

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07421

研究課題名(和文) 進行期直腸癌の癌免疫監視回避機構による癌幹細胞ニッチ形成を標的とした新規治療戦略

研究課題名(英文) Association of nuclear beta-catenin and PD1/PDL1 expression with cancer stem niche in advanced rectal cancer

研究代表者

高橋 博之 (Takahashi, Hiroyuki)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：60377330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：結腸直腸癌(CRC)におけるPD-1/PD-L1シグナル伝達の免疫学的影響と、局所進行直腸癌における術前補助化学放射線療法(NCRT)に対する耐性との関連性に焦点を当て、NCRTなしの100例のCRC症例(34例の直腸癌(RC)を含む)および109例のNCRT治療進行直腸癌症例の組織病理学および免疫組織化学的分析を行った。間質のPD-L1陽性免疫細胞と核β-カテニン陽性腫瘍簇出像の組み合わせは、免疫抵抗性とCSC特性を示すニッチ様病変の形成を通じて、CRCの腫瘍進行と進行直腸癌に対するNCRTへの抵抗に寄与する可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の進行期直腸癌患者数は5万人で、その予後は術前化学・放射線療法(NCRT)と外科的切除の併用療法により著しく向上したが、依然、NCRT抵抗例も認められる。NCRT抵抗性を示す進行直腸癌では、間質のPD-L1陽性免疫細胞と癌幹細胞化特性を示すニッチ様病変がNCRTへの抵抗に寄与する可能性が示されたことから、NCRTと癌免疫療法の併用はNCRT抵抗性直腸癌の新規治療戦略への展開が期待でき、今後臨床試験などで検討される価値があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We focused on the immunological impact of PD-1/PD-L1 signaling during tumor progression in colorectal carcinoma (CRC) and its association with resistance to neoadjuvant chemoradiotherapy (NCRT) in locally advanced rectal carcinoma (LAd-RC). Histopathological and immuno-histochemical analyses of 100 CRC cases (including 34 RC) without NCRT and 109 NCRT-treated LAd-RC cases were performed. A combination of stromal PD-L1+ immune cells and nuclear β-catenin+ tumor budding may contribute to tumor progression in CRC and resistance to NCRT in LAd-RC, through formation of niche-like lesions that exhibit immune resistance and CSC properties.

研究分野：人体病理学

キーワード：直腸癌 NCRT PD-L1

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の進行期直腸癌患者数は5万人で、その予後は術前化学・放射線療法 (NCRT) と外科的切除の併用療法により著しく向上したが、依然、NCRT 抵抗例も認められる。申請者は先行研究で、この抵抗能獲得に癌細胞の  $\beta$ -カテニン依存性癌幹細胞化機構が関与することを報告した (Takahashi et al, Histopathology 2017)。その後の検索で、癌幹細胞化には、癌・間質因子として PDL1/PD1 による癌免疫監視回避機構が重要である可能性を得た。

様々な診断技術や治療法の開発により、多くの直腸癌患者 (我が国の患者数は5万人) の予後は画期的に改善したが、臨床病期 IV 期の進行期直腸癌の5年生存率は20-30%と依然不良である (Radiother Oncol 2016)。近年、これらの進行期癌に対して術前化学・放射線療法 (以下、NCRT) と外科的切除の併用療法が実施され、一部の症例では癌細胞の完全消失などの驚異的な成績が得られた。一方、自験例では61/109例 (55%) が NCRT 効果の乏しい Grade 1 に分類され、これらの治療抵抗例への対策は喫緊の課題であった。

癌組織の間質には免疫細胞、血管・リンパ管構成細胞、および線維芽細胞などが存在し、これらの間質細胞が様々な液性因子の産生を介して癌幹細胞化を誘導する癌・間質相互作用説がある。また、最近のトピックスとして PDL1/PD1 系を介した癌免疫監視回避説があり、様々な癌細胞や間質細胞が PDL1 を発現して T 細胞性癌免疫を回避する機構が注目されている。そこで、先行実験として、NCRT 施行前後の進行期直腸癌において PDL1/PD1 発現および T 細胞 (CD4, CD8) 浸潤と  $\beta$ -カテニン依存性癌幹細胞化との関連性を検索した。その結果、NCRT 施行前の癌組織では、 $\beta$ -カテニン陽性簇出部 (EMT) に極めて少数の PDL1 陽性癌細胞を認めたが、同簇出部領域を取り囲むように多数の PDL1 陽性間質細胞の集簇による癌免疫不全領域 (癌幹細胞ニッチ) も認めた。NCRT 後、癌間質組織内の PD1/CD8 陽性リンパ球が有意に増加した。NCRT 抵抗例では癌幹細胞ニッチは存続し、ニッチ内の PDL1 陽性癌・間質細胞は増加した。NCRT 治療効果の良好群 (Grade 2) は、不良群 (Grade 1) に比べて PDL1 陽性癌・間質細胞数は有意に低値で、間質の PD1/CD8 陽性リンパ球は治療効果に相関して増加した。

