

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23893

研究課題名（和文）甲状腺濾胞癌の発生と進行に關与する免疫的癌微小環境特性の同定

研究課題名（英文）Identification of tumor immune microenvironment properties involved in the development and progression of follicular thyroid carcinoma

研究代表者

大村 学 (ohmura, gaku)

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：20516182

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、甲状腺濾胞癌の発生・進行に関わりうる免疫的機序を組織内免疫細胞分布を調べることで解析し、甲状腺濾胞癌の早期診断や発癌機序の解明に寄与する組織バイオマーカーの確立を目的とした。当初の計画通り、濾胞癌巣内と周囲非癌部における免疫的微小環境の検討し、多重免疫染色ならびにデジタル画像解析による定量化を行った。濾胞癌の被膜浸潤部における特異な免疫的微小環境特性の存在が示唆された。さらに、濾胞癌の皮膜浸潤部における免疫的微小環境特性を解析し、腫瘍中心部や非浸潤辺縁部との差異を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本手法の原法は1978年に報告されているが(Tramu G et al. J Histochem Cytochem 1978)、様々な染色・抗体除去手順の最適化やデジタル画像解析技術の併用で、従来の方法では実現困難であった低コストでの多重染色技術を確立した。本研究では甲状腺濾胞癌の皮膜浸潤部における免疫微小環境特性を解析し、腫瘍中心部や非浸潤辺縁部との差異を確認した。これらの解析を進めることで、甲状腺濾胞癌の早期診断や発癌機序の解明に寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the immune mechanisms that may be involved in the development and progression of thyroid follicular carcinoma by examining the distribution of immune cells in tissues, and aimed to establish tissue biomarkers that may contribute to the early diagnosis and elucidate the carcinogenic mechanism of thyroid follicular carcinoma. As originally planned, we examined the immune microenvironment in follicular carcinoma nests and surrounding non-cancer areas, and quantified it by multiple immunostaining and digital image analysis. The results suggested the existence of specific immune microenvironmental properties in the invasive margin of the follicular carcinoma. Furthermore, we analyzed the properties of the immune microenvironment in the invasive margin of the follicular carcinoma and confirmed the differences between the tumor center and the non-invasive margin.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：甲状腺癌 甲状腺濾胞癌 イメージング 腫瘍免疫 バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

甲状腺癌症例の多くは緩徐で予後良好な経過を示す一方、転移・再発により追加治療を要する症例も存在し、リスクの層別化が切除範囲を含めた治療最適化の上で課題となっている。我々はこれまでに、甲状腺乳頭癌の腫瘍組織内部の免疫特性が周囲非癌部と異なることや、病理学的侵襲性と骨髄系免疫細胞の細胞密度に相関がみられることから、甲状腺癌の発生・進行に免疫的機序が関与する可能性を報告してきた(Means et al. Head Neck, 2019)。

甲状腺良性結節の臨床管理上の課題に濾胞癌の鑑別があり、濾胞癌は腫瘍被膜外進展や血管浸潤像などの病理学的組織侵襲性に基づいて定義する必要があり、術前診断が極めて難しいことが挙げられる。我々の先行研究により甲状腺乳頭癌の進行に免疫的癌微小環境の寄与が示された一方、甲状腺濾胞癌については癌の悪性形質と宿主由来の免疫・組織細胞で構成される癌微小環境の解析はこれまで行われていない。癌細胞の悪性形質とその組織上での偏りと免疫細胞の分布・組成・性質を含む癌微小環境の特性の両者を同一組織上で同時に解析できれば、甲状腺濾胞癌の早期診断や発癌機序の解明に寄与する組織バイオマーカー確立につながり得る。

