6抗体で治療する3群で腫瘍増殖を評価した。抗IL6抗体群では3日毎に直接腫瘍に抗体を投与した。腫瘍は3日毎に評価し、測定最終日に腫瘍を摘出した。

マウスモデルで摘出した組織における免疫組織学的染色

腫瘍はホルマリン固定しパラフィン包埋した。上記と同様に脱パラフィン・賦活化を施行した。一次抗体としてCD8a (eBioscience, clone 4SM15, 1:100 dilution), FoxP3 (eBioscience, clone FJK-16s, 1:100 dilution), and aSMA (SIGMA, clone 1A4, 1:1,000 dilution)は常温60分、IL6 (Abcam; Catalog No. ab6672, 1:500 dilution)は4°C overnightで反応を行った。後に適切な二次抗体で反応させた後に、可視化ならびに対比染色を施行した。それぞれのTILsの定量化ならびにarea indexについては上記に述べた方法と同様に施行した。

統計学的評価方法

SPSS softwareを用いて解析を行った。OS, DFSはカプランマイヤー法、ログランク検定、Cox比例ハザードモデルを用いて、ハザード比、95%信頼区間を単変量・多変量解析にて評価した。2群間ではthe Mann-Whitney 検定もしくはt検定を、多群間においてはANOVAとTukeyの多重比較法を用いて評価した。 $P<0.05$ を統計学的有意と設定し解析を行った。

研究承認・倫理

本研究において、臨床検体を用いた研究は岡山大学倫理委員会の承認の元、行われている(No. 1603-023)。またマウス実験においても動物実験計画書の承認の元、施設ガイダンスに準じ施行されている。

【結果】

CAFs は食道癌組織において TILs の分布に影響を与える

食道癌における CD8 ならびに FoxP3 陽性 TILs の分布を検討するために、代表的な食道癌の切除切片を用いて免疫染色にて評価を行った。腫瘍内と腫瘍周辺の CD8、FoxP3 陽性リンパ球においてリンパ球の分布の相違を認めた。 α SMA をマーカーとし検証した CAFs は腫瘍内の発現量に差が認められた。蛍光染色を用いた多重染色では腫瘍内の CAFs が少ないと CD8 陽性リンパ球の浸潤が多く、逆に腫瘍内の CAFs が多いと、CD8 陽性のリンパ球は腫瘍周辺には存在するものの、腫瘍内への浸潤が少ない結果が得られた。FoxP3 については、CAFs が多いと、FoxP3 リンパ球の腫瘍内への浸潤が多かった。以上より、CAFs が TILs を介して腫瘍免疫において影響を与えている可能性が示唆された。

腫瘍内の CD8+/FoxP3+ TILs は食道癌において独立した予後規定因子である

岡山大学消化器外科学で 2008 年から 2010 年に食道癌に対して根治手術を施行された 149 例を対象とし、除外基準を除いた合計 140 例を検討対象とした。CD8+/FoxP3+ TILs はどちらも腫瘍内の TILs に比べて、腫瘍周辺に多い結果であった。腫瘍内の CD8+ TILs が多い患者では、有意に予後良好である一方、FoxP3+ TILs が多い患者では予後不良であった。多変量解析で CD8+/FoxP3+ TILs は独立した予後規定因子であった (CD8+, HR = 0.45, 95% CI = 0.27-0.77, $P=0.004$; FoxP3+, HR = 1.86, 95% CI = 1.05-3.29, $P=0.034$)。しかしながら、腫瘍周辺の TILs は CD8+/FoxP3+ TILs と予後において有意な相関は認められなかった。つまり、腫瘍周辺ではなく腫瘍内の TILs が食道癌予後に強く影響を与えていることが示された。

