

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16377

研究課題名(和文) 微小環境の改変による難治性がんに対する治療基盤の構築

研究課題名(英文) Developing integrated approaches for the treatment of refractory tumor microenvironment

研究代表者

中嶋 幸生 (Nakajima, Kosei)

岡山理科大学・獣医学部・講師

研究者番号：80785775

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)：現在のがん診療において、未だ予後不良の癌腫がある。これらは難治性がんと呼ばれ、例を挙げると膵臓がんや骨軟部腫瘍の一部などが含まれる。そのため、これら難治性がんに対する新しい治療方法を見出すことは、当該領域における課題の一つとなっている。特に難治性がんの周囲には特殊な環境が形成されており、既存の治療成果が乏しい原因の一端を担っている。そこで本研究では、臨床データ、病理組織学的解析、初代培養細胞、分子ノ遺伝子解析、バイオインフォマティクス、化合物スクリーニング、担癌マウスなど種々の方法を用い、統合的に解析することによって、難治性がんの特殊な微小環境に作用して有効性を示す可能性のある薬剤を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回得られた成果は、難治性のがんに苦しむ患者さんにとって、治療のための一筋の光明となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Non-curable tumors, including pancreatic cancer and musculoskeletal tumors, remains clinically challenging, and requires the identification of new molecular target that can be therapeutically exploited to improve patient outcome. Here, our studies demonstrate that a candidate molecule shapes the refractory tumor microenvironment through stratified experimental approaches, i.e. clinical patient data, pathological analysis, cell-molecular-genome analysis, bioinformatics, compound screening, and mouse models. The results highlight a drug suggesting a potential therapeutic strategy, "Normalization of tumor microenvironment" for mitigating refractory tumors. Thus, our new outlook suggests delivering a novel treatments, providing a hope to patients afflicted with non-curable tumors.

研究分野：外科関連

キーワード：難治性がん 微小環境 トランスレーショナル・リサーチ

1. 研究開始当初の背景

現在のがん診療において、診断された時点ですでにがんが進行している場合や、早期の段階で診断され手術が実施できたとしても再発や転移のため根治が難しい場合がある。これらはいわゆる難治性がんと呼ばれており、具体的ながん腫としては、一部の悪性骨軟部腫瘍、膵臓がんなどが挙げられる。そのため、これら難治性がんに対する新しい治療方法を見出すことは、当該領域における課題の一つとなっている。特に難治性がんの周囲には特殊な微小環境が形成されており、既存の治療成果が乏しい原因の一端を担っている。そのため、難治性がんにおける微小環境を解明することは新規の治療技術を開発するために重要である。難治性がんの微小環境は、腫瘍細胞のみならず、線維芽細胞、免疫系細胞、血管内皮細胞など、多種類の細胞が構成している。そして、それぞれの細胞がリガンド(分泌因子)・レセプターを介して、多様なコミュニケーションをとっている。そこで、複雑な難治性がんにおける微小環境を可視化し、異常な微小環境を形成している原因分子を同定できないかと考えた。そこで、申請者は国立がん研究センターにおいて、がん線維芽細胞(CAF)などのがん微小環境を形成する約1500種の細胞から網羅的なトランスクリプトームデータを抽出して、ソフトウェアに導入し、難治性がんの微小環境の可視化に成功した [Nakajima K et al, unpublished data]。その結果から、腫瘍血管内皮細胞とリンパ球の有する分子間相互作用に興味深い知見を見出し、本研究において着目することとした。

2. 研究の目的

難治性がんに対しては、特に全身療法の改善が早急の課題であり、本研究においては全身治療の一つである免疫治療をより円滑に作用させる新しいコンセプトの治療法の開発に着手した。免疫応答には、免疫細胞ががん組織内へと透過することが必須であり、がん微小環境中の血管内皮細胞が制御している。本研究の目的は、難治性がんの血管内皮細胞の性質を変化させることにより、抗腫瘍免疫細胞をがん組織内に円滑に輸送する技術を開発することである。

3. 研究の方法

研究計画は次の5段階として開始した。

(1) 第一段階として、国立がん研究センターにおいて切除された難治性がんの手術検体から、腫瘍細胞、腫瘍内の血管内皮細胞、がん関連線維芽細胞、腫瘍内に浸潤したリンパ球などを個別に分離して培養する技術を確立した。

(2) 次に、マイクロアレイによる網羅的発現解析を行い、上記の手法により樹立された腫瘍血管内皮細胞における特徴的な発現プロファイルを明らかにすることを試みた。その結果、正常な血管内皮細胞と比較すると、難治性がんの血管内皮細胞には、パスウェイAの一部の発現が顕著に低下していることが明らかとなった。この所見と一致して、パスウェイAの下流分子であり、リンパ球の接着・透過を促すエフェクター分子Bの発現低下も確認された。これらの所見から、難治性がんにおける分子Bの発現を向上させることによって、目下さまざまに研究されている抗腫瘍活性を有するリンパ球の腫瘍組織内浸潤を促し、既存の免疫治療効果を倍加させることが可能ではないかと我々は仮説を立てた。

