

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10704

研究課題名(和文)サルコペニアにおける免疫学的癌微小環境の意義

研究課題名(英文)Sarcopenia and immunological tumor microenvironment

研究代表者

今井 克憲 (Imai, Katsunori)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：60555746

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)：膵癌細胞におけるPD-L1の発現は有意に予後不良と関連し、その発現には腫瘍浸潤マクロファージが関与していた。膵癌細胞株と活性型マクロファージを共培養すると、膵癌細胞におけるPD-L1の発現が有意に増加した。さらにこれは活性型マクロファージが分泌するTNF- α によって制御されることが証明され、TNF- α が膵癌細胞におけるPD-L1の発現を制御するメカニズムとして、NF- κ Bの関与が示された。腫瘍浸潤マクロファージの分泌するTNF- α が膵癌細胞におけるPD-L1の発現を促しており、このTNF- α を抑制することが、新たな膵癌治療における治療ターゲットとなる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤の登場をうけ、抗腫瘍免疫療法は目覚ましい発展を遂げた。しかし治療効果を予測するバイオマーカーは確立しておらず、免疫学的な腫瘍微小環境の機序解明は急務である。今回我々は膵癌において、免疫チェックポイント分子であるPD-L1の発現が予後に関連し、PD-L1の発現を調節する因子として腫瘍浸潤マクロファージが分泌するTNF- α を同定した。さらに、TNF- α がPD-L1の発現を制御するメカニズムとしてNF- κ Bの関与を証明し、新たな膵癌治療における治療ターゲットとなる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the clinical significance and regulatory mechanism of PD-L1 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells. Among the various cytokines tested, tumor necrosis factor (TNF)- α upregulated PD-L1 expression in PDAC cells through NF- κ B signaling. The induction of PD-L1 expression was also caused by co-culture with activated macrophages, and the upregulation was inhibited by neutralization with anti-TNF- α antibody after co-culture with activated macrophages. PD-L1 expression in PDAC cells was positively correlated with macrophage infiltration in tumor stroma of human PDAC tissues. In addition, survival analysis revealed that high PD-L1 expression was significantly associated with poor prognosis in 235 PDAC patients and especially in patients harboring high CD8-positive T-cell infiltration. These findings indicate that tumor-infiltrating macrophage-derived TNF- α could be a potential therapeutic target for PDAC.

研究分野：消化器外科学、腫瘍免疫学

キーワード：腫瘍免疫学 免疫チェックポイント 膵癌 マクロファージ 腫瘍微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤の登場をうけ、抗腫瘍免疫療法は目覚ましい発展を遂げ、外科的手術、化学療法、放射線療法に次ぐ第4の治療法として期待されている。しかし効果が全く認められない患者も多く、治療効果を予測するバイオマーカーは確立しておらず、免疫学的な腫瘍微小環境の機序解明は急務である。

加齢に伴い体組成の状態は変化し、進行性、全身性に骨格筋量が低下する現象はサルコペニアとして知られている。現在は筋力の低下や機能低下を含めて、サルコペニアの定義や重症度分類がなされている。サルコペニアは大きく、加齢に伴う一次性と、低栄養や低活動、疾患に起因する二次性に分類される。担癌患者は、過剰な炎症反応に伴う蛋白異化亢進や代謝変動、低栄養が重なり、二次性サルコペニアに陥りやすい。しかし、サルコペニアの原因や病態にはいまだ不明な点が多く、特に癌細胞に与える影響については、ほとんど報告されていない。癌患者におけるサルコペニアと、免疫学的な腫瘍微小環境の関連を検証し、サルコペニアが腫瘍微小環境に与える影響を解明することにより、免疫療法を含む抗癌治療の発展に大きく寄与することができると思う。

2. 研究の目的

近年Programmed death 1 (PD-1) をターゲットとした抗腫瘍免疫療法が脚光を浴び、多くの癌腫において臨床試験が進み、良好な成績が報告されている。しかし同じ癌腫でも全く効果の認めない患者も多く、効果発現の機序も不明な点も多い。今後抗腫瘍免疫療法は、癌治療の中心的役割を担うことが期待されており、免疫学的な腫瘍微小環境の機序解明は急務である。

従来サルコペニアは骨格筋量の減少を意味する概念であったが、近年このサルコペニアが癌の再発や予後と関連することを示す報告が増えてきている。しかしサルコペニアの原因や病態は解明されておらず、特に癌に与える影響に関しては不明な点が多い。免疫チェックポイント阻害剤の登場をうけ、抗腫瘍免疫療法は目覚ましい発展を遂げ、外科的手術、化学療法、放射線療法に次ぐ第4の治療法として期待されている。しかし効果が全く認められない患者も多く、治療効果を予測するバイオマーカーは確立しておらず、免疫学的な腫瘍微小環境の機序解明は急務である。サルコペニアが癌の微小環境に及ぼす効果を、腫瘍免疫学的見地から解明することが本研究の最大の目的である。

