

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08706

研究課題名(和文) 膵臓癌細胞におけるPD-L1発現と腫瘍幹細胞性・上皮間葉転換による悪性形質の解析

研究課題名(英文) Malignant potential of PD-L1-positive pancreatic cancer cells. Analysis of the stemness and epithelial to mesenchymal transition.

研究代表者

稲熊 真悟 (Inaguma, Shingo)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・実験病態病理学教授

研究者番号：80410786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓癌のみならず、大腸癌細胞株におけるPD-L1高発現分画が、高い浸潤遊走能、細胞分裂能を有することを見出し、同分画において、特異的発現を示す遺伝子群を抽出した。その中で、幹細胞性、上皮間葉転換に関連すると思われる遺伝子群の発現を誘導・低減させるレンチウイルスを作成し、膵臓癌・大腸癌細胞株に感染させ、その表現型の変化をin vitroの実験系を用いて観察している。腫瘍組織アレイを用いた発現解析を行い、PD-L1陽性大腸癌の病理学的特徴を同定するとともに、大腸癌細胞におけるCD47、PHH3、PBK発現、および大腸癌間質線維芽細胞におけるCD70発現が患者の予後を規定することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、様々な固形腫瘍において、PD-1/PD-L1シグナルを標的とした分子標的治療薬が用いられているものの、単剤では腫瘍の治癒には至っておらず、他の分子標的治療薬との併用療法の重要性が示唆されている。本研究において、膵臓癌、および大腸癌におけるPD-L1高発現分画が高い悪性度を有していること、また、その分画において特異的に発現する遺伝子群を同定したことで、それらの遺伝子が新規併用療法の標的となる可能性を有していると考えられた。また、腫瘍組織アレイを用いた発現解析より同定された予後因子群に関しても、今後、それらの分子メカニズムを解析することで、新たな治療標的となりうると考えている。

研究成果の概要(英文)：This study identified that PD-L1-high fraction of pancreatic and colorectal cancer cells harbor higher potentials for migration, invasion, and cellular proliferation than PD-L1-low fraction. Gene expression microarray analyses identified specifically expressed genes in PD-L1-high fraction. Among them, we have selected several genes those might be responsible for tumor stemness and epithelial-mesenchymal transition (EMT). We are now analyzing the malignant potentials of pancreatic and colorectal cancer cells those gene expressions were modulated by lentiviral vectors.

This study also identified the clinicopathological characteristics of PD-L1-positive colorectal cancer from tissue microarray analyses. Furthermore, prognostic significance of CD47, PHH3, and PBK expressions in colorectal cancer cells were identified. Also, CD70 expression in tumor-associated fibroblasts was identified as a worse prognostic factor in colorectal cancer patients.

研究分野：分子病理学

キーワード：CD274 膵臓癌 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

近年、腫瘍細胞の宿主免疫機構からの逃避が、腫瘍の発生、進展や転移に重要であることが明らかになり、様々な腫瘍性疾患において、PD-L1/PD-1 シグナルを含む、免疫チェックポイント阻害剤が臨床応用され、成果を上げている。しかしながら、免疫チェックポイント単剤では、腫瘍の根絶には至っておらず、通常化学療法との併用や、免疫チェックポイント阻害剤による多剤併用療法の必要性が示唆されている。免疫チェックポイント阻害剤による治療効果を予測するバイオマーカーとして、腫瘍細胞における PD-L1 発現が提唱されているが、PD-L1 を発現する腫瘍細胞の性質については、精力的に解析が進められているものの、現段階ではほぼ未解明の状態である。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が大腸癌における腫瘍幹細胞性と PD-L1 発現との相関性を免疫組織学的に見出したことを基礎とし、難治性疾患である膵臓癌における PD-L1 発現と、腫瘍幹細胞性、上皮間葉転換、およびヘッジホッグ(Hh)シグナル系との関連を分子生物学的に解析することにより、膵臓癌の悪性形質制御メカニズムを解明し、新規併用療法の可能性を探ることを目的としている。

また、腫瘍組織アレイを用いた免疫チェックポイント分子の発現解析を行い、患者の予後を規定する遺伝子の同定、およびそのメカニズムの同定、新規免疫チェックポイント阻害剤の適応を明らかにすることを試みる。

3. 研究の方法

膵臓癌、および大腸癌腫瘍細胞株より PD-L1 高発現分画を単離し、その浸潤遊走能、細胞分裂能を PD-L1 低発現分画とと比較する。また、PD-L1 高発現分画において、特異的発現を示す遺伝子群を抽出し、その中で幹細胞性、上皮間葉転換に関連すると思われる遺伝子群の発現を誘導・低減させるレンチウイルスを作成し、膵臓癌・大腸癌細胞株に感染させ、その表現型の変化を *in vitro* の実験系を用いて観察する。

