

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07414

研究課題名（和文）膵がんの線維形成性間質不均一の臨床病理学的意義およびその形状に係る分子機構の解明

研究課題名（英文）Heterogeneity of the desmoplastic stroma of human pancreatic cancer: Clinicopathological significance and molecular mechanisms shaping the heterogeneity

研究代表者

眞杉 洋平（Masugi, Yohei）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：90528598

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）：膵癌はいまだに効果的な治療手段のない難治癌です。私たちは、膵癌において癌と共存する間質に着目し、最新の染色技術と画像解析を用いて200症例以上の膵癌組織を解析することで、新しい線維芽細胞の分類法を見つけました。さらに膵癌間質の性格が患者間で大きく異なることを客観的に示すとともに、癌の悪性度や生物学的特徴を良く反映した間質タイプ分類を提唱しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の新規治療標的が模索される中で、特に注目されている間質について、多数の膵癌患者組織を客観的データに基づき解析することにより、間質の性格が患者間で大きく異なることが示され、有効な間質治療戦略の実現のためには適切な患者層別化が重要であることが示唆されました。また、免疫治療との併用が有効とされるある標的間質細胞が膵癌における腫瘍免疫の制御に関わる可能性を裏付ける、ヒトにおける初めてのエビデンスを報告しました。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic cancer is a hard-to-treat cancer. We focused on pancreatic cancer stroma and set out to assess inter- and intratumoral stromal heterogeneity in a large series of clinical tumors. Here, we developed a pixel-by-pixel image analysis system to digitally differentiate and quantify two mutually exclusive fibroblast subpopulations within tumor tissues. Quantitative computation of these principal fibroblast subpopulations, intratumoral collagen, and CD8+ T cells using whole-tissue sections from 215 treatment-naive pancreatic cancers allowed us to identify three distinct stroma types differentially associated with patient outcomes, molecular characteristics and the immunosuppressive tumor microenvironment. Our human tissue-based quantitative analysis likely provides new insights into the clinical importance of stroma-based pancreatic cancer subtyping in facilitating the development of multidisciplinary treatment strategies against this lethal malignancy.

研究分野：人体病理学

キーワード：膵がん 線維芽細胞亜型 不均一 免疫療法

図3は、未治療膵癌 215 症例の外科的切除検体の全組織切片で測定した線維芽細胞亜型およびコラーゲンの組織内占有率の分布を示している。平均として最も占有率が高いのがコラーゲン(平均 38.4%; 範囲 5.2%-74.5%; 四分位範囲 31.2%-44.9%)、次いで ACTA2 発現優勢 CAF(平均 24.2%; 範囲 6.9%-55.0%; 四分位範囲 16.4%-30.8%)、最も少ないのが FAP 発現優勢 CAF(平均 8.9%; 範囲 1.1%-29.8%; 四分位範囲 5.9%-11.5%)の領域であった。各症例を並べて比較すると、線維芽細胞+コラーゲンが占めている領域は症例毎にかなり違い、症例によっては癌組織のほとんどが線維芽細胞とコラーゲンで占められていることが分かる(注: 占有率が100%を超えている症例があるのは、細胞外にあるコラーゲン沈着領域と線維芽細胞領域に切片の厚みなどによるシグナルの重なりが影響していると予想される)。さらに症例毎に線維芽細胞亜型とコラーゲンの割合が大きく異なる、すなわち線維性間質の質には違いがあることも明らかとなった。

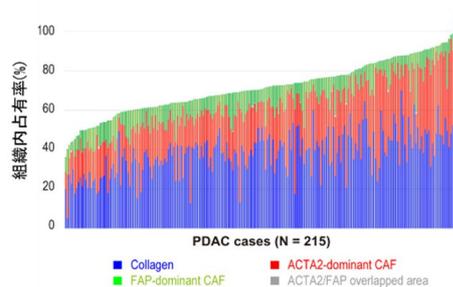


図3 膵癌線維芽細胞亜型とコラーゲンの組織定量解析

(3) 線維性間質組成の腫瘍間不均一により見出される膵癌間質の3タイプ

線維性間質組成の質の違いに係る臨床病理学的意義を明らかにするため、線維芽細胞亜型ならびにコラーゲンの定量データを用いてクラスター解析を行い、膵癌間質を3つのタイプに分類し、コラーゲンが豊富で線維芽細胞が少ないCタイプ、FAP発現優勢CAFが多いFタイプ、ACTA2発現優勢CAFが多いAタイプを定義した。これら間質タイプと膵癌の生命予後との相関を検討したところ、これら3群で予後が層別化されることが示された(図4)。すなわち、Cタイプが最も予後がよく(生存期間中央値:未到達)、Fタイプが中間(生存期間中央値:2.7年)、Aタイプが最も予後不良(生存期間中央値:1.8年)であるという結果が示された。また、先行研究では膵癌組織におけるACTA2陽性細胞とコラーゲンの占有面積比を間質活性率と定義すると、間質活性率が高いほど予後不良であると報告しており、我々の定量データを用いて類似の解析を行ったところ同様の結果が再現された(図4)。

一方、ACTA2、FAPあるいはコラーゲンのみに注目して、占有率と予後との相関を見たところ、ACTA2発現優勢CAFの占有率が高い群が低い群より若干予後不良であったが(生存期間中央率:2.5年対3.9年)、FAP発現優勢CAF占有率およびコラーゲン占有率は予後と相関しなかった(図5)。膵癌におけるACTA2やFAP陽性細胞の割合は生命予後不良と関連するという報告もある一方、関連がないとする報告も散見され、線維芽細胞マーカーやコラーゲン量のみに基づいた研究結果が一定しない。

