

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10668

研究課題名（和文）大腸癌間質における免疫担当細胞と化学療法感受性および癌悪性度の評価

研究課題名（英文）Evaluation of immune cells and cancer malignancy in colorectal cancer stroma

研究代表者

西村 潤一（Nishimura, Junichi）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター（研究所）・その他部局等・消化器外科副部長

研究者番号：20379209

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：大腸癌は上皮細胞から発生し大腸の間質に浸潤するが、間質に存在する免疫担当細胞は癌の浸潤を手助けしたり、抑えたりすることが知られている。今回、大腸癌の間質の免疫細胞に注目して個々の症例における免疫細胞の比率と個々の大腸癌の特徴や血液検査などと比較を行った。その結果、血液検査においてはCRPやHbと各免疫担当細胞との関連が示唆された。また、これらは免疫染色による病理標本の検討でも同様の結果となった。このように大腸癌と癌間質の免疫担当細胞、宿主の状態と癌間質の免疫担当細胞には関連があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究において、大腸癌の間質の免疫担当細胞は大腸癌の進行度などの状態と、患者の炎症所見などの状態と関連することが示唆された。大腸癌のみに注目した大腸癌に対する治療方法の開発だけでなく、大腸がん罹患した患者のもともとの免疫細胞の状態や大腸癌罹患中の炎症の状態により免疫担当細胞の比率が変化することが分かった。これらの解析を進めることで、大腸癌に対する治療において個々人の免疫状態を加味した新たな治療方法の開発が進むことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Colorectal cancer originates from epithelial cells and invades the stroma of the colon, but immune cells present in the stroma are known to help or suppress the infiltration of cancer. This time, we focused on the interstitial immune cells of colorectal cancer and compared the ratio of immune cells in individual cases with the characteristics of individual colorectal cancers and blood tests. As a result, it was suggested that CRP and Hb are associated with immune cells in the blood test. In addition, these results were similar in the examination of pathological immunostaining. Thus, it was found that there is a relationship between colorectal cancer and cancer stromal immune cells, and host status and cancer stromal immune cells.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 間質 免疫細胞

## 1. 研究開始当初の背景

腸管は食餌を吸収する場ではあるが、食餌抗原に曝され、また腸内細菌や食事に含まれる細菌やウイルスとの接触する場でもある。この腸管の特殊な環境を作り出すために様々な細胞が腸管特異的に存在すると報告されている。さまざまな免疫担当細胞のうちマクロファージや樹状細胞は自然免疫として第一線の防御を行う。

マウス腸管免疫においては CD11c<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> 細胞、CD103<sup>+</sup>CX3CR1<sup>int</sup> 細胞、CD103<sup>+</sup>CX3CR1<sup>high</sup> 細胞は各々抑制性 T 細胞の活性化、Th17 細胞を誘導する樹状細胞、T 細胞の反応を抑制する自然免疫系細胞であることが分かってきた (Atarashi K, Nishimura J, (equally contributed author) Nature, 2008)。ヒト腸管からは CD103<sup>+</sup>CD141-SIRP $\alpha$ <sup>high</sup> 樹状細胞 (Watchmaker PB, Nat Immunol, 2014)、CD14<sup>+</sup>マクロファージ (Kamada N, J Clin Invest, 2008) が Th17 細胞を誘導することが報告されている。しかしヒト腸管に関する免疫担当細胞の解析はマウスと比較すると発展途上である。我々は大腸癌手術検体の非癌部、炎症性腸疾患の切除検体を用いて腸管特異的に存在する抗原提示細胞を報告した。CD14<sup>+</sup>CD163<sup>low</sup> 細胞は IL-6、IL-23p19、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  を高産生し、ヒト Th17 細胞を分化誘導することを報告した (Ogino T, Gastroenterology, 2013, co-responding Author Nishimura J)。また、CD163<sup>high</sup>CD160<sup>high</sup> 細胞は T 細胞の増殖を抑制することで免疫抑制機能を有することを報告した (Barman S, Int Immunol, 2016, corresponding Author Nishimura J)。これらの細胞は炎症性腸疾患と深く関わることを示し、炎症性腸疾患に対する新たな治療ターゲットとしての可能性を示唆した。このようにヒト腸管にはマウスと同様に腸管特異的な細胞が存在することが分かってきた。

以前より大腸癌間質に存在するマクロファージは腫瘍関連マクロファージ (Tumor-associated macrophages: TAMs) と呼ばれ、解析が進められた。TAMs は抗炎症作用を有する M2 マクロファージと分類され、大腸癌症例の予後を悪化させる因子として考えられてきた。他方、大腸癌組織内のマクロファージの浸潤の症例は予後が良好であるとの報告もあり未だに一定した見解はない。これらの解析はマクロファージを細分化しないままにとらえたものであり、マクロファージにも炎症誘導性のものや炎症抑制性のものがあること、また腸管には上述したように腸管特異的なマクロファージ、抗原提示細胞が存在することに注目した報告は少ない。最近大腸癌間質のマクロファージの細分化を試みた報告が注目に値する (Samuel EN, Clin Transl Immunology, 2016)。この報告では大腸癌間質および同一症例の非癌部分から細胞を単離し様々な表面抗原マーカーを用いた FACS 解析によりマクロファージの細分化、および大腸癌間質と非癌部分との比較を行っている。しかし、この解析は分布のみを報告しており、実際のマクロファージの活性化度や機能の解析には至っていない。また、マクロファージの細分化手法を応用した化学療法の奏効率の比較や予後解析には至っていないのが現状である。