診断後の残余検体から、大腸癌腫瘍組織を 4.5mm のパンチにて採取し、腫瘍組織アレイを作成する。CD70、CD47 などの新規免疫チェックポイント分子に対する抗体を用いて、各分子の発現を解析し、陽性症例の病理学的特徴を同定するとともに、患者の予後を規定する遺伝子の同定を試みる。また、*in vitro* の実験系を用いて、各分子の機能を解析する。

4. 研究成果

膵臓癌のみならず、大腸癌細胞株における PD-L1 高発現分画が、高い浸潤遊走能、細胞分裂能を有することを見出した (Figure 1)。また、同分画において、特異的発現を示す遺伝子群を抽出した。その中で、幹細胞性、上皮間葉転換に関連すると思われる遺伝子群の発現を誘導・低減させるレンチウイルスを作成し、膵臓癌・大腸癌細胞株に感染させ、その表現型の変化を *in vitro* の実験系を用いて観察している。

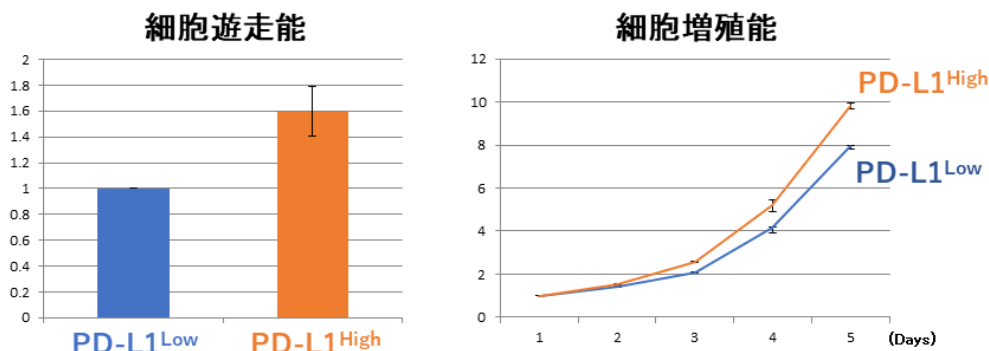


Figure 1. HCT-116におけるPD-L1高発現分画は高い遊走能、細胞増殖能を有する

腫瘍組織アレイを用いた発現解析を行い、PD-L1 陽性大腸癌の病理学的特徴を同定するとともに、大腸癌細胞における CD47、PHH3、PBK 発現、および大腸癌間質線維芽細胞における CD70 発現が患者の予後を規定することを見出した (Figure 2)。

本研究において、膵臓癌、および大腸癌における PD-L1 高発現分画が高い悪性度を有していること、また、その分画において特異的に発現する遺伝子群を同定したことで、それらの遺伝子が新規併用療法の標的となる可能性を有していると考えられた。同様に、腫瘍組織アレイを用いた発現解析より同定された予後因子群に関して、今後、それらの分子メカニズムを解析することで、新たな治療標的となりうると考えている。