3. 研究の方法

(1) 肝胆膵癌の切除検体における免疫関連因子とサルコペニアの関連の検証

サルコペニアの患者では腫瘍局所の抗腫瘍免疫能が低下している可能性がある。そこで、当科において外科的に切除された肝胆膵系の癌(肝細胞癌、胆管癌、膵癌など)の術後検体を用い、腫瘍浸潤リンパ球TIL (CD8 やCD4 陽性T細胞、Treg など)や腫瘍関連マクロファージ、MHC-classI、PD-1 やPD-L1 などの免疫チェックポイント分子を、免疫染色を用いて網羅的に解析し、サルコペニアとの関連を検証する。

2) サルコペニア患者のTIL の増殖、抗腫瘍活性の解析

切除後の新鮮標本よりTIL を分離し、リンパ球垂型の解析を行う。TIL をex vivo で培養し、細胞増殖活性や抗腫瘍活性の解析を行い (INF- のELISPOT assay やCr release assay 等)、サルコペニアの有無がTIL の抗腫瘍活性に与える影響を検証する。

3) In vivo における、TIL の抗腫瘍活性の解析

切除後の新鮮標本より分離、培養したTIL を、ヒト腫瘍細胞株を移植(皮下もしくは腹腔内投

与)したNOD/SCID マウスに投与し、サルコペニアの患者から分離したTIL とサルコペニアでない患者から分離したTIL の抗腫瘍活性を比較検証する。

4. 研究成果

当科および関連施設にて外科的切除を施行した膵癌235例を用いて、膵癌腫瘍微小環境を形成する免疫担当細胞であるCD8陽性T細胞、regulatory T細胞、腫瘍浸潤マクロファージ、および膵癌細胞のPD-L1の発現を免疫染色にて網羅的に解析した結果、癌細胞におけるPD-L1や腫瘍浸潤マクロファージ、CD8陽性T細胞が膵癌切除術後の再発および予後に影響を与えることが示されたが、サルコペニアとの相関は示されなかった。この膵癌235例における検討、およびTCGAコホートをを用いた検討では、PD-L1の発現が有意に予後不良と相関することがわかった(図1)。そこで、腫瘍浸潤マクロファージに注目し、膵癌細胞におけるPD-L1の発現との相関を調べたところ、両者に有意な相関が認められた(図2)。膵癌細胞株と活性型マクロファージを共培養すると、膵癌細胞におけるPD-L1の発現が有意に増加した(図3)。さらにこれは活性型マクロファージが分泌するTNF- α によって制御され、高TNF- α 中和抗体にて抑制されることが証明され、TNF- α が膵癌細胞におけるPD-L1の発現を制御するメカニズムとして、NF- κ Bの関与が示された(図4)。以上より、腫瘍に浸潤する活性型マクロファージの分泌するTNF- α が膵癌細胞におけるPD-L1の発現を促し、予後不良に繋がっているものと考えられた。このTNF- α を抑制することが、新たな膵癌治療における治療ターゲットとなる可能性が示された。

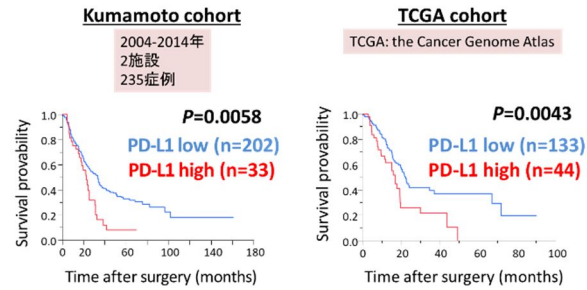


図 1

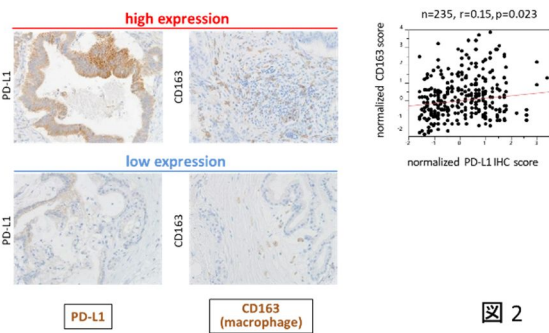


図 2

腫瘍浸潤マクロファージに注目し、膵癌細胞におけるPD-L1の発現との相関を調べたところ、両者に有意な相関が認められた(図2)。膵癌細胞株と活性型マクロファージを共培養すると、膵癌細胞におけるPD-L1の発現が有意に増加した(図3)。さらにこれは活性型マクロファージが分泌するTNF- α によって制御され、高TNF- α 中和抗体にて抑制されることが証明され、TNF- α が膵癌細胞におけるPD-L1の発現を制御するメカニズムとして、NF- κ Bの関与が示された(図4)。以上より、腫瘍に浸潤する活性型マクロファージの分泌するTNF- α が膵癌細胞におけるPD-L1の発現を促し、予後不良に繋がっているものと考えられた。このTNF- α を抑制することが、新たな膵癌治療における治療ターゲットとなる可能性が示された。

