

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15094

研究課題名（和文）膵癌組織における免疫抑制性微小環境のデジタル画像解析ならびに亜分類の試み

研究課題名（英文）Image analysis-based subtyping of immunosuppressive tumor-immune microenvironment in pancreatic cancer tissue

研究代表者

眞杉 洋平（Masugi, Yohei）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：90528598

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞傷害性T細胞（CD8+細胞）の組織内密度を定量測定する画像診断技術を開発し、腫瘍中心と辺縁の免疫反応の違いに基づき、200症例以上の膵癌症例について抗腫瘍免疫活性および免疫抑制活性をこれらの指標を数値化する手法を確立した。続いて、これらの指標の臨床病理学的意義を明らかにした。さらに免疫抑制活性と量ならびに空間的に逆相関する免疫抑制因子を検証し、特殊な間質組成をもつ膵がんの一群を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治がんの代表である膵癌に対する治療が模索される中、腫瘍間質の修飾により免疫治療効果が顕著に増強されることが明らかとなりつつある。本研究は、患者組織の精緻な定量解析を用いて、ヒト膵癌における腫瘍内CD8+T細胞除去に中心的役割を果たす有力な因子として、ある特定の線維芽細胞サブタイプを見出し、この線維芽細胞サブタイプに富む膵がんは、強力な免疫抑制活性で特徴づけられる一群であることを発見した。この結果は、膵癌モデルマウスを用いた先行研究結果によって支持されるヒト組織でのエビデンスであり、免疫療法との併用を想定した間質標的治療の実現には、治療に反応する群を選定する患者層別が重要であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We established computational quantitative system to calculate tumor-infiltrating CD8+ cells in the tumor center and the tumor margin to establish the quantitative evaluation methods for the anti-tumor immune activity and for the in situ immunosuppressive activity of pancreatic cancer microenvironment. Then, we clarified clinicopathologic significances of these quantitative measurements. We further examined candidate factors/cells contributing to the immunosuppression of pancreatic cancer stroma, and focused on the desmoplastic stroma. Using multiplex immunohistochemistry-based image analyses, we identified a stroma type that showed a significant correlation with aforementioned immunosuppressive activity of pancreatic cancer.

研究分野：人体病理学

キーワード：膵がん 免疫療法 間質標的治療 腫瘍不均一 Tリンパ球

1. 研究開始当初の背景

膵癌は効果的な治療手段のない難治がんであるが、リンパ球浸潤の強い膵癌は予後良好であり、膵癌に対する T 細胞性免疫療法の開発が期待されている。様々な悪性腫瘍に対し、PD-1 (programmed cell death 1) に代表される免疫チェックポイント阻害の有効性が示されているが、膵癌に対するその単剤投与は有効でないことが示唆されている。その理由として、膵癌では(1) 新生変異抗原が少ないこと、(2) 強力な免疫抑制性微小環境が想定されている。キメラ抗原受容体 T 細胞療法に代表される癌細胞特異的 T 細胞作成技術が現在実用化段階にあり、また大部分の膵癌症例で内因性の腫瘍特異的 T 細胞が検出されることから、強力な免疫療法の実現のためには(2)の克服が特に問題と考えられている。膵癌微小環境では免疫チェックポイント機構に加え、制御性 T 細胞、腫瘍関連マクロファージ、骨髄由来免疫抑制細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、制御性 B 細胞など様々な抑制性免疫細胞が癌特異的 T 細胞の抑制に関与することが数々の研究により示唆されている。顕著な線維性間質形成は膵癌の特徴であるが、線維芽細胞、間質に沈着するコラーゲンやヒアルロン酸による物理的バリアーもまた微小環境における T 細胞浸潤・機能を阻害する因子となり得る。上述の抑制性免疫細胞や間質をターゲットとした多くの臨床試験が現在進行中であり、免疫制御機構の解除による新規治療の臨床応用が期待される一方で、治療効果の個体差が大きいことも明らかとなりつつある。実際、膵癌は多様なゲノム・エピゲノム異常の異なる組合せからなるヘテロな病気であり、免疫反応も患者毎に多彩である、すなわち膵癌微小環境は症例により千差万別である。本研究は、「膵癌患者組織において T 細胞性獲得免疫を抑制する中心的免疫制御機構は何なのか。それには複数の制御機構が相互排他的あるいは協調的に作用しているのか。」という「問い」に答えるものであり、膵癌に対するがん免疫療法の実用化・個別化への展開の基盤となる研究である。

2. 研究の目的

難治がんの代表である膵癌に対し、膵癌の特徴である免疫抑制性腫瘍微小環境をターゲットにした治療戦略の開発が試みられる中で、臨床検体における腫瘍微小環境の多彩性や腫瘍内不均一性の課題が認識されつつある。本研究では、次の目的 1 ならびに 2 を達成し、膵癌に対するがん免疫療法の実用化・個別化への展開の基盤となる成果を創出する。

