

令和元年6月11日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08663

研究課題名(和文) 膵がん免疫微小環境における血管内皮細胞の役割と機能制御

研究課題名(英文) Role and function control of vascular endothelial cells in pancreatic cancer immune microenvironment

研究代表者

石川 義典(猪野義典)(Ishikawa(Ino), Yoshinori)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：90291137

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)：がん微小環境はがんの生物学的特性に寄与する。本研究では膵がん免疫微小環境における血管内皮細胞の役割について検討した。膵がん組織内・外(慢性膵炎)から血管内皮細胞を単離後、網羅的遺伝子発現解析を実施し、膵がん組織由来血管内皮細胞に高発現遺伝子Xを得た。分子Xは膵がん組織内の一部の血管内皮細胞に発現し、分子X陽性血管内皮細胞密度の高い症例は、全生存・無再発生存が有意に長く、分子X発現陽性血管内皮細胞がCD4+T細胞を活性化させている可能性が示唆された。本研究により、がん組織内血管内皮細胞がCD4+T細胞を活性化する新たな事象が発見された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん微小環境はがんの生物学的特性の決定に寄与し、その形成機序の解明はがんの生物学の解明とがん治療の標的探索に重要である。本研究ではがん免疫微小環境における血管内皮細胞の役割について検討し、これまで知られていなかった、がん組織内血管内皮細胞がCD4+T細胞を活性化する新たな事象を新しく発見した。膵がんは極めて難治性で、免疫チェックポイント阻害剤による最近の免疫治療にも抵抗性である。本研究により発見された分子X発現血管内皮細胞を利用し、既存の免疫療法と組み合わせることで治療効果の向上が期待される。難治性膵がんの治療選択肢が広がるようになれば、国民の保険・医療に寄与するところが大きい。

研究成果の概要(英文)：Cancer microenvironment is very important for characterizing the behaviors of cancer. Here we investigated roles of the endothelial cells in pancreatic cancer (PDAC) immune microenvironment. We analyzed gene expression profiles of endothelial cells isolated from fresh PDAC tissues or chronic pancreatitis tissues. Gene X expressed significantly higher in PDAC tissues than in non-cancerous tissues and molecule X expressed in a part of endothelial cells in PDAC tissues but not in non-cancerous tissues. Patients of PDAC with higher density of molecule X-expressing endothelial cells had a significantly longer survival both for overall survival and disease-free survival. It is suggested that molecule X-expressing endothelial cells are involved in the activation of CD4+ T cells. This is the first study to show endothelial cells in cancer tissues contribute to activation of CD4+ T cells.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：免疫微小環境 膵がん 血管内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景：がんの重要な生物学的特性は、がん細胞、がん間質、または両者の相互作用によって規定される。がん間質を構成する一員として免疫担当細胞があり、それによるがん免疫微小環境に与える影響は大きく、このがん免疫微小環境が形成される分子機構を理解し、それをコントロールすることが出来れば、新たながん治療に繋がるものと確信される。申請者はこれまで、がん免疫微小環境に注目し、特にヒト膵がんを中心に進行がんと発がん・進展過程における宿主免疫応答性の変化について、臨床病理学的観点や分子機序の観点から研究を続けてきた (Br J Cancer 108, 914-23, 2013, Gastroenterology. 140, 310-321, 2011)。がん組織を詳細に観察すると、がん組織には形態学的な不均質性をはじめとして、浸潤するリンパ球やマクロファージ等の免疫細胞、様々な免疫微小環境構成要素の種類・量などが局所毎に異なり、全体として不均質であることがわかる。そして免疫微小環境特性 (例えば、抗腫瘍性や腫瘍支持性の微小環境) も異なる。それら局所の特性の総和として、がん組織全体の免疫微小環境特性の方向性が決定されていると考えられる。特性の異なる免疫微小環境局所の時間的、空間的な形成の調整機序、両者特性の移行機序について理解をさぐることが出来れば、免疫微小環境形成の分子機序を明らかにすることに繋がるものと考えられる。

2. 研究の目的：がん組織内は、がん細胞のみならず、免疫担当細胞のリンパ球や M1, M2 などのマクロファージ、血管内皮や異常増殖線維芽細胞など様々な微小環境構成要素の種類や量などが症例毎ごとに不均質である。本研究では、がん微小環境の不均質性、特に免疫細胞浸潤が無秩序なものではなく、一定の傾向をもつ不均質性であることを調べ、さらにそれが、どのような分子機序で形成されているのかを検討することを目的とする。