## 2. 研究の目的

上記の課題に取り組むべく、我々は従来の免疫組織化学手法を改良し、1枚のパラフィン包埋ホルマリン固定(FFPE)切片で12マーカーを解析可能な多重免疫組織化学法を構築した(Tsujikawa et al. Cell Reports 2017)。本手法は1978年に報告された原法(Tramu G et al. J Histochem Cytochem 1978)をもとに、染色・抗体除去手順の最適化やデジタル画像解析技術の併用で、従来の方法では実現困難であった低コストでの多重染色技術を確立した。さらにこの手法に対応して、単一細胞ごとの信号強度を測定し、フローサイトメトリー様に定量化するデジタル画像解析法を開発した。切片1枚あたり、リンパ球系、骨髄系あるいは機能状態に関するマーカーを12項目ずつ解析できるため、3枚のFFPE切片で、癌組織中の各種T細胞、B細胞、NK細胞、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球などの14種類の免疫細胞の細胞数、組成、機能状態が網羅的に分析可能となった(Tsujikawa et al. Cell Reports 2017)。本手法の染色手技は通常の免疫染色を発展させたものであり、古典的な免疫染色と費用・設備・手技的に同等である一方、手術や生検組織からの限られた量のFFPE切片から豊富な情報を取得できる。また、従来の技術であるフローサイトメトリーやRNAseqでは極めて困難であったが、本手法では組織構造を保ったまま単一細胞レベルで細胞の位置情報や分布が解析可能なことから、今後の組織バイオマーカーの解析手段として有用と考えられる。

本研究では、上記の手法の新規性と優位性に基づいた独自性と創造性を活かして、バイオマーカーにつながる甲状腺濾胞癌の免疫的癌微小環境の特性解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### 1. 濾胞癌巢内と周囲非癌部における免疫的微小環境の検討 (Discovery cohort)

甲状腺濾胞癌症例20例をDiscovery cohortとし、Means et al Head Neck, 2019で確立した甲状腺癌免疫解析パネルを用いて、CD8陽性T細胞、ヘルパーT細胞、制御性T細胞、B細胞、NK細胞、マクロファージ、樹状細胞、肥満細胞など免疫細胞の細胞密度・組成を調べ、癌部と非癌部における免疫的微小環境の差異を検討する。また、同一患者内における良性結節との差異も検討し、濾胞癌の進行や浸潤に関与する病態を検討する。

### 2. 濾胞癌微小浸潤例における浸潤先進部の免疫的微小環境解析

多重免疫染色法で位置情報の解析が可能であることを活用し、上記で解析した検体で腫瘍被膜浸潤部における免疫的微小環境を解析し、腫瘍中心部や非浸潤辺縁部との差異の有無を検討する。

### 3. 濾胞癌形成に関わる免疫的微小環境因子の検討 (Validation cohort)

上記 1-2 で得られたデータを解析し、癌の内部や浸潤部形成に關与する免疫細胞種を同定し、Validation cohort(50-100 症例)で検証を行う。この中で、利用可能な血管浸潤性、リンパ節転移、後発遠隔転移の有無や予後情報との相関も検討する。解析結果に基づき、甲状腺濾胞癌の診断や新規治療に關連する組織バイオマーカーの同定を行う。

#### 4 . 研究成果

平成 31 年度は Discovery cohort を用いて濾胞癌巢内と周囲非癌部における免疫的微小環境の検討し、甲状腺濾胞癌症例 21 例において多重免疫染色ならびにデジタル画像解析による定量化を完了した。濾胞癌の被膜浸潤部における特異な免疫的微小環境特性の存在が示唆され、Validation cohort での解析に向けた基盤的データを取得した。令和 2 年度には、Validation cohort を用いて、濾胞癌の皮膜浸潤部における免疫的微小環境特性を解析し、腫瘍中心部や非浸潤辺縁部との差異を確認した。これらの研究成果の一部を第 43 回・第 44 回日本頭頸部癌学会等で発表し、共著論文 1 編を報告した。