目的 1: 膵癌患者組織において T 細胞性免疫の抑制に中心的な役割を果たす腫瘍微小環境因子を同定する。

目的 2: 免疫抑制性微小環境の定量情報をベースとして、悪性度診断や治療の指針となり得る膵癌のサブクラス分類の提唱を目指す。

3. 研究の方法

詳細な分子病理学的情報および臨床情報の付随した 200 症例以上の膵癌切除組織切片を用いて、蛍光多重免疫染色と特殊染色とを重ね合わせて取得したデジタル病理画像を、当教室で開発を進めている解析システムにより定量化し、「腫瘍組織内における細胞傷害性 T 細胞 (CD8+ 細胞) 密度が各種免疫抑制因子 (制御性 T 細胞、腫瘍関連マクロファージ、骨髄由来免疫抑制細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、PD-L1/PD-L2 発現細胞、線維芽細胞、コラーゲン) の密度と逆相関する」という仮説を検証する。続いて複数の免疫制御因子が相互排他的あるいは協調的関係にあるのかを吟味しつつ、分子病理学的特徴や予後を反映する膵癌微小環境のサブクラス分類を見出す。

4. 研究成果

(1) 細胞傷害性 T 細胞の組織内密度、癌細胞—T 細胞間距離の定量画像解析システムの開発
 膵癌組織を用いた CD8 の蛍光免疫染色を行い、細胞傷害性 T 細胞 (CD8+T リンパ球) の組織内密度、癌細胞—CD8+細胞間距離を自動測定する画像解析システムを開発した (図 1)。この技術を用いて 200 症例以上の膵癌症例を解析し、まず腫瘍領域全体における CD8+細胞密度を測定し、これが予後の良好な指標となることを確認した。これは膵癌患者組織において T 細胞性免疫が機能し、がんの進行抑制に寄与している可能性が示唆される結果であり、この成果を国際学会にて発表した (2018 年 9 月)。

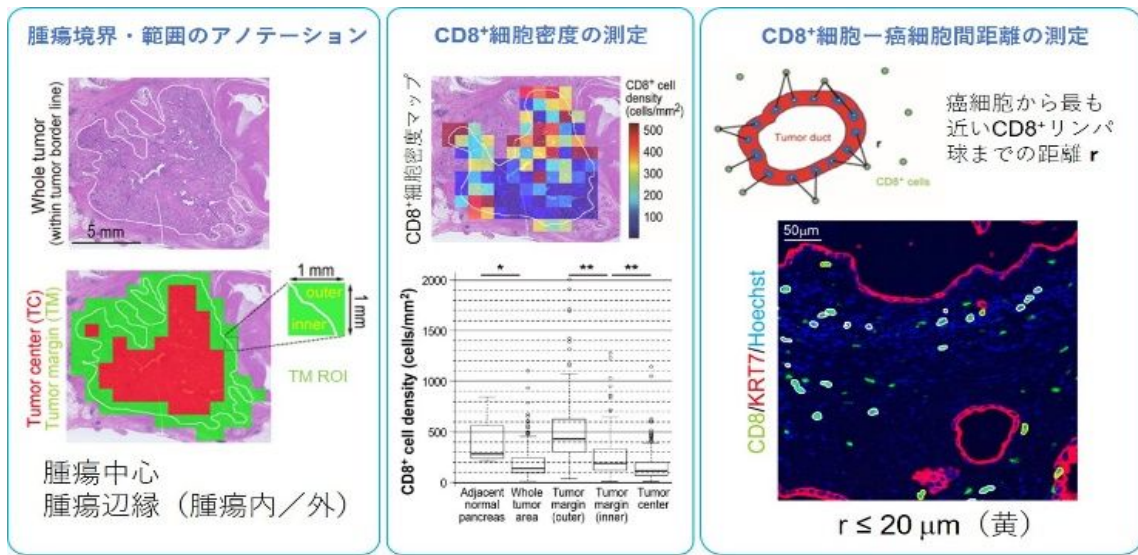


図 1. CD8 陽性細胞の組織内定量画像解析システム

(2) 膵癌では腫瘍辺縁に比べ腫瘍中心では CD8+細胞浸潤が顕著に抑制されている

測定法開発を進める中で、CD8+細胞の癌組織内分布は不均一であり、実際に定量測定を行うと 95%以上の膵癌症例で、腫瘍中心部の CD8+細胞密度は辺縁部に比べて低いことが明瞭に示された (図 2)。さらなる検討で、腫瘍辺縁部では受動免疫反応の成立を示唆する 3 次リンパ組織の形成や PD-L1 発現が観察されるのに対し、膵癌中心部では T 細胞性免疫反応を打ち消す強力な免疫抑制性微小環境が存在し、結果として CD8+細胞の腫瘍内浸潤が不均一に抑制されていると考えられた。さらに CD8+細胞の膵癌組織内分布不均一の臨床的意義を明らかにするため、患者予後と比較したところ、膵癌中心部の CD8+細胞密度が高いほど患者生命予後が良好である一方で、辺縁部における CD8+細胞密度、癌細胞—CD8+細胞間距離は予後と関連がないことも明らかとなった (図 3)。これらの一連の成果を国内外の学会で発表し、原著論文を発表した。

