

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07408

研究課題名(和文)胆嚢癌におけるCD1a陽性樹状細胞の免疫応答メカニズムと直接相互作用機序の解明

研究課題名(英文) Immune response and direct interaction of CD1a-positive dendritic cells in gallbladder cancer

研究代表者

甲斐 敬太 (Kai, Keita)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：60516540

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)：CD1a陽性樹状細胞(CD1a-DCs)と胆嚢癌細胞との相互作用機序を解明するため、単球を培養しCD1a-DCsに分化誘導。胆嚢癌細胞株との相互作用を解析した。また、胆嚢癌の所属リンパ節におけるCD1a-DCs浸潤意義を解明するため、胆嚢癌組織と所属リンパ節でCD1a-DCsの浸潤を解析した。その結果、癌細胞からもCD1a-DCsが誘導される、癌細胞とサイトカインが存在する状況下で多核巨細胞が誘導される、転移リンパ節でのみCD1a-DCsの高度浸潤が認められる、リンパ節転移例において原発巣のCD1a-DCsの浸潤は有意に生存期間と関連する、という新しい知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果から「血管から遊出した単球は腫瘍との直接相互作用でCD1a-DCsに分化し、リンパ節に移動することなく腫瘍局所で免疫応答を行う」という仮説が提案できる。今後CD1a-DCsを誘導する腫瘍の発現形質に焦点をあて研究を行うことで、CD1a-DCsを介した腫瘍免疫応答のメカニズムの解明、ひいては新規の免疫療法の開発に期待できる。また「癌細胞とサイトカインが存在する状況下で、単球から多核巨細胞が誘導される」という副産物的な成果が得られた。これは固形癌手術検体の病理診断時に稀に認める「リンパ節のsarcoid reaction」という現象を説明する手掛かりとなる知見である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of interaction between CD1a-positive dendritic cells (CD1a-DCs) and gallbladder cancer cells, monocytes were cultured and induced into CD1a-DCs and interactions with gallbladder cancer cell lines were analyzed. To clarify the significance of CD1a-DCs infiltration in the regional lymph nodes of gallbladder cancer, we analyzed the infiltration of CD1a-DCs in gallbladder cancer tissue and regional lymph nodes. As a result, following new finding was obtained: CD1a-DCs are induced by cytokines, but CD1a-DCs are also induced by cancer cells. In the presence of cancer cells and cytokines, multinucleated giant cells are induced. High-infiltration of CD1a-DCs is observed only in metastatic lymph nodes. The infiltration of CD1a-DCs in the primary tumor was significantly associated with survival in cases with lymph node metastasis

研究分野：人体病理学

キーワード：胆嚢癌 樹状細胞 単球 CD1a 多核巨細胞 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

進行胆嚢癌は、極めて予後不良であり、この進行胆嚢癌に対する有効な治療法の開発が急務である。また、樹状細胞は最も特化した抗原提示細胞であり、獲得免疫においては体外から侵入した微生物抗原を貪食し、この抗原を二次リンパ組織に運びナイーブ T 細胞に提示し免疫応答を開始させる。抗原を貪食していない樹状細胞は未熟樹状細胞とよばれ、貪食能が高いが、この時点ではナイーブ T 細胞を活性化することはできない。CD1a は膜貫通性糖蛋白で未熟樹状細胞やランゲルハンス細胞、未熟 T 細胞に発現する。

申請者は以前に進行胆嚢癌の一部に CD1a 陽性樹状細胞(CD1a-DCs)が高度に浸潤している群が存在し、その様な症例では進行胆嚢癌であるにも関わらず、良好な臨床経過を辿ることを見出した(文献 1)。しかしながら腫瘍組織における CD1a 陽性樹状細胞の免疫応答メカニズムや、腫瘍細胞と CD1a 陽性樹状細胞との相互作用機序は、未だ解明されていない。さらには、胆嚢癌の所属リンパ節における樹状細胞浸潤について解析した先行研究は存在しない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「胆嚢癌組織における CD1a 陽性樹状細胞の腫瘍免疫応答メカニズムを明らかにすること」である。アプローチの手段として以下 2 つの目的をたて、研究計画を構築した。

- ① CD1a-DCs と胆嚢癌細胞との相互作用機序を明らかにする: 単球を培養し CD1a-DCs に分化誘導し、胆嚢癌細胞株との相互作用を解析する (研究①)。
- ② 胆嚢癌の所属リンパ節における CD1a-DCs 浸潤の意義について解析する: 胆嚢癌組織と所属リンパ節の両方で CD1a-DCs の浸潤状況を免疫染色により解析し、臨床病理学的因子との関連を検討する (研究②)。

