

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03752

研究課題名(和文) 胃癌腫瘍免疫微小環境における3次リンパ構造の成熟機構の解明と抗体取得

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of maturation of tertiary lymph structure in gastric cancer tumor immune microenvironment and identification of the therapeutic antibodies

研究代表者

掛地 吉弘 (Kakeji, Yoshihiro)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：80284488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：TLSの構造・成熟度の解析を行い、一定の成果を得ている。TLSの構造解析に関しては、胚中心B細胞などが成熟度とその存在が関連し、CD27+B細胞が候補として同定された。次に、腫瘍由来B細胞からの抗体取得に関しては、抗体情報を取得する新技術Ecobody法を用いた。TAB表現型情報を用いて、手術時に胃癌切除組織を選別し、セルソーティング法を用いて TLS-TABを単離抽出し、Ecobody法にて抗体情報を取得する。取得された抗体は胃癌細胞株への結合能をELISA法で測定し、スクリーニングを行った。胃癌組織内 TAB から抽出した抗体の胃癌反応性モノクローナル抗体の取得に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌に関しては包括的解析データを用いてびまん浸潤性胃癌の特定抗原を標的とした抗体を取得し、さらにトランスクリプトーム解析で再評価することで腫瘍に対する増殖抑制効果を持つ抗体の同定に成功した報告がある。一方、我々はTAB網羅的解析データを基盤にTLS解析に伴う戦略を立てた。これまでTLSは予後予測因子として注目されたが、免疫チェックポイント阻害剤のTLSがバイオマーカーであることが示された。形態学的な解析を含めたTLSの成熟とB細胞の関連を詳細に行っている研究は少なく、この手法でのB細胞取得での類を見ない点、抗体取得の成功例として意義がある。

研究成果の概要(英文)：The analysis of the structure and maturity of TLS has been conducted, and a certain amount of results have been obtained. About the structural analysis of TLS, embryonic center B cells and other cells were associated with maturity and their presence, and CD27+ B cells were identified as a candidate.

Next, for the acquisition of antibodies from tumor-derived B cells, we used the Ecobody method, a new technology for acquiring antibody information: using TAB phenotype information, gastric cancer resection tissue is selected at the time of surgery, TLS-TAB is isolated and extracted using a cell sorting method, and antibody information is acquired by the Ecobody method. The acquired antibodies were screened by measuring their binding ability to gastric cancer cell lines using ELISA. Gastric cancer reactive monoclonal antibodies were successfully obtained for antibodies extracted from TABs in gastric cancer tissues.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌 三次リンパ構造 抗体取得 B細胞 抗体薬剤複合体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胃癌の治療成績は胃癌の全病期での5年生存率は、約半世紀で37.5%(1963年)から70.1%(2008年)と大きく上昇したが、StageIVに限ると7.8% 12.5%であった。新規医薬剤の開発は進んだが、満足できるものではないのが現状である。現在、免疫チェックポイント阻害剤の台頭により、消化器癌の腫瘍免疫微小環境の解析が劇的に進行している。免疫チェックポイント阻害剤を中心とした免疫療法の進歩は、悪性黒色腫や非小細胞性肺癌などに良好な治療効果をもたらしたが、固形癌の大半を占める消化器癌の治療効果は、不十分である。一方で、腫瘍の制御や免疫療法の効果は、多様な免疫細胞と腫瘍局所微小環境における腫瘍細胞と他の全ての細胞との相互作用(腫瘍免疫微小環境 Tumor immune microenvironment : TIME) によって規定されるとされ、The Cancer Genome Atlas(TCGA)などのビッグデータと新規の解析ツールにより、各癌腫の TIME 組成や機能を正確に定量化し、ヒト TIME の詳細な情報をもたらした。我々も食道癌、直腸癌、胃癌についての術前治療後 TIME を解析し、術前治療と免疫チェックポイント阻害剤の併用の可能性について検討している。

2. 研究の目的

本研究における目的は、胃癌 TLS 成熟度解析、胃癌術前化学療法後の TLS の変化と治療効果、胃癌 (NAC なし/あり) TAB サイトカイン、ケモカイン及び microRNA の測定と機能解析、胃癌 (NAC なし/あり) TAB 由来取得抗体の機能的スクリーニング、である。

3. 研究の方法

胃癌 TLS の構造・成熟度の解析

1) NAC なし/あり手術標本 TLS の形態学的成熟度分析/深層学習アルゴリズムを用いた迅速診断法の確立 2012-2018 年度胃癌手術標本 (NAC なし約 300 例、NAC あり約 50 例) の成熟度解析を深層学習アルゴリズムで行う。TLS、GC については構造認識が可能であり、成熟度マーカーで行う。

2) NAC なし/あり標本 TLS 成熟因子の解析分析 TLS 関連発現シグナチャーの測定を行う。これらを相補的に検討し、形態学的な TLS の成熟度診断のシステムを構築する。