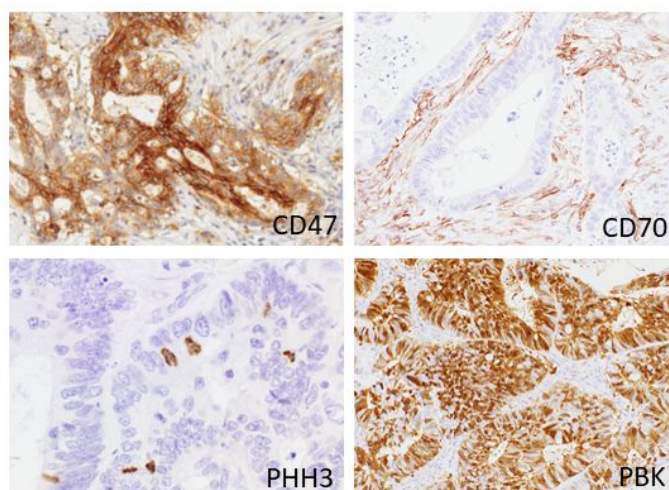


Figure 2. 大腸癌組織アレイを用いた免疫組織学的発現解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Inoue S, Tsunoda T, Riku M, Ito H, Inoko A, Murakami H, Ebi M, Ogasawara N, Pastan I, Kasugai K, Kasai K, Ikeda H, Inaguma S.	4. 巻 19(3)
2. 論文標題 Diffuse mesothelin expression leads to worse prognosis through enhanced cellular proliferation in colorectal cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 1741-1750
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.11290.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Inaguma S, Lasota J, Czapiewski P, Langfort R, Rys J, Szpor J, Waloszczyk P, Okon; K, Biernat W, Schrupp DS, Hassan R, Kasai K, Miettinen M, Ikeda H.	4. 巻 250(2)
2. 論文標題 CD70 expression correlates with a worse prognosis in malignant pleural mesothelioma patients via immune evasion and enhanced invasiveness.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pathol.	6. 最初と最後の頁 205-216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/path.5361.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Inoue Satoshi, Ito Hideaki, Tsunoda Takumi, Murakami Hideki, Ebi Masahide, Ogasawara Naotaka, Kasugai Kunio, Kasai Kenji, Ikeda Hiroshi, Inaguma Shingo	4. 巻 0
2. 論文標題 CD70 expression in tumor-associated fibroblasts predicts worse survival in colorectal cancer patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-019-02565-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Inaguma S., Lasota J., Felisiak-Golabek A., Kowalik A., Wang Z., Zieba S., Kalisz J., Ikeda H., Miettinen M.	4. 巻 3(4)
2. 論文標題 Histopathological and genotypic characterization of metastatic colorectal carcinoma with PD-L1 (CD274)-expression: Possible roles of tumour micro environmental factors for CD274 expression.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Pathol Clin Res.	6. 最初と最後の頁 268-278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cjp2.81.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Koshino A, Inoue S, Sugimura-Nagata A, Nishiyama T, Murakami H, Ito H, Riku M, Inoko A, Ebi M, Ogasawara N, Tsuzuki T, Kasugai K, Kasai K, Inaguma S.	4. 巻 -
2. 論文標題 High phospho-histone H3 expression uniquely predicts favorable survival among four markers of cellular proliferation in colorectal cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathol Int.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13084.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagano-Matsuo A, Inoue S, Koshino A, Ota A, Nakao K, Komura M, Kato H, Naiki-Ito A, Watanabe K, Nagayasu Y, Hosokawa Y, Takiguchi S, Kasugai K, Kasai K, Inaguma S, Takahashi S.	4. 巻 -
2. 論文標題 PBK expression predicts favorable survival in colorectal cancer patients.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virchows Arch.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-021-03062-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugimura-Nagata A, Koshino A, Inoue S, Matsuo-Nagano A, Komura M, Riku M, Ito H, Inoko A, Murakami H, Ebi M, Ogasawara N, Tsuzuki T, Takahashi S, Kasugai K, Kasai K, Inaguma S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Expression and Prognostic Significance of CD47-SIRPA Macrophage Checkpoint Molecules in Colorectal Cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 2690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052690.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 稲熊真悟、長野愛矢、小村理行、加藤寛之、内木綾、高橋智
2. 発表標題 CD70およびPD-L1は協調して悪性胸膜中皮腫細胞の免疫逃避を亢進させ患者予後を悪化させる
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲熊真悟、Jerzy Lasota, 池田 洋、笠井謙次、Markku Miettinen、高橋 智
2. 発表標題 CD70分子はMET-ERK経路の活性化、腫瘍細胞の免疫逃避亢進により悪性胸膜中皮腫患者の予後を悪化させる
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inaguma S., Inoue S., Ito H., Tsunoda T., Murakami H., Kasugai K., Kasai K., Ikeda H.
2. 発表標題 Expression analysis of CD70, CD27 and FOXP3 with an evaluation of their prognostic values in colorectal cancer.
3. 学会等名 United States and Canadian Academy of Pathology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inaguma S., Lasota J., Tsunoda T., Ito H., Murakami H., Kasai K., Miettinen M., Ikeda H.
2. 発表標題 CD70 upregulates migration and invasion of malignant pleural mesothelioma cells through ERK pathway.
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Inoue S., Ito H., Tsunoda T., Murakami H., Ebi M., Ogasawara N., Kasugai K., Kasai K., Ikeda H., Inaguma S.
2. 発表標題 CD70 expression in tumor-associated fibroblasts predicts worse survival in colorectal cancer patients.
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	笠井 謙次 (Kasai Kenji)		
研究協力者	高橋 智 (Takahashi Satoru)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ポーランド	Medical University of Gdansk	Nat. Tuber. and Lung Dis. Res. Inst.	Maria Sklodowska-Curie Memorial Inst.	他2機関
ドイツ	Otto-von-Guericke University Magdeburg			
アメリカ合衆国	National Institutes of Health	National Cancer Institute	Laboratory of Pathology	他1機関