腫瘍内において CAFs と CD8+/FoxP3+ TILs の分布には有意な関連性が存在する

SMA の評価のために Area index を使い、CD8+/FoxP3+ TILs と CAFs の関連性について散布図を用いて評価した。腫瘍内の TILs において、CD8+ TILs と CAFs は負の相関が ($r=-0.416$)、FoxP3+ TILs では正の相関が認められた ($r=0.484$)。一方で、腫瘍周辺の TILs と CAFs の関連性は認められなかった。食道癌症例において、CAFs は腫瘍内への CD8+リンパ球の浸潤を抑制し、逆に FoxP3+リンパ球の浸潤を促進させていることが証明された。

CAFs は *in vivo* において腫瘍免疫抑制を惹起する

CAFs の腫瘍免疫抑制を検証するために、2 種類のマウス BALB/c と BALB/c-*nu/nu* を用いて *in vivo* の実験を行った。癌細胞単独皮下腫瘍 (Colon26-luc) と線維芽細胞の共接種モデル (Colon26-luc+NIH/3T3) の 2 群間での腫瘍増殖について IVIS imaging system を用いて継続的に

評価した。どちらのマウスにおいても、共接種モデル群で有意に腫瘍増殖が強かった。しかし、BALB/c 群においてより早期から有意に増殖効果が認められ、かつ Colon26-luc+NIH/3T3 と Colon26-luc のルシフェリン活性の比が 2.5-3.0 倍と高かった。BALB/c 群の皮下腫瘍切片の免疫染色では、共接種モデルにおいて α SMA 陽性の CAFs が多く、腫瘍内の TILs において腫瘍免疫抑制傾向が認められた。以上より、CAFs は腫瘍内の TILs を制御することで腫瘍免疫抑制を加速させ、腫瘍増殖をより引き起こしていることが示された。

腫瘍微小環境において、CAFs はインターロイキン 6(IL6)を過剰発現させる

次に CAFs がどのようなメカニズムで腫瘍免疫抑制を引き起こしているのかを検証した。In vitro において癌・線維芽細胞単独、その共培養した時の上清を用いマルチサイトカインアレイを行い、IL6 に着目した。上記と同様の上清を用いて、ELISA にて IL6 の濃度を測定したところ、癌細胞・線維芽細胞単独培養に比べ、共培養において上清内に有意に高い IL6 の濃度を認めた。さらに、癌細胞の播種数を変化しても IL6 の分泌量が変化しなかった反面、線維芽細胞の播種数を増やせば、その量に応じて IL6 の分泌量が増加した。この変化は、transwell chamber を用いて direct contact ではない状態で評価を行っても同様の結果であった。最後に、多種の癌細胞・線維芽細胞、ならびにヒトの細胞を用いて検証を行ったが、概ね同様の傾向であった。以上より、癌によって刺激されたマウス・ヒト双方の CAFs は高濃度の IL6 を分泌することが認められた。

IL6 は *in vivo* において腫瘍増殖ならびに免疫抑制を誘導する

マウスモデルを用いて、IL6 の腫瘍免疫抑制に対する効果について検証した。上記と同様の 2 種類のマウスに皮下腫瘍を作成した後に、IL6 を腫瘍内に直接注入させ、IL6 の高濃度の状態維持させるモデルを用いた。双方のマウスともに、IL6 は腫瘍増殖に寄与したが、BALB/c マウスにおいては有意に腫瘍を増殖させた。腫瘍免疫の側面から、IL6 群においては有意に CD8+ TILs が少なく、FoxP3+ TILs が多かった。他の癌種の Cell line を用いてもほぼ同様の傾向が認められた。最後に、CAFs が誘導した免疫抑制の可逆性を評価するために、抗 IL6 抗体を用いて 3 群間で検証を行った (Colon26 群 vs Colon26+NIH/3T3 群 vs Colon26+NIH/3T3+Anti-IL6 antibody 群)。IL6 blockade を用いた群では、CAFs によって導かれた腫瘍増殖が有意に抑えられた。切片の組織免疫学的評価においても、Colon26+NIH/3T3 群に比較し CD8+ TILs が上昇し、逆に FoxP3+ TILs が低下していた。以上より、CAFs はひとつのメカニズムとして、IL6 を介して腫瘍内の CD8+/FoxP3+ TILs を制御することにより腫瘍免疫抑制に影響を与えていることを証明した。