3) TLS の成熟度と予後の解析 予後との相関、NAC 例には治療効果との相関を検討する。胃癌手術検体からの TLS 成熟度分析による B 細胞取得 (前向き研究) の研究成果を基に、組織採取後、迅速に TLS 成熟度判定を行い、保存した腫瘍組織より TLS 抽出、分離し、単一 B 細胞ソーティングで採取する。NAC なし/あり手術例で 20 例/10 例を目安に行う。対照として、正常組織由来 B 細胞を採取しておく。

胃癌 TAB (Tumor-associated B lymphocytes) の機能解析

1) 採取した B 細胞の RNA シークエンスを行う。2) microRNA、サイトカイン、ケモカインの発現解析と取得された microRNA の機能解析を行う。

胃癌特異的抗体同定プロセスの確立と最適化 1) 単一採取 B 細胞を Ecobody 法で取得する。第一スクリーニングとして、組織切片で免疫染色を行い、抗体 affinity を評価する。

2) 抗体スクリーニング 診断抗体スクリーニングとして、取得抗体ライブラリーを作成し、患者血清をマルチプレックスアッセイシステムで抗体価を測定する。患者予後を対比させ、病態管理や予後予測に使用できるか否かを検討する。治療抗体スクリーニングとして、治療効果は、1) 直接的な抗腫瘍効果 2) NK 細胞主体 ADCC 活性を検討する。1) は、胃癌、大腸癌、膵癌細胞株の抗体 affinity を抗体ライブラリーと、細胞株、及び患者由来がん細胞を用いたハイコンテンツスクリーニング法でスクリーニングを行う。さらに、Xenograft/ Patient-derived Xenograft モデル及びオルガノイド培養にて直接的な増殖・細胞死に関連する機能を評価する。2) ADCC reporter assay でスクリーニングを行う。判定を行う。以上のアッセイを用いて抗体スクリーニングに関するプロセスを最適化していく。

4. 研究成果

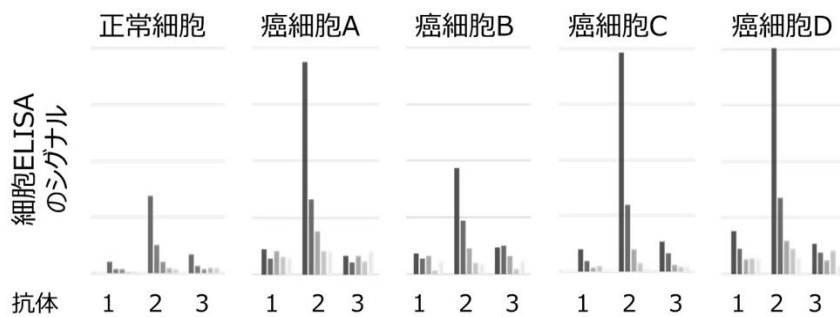
TLS の構造・成熟度の解析

TLS の構造解析に関しては、B 細胞の染色 (CD20)、胚中心 B 細胞 (Bcl6)、濾胞ヘルパー T 細胞の染色 (Bcl6-CD4) などにより成熟度とその存在が関連していることが明らかとなった。TLS の一定の成熟度があるのは、胚中心形成が存在するものであり、CD27+B 細胞が候補として同定された。

腫瘍由来 B 細胞からの抗体取得

モノクローナル抗体は特定の抗原決定基 (エピトープ) を認識し結合する単一の抗体である。昨今の目覚ましい創薬成果はそのモノクローナル抗体医薬であり、それを下支えるのが抗体情報取得技術の発展である。中でも迅速で網羅的な手法として優れているのが、B 細胞から抗体情報を取得する新技術として開発した Ecobody 法である。本法は抗体採取の取りこぼしが少なく、行程の迅速化/自動化が可能という特徴を持つ。これまでの成果として、胃癌切除組織か

らの胃癌反応性モノクローナル抗体を抽出している。本研究では、上記 TAB 表現型情報を用いて、手術時に胃癌切除組織を選別し、セルソーティング法を用いて TLS-TAB を単離抽出し、Ecobody 法にて抗体情報を取得する。取得された抗体は胃癌細胞株への結合能を ELISA 法で測定し、スクリーニングを行った。胃癌組織内 TAB から抽出した抗体に関して、胃癌細胞株に発現し、正常細胞に発現していない胃癌反応性モノクローナル抗体の取得に成功した。