以上から、申請者は、「進行期直腸癌の  $\beta$ -カテニン依存性癌幹細胞領域 (簇出部) は、PDL1 陽性癌・間質細胞より形成される癌免疫不全領域 (癌幹細胞ニッチ) である。NCRT により間質の PD1/CD8 陽性リンパ球が増加するが、NCRT 抵抗例ではそのニッチ内の PDL1 陽性癌・間質細胞も増加する。故に、NCRT と癌免疫療法併用は NCRT 抵抗性直腸癌の新規治療戦略への展開が期待できる」という作業仮説を立案した。

## 2. 研究の目的

進行期直腸癌において、NCRT と癌免疫療法の併用による進行期直腸癌の新規治療戦略を構築することを目的とする。このため、以下の検索を実施する。PDL1 陽性癌・間質細胞により構築される癌幹細胞ニッチの存在を実証する。PDL1 陽性癌・間質細胞が  $\beta$ -カテニン依存性癌幹細胞化機構に及ぼす影響を明らかにする。NCRT 抵抗性と癌幹細胞ニッチとの関連性を解明する。

## 3. 研究の方法

### A. 進行期直腸癌の PDL1 陽性癌・間質細胞と癌幹細胞ニッチの実証

#### 1) $\beta$ -カテニン依存性 EMT と癌幹細胞化の関連性の証明:

<項目> 進行直腸癌の臨床検体で核  $\beta$ -カテニン陽性を示す簇出 (EMT) 部と癌幹細胞化との関連性を検索する。大腸癌培養細胞で HGF や TGF- $\beta$  などの液性因子により誘導される EMT 過程における  $\beta$ -カテニンシグナル系の機能解析。

<方法> 約100例の外科的切除された進行直腸癌検体で、形態的に簇出 (EMT) 部を同定し、 $\beta$ -カテニンおよび各種癌幹細胞関連マーカー (CD133, Sox2, Oct3/4, CD44, ALDH1, Igr5 など) 発現を検索する。DLD1 などの大腸癌培養細胞を EMT 誘導因子 TGF- $\beta$  や HGF で処理して EMT を誘導し、EMT (E-カドヘリン, Snail, Slug, Twist1 など) や  $\beta$ -カテニン系 (TCF4, GSK-3 など) 関連分子マーカーの発現を Real-time PCR 法や Western blot 法で検索する。EMT による癌幹細胞化誘導は Aldefluor アッセイ (癌幹細胞検出法) 及び Spheroid アッセイで検索する。

#### 2) PDL1 陽性癌・間質細胞による癌幹細胞ニッチの形成の証明:

<項目> 癌免疫関連因子発現細胞と癌幹細胞ニッチ形成の関連性の検索。

<方法> A-1 で使用した臨床検体材料を用い、癌免疫関連因子 (PDL1, PD1, CD4, CD8 など) 発現、癌幹細胞ニッチと関連する癌関連線維芽細胞マーカー (SMA, fibroblast activation protein, desmin, fibronectin など) 発現などを検索する。

#### 3) $\beta$ -カテニン依存性 EMT (癌幹細胞) と癌幹細胞ニッチの関連性の証明:

<方法> A-1 で同定した簇出 (EMT) 部と、A-2 で同定した癌幹細胞ニッチとの関連性を、浸潤

間質細胞密度と癌細胞の幹細胞マーカー発現レベルの観点から検索する。PDL1 陽性リンパ球を培養し、これらの細胞の培養液中に過剰分泌されている液性因子を、サイトカイン・キモカイン・アレイキットで検索する。同定できた液性因子を A-2 で作製した癌幹細胞の培養液に加えて  $\beta$ -カテニン系への影響を検索する。