3. 研究の方法: 当センターにて外科切除された膵がん組織および非がん組織を酵素処理後、抗体標識ビーズ (CD45, CD31) にてがん組織及び慢性膵炎組織から血管内皮細胞を選択的に回収した。回収した内皮細胞から RNA を抽出し、Rib-SPIA 増幅法 (NuGEN Technologies) により増幅後、SurePrint G3, Agilent を用いマイクロアレイ実施した。腫瘍組織由来内皮細胞と非腫瘍部組織由来内皮細胞で発現量に最も差のある遺伝子を選択し、それがコードする分子をターゲット分子として解析を進めた。解析方法は下にまとめた。

1. 膵がん組織新鮮凍結切片をもちいた分子発現解析：免疫染色。

2. 膵がん外科切除症例のホルマリン固定・パラフィン包埋組織切片を用いた免疫染色、および臨床病理学的解析。免疫染色後、組織切片はホールスライドイメージングとして画像ファイルに変換され (NanoZoomer 2.0-HT, 浜松ホトニクス)、必要に応じて画像解析ソフト (Tissue Studio, Definiens, Germany) を用いて画像解析を実施した。

4. 研究成果：外科切除された新鮮膵がん組織および慢性膵炎組織からマグネットビーズ法により CD31<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> の血管内皮細胞を単離し、網羅的発現解析を実施した。膵がん組織由来血管内皮細胞と慢性膵炎組織由来血管内皮細胞で発現量に有意な差のある遺伝子の中から、膵がん組織で発現の高い遺伝子 X を選択した。

遺伝子 X の発現を蛋白質レベルで確認するため、膵がん凍結切片を免疫染色した結果、膵がん組織内の内皮細胞に陽性像を認めた。一方慢性膵炎組織内の内皮細胞では発現が陰性であった。膵がん外科切除検体から、ホルマリン・パラフィン組織切片を用いて、分子 X 発現を免疫組織化学で解析した。分子 X を発現する血管内皮細胞は膵がん組織内血管の一部に限られ、極少数血管のみに発現している症例が多数を占めた。膵がん 119 症例について、分子 X 発現陽性の血管内皮細胞密度を解析し、その症例間平均値で症例を 2 群に分けて患者予後との関係を調べた。

分子X発現陽性血管密度の高い症例は、低い症例に比して有意に全生存、無再発生存の長いことがわかった(図1)。

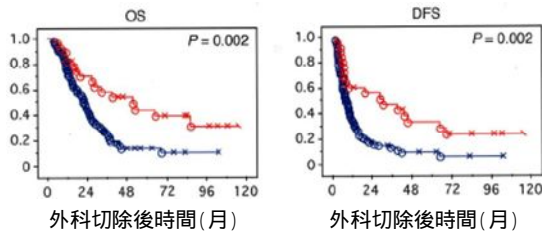


図1 Kaplan-Meier生存曲線  
分子X発現内皮細胞密度の高い分(赤線)、同低い群(青線)。X軸は全生存(OS)、無再発生存(DFS)の割合

X分子陽性血管内皮の分布はX分子陽性細胞数の数に関わらず膵がん組織領域内の辺縁に多く分布する傾向が認められた。

分子Xは血管内皮細胞上でHLA-DRと共発現していることからCD4<sup>+</sup>T細胞との相互作用を通してCD4<sup>+</sup>T細胞に何らかの影響を与えている可能性について検討した。膵がん組織内に浸潤するCD4<sup>+</sup>T細胞について、その活性化・疲弊状態をCD4とCD69, Ki-67, CTLA-4との二重染色を実施した。分子X発現陽性血管密度の高い症例では、低い症例に比して、有意にCD69<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞/CD4<sup>+</sup>T細胞の割合が高く( $P=0.024$ )、また有意にKi-67<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞/CD4<sup>+</sup>T細胞の割合が高く( $P=0.008$ )、逆に有意にCTLA-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞/CD4<sup>+</sup>T細胞の割合が低い( $P=0.04$ )ことがわかった。分子X発現陽性血管内皮細胞とCD4<sup>+</sup>T細胞との相互作用を直接的に観察できていないが、分子X発現陽性血管内皮細胞密度が高い症例では、活性化したCD4<sup>+</sup>T細胞が有意に多く、逆に疲弊したCD4<sup>+</sup>T細胞あるいは制御性T細胞が有意に少ないことは、分子X発現陽性血管内皮細胞がCD4<sup>+</sup>T細胞を活性化させている可能性を示唆するものである。さらにCTLA-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞と分子X発現陽性血管内皮細胞の分布を比較すると、互いにほぼ排他的な分布を呈した(図2)。