取得抗体の機能解析

現在、取得抗体の機能解析を進めている。標的抗原の IP/MS 解析は終了し、タンパク結合解析を終了している。

また、胃癌組織における免疫染色を行い、予後解析を進めている。

抗体薬剤複合体作成とその機能評価

抗体薬剤複合体を作成し、細胞株を免疫不全マウスに移植し、治療効果を判定した。現在のところ、解析中であるが、一部に有望な抗体を確認しているが、その詳細に関しては、今後の報告としたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shibuya Naoki, Kakeji Yoshihiro, Shimono Yohei	4. 巻 111
2. 論文標題 MicroRNA 93 targets WASF3 and functions as a metastasis suppressor in breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2093 ~ 2103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14423	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 Ikeda Taro, Nishita Michiru, Hoshi Kyoka, Honda Takashi, Kakeji Yoshihiro, Minami Yasuhiro	4. 巻 111
2. 論文標題 Mesenchymal stem cell derived CXCL16 promotes progression of gastric cancer cells by STAT3 mediated expression of Ror1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1254 ~ 1265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14339	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 Koide Takahiro, Koyanagi-Aoi Michiyo, Uehara Keiichiro, Kakeji Yoshihiro, Aoi Takashi	4. 巻 25
2. 論文標題 CDX2-induced intestinal metaplasia in human gastric organoids derived from induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104314 ~ 104314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104314	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 SUZUKI SATOSHI, URAKAWA NAOKI, HASEGAWA HIROSHI, KANAJI SHINGO, YAMASHITA KIMIHIRO, MATSUDA TAKERU, OSHIKIRI TARO, KAKEJI YOSHIHIRO	4. 巻 42
2. 論文標題 Prognostic Predictors After Surgical Intervention for Stage IV Gastric Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1541 ~ 1546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15627	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 TAKAI RYO, FUNAKOSHI YOHEI, SUTO HIROTAKA, NAGATANI YOSHIKI, IMAMURA YOSHINORI, TOYODA MASANORI, YAKUSHIJIN KIMIKAZU, KIYOTA NAOMI, HARADA KEN-ICHI, YAMASHITA KIMIHIRO, KAKEJI YOSHIHIRO, MINAMI HIRONOBU	4. 巻 41
2. 論文標題 Serum Soluble Interleukin-2 Receptor as a Potential Biomarker for Immune-related Adverse Events	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1021 ~ 1026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.14857	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 Okamoto Daiki, Yamauchi Natsuko, Takiguchi Gosuke, Nishita Michiru, Kakeji Yoshihiro, Minami Yasuhiro, Kamizaki Koki	4. 巻 27
2. 論文標題 Autonomous and intercellular chemokine signaling elicited from mesenchymal stem cells regulates migration of undifferentiated gastric cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 368 ~ 375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12933	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 Yamada Kota, Saito Masafumi, Ando Masayuki, Abe Tomoki, Mukoyama Tomosuke, Agawa Kyosuke, Watanabe Akihiro, Takamura Shiki, Fujita Mitsugu, Urakawa Naoki, Hasegawa Hiroshi, Kanaji Shingo, Matsuda Takeru, Oshikiri Taro, Kakeji Yoshihiro, Yamashita Kimihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Reduced Number and Immune Dysfunction of CD4+ T Cells in Obesity Accelerate Colorectal Cancer Progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 86 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12010086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	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 山田 康太、斎藤 雅史、山下 公大、安藤 正恭、阿部 智喜、向山 知佑、阿河 杏介、裏川 直樹、後藤 裕信、長谷川 寛、金治 新悟、松田 武、押切 太郎、掛地 吉弘
2. 発表標題 大腸癌におけるCD4陽性T細胞の抗腫瘍免疫に及ぼす肥満の影響
3. 学会等名 第33回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下 公大、長坂 暢、阿河 杏介、阿部 智喜、高村 史記、澤田 隆一郎、長谷川 寛、金治 新悟、松田 武、押切 太郎、掛地 吉弘
2. 発表標題 第35回日本バイオセラピー学会学術集会総会
3. 学会等名 AI イメージサイトメトリーを用いた直腸癌術前化学放射線療法の腫瘍 CD8+T 細胞の新たな評価法の開発
4. 発表年 2022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	中野 秀雄 (Nakano Hidieo) (00237348)	名古屋大学・生命農学研究科・教授 (13901)	
研究分担者	青井 貴之 (Aoi Takashi) (00546997)	神戸大学・科学技術イノベーション研究科・教授 (14501)	
研究分担者	藤田 貢 (Fujita Mitsugu) (40609997)	近畿大学・医学部・准教授 (34419)	
研究分担者	岡田 誠治 (Okada Seiji) (50282455)	熊本大学・ヒトレトロウイルス学共同研究センター・教授 (17401)	
研究分担者	向山 順子 (Mukohyama Junko) (70734987)	神戸大学・医学研究科・医学研究員 (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山下 公大 (Yamashita Kimihiro) (80535427)	神戸大学・医学部附属病院・特命准教授 (14501)	
研究分担者	高村 史記 (Takamura Shiki) (90528564)	近畿大学・医学部・講師 (34419)	

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