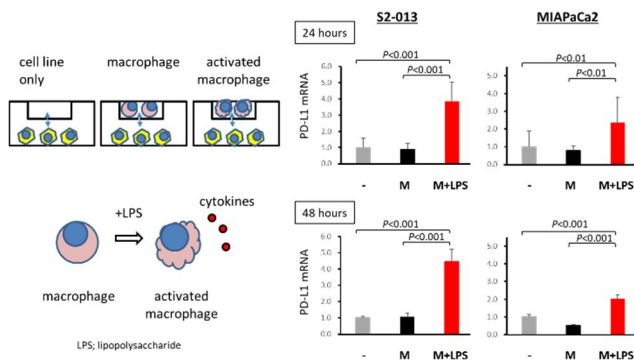


図 3

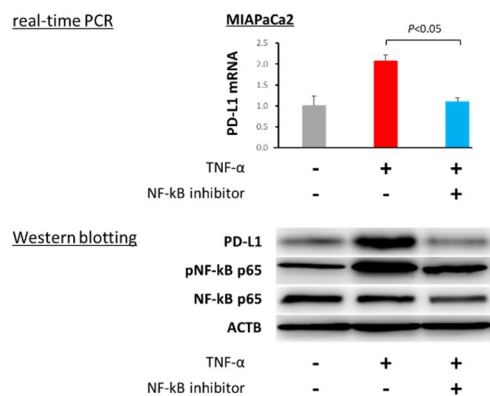


図 4

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 1件）

1. 著者名 Tsukamoto Masayo, Imai Katsunori, Ishimoto Takatsugu, Komohara Yoshihiro, Yamashita Yo ichi, Nakagawa Shigeki, Umezaki Naoki, Yamao Takanobu, Kitano Yuki, Miyata Tatsunori, Arima Kota, Okabe Hirohisa, Baba Yoshifumi, Chikamoto Akira, Ishiko Takatoshi, Hirota Masahiko, Baba Hideo	4. 巻 110
2. 論文標題 PD L1 expression enhancement by infiltrating macrophage derived tumor necrosis factor leads to poor pancreatic cancer prognosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 310-320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13874	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 0件）

1. 発表者名 塚本雅代、今井克憲、石本崇胤、菰原義弘、山下洋市、中川茂樹、梅崎直紀、山尾宣暢、伊東山瑠美、中尾陽佑、遊佐俊彦、宮田辰徳、岡部弘尚、近本亮、石河隆敏、廣田昌彦、馬場秀夫
2. 発表標題 腫瘍浸潤マクロファージ由来の TNF- が膵癌におけるPD-L1の発現を増強し、予後不良の原因になる
3. 学会等名 第40回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本雅代、今井克憲、石本崇胤、梅崎直紀、山尾宣暢、伊東山瑠美、中尾陽佑、遊佐俊彦、有馬浩太、宮田辰徳、岡部弘尚、中川茂樹、橋本大輔、山下洋市、近本亮、石河隆敏、馬場秀夫
2. 発表標題 腫瘍浸潤マクロファージが膵癌におけるPD-L1の発現を増強する
3. 学会等名 第118回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本雅代、今井克憲、石本崇胤、菰原義弘、中川茂樹、梅崎直紀、山尾宣暢、北野雄希、宮田辰徳、有馬浩太、岡部弘尚、山下洋市、近本亮、石河隆敏、廣田昌彦、馬場秀夫
2. 発表標題 腫瘍浸潤マクロファージ由来のTNF- がPD-L1の発現を増強し、膵癌患者における予後不良の原因となる
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塚本雅代、今井克憲、石本崇胤、北野雄希、宮田辰徳、有馬浩太、岡部弘尚、中川茂樹、橋本大輔、山下洋市、近本 亮、石河隆敏、馬場秀夫
2. 発表標題 腫瘍浸潤マクロファージは膀胱癌におけるPD-L1の発現を増強し免疫寛容の原因となる
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 塚本雅代、今井克憲、石本崇胤、梅崎直紀、山尾宣暢、伊東山瑠美、中尾陽佑、遊佐俊彦、北野雄希、有馬浩太、宮田辰徳、山村謙介、岡部弘尚、中川茂樹、橋本大輔、山下洋市、近本 亮、石河隆敏、馬場秀夫
2. 発表標題 腫瘍浸潤マクロファージが膀胱癌におけるPD-L1の発現を増強する
3. 学会等名 第28回日本消化器癌発生学会総会・第28回国際消化器癌発生会議
4. 発表年 2017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	中川 茂樹 (Nakagawa Shigeki) (10594872)	熊本大学・病院・非常勤診療医師 (17401)	
研究分担者	東 孝暁 (Higashi Takaaki) (70594878)	熊本大学・病院・医員 (17401)	
研究分担者	林 洋光 (Hayashi Hiromitsu) (80625773)	熊本大学・病院・助教 (17401)	