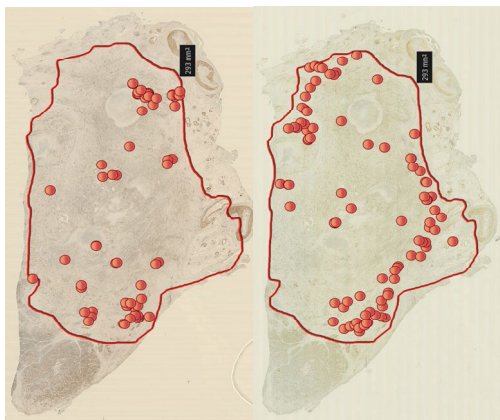


図2 CTLA-4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T細胞(左)と分子X発現陽性血管内皮細胞(右)の分布、赤線は膵がん領域。

膵がん組織に浸潤するCD4<sup>+</sup>T細胞は予後良好な、制御性T細胞は予後不良因子になることを既に報告している。分子XはCD4<sup>+</sup>T細胞を活性化させて、抗腫瘍性活性化免疫微小環境を形成している可能性が考えられる。

血管内皮細胞がCD4<sup>+</sup>T細胞を活性化する機序として、メモリーCD4<sup>+</sup>T細胞への抗原提示とCD4<sup>+</sup>T細胞血管外遊走時の相互作用が知られている。しかしながら、がん組織内では血管内皮細胞障害が起こって、リンパ球の血管外遊走を担う接着分子やケモカインの発現低下・消失が生じることや、血管内皮細胞上にFASLの発現を通したリンパ球殺傷やCLEVER-1発現による選択的制御性T細胞の血管外遊走、また低酸素環境における血管内皮細胞上のPD-L1, PD-L2発現誘導を介して、免疫微小環境を免疫寛容に向かうことに役立つことが知られている。本研究により、

分子Xを発現する膵がん組織内血管内皮細胞がCD4<sup>+</sup>T細胞を活性化する可能性が示唆されたことは、新たな事象の発見である。分子X発現血管内皮細胞がどのような機序でCD4<sup>+</sup>T細胞を活性化するかについて明らかにし、同血管内皮細胞の誘導機構を明らかにすることが出来れば、既存の免疫療法と組み合わせることで治療効果の向上につながることを期待される。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

Ino Y, Oguro S, Yamazaki-Itoh R, Hori S, Shimada K, Hiraoka N.

Reliable evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in pancreatic cancer tissue biopsies. *Oncotarget*. 2019 Feb 1;10(10):1149-1159.

Iwasaki T, Hiraoka N, Ino Y, Nakajima K, Kishi Y, Nara S, Esaki M, Shimada K, Katai H.

Reduction of intrapancreatic neural density in cancer tissue predicts poorer outcome in pancreatic ductal carcinoma. *Cancer Sci*. 2019 Apr;110(4):1491-1502.

Kawachi A, Yoshida H, Kitano S, Ino Y, Kato T, Hiraoka N.

Tumor-associated CD204<sup>+</sup> M2 macrophages are unfavorable prognostic indicators in uterine cervical adenocarcinoma. *Cancer Sci*. 2019 Apr;110(4):1491-1502.

### 〔学会発表〕(計1件)

Nakajima K, Ino Y, Hiraoka N.

Characterization of pancreatic cancer endothelial cells: Approaching to enhance immune cell infiltration for immunotherapy. September 30-October 3, 2018.

### 〔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：  
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：  
国内外の別：

### 〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：平岡伸介

ローマ字氏名：Hiraoka Nobuyosi

所属研究機関名：国立がん研究センター

部局名：病理解析部門

職名：部門長

研究者番号（8桁）：40276217

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。