3. 研究の方法

研究①: 末梢血単核細胞(Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMC)を用いて、CD1a-DCs と、CD83 陽性成熟樹状細胞を分化・誘導する実験系を確立した。健常人ボランティアより末梢血を採血。分離キットを用いて PBMC を分離。PBMC に IL4 と GM-CSF を添加して培養し、Day 7 に TNF α を添加した。分化の評価はフローサイトメトリー(FCM)で行い、その指標として、CD1a、CD83、HLA-DR、CD14 を用いた。また、2 種類の胆嚢癌細胞株(NOZ、TGBC2TKB) とインサート共培養を行い、樹状細胞の分化誘導の形態的变化や、癌細胞の増殖能への影響等を評価した。さらに、培養の各段階(PBMC、胆嚢癌細胞株、およびそれらの共培養)の細胞浮遊液より液状化検体細胞診(Liquid Based Cytology : LBC)検体を作製(ThinPrep®, Hologic Japan, Tokyo)。さらに LBC 検体を用いて HE 染色と CD1a の免疫染色を行い、それぞれ評価した。

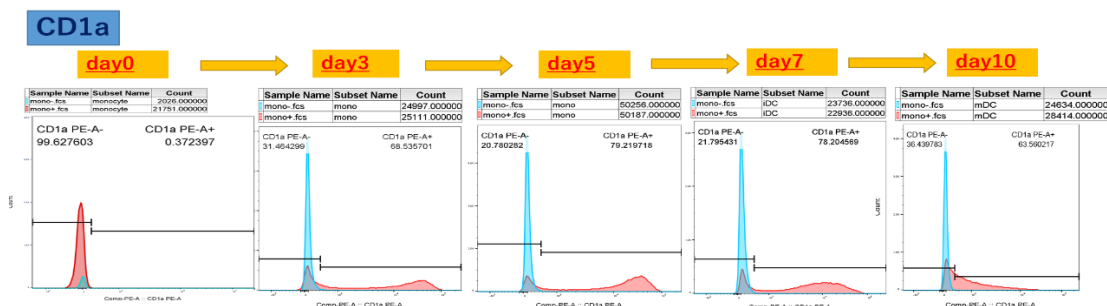
研究②: 佐賀大学医学部附属病院で 2000 年 1 月から 2020 年 12 月の間に根治切除術を行った胆嚢癌 101 例のうち、筋層以深の浸潤癌かつリンパ節廓清がなされた 70 例を対象とした。を用いて行った。原発巣およびリンパ節(リンパ節転移例は転移リンパ節、リンパ節非転移例はセンチネルリンパ節)のホルマリン固定パラフィンブロックより薄切切片を作製。CD1a と S100 の免疫染色をそれぞれ施行した。評価に関しては、100 倍視野で 10 個以上陽性細胞を認めるものを高浸潤群、10 個未満のものを低浸潤群として、各臨床病理学的因子との関連を検討した。

4. 研究成果

研究①

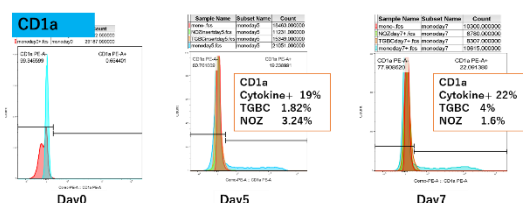
①-1 <PBMC からの CD1a-DC の分化誘導>

PBMC に IL4 と GM-CSF を添加して培養すると、Day3 より CD1a-DCs へ分化が認められることを FCM で確認した。CD1a-DCs は Day3 より出現し、Day7 まで一定数が存在。Day7 以降(TNF α 添加後) は減少傾向を示した(下図参照)。一方、CD83 に関しては day0 よりある一定量が存在していた。Day 7 で TNF α を添加すると、確かに CD1a-DCs から CD83-DCs への分化が起きていると考えられたが、CD83-DCs の全体数からすると、その数は多くはない。



①-2 <PBMCと胆嚢癌細胞株とのインサート共培養によるCD1a-DCsの分化誘導>

「癌細胞が直接 CD1a-DCs を分化させる能力があるのか」という疑問を検証するために、PBMCと胆嚢癌細胞株(NOZ、TGBC2TKB)とのインサート共培養を行った。サイトカイン(IL4, GM-CSF)存在下の状態では、Day 5 の時点で約20%CD1a-DCsへの分化が認められたが、非添加の状態では、day 5 の時点において、NOZで3.24%、TGBC2TKBで3.24%と、CD1a-DCsへの分化はごく少量であった。この結果から、胆嚢癌細胞株のみでも少量であれば、CD1a-DCsの分化誘導は可能であることが判明した。高サイトカイン産生性の胆嚢癌であれば、より多くのCD1a-DCsを誘導できる可能性が示唆された。