(3) 着目した分子Bについて、国立がん研究センターのバイオバンクに登録されている約100例の難治性がんの臨床検体を用いて、解析結果の客観性・信頼性を担保させるため、盲検下において免疫染色を実施した。Kaplan-Meyer生存曲線、並びにLog-rank検定を用いた解析の結果から、難治性がんの血管内皮細胞において、分子Bの発現が低下している患者では生命予後が短縮していることが見出され、一方で、分子Bの発現が上昇している患者では生命予後が延長していることが確認された($p=0.029$)。さらに、単変量/多変量解析(Cox回帰比例ハザード分析)によって、予後因子を検討したところ、独立因子として、分子Bの発現が難治性がんの患者の生存期間に影響を与えることが見出された($p=0.010$)。これらの結果から、分子Bの発現上昇を惹起させる化合物を見つければ、難治性がん罹患した患者の生存期間を延長させる可能性が示唆された。

(4) 上記の研究によって、該当したパスウェイAをターゲットとする化合物のライブラリを企業と協力して網羅的に構築し、スクリーニングすることによって、in vitroの実験系において、リンパ球の腫瘍血管内皮細胞への接着・透過を促進させる化合物Xを同定した。また、この化合物Xは、目的とする分子Bの発現を上昇する薬効があり、in vitroの実験系にて、リンパ球の接着・浸潤を亢進させることを確認した。さらに、網羅的に解析するため、臨床検体から初代培養した腫瘍血管内皮細胞に対して、化合物Xを暴露させた後にRNAを抽出し、現在アレイ解析を

実施している。この解析によって、化合物 X が作用することにより、パスウェイ A に関する分子がどのように変化するのかなどを調査しようと試みている。

(5) 上記の *in vitro* の実験系にて見出された化合物 X について、難治性がんを移植したモデルマウスを作成し、候補化合物 X を投与して治療効果を評価した。主要評価項目として、腫瘍径の変化、腫瘍内に浸潤した CD3+T 細胞数、腫瘍内に浸潤した CD8+T 細胞数、腫瘍内血管内皮細胞における分子 B の発現率、マウス体内における化合物 X 投与後の濃度とクリアランス、などを検討した。その結果、コントロール群と比較して、化合物 X を投与した群では、移植した腫瘍組織は縮小する傾向性を示し、また病理組織学的に分子 B の発現は腫瘍内において高頻度で発現が認められた。その所見に一致して、自動化された画像解析により、コントロール群と比較して、化合物 X を投与した群では、腫瘍内に浸潤した CD3 + 細胞数、CD8+細胞数は増加して観察された。これらの結果から、化合物 X は、分子 B の発現頻度を増加させ、腫瘍内にリンパ球浸潤を促す薬剤として同定された。

4. 研究成果

以上の結果により、本研究では、臨床データ、病理組織学的解析、初代培養細胞、分子 / 遺伝子解析、バイオインフォマティクス、化合物スクリーニング、担癌マウスなど種々の方法を用いて、統合的に解析を行い、難治性がんの特殊な環境に作用して、腫瘍内に免疫系細胞を浸潤させることによって、免疫治療を増強し有効性を示す可能性のある薬剤を同定した。

今後は、難治性がんの治療成績の向上を目指して、既存の免疫治療である免疫チェックポイント阻害剤などの併用することにより、がんに対する免疫応答を最大化させるための臨床応用へ進めたいと考えている。また、今回対象としたがん腫以外にも同様の研究手技にて、有用な薬剤が同定される可能性がある。さらには、術前の放射線治療や化学療法との併用なども考慮に入れて検討を行いたいと考えている。

本研究によって得られた成果が、難治性がんに苦しむ患者さんにとって、治療のための一筋の光明となることを期待したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Nakajima K, Ino Y, Hiraoka N.
2. 発表標題 Characterization of refractory cancer endothelial cells: Approaching to enhance immune cell infiltration for immunotherapy.
3. 学会等名 Forth CRI-CIMT-EATI-AACR international cancer immunotherapy conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakajima K, Ino Y, Nara S, Iwasaki T, Hiraoka N.
2. 発表標題 Neoadjuvant therapy alters collagen architecture of refractory cancer through EFNA5
3. 学会等名 AACR (American Association for Cancer Research) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakajima K, Ino Y, Hiraoka N.
2. 発表標題 Immune landscape of neoadjuvant chemoradiotherapy in refractory cancer
3. 学会等名 ASCO (American Society of Clinical Oncology) (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----