【考察】

今回我々は *in vitro*, *in vivo* そして臨床検体と一貫性をもって、CAFs と腫瘍免疫との関連性について検討し、特に CAFs が腫瘍免疫抑制性に TILs を制御している可能性があることを証明した。食道癌において腫瘍内の CD8+/FoxP3+ TILs が独立した予後規定因子であり、さらに Peri-/intra-tumoral TILs の比率は SMA area index と関連を認めることから、CAFs が CD8+/FoxP3+ TILs と有意に相関していることを証明した。つまり、CAFs は癌細胞と共に腫瘍

内の TILs の遊走を制御していることが示唆された。

IL6 は炎症性サイトカインとして腫瘍増殖、浸潤、血管新生、腫瘍免疫抑制に重要な役割を示すことは知られている。我々は、免疫不全ヌードマウス (BALB/c-*nu/nu*) と免疫 wild マウス (BALB/c) を用いて、人工的に IL6 高濃度腫瘍を作成した。その結果、どちらのマウスでも IL6 高濃度腫瘍において、腫瘍増殖効果が認められたが、BALB/c マウスにて有意に強い腫瘍増殖を認めた。さらに、IL6 blockade を用いると腫瘍増殖が抑えられ、腫瘍免疫抑制が改善されていた。臨床検体の切除切片においても、SMA 発現部位と一致して IL6 の発現があることを確認した。CAFs 高密度腫瘍における IL6 過剰分泌は、CD8+ T cell の低下ならびに FoxP3+ T cell の増加という腫瘍免疫抑制を誘導する可能性が示唆された。

しかしながら、一般的に IL6 は TGF- β の環境下においてナイーブ T cell からの Treg の分化を抑制するとされており、我々の結果とそぐわない。そこで我々は CAFs や IL6 によって引き起こされる腫瘍内の低酸素環境が、T 細胞代謝に強く関連しているという仮説を立てた。低酸素環境下では腫瘍細胞と免疫担当細胞とグルコースの競合が起こり解糖系を中心とする CD8+T cell の代謝が低下することで、CD8+Tcell が減少する一方、脂質も利用可能な FoxP3+T cell は低酸素の影響を受けにくく、FoxP3+Tcell が保たれていると考えられた。実際に食道癌切片において、 α SMA/IL6 の発現に一致して、低酸素マーカーである HIF-1 α /CAIX の高発現が認められた。以上より、腫瘍代謝と低酸素の側面から、腫瘍環境と非腫瘍環境においては IL6 の異なる役割があることが示された。

既存の免疫療法において、例えば腫瘍内の CD8+ TILs の値が Immuno-Checkpoint inhibitor の治療効果に影響を与えることが報告されている。CAFs が腫瘍内の TILs に影響を与える主因子であることは明らかであり、CAFs をコントロールすることが既存の免疫療法の効果を改善させる可能性がある。

しかしながら CAFs 自体を標的するにはいくつかの問題点が存在する。CAFs は様々な細胞から分化するとされており、また CAFs に特異性の高いマーカーも存在しないところから、CAFs のみを標的とするのは困難である。しかしながら、本研究では FDA でもすでに承認されている抗 IL6 抗体を用いて CAFs が誘導する腫瘍免疫を改善させる結果を得ており、腫瘍免疫微小環境を改善させるこの治療法は現実的な戦略であると提案することが可能である。

【結論】

我々は、特に腫瘍内の TILs の浸潤の点において腫瘍免疫を調整する CAFs の役割について述べた。CAFs は IL6 を過剰分泌することで腫瘍内の TILs を免疫抑制性へ変化させることが判明した。IL6 を制御すること、もしくは CAFs 自体を標的とする治療は、腫瘍免疫を改善させ、さらには食道癌を含む、多種の癌種の予後を改善させる可能性が認められた。