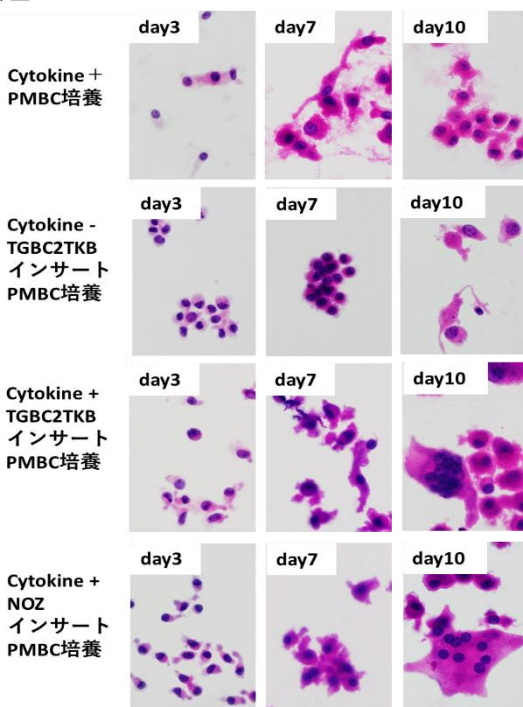


①-3 <CD1a-DCsが胆嚢癌細胞株の増殖能に与える影響についての検証>

「CD1a-DCsが直接的に癌細胞の増殖を抑制するの否か」を検証するために、胆嚢癌細胞株の増殖能をCD1a-DCs (Day 7までプロトコール通りに培養)インサート共培養前と共培養後にcell countで評価したが、CD1a-DCsによる増殖抑制効果はTGBC2TKB、NOZともに認めなかった。

①-4 <LBC標本による形態観察とCD-1a免疫染色>

- サイトカイン(IL4, GM-CSF)存在下でPBMCを培養すると、Day7で樹状細胞としての形態は最も顕著であった。
- サイトカインがない状況下であっても、TGBC2TKBとPBMCをインサート共培養すると、樹状細胞への形態分化を示す細胞が一部に確認できた。NOZとのインサート共培養でも同様の結果であった。
- サイトカイン存在下で、TGBC2TKBとPBMCをインサート共培養すると、樹状細胞への形態分化が認められたが、day7から多核巨細胞への分化が認められた。この多核巨細胞への分化は、day7のTNF α 添加の如何に関わらず認められた。
- NOZとの共培養においてもTGBC2TKBと同様の結果であり、day7から多核巨細胞への分化が認められた。
- いずれの培養系においてもday7の樹状細胞の形態を示す細胞にCD1aの発現を免疫染色で確認できた。
- 癌細胞とPBMC、サイトカインが存在する状況下でのみ、多核巨細胞が誘導される現象を、再現性をもって確認できた。



<研究①の結果のまとめ>

- CD1a-DCsはサイトカインにより誘導されるが、癌細胞によってもCD1a-DCsが誘導される可能性が示唆された。
- CD1a-DCs単独で癌細胞の増殖を抑制するという現象は確認できなかった。
- 癌細胞とPBMC、サイトカインが存在する状況下で、多核巨細胞が誘導されるという現象が、再現性をもって認められた。

研究②

②-1 <胆嚢癌所属リンパ節におけるCD1a-DCsと臨床病理学的因子についての検証>

対象症例70症例のうち、胆嚢癌所属リンパ節にCD1a-DCsが高浸潤していたのは14例であった。リンパ節におけるCD1a-DCsと臨床病理学的因子の関連を右表に示す。リンパ節におけるCD1a-DCsの浸潤の多寡と関連を示したのは、T因子とN因子であった。特にN因子に関しては強い相関がみられ、驚くことにCD1a-DCsが高浸潤していたのは全てリンパ転移陽性例であった。