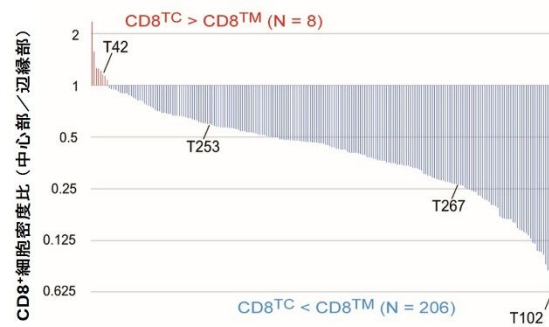


図 2. CD8+細胞密度の腫瘍内不均一

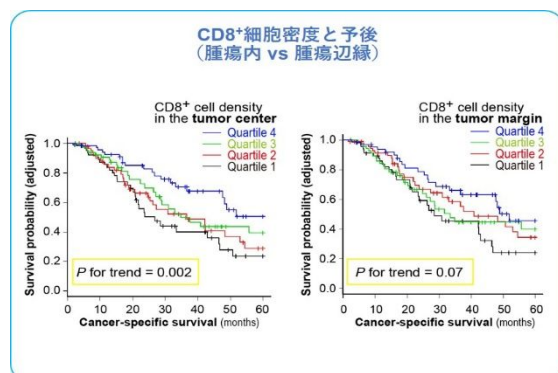


図 3. CD8+細胞密度不均一と予後

(3) CD8+細胞の腫瘍内浸潤と逆相関する免疫抑制性線維性間質タイプの同定

膵癌組織内 CD8+細胞の空間的分布に着目した解析を先行させたことにより、当初の予想と異なる方向で研究が進展した。すなわち上述のように、腫瘍内不均一、特に腫瘍辺縁部と中心部の免疫反応に特徴的な違いがあることが見出され、膵癌組織における腫瘍中心・腫瘍辺縁の CD8+細胞密度を各症例について個別に定量測定することにより、ヒト膵癌に対する T 細胞性免疫の活動性に加え、膵癌微小環境の持つ免疫抑制活性を in situ で数値化することができることが示された(図4)。これらの指標が量化がされたことで、膵癌の免疫抑制性微小環境に寄与するとされる多くの因子(制御性 T 細胞、腫瘍関連マクロファージ、骨髄由来細胞、好中球、PD-L1/PD-L2 を含めた複数の免疫チェックポイント発現細胞、線維芽細胞、コラーゲン等)について、腫瘍辺縁と中心の免疫組織学的相違に基づく定性的手法にて効率良くスクリーニングすることができることが分かり、結果としてより有力な候補因子として膵癌特有の線維性間質に特に着目した。

