

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09136

研究課題名(和文)放射線照射により胃がん幹細胞に生じる免疫学的プロファイルの変化

研究課題名(英文)Changes in the immunological profile of gastric cancer stem cells due to irradiation

研究代表者

熊谷 厚志(KUMAGAI, Koshi)

公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・医長

研究者番号：40383848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞への放射線照射の影響を調べるために、胃癌患者由来細胞株に放射線を照射し、PD-L1(Programmed cell Death 1-Ligand 1)や免疫応答・炎症関連の遺伝子の発現変化を比較した。低分化腺癌に由来する細胞株では、照射前のPD-L1発現細胞の比率は4.8%であったが、8Gyの照射によって75%にまでPD-L1発現が誘導された。一方、中分化腺癌より樹立された細胞株は、照射前のPD-L1発現率が17%であり、8Gyの照射によってもPD-L1発現率は28%までにしか上昇しなかった。放射線照射によるPD-L1発現と組織型、予後等の関連を今後さらに検討して行く予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、放射線照射によってがん免疫にかかわる細胞表面マーカーの代表であるPD-L1(Programmed cell Death 1-Ligand 1)の発現がどのように変化するかを検討した。その結果、放射線照射によって胃がん細胞のPD-L1発現は増強するが、その程度は組織型によって異なる可能性が示唆された。免疫チェックポイント阻害薬と放射線療法の併用によって腫瘍縮小効果が増強する機序の解明につながる、興味深い知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the effects of radiation on cancer stem cells, we irradiated We cell lines derived from gastric cancer patients and compared changes in the expression of PD-L1 (Programmed cell Death 1-Ligand 1) and genes related to immune response. In cell lines derived from poorly differentiated adenocarcinoma, the proportion of PD-L1 expressing cells before irradiation was 4.8%, but it went up to 75% by irradiation of 8 Gy. On the other hand, the cell line established from the moderately differentiated adenocarcinoma had a PD-L1 expression rate of 17% before irradiation, and it was 28% even after irradiation of 8 Gy. We plan to further investigate the relationship between PD-L1 expression by irradiation and histological type, prognosis, etc. in the future.

研究分野：癌

キーワード：胃癌 癌幹細胞 放射線

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、がん治療における免疫チェックポイント阻害薬と放射線療法の相乗効果に関する基礎および臨床研究が盛んに行われており、"abscopal 効果=照射を受けていない転移巣における腫瘍縮小効果"がその根拠となっている。

一方、がん幹細胞はがんの転移・再発や抗がん剤耐性に関与するとされ、がん幹細胞の根絶ががん克服のカギを握ると考えられているが、放射線治療と免疫チェックポイント阻害薬の併用療法におけるがん幹細胞の動態に関しては、基礎、臨床研究いずれについても確立した知見が報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、胃がんにおいて、放射線照射によってがん幹細胞に生じる免疫学的プロファイルの変化を解析し、免疫チェックポイント阻害薬と放射線療法の相乗効果におけるがん幹細胞の関わりを探ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、胃がん、特にそのがん幹細胞分画において、放射線照射が免疫学的プロファイルにどのような変化をもたらすかを明らかにするために、以下の方法で研究を進めた。

(1)胃がん細胞とそのがん幹細胞分画における PD-L1 および MHC クラス I 分子発現等の検討

患者腫瘍由来胃がん細胞を樹立し、それらの細胞やその中に存在するがん幹細胞分画における PD-L1 (Programmed cell Death 1- Ligand 1) 発現率を比較した。また、遺伝子発現プロファイリングを行い、MHC クラス I 抗原、がんの免疫応答へ寄与する各種サイトカインの発現も検討した。

(2) 胃がん細胞とそのがん幹細胞分画における放射線照射後の PD-L1 および MHC クラス I 分子発現等の変化

胃がん細胞、特に、がん幹細胞分画に対して放射線を照射した後、それぞれの分画での PD-L1 発現の変化を観察する。同様に、がん幹細胞における放射線照射による MHC クラス I および各種サイトカイン等の発現の関連を調べるため、フローサイトメトリーで分離された CD44v 陽性細胞と陰性細胞分画に対して放射線を照射した後、それぞれの分画での各種因子の発現変化を遺伝子発現プロファイリングにより解析した。

(3)患者検体による治療効果とがん幹細胞およびがん幹細胞由来免疫制御因子との相関分析

(2)までの解析により、放射線療法の癌幹細胞への作用を基軸として、放射線療法と免疫チェックポイント阻害薬の併用療法の proof of concept を獲得する。これらの基礎データに基づき、進行胃がん患者に対する免疫化学放射線療法の臨床試験を計画する。特に、基礎実験により示された放射線によるがん幹細胞への免疫学的プロファイルへの作用と治療効果との関連については、患者組織検体を用いて検討する。

4. 研究成果

(1) がん細胞とそのがん幹細胞分画における PD-L1 および MHC クラス I 分子発現等の検討

胃がん手術検体より、患者由来胃がん細胞 (Patient-derived cells)を 5 株樹立した(Mashima, Kumagai et al. Br J Cancer 2019, Kawakami, Mashima, Kumagai et al. Cancer Sci 2020)。樹立された患者由来胃がん細胞より、胃がん幹細胞マーカーとして知られる CD44v 陽性および陰性細胞をフローサイトメトリーにより分離した。CD44v 陽性細胞は、各種制がん剤暴露後に残