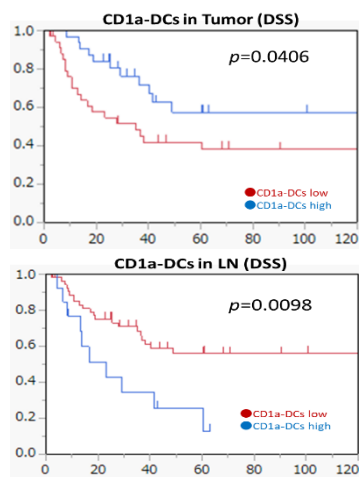
Characteristics	CD1a-DCs high (n=14)	CD1a-DCs low (n=56)	p-value
Age (mean \pm SD)	70.9 \pm 8.66	71.9 \pm 9.43	0.7178
Male / Female (%)	6 / 8 (42.9 / 57.1)	23 / 33 (41.1 / 58.9)	1
T1b, T2 / T3, T4 (%)	3 / 11 (21.4 / 78.6)	33 / 23 (58.9 / 41.1)	0.0166
N0 / N1, N2 (%)	0 / 14 (0 / 100)	38 / 18 (32.1 / 67.8)	<0.0001
M0 / M1 (%)	11 / 3 (78.6 / 21.4)	6 / 50 (10.7 / 89.3)	0.3697
CD1a-DCs in tumor (high / low)	8 / 6 (57.1 / 42.9)	27 / 29 (48.2 / 51.8)	0.766
Adjuvant therapy (done / not done)	8 / 6 (57.1 / 42.9)	29 / 27 (51.8 / 48.2)	0.7724

DCs: dendritic cells, SD: standard deviation

②-2 <胆嚢癌および所属リンパ節における CD1a-DCs 浸潤と疾患特異的生存率>

胆嚢癌組織中の CD1a-DCs の多寡と、疾患特異的生存率 (Disease-specific survival: DSS)との関連を解析した生存曲線を右上図に示す。異なる対象対象集団で解析した過去の研究(文献1)と同様に、CD1a-DCs が多く浸潤する群が、有意に生存期間が長かった。

その一方所属リンパ節では、腫瘍での結果とは逆にリンパ節内に CD1a-DCs が多く浸潤する群の方が、有意に生存期間が短いという結果が得られた(右下図)。これはリンパ節での CD1a-DCs 高浸潤例は全例リンパ節転移陽性であったためと考察される。実際、DSS に関して Cox の比例ハザードモデルを用いた単変量解析で有意差を認めた因子を用いて多変量解析を行ったところ、リンパ節における CD1a-DCs は独立因子として残らなかった。

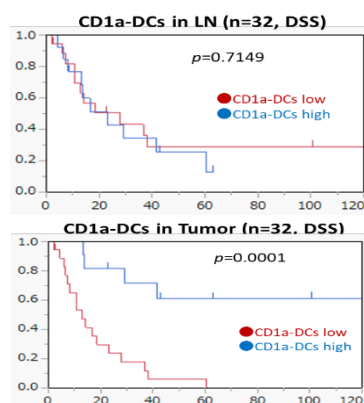


②-3 <リンパ節陽性症例におけるサブグループ解析>

CD1a-DCs 高浸潤例は全例リンパ節転移陽性であったという結果を受け、リンパ節転移陽性症例(n=32)に局限したサブグループ解析を行った。

このサブグループにおいては、リンパ節内に浸潤する CD1a-DCs の多寡と DSS に関連性は認められなかった(右上図)。

次に、このサブグループにおいて、腫瘍内の CD1a-DCs の多寡と DSS の関連について解析を行ったところ、腫瘍内に CD1a-DCs が多く浸潤していた症例は、CD1a-DCs 低浸潤群に比べて有意に生存期間が長いという結果が得られた(右下図)。



<研究②の結果のまとめ>

- ・ CD1a-DCs は転移リンパ節でのみ、多数の浸潤がみられた。
- ・ リンパ節転移がある症例において、原発巣における CD1a-DCs の浸潤は有意に生存期間と関連していた。

4. 研究成果の意義と今後の展望

樹状細胞を介した固形癌の腫瘍免疫に関しては、依然として不明な点が多く、研究報告も限られている。感染免疫で積み上げられた知見では、樹状細胞は微生物抗原を貪食した後、リンパ節に移動して成熟すると考えられていることから、腫瘍免疫においても腫瘍抗原を貪食した未熟な CD1a-DCs はリンパ節に移動して成熟し、免疫応答を行うと考えられていた。

しかしながら実際には、転移のないリンパ節で CD1a-DCs は殆ど認められなかった(研究②)。従って腫瘍免疫においては、「血管から遊出した単球は腫瘍との直接相互作用で CD1a-DCs に分化し、リンパ節に移動することなく腫瘍局所で免疫応答を行う」という新しい学説が、今回の研究成果から提案できる。この説を裏付けるエビデンスとしては、①CD1a-DCs は組織標本上、腫瘍に隣接して認められること、②リンパ節転移例のサブグループ解析で、腫瘍内に浸潤する CD1a-DCs が生存期間に有意に関連したこと(研究②)、即ち CD1a-DCs を誘導できる腫瘍の発現形質が免疫応答に重要なこと、さらに In Vitro の環境で、胆嚢癌細胞株により CD1a-DCs への分化が少量ながら観察でき、その分化には腫瘍が産生するサイトカインが深く関与すること(研究①)が挙げられる。