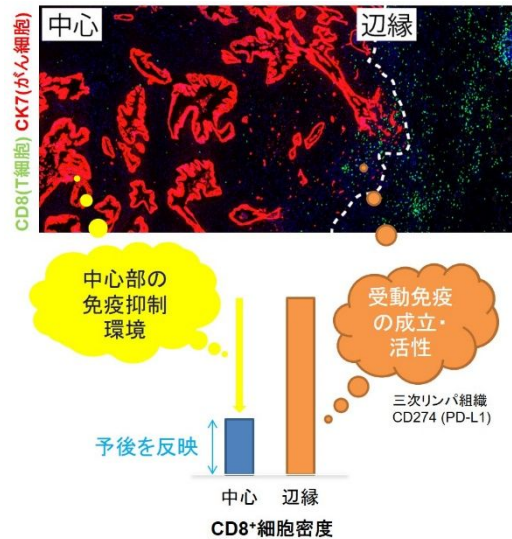


図 4. 膵癌における CD8+細胞密度の定量画像解析による T 細胞性免疫活性、免疫抑制活性の数値化

膵癌特有の線維性間質に着目した解析では、多重蛍光染色を応用した画像解析を用いて、複数の線維芽細胞サブタイプを同定し、特に膵癌間質では、相互排他的な 2 種類の線維芽細胞サブタイプが主体を占めることを明らかとし、国際学会にて発表した(2020年3月)。これらの占有率やコラーゲン量を同一切片上で定量画像解析し、膵癌間質が 3 種の異なる間質組成タイプに亜分類されることを見出した。これら 3 種の間質タイプは予後が異なり、さらにその内、ある特定の線維芽細胞サブタイプに富む間質組成タイプ(F-stroma)では、前述した免疫抑制活性の指標との相関が示され、強い免疫抑制活性で特徴づけられる間質タイプであることが示唆された(論文投稿中)。これは、Science 誌や PNAS 誌などで報告されている膵癌モデルマウスを用いた先行研究結果を支持するヒト組織での現象を想起する結果であり、免疫療法との併用を想定した間質標的治療の実現に重要なエビデンスである。今後この研究で見出された 3 種の膵癌間質タイプが、悪性度診断ならびに治療指針に結び付く患者層別化に有用であることを検証したい。

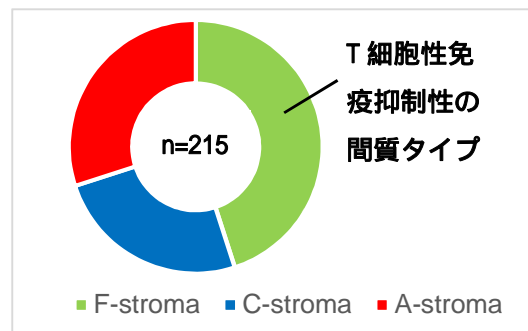


図 5. 膵癌線維性間質タイプ

(4) 多発膵癌の発生に係る分子病理学的解析

他方、(1)~(3)の検証を行う中で一人の患者に複数の膵癌を発生する、いわゆる多発膵癌症例にも着目した。多発膵癌症例では、がん細胞の形態が異なるのみならず、間質も同じ患者内で異なる形態を示すこともしばしばである。実際、次世代シーケンスや病理形態学的ならびに免疫染色等による多発膵癌患者 9 症例 20 結節の解析により、多発膵癌の成り立ちとして膵内転移、多中心性発生の二つの異なる形成過程が関わることを明らかとし、論文として発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Masugi Y, Abe T, Ueno A, Fujii-Nishimura Y, Ojima H, Endo Y, Fujita Y, Kitago M, Shinoda M, Kitagawa Y, Sakamoto M	4. 巻 32
2. 論文標題 Characterization of spatial distribution of tumor-infiltrating CD8(+) T cells refines their prognostic utility for pancreatic cancer survival	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Modern Pathology	6. 最初と最後の頁 1495-1507
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41379-019-0291-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 -

1. 著者名 Fujita Y, Matsuda S, Sasaki Y, Masugi Y, Kitago M, Yagi H, Abe Y, Shinoda M, Tokino T, Sakamoto M, Kitagawa Y	4. 巻 111
2. 論文標題 Pathogenesis of multiple pancreatic cancers involves multicentric carcinogenesis and intrapancreatic metastasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 739-748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14268	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yohei Masugi, Tokiya Abe, Minoru Kitago, Masahiro Shinoda, Michiie Sakamoto
2. 発表標題 Prognostic value of CD8+ T-cell density computed by quantitative image analysis using whole tissue sections of pancreatic ductal adenocarcinoma
3. 学会等名 AACR Special Conference on Pancreatic Cancer（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yohei Masugi, Tokiya Abe, Minoru Kitago, Masahiro Shinoda, Michiie Sakamoto
2. 発表標題 Characterization of spatial distribution of tumor-infiltrating CD8+ T cells refines their prognostic impact in pancreatic cancer
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞杉洋平
2. 発表標題 ヒト膵癌組織に浸潤する細胞傷害性T細胞の空間的定量画像解析
3. 学会等名 第一回日本医学会連合Rising Starリトリート（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞杉洋平、阿部時也、西村瑤子、上野彰久、久保田直人、川井田みほ、辻川華子、尾島英知、坂元亨宇
2. 発表標題 膵癌組織におけるCD8陽性T細胞浸潤の空間分布・密度解析は精緻な予後予測に有用である
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masugi Y, Abe T, Kitago M, Shinoda M, Sakamoto M
2. 発表標題 CD8+ cell density in the tumor center relates to pancreatic cancer survival differentially by the abundance of CD8+ cell infiltrates in the tumor margin
3. 学会等名 American Pancreatic Association Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 眞杉洋平、藤田優裕、北郷実、北川雄光
2. 発表標題 多発膵管癌の二つの異なる発生病理学的解析
3. 学会等名 第50回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masugi Y, Abe T, Ogawa Y, Sakamoto M
2. 発表標題 Characterization of tumor heterogeneity in pancreatic cancer desmoplastic stroma by multiplex immunohistochemistry-based image analysis
3. 学会等名 USCAP annual Meeting (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----