## 2. 研究の目的

大腸癌間質に存在するマクロファージを細分化し、機能解析により大腸癌の進展、悪性化に寄与している因子を抽出し新たな治療法、治療効果予測法の創出を目的とする。大腸癌間質と同一検体内から非癌部を採取し細分化したマクロファージや樹状細胞を比較することで腫瘍特異的なマクロファージの存在や個体間での大腸癌間質マクロファージの機能の違

いを解析し、臨床病理学的因子のみならず化学療法の奏効、予後と比較することで治療成績に関連するマクロファージ、樹状細胞を同定する。また、切除検体の組織学的免疫染色により化学療法の奏効、予後に関連するマクロファージ、樹状細胞のマーカーを同定する。

### 3. 研究の方法

研究施設において大腸癌切除術を施行された大腸癌症例を対象とする。切除後ホルマリオン固定前の手術標本より大腸癌の最深部以外の部位から 1cm × 1cm の検体を採取する。また口側または肛門側の断端付近より非癌部の組織を採取する。洗浄後癌部は非癌部分を除去して癌および癌間質のみの状態にする。非癌部は 10mMEDTA 入り PBS にて振盪することで上皮細胞を除去し、筋層以深を除去することで粘膜固有層を得る。癌部、非癌部ともに Collagenase および Dispase、DNase 存在下で振盪させることでマクロファージ、樹状細胞を単離化する。40µm メッシュで濾したのちに Lineage として CD3、CD19、CD20、CD56、HLA-DR、CD14、CD163、CD11c、CD160 の FACS 用抗体を用いて目的のマクロファージ、樹状細胞の分画を展開する。細分化したマクロファージ、樹状細胞を sorting により個別に回収し培養する。2 日間培養後、再度 FACS にて表面抗原マーカーの解析を行い、培養による影響を解析する。培養後の培養液については精製したのちに ELISA によって IL-12、IL-6、TNF などの炎症性サイトカインや IL-10、TGF-β などの抑制性サイトカインの分泌について解析する。

### 4. 研究成果

研究施設の使用可能解析機械が限定されていたため、FACS での sort ができない状況であった。そのため、FACS での解析による CD14-CD11chigh、CD14-CD11clow、CD14+CD163low、CD14+CD163high の 4 つの細胞集団の比率と各種臨床病理学的因子、血液検査との比較を行うこととした。

大阪国際がんセンター研究所がん創薬部所有の BD LSRFortessaX-20 フローサイトメーターを使用し、大腸癌切除症例の癌部分の検体を採取し、細胞を単離、FACS による解析をおこなった。前年度に引き続き FACS 抗体の制限から CD3、HLA-DR、CD163、CD11c、CD14 および死細胞除去のために FSV510 を用いた。死細胞除去ののちに CD3 陰性、HLA-DR 陽性の細胞を CD14、CD11c、CD163 で展開し CD14-CD11chigh、CD14-CD11clow、CD14+CD163low、CD14+CD163high の 4 つの細胞集団に分けて、4 つの細胞集団ごとに各細胞集団の比率を low と high に 2 分し、血液検査との相関を解析した。術前 CRP の上昇症例においては CD14+CD163low の細胞集団の比率が低いこと、CD14-CD11chigh の細胞集団の比率が低いことが分かった。なお、これらの傾向は大腸癌切除症例の癌部分の検体を採取する際に同時に採取した切除断端の非癌部分の解析においては認められなかった。非癌部分においては CD14+CD163high の細胞集団の比率が高い症例は T3 以深の症例が多いことが分かった。FACS で解析した大腸癌切除症例の癌部分の検体のパラフィンブロックを用いて、抗 CD68、CD163、CD11c 抗体を用いて免疫染色による抗原提示細胞の組織内分布を解析し、FACS と同様の分布となっていることを確認した。これらのことを 2020 年の日本癌学会学術総会で報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishimura Junichi, Clinical Study Group of Osaka University (CSGO) Colorectal Group, Hasegawa Junichi, Kato Takeshi, Yoshioka Shinichi, Noura Shingo, Kagawa Yoshinori, Yasui Masayoshi, Ikenaga Masakazu, Murata Kohei, Hata Taishi, Matsuda Chu, Mizushima Tsunekazu, Yamamoto Hirofumi, Doki Yuichiro, Mori Masaki	4. 巻 82
2. 論文標題 Phase II trial of capecitabine plus oxaliplatin (CAPOX) as perioperative therapy for locally advanced rectal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Chemotherapy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 707 ~ 716
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00280-018-3663-z	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Junichi Nishimura, Naotsugu Haraguchi, Chu Matsuda, Masayoshi Yasui, Tomohira Takeoka, Naoki Shinno, Kei Asukai, Naoshi Hara, Nozomu Nakai, Shinichiro Hasegawa, Keiji Sugimura, Hiroshi Wada, Hidenori Takahashi, Miroshi Miyata, Masayuki Ohue
2. 発表標題 Distribution of myeloid cell subset in colorectal cancer stroma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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
研究分担者	香山 尚子 (Kayama Hisako)  (40548814)	大阪大学・高等共創研究院・准教授  (14401)	

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
---------	---------