今後「CD1a-DCs を誘導する腫瘍の発現形質」に焦点をあてて研究を行うことで、CD1a-DCs を介した腫瘍免疫応答のメカニズムの解明、ひいては新規の免疫療法の開発に期待できる。

また今回、研究①の副産物的な成果で、「癌細胞とサイトカインが存在する状況下で、単球から多核巨細胞が誘導される」という知見が明らかとなった。これは固形癌手術検体の病理学的検索の際に稀に認める「リンパ節の sarcoid reaction」という現象を説明する大きな手掛かりとなる知見である。この点に関しても検討を進めていく。

<引用文献>

1. Kai K, Tanaka T, Ide T, Kawaguchi A, Noshiro H, Aishima S. Immunohistochemical analysis of the aggregation of CD1a-positive dendritic cells in resected specimens and its association with surgical outcomes for patients with gallbladder cancer. *Transl Oncol.* 2021;100923.

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 7件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kai Keita, Ide Takao, Tanaka Tomokazu, Yukimoto Kumpei, Irie Hiroyuki, Noshiro Hirokazu, Aishima Shinichi	4. 巻 -
2. 論文標題 A Case of Multicystic Biliary Hamartoma with a Marked Peribiliary Gland Component Successfully Treated by Purely Laparoscopic Anatomical Liver Resection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastrointestinal Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12029-022-00893-1	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 該当する
1. 著者名 Kai Keita, Tobu Shohei, Kido Shinichi, Mikami Shuji, Takeuchi Kengo, Dobashi Akito, Togashi Yuki, Noguchi Mitsuru, Aishima Shinichi	4. 巻 17
2. 論文標題 ALK rearrangement-associated renal cell carcinoma morphologically mimicking mucinous tubular and spindle cell carcinoma: a case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostic Pathology	6. 最初と最後の頁 52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13000-022-01238-z	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 該当する
1. 著者名 Kai Keita, Tanaka Tomokazu, Ide Takao, Kawaguchi Atsushi, Noshiro Hirokazu, Aishima Shinichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Immunohistochemical analysis of the aggregation of CD1a-positive dendritic cells in resected specimens and its association with surgical outcomes for patients with gallbladder cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 100923 ~ 100923
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tranon.2020.100923	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 該当する
1. 著者名 Minesaki Akimichi, Kai Keita, Kuratomi Yuichiro, Aishima Shinichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Infiltration of CD1a-positive dendritic cells in advanced laryngeal cancer correlates with unfavorable outcomes post-laryngectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 973
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-021-08715-6	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 該当する

1. 著者名 Shichijo Chika, Kai Keita, Jinnouchi Kazuki, Nishihara Masashi, Hara Hideo, Aishima Shinichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Intracranial M?nckeberg 's Atherosclerosis Is Frequently Found in Autopsy Cases of Advanced Stage Malignancy with Cerebral Infarction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 5234 ~ 5234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13205234	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 該当する

1. 著者名 Kai Keita, Hashiguchi Mariko, Kurihara Makiko, Tanaka Yuya, Kitamura Sho, Nakamura Mitsuo, Shichijo Chika, Yamamoto-Rikitake Mihoko, Okuma Ryoichi, Hikari Takako, Okuma Emi, Uchiyama Michiko, Aoki Shigehisa, Nakao Yoshifumi, Yokoyama Masatoshi, Aishima Shinichi	4. 巻 65
2. 論文標題 Cytological Appearances of Ovarian Seromucinous Borderline Tumor in Ascites: Presentation of 2 Cases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Cytologica	6. 最初と最後の頁 440 ~ 447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000517313	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 該当する

1. 著者名 Kai Keita, Tanaka Tomokazu, Ide Takao, Kawaguchi Atsushi, Noshiro Hirokazu, Aishima Shinichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Immunohistochemical analysis of the aggregation of CD1a-positive dendritic cells in resected specimens and its association with surgical outcomes for patients with gallbladder cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 100923 ~ 100923
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2020.100923	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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	菰原 義弘 (Komohara Yoshihiro) (40449921)	熊本大学・大学院生命科学研究部 (医)・教授 (17401)	

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	田中 智和 (Tanaka Tomokazu) (60781903)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	

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