#### B. 進行期直腸癌の癌免疫微小環境の検索

##### 1) 癌免疫微小環境内の増強・抑制因子の同定:

<項目> 進行直腸癌の臨床検体で、癌免疫増強・抑制因子の発現を検出。

<方法> A-1 で使用した臨床検体材料を用い、癌免疫増強因子 (PD1, DAMP など) と癌免疫抑制因子 (PDL1, 癌関連線維芽細胞マーカー, CD68 など) の発現を免疫組織学的手法で同定し病理組織標本上で可視化する。A-3 で同定した液性因子を発現する間質細胞を *in situ* hybridization 法や免疫組織学的手法で同定する。

##### 2) 癌免疫増強・抑制因子の癌・間質細胞への影響:

<項目> 癌免疫増強・抑制因子の発現による癌細胞の形態・機能変化を検索。

<方法> B-1 で同定した癌免疫増強・抑制因子の発現部位における、癌細胞の組織形態変化、 $\beta$ -カテニン発現、増殖能、癌幹細胞関連マーカー発現を検索する。A-3 で同定した液性因子を直腸癌培養液に添加して癌細胞の増殖・浸潤・移動能の変化を検索する。

##### 3) 癌免疫微小環境と NCRT 治療効果との関連性の検索:

<項目> 進行期直腸癌の NCRT 治療による癌免疫環境の変化を検索。

<方法> NCRT + 外科切除療法が施行された約 100 例の臨床検体で、主に免疫組織学的に癌免疫微小環境 (PD1, PDL1, CD8, CD4, CD68 発現) の変化を検索し、NCRT による癌組織の改変効果との比較検討を行う。

#### C. 進行直腸癌の NCRT・癌免疫療法併用による新規治療戦略の策定 (総括):

本研究課題の総決算的な位置づけで、研究項目 A, B の各実験結果より NCRT 抵抗例における癌免疫療法併用の有用性の検討を通じて、進行期直腸癌の新規治療パラダイム構築のための基礎データを集積する。

#### 4. 研究成果

NCRT なしの 100 例の CRC 症例 (34 例の直腸癌 (RC) を含む) および 109 例の NCRT 治療進行直腸癌症例の組織病理学および免疫組織化学的分析を行った。腫瘍の PD-L1 膜発現は、34 例中 1 例 (2.9%) の RC 症例を含む 100 例中 9 例 (9%) の CRC 症例で確認されたが、PD-L1 陽性はミスマッチ修復 (dMMR) 状態を除き、臨床病理学的因子とは関連していなかった。一方、間質の PD-L1 陽性免疫細胞は、頻りに PD-1 と CD8 の同時発現を示し、静脈侵襲、核  $\beta$ -カテニン陽性で癌幹細胞 (CSC) 様の腫瘍簇出像、予後不良と有意に関連していた。進行直腸癌の治療前の生検検体で、間質 CD8 陽性細胞浸潤は、治療効果と関連していた。NCRT 後、腫瘍の PD-L1 発現は、dMMR の状態に関係なく、83 例中 2 例 (2.4%) の腫瘍のみで観察されたが、間質 PD-L1 陽性および腫瘍核  $\beta$ -カテニン陽性は、NCRT に対する反応不良および腫瘍簇出像と有意に関連していました。さらに、高い間質 PD-L1 陽性は、全生存率の低下と有意に関連していた。結論として、間質性 PD-L1 陽性免疫細胞と核  $\beta$ -カテニン陽性腫瘍簇出像の組み合わせは、免疫抵抗性と CSC 特性を示すニッチ様病変の形成を通じて、CRC の腫瘍進行と進行直腸癌に対する NCRT への抵抗に寄与する可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊 都乃, 高橋 博之, 橋村 美紀, 犬飼 円, 信太 昭子, 三枝 信
2. 発表標題 進行期直腸癌の -カテニンとPD1/PDL1による癌幹細胞ニッチ形成の証明
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 渡邊 都乃, 高橋 博之, 橋村 美紀, 犬飼 円, 信太 昭子, 三枝 信
2. 発表標題 進行期大腸癌の -カテニン、PD1/PDL1による癌幹細胞ニッチ形成とNCRT治療効果
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
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	三枝 信  (Saegusa Makoto)  (00265711)	北里大学・医学部・教授    (32607)	

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