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 0件）

1. 著者名 辻川敬裕, 吉村佳奈子, 光田順一, 佐分利純代, 竹中まり, 大村 学, 新井啓仁, 荻 寛志, 宮川 文, 小西英一, 伊東恭子, 平野 滋	4. 巻 45
2. 論文標題 免疫的癌微小環境解析を通じた頭頸部癌薬物療法の治療効果予測	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 頭頸部癌	6. 最初と最後の頁 362-365
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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14件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉村佳奈子, 辻川敬裕, 光田順一, 佐分利純代, 竹中まり, 大村 学, 新井啓仁, 平野 滋
2. 発表標題 頭頸部癌微小環境におけるヘルパー T 細胞の腫瘍内局在と予後の影響の検討
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 光田順一, 辻川敬裕, 吉村佳奈子, 佐分利純代, 竹中まり, 大村 学, 新井啓仁, 平野 滋
2. 発表標題 組織バイオマーカーのメタアナリシスに基づいた頭頸部扁平上皮癌の悪性形質の解析
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐分利純代, 吉澤宏一, 吉村佳奈子, 光田順一, 辻川敬裕, 竹中まり, 大村 学, 新井啓仁, 杉山庸一郎, 平野 滋
2. 発表標題 下咽頭癌に対する経口切除後の嚥下障害症例の検討
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新井啓仁, 竹中まり, 吉村佳奈子, 光田順一, 佐分利純代, 大村 学, 辻川敬裕, 杉山庸一郎, 平野 滋
2. 発表標題 術前化学療法として PCE 療法を施行した口腔癌症例の検討
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大村 学, 為野仁輔, 森 大地
2. 発表標題 当科における甲状腺腫瘍手術症例の検討
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本 藍, 光田 順一, 吉村 佳奈子, 佐分利 純代, 高島 康利, 北條 智人, 菌部 優大, 村田 晋一, 岸本 光夫, 小西 英一, 竹中 まり, 大村 学, 辻川 敬裕, 新井 啓仁, 平野 滋
2. 発表標題 頸部に発生した異所性胸腺腫の1例
3. 学会等名 第133回日耳鼻京滋合同地方部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊田拓司, 大村 学, 川勝大河, 吉村佳奈子, 光田順一, 佐分利純代, 小西博貴, 塩崎 敦, 藤原 斉, 竹中まり, 辻川敬裕, 新井啓仁, 平野 滋
2. 発表標題 遊離空腸再建症例における術後経口摂取状況とリスク因子の検討
3. 学会等名 第134回日耳鼻京滋合同地方部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新井啓仁, 光田順一, 吉村佳奈子, 佐分利純代, 大村 学, 竹中まり, 辻川敬裕, 平野 滋
2. 発表標題 術前PCE療法による舌癌縮小手術の可能性
3. 学会等名 第30回日本頭頸部外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 大地, 宗川亮人, 大村 学, 為野仁輔, 山本 聡
2. 発表標題 術中経食道エコーが誘引となった声門下肉芽腫の2例
3. 学会等名 第30回日本頭頸部外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻川敬裕, Grace Banik, 光田順一, 吉村佳奈子, 佐分利純代, 竹中まり, 大村 学, 新井啓仁, Daniel R. Clayburgh, Lisa M. Coussens, 平野 滋
2. 発表標題 化学放射線治療後の局所再発と相関する頭頸部癌免疫的微小環境特性の解析
3. 学会等名 第30回日本頭頸部外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大村 学, 川勝大河, 光田順一, 吉村佳奈子, 佐分利純代, 竹中まり, 辻川敬裕, 新井啓仁, 平野 滋
2. 発表標題 遊離空腸再建症例52例における術後合併症とリスク因子の検討
3. 学会等名 第30回日本頭頸部外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐分利純代, 新井啓仁, 吉村佳奈子, 光田順一, 竹中まり, 大村 学, 辻川敬裕, 平野 滋
2. 発表標題 頭頸部神経鞘腫の手術症例の検討
3. 学会等名 第30回日本頭頸部外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 光田順一, 辻川敬裕, 吉村佳奈子, 佐分利純代, Machuca Ostos Mercedes, 竹中まり, 大村 学, 新井啓仁, 平野 滋
2. 発表標題 頭頸部癌メタ解析に基づく癌細胞多重免疫染色パネルによる悪性形質・腫瘍不均一性の検討
3. 学会等名 第44回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Machuca Ostos Mercedes, 辻川敬裕, 光田順一, 吉村佳奈子, 佐分利純代, 竹中まり, 大村 学, 新井啓仁, 平野 滋
2. 発表標題 Intratumoral T cell characterization for identification of biomarkers in head and neck cancer
3. 学会等名 第44回日本頭頸部癌学会
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

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