存する薬剤抵抗性細胞であり、CD44v 分子が抵抗性に寄与することが確認された (Mashima, Kumagai et al. Br J Cancer 2019)。

また、CD44v 陽性細胞と陰性細胞における網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、CD44v 陽性細胞においては、免疫細胞による攻撃に必要な MHC class I 抗原発現が全般に陰性細胞より低いことが示された。

さらに、患者由来胃がん細胞において、シングルセル解析を行い、治療後に残存する薬剤耐性と最もリンクする新たながん幹細胞マーカー分子として ALDH1A3 を同定した。ALDH1A3 は、アルデヒド脱水素酵素の 1 つであり、がん幹細胞マーカーの 1 つと考えられている。ALDH1A3 高発現細胞と低発現細胞での免疫応答関連因子発現を調べると、免疫応答関連因子の誘導に関わる炎症応答遺伝子は、ALDH1A3 高発現細胞で照射前から高発現だった。また、T cell などでの認識に関わる HLA 抗原の一部も、同様に ALDH1A3 高発現細胞で照射前から高発現であった。

(2) 胃がん細胞とそのがん幹細胞分画における放射線照射後の PD-L1 および MHC クラス I 分子発現等の変化

まず、各種胃がん細胞株における PD-L1 発現を調べたところ、細胞株間で発現に差があり、また同一細胞株内でも陽性、陰性細胞の不均一性が見出された。このうち、比較的 PDL-1 発現を有する細胞株において、放射線照射後に PD-L1 発現が増強することが確認された。

次に、我々が樹立した複数の患者由来胃がん細胞で放射線照射後の PD-L1 誘導の比較検討を行った。その結果、放射線照射による PD-L1 の誘導には、細胞間での差が大きいことが分かった。組織学的には低分化腺癌に由来する JSC177 細胞では、照射前の PD-L1 発現細胞の比率は 4.8%であったが、8Gy の照射によって 75%にまで PD-L1 発現が誘導された。一方、中分化腺癌より樹立された JSC181 細胞は、照射前の PD-L1 発現率が 17%であり、8Gy の照射によっても PD-L1 発現率は 28%までにしか上昇しなかった。

さらに、患者由来胃がん細胞から分離された ALDH1A3 高発現細胞および低発現細胞における遺伝子発現解析と免疫応答関連因子の発現プロフィールを検討した。我々は、胃がん細胞株 JSC153 を ALDH1A3 高発現細胞と低発現細胞に分け、それぞれに対し放射線を照射し、PD-L1 や免疫応答・炎症関連の遺伝子の発現変化を比較した。今回用いた JSC153 においては全体的に PD-L1 発現が低く、ALDH1A3 高発現細胞、低発現細胞いずれにおいても放射線照射によって PD-L1 の発現は誘導されなかった。一方、免疫応答関連因子の誘導に関わる炎症応答遺伝子は、ALDH1A3 高発現細胞で照射前から高発現であり、放射線照射により発現がさらに増強した。また、T cell などでの認識に関わる HLA 抗原の一部も、同様に ALDH1A3 高発現細胞で照射前から高発現であり、放射線照射により発現がさらに増強した。

放射線照射による PD-L1 発現と組織型、予後等の関連について、今後より包括的に検討して行く予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 Mashima Tetsuo, Iwasaki Risa, Kawata Naomi, Kawakami Ryuhei, Kumagai Koshi, Migita Toshiro, Sano Takeshi, Yamaguchi Kensei, Seimiya Hiroyuki	4. 巻 121
2. 論文標題 In silico chemical screening identifies epidermal growth factor receptor as a therapeutic target of drug-tolerant CD44v9-positive gastric cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 846 ~ 856
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-019-0600-9	査読の有無 無
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 Kawakami Ryuhei, Mashima Tetsuo, Kawata Naomi, Kumagai Koshi, Migita Toshiro, Sano Takeshi, Mizunuma Nobuyuki, Yamaguchi Kensei, Seimiya Hiroyuki	4. 巻 111
2. 論文標題 ALDH1A3 mTOR axis as a therapeutic target for anticancer drug tolerant persister cells in gastric cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 962 ~ 973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14316	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 馬島哲夫、川上隆兵、熊谷厚志、右田敏郎、佐野武、山口研成、清宮啓之
2. 発表標題 制がん剤処理後の残存胃がん細胞におけるマーカーおよび治療標的としてのALDH1A3
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬島哲夫、岩崎里紗、川上隆兵、熊谷厚志、右田敏郎、佐野武、山口研成、清宮啓之
2. 発表標題 EGFR阻害剤による胃がん薬剤抵抗性CD44v発現細胞の増殖抑制とイリノテカンによる治療効果の増強
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
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
研究分担者	若槻 尊 (WAKATSUKI Takeru) (60443876)	公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器内科・医長 (72602)	削除：2020年3月9日
研究分担者	馬島 哲夫 (MASHIMA Tetsuo) (30311228)	公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子生物 治療研究部・主任研究員 (72602)	
研究分担者	山口 研成 (YAMAGUCHI Kensei) (10321845)	公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器化学療法科・部 長 (72602)	
研究分担者	佐野 武 (SANO Takeshi) (30215884)	公益財団法人がん研究会・有明病院・病院長 (72602)	

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