これらのことから、線維芽細胞の量あるいはコラーゲンの量が単独で予後に影響しているわけではなく、それらのバランスが膵癌の予後と関連が深いことを示唆している。総合すると、間質活性率や線維芽細胞密度の高い間質を持つ膵癌は予後不良であり、線維芽細胞密度の高い症例の中でもACTA2発現優勢CAFで占められている間質を持つ膵癌は、FAP発現優勢CAFが多い間質を持つ膵癌よりも予後が悪いと結論付けられた。

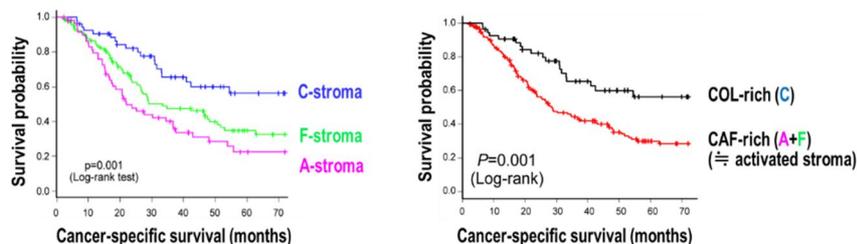


図4 膵癌間質タイプ、活性型間質と生存予後の関連

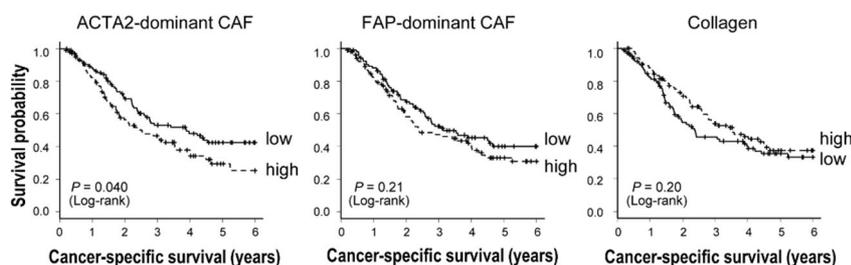


図5 線維芽細胞亜型、コラーゲン量と生存予後の関連

(4) 膵癌間質タイプと免疫微小環境

膵癌は PD-1 あるいは CTLA-4 系の免疫チェックポイント阻害剤単独療法には抵抗性である。膵癌の免疫療法抵抗性には、腫瘍微小環境内の多様な免疫抑制因子、間質における物理的バリアー等の複合的関与が示唆されている。実際、ヒト膵癌の多くで、CD8陽性Tリンパ球は腫瘍辺縁部に比較して腫瘍中心部で顕著に抑制されており、膵癌の腫瘍内部におけるCD8陽性リンパ球密度は、免疫療法が奏功することで知られる悪性黒色腫やミスマッチ修復機能欠損大腸癌等の他がん種に比較してかなり少ないことが明らかとなっている。FAP陽性線維芽細胞は、膵癌を含めた複数の悪性腫瘍の腫瘍微小環境における免疫抑制に関わり、FAP陽性線維芽細胞を標的とし

た治療薬を免疫療法と併用することで、幾つかの固形がんに対しての効果を示すことが示されている。我々は、ヒト膵がん間質における FAP 発現優勢 CAF の組織内占有割合は平均 10%弱と ACTA2 発現優勢 CAF の約 1/3 のポピュレーションではあるものの、膵癌患者のほとんどで FAP 発現優勢 CAF が一定の割合は含まれていることが示した。さらに FAP 陽性線維芽細胞の占有率は、CD8 陽性 T 細胞の腫瘍内浸潤と有意に逆相関するという結果を得た。実験的に Fap 陽性線維芽細胞を抑制することで膵癌組織内 Acta2 陽性線維芽細胞の一部も同時に抑制され、コラーゲン量も減少するとの先行研究による報告もある。膵癌マウスモデルを用いた先行研究では、Fap 陽性間質細胞が主に産生するケモカイン Cxcl12 を阻害することで腫瘍内 T リンパ球浸潤が抑制され、PDCD1 阻害剤の治療効果が増強されることが示されている。実際、遠隔転移を有する膵癌に対して、CXCL12-CXCR4 系阻害剤と PD1 経路阻害剤・化学療法との併用療法の治療効果が期待されるとする第 II 相臨床試験の結果も報告されており、膵癌に対する FAP 陽性線維芽細胞や CXCL12-CXCR4 系を標的とした臨床試験、治療の実用化に期待したい。

(5) 膵癌間質タイプとトランスクリプトームサブタイプ

膵癌においては、現在までのところアクションナブルな遺伝子変異を有する割合は非常に低く、治療に繋がる確立されたサブタイプ分類は未だ確立していないが、網羅的遺伝子発現に基づく分子サブタイプ分類が幾つかのグループから提唱されている。中でも、遺伝子発現をバイオインフォマティクスにより上皮由来と間質由来に分け、腫瘍サブタイプを Basal-like tumor あるいは Classical tumor に、間質サブタイプを Activated stroma と Normal stroma にそれぞれ分ける Moffitt らによって提唱された分類は広く用いられている。腫瘍サブタイプとしては Basal-like tumor、間質サブタイプとしては Activated stroma がより予後不良とされる。

そこで、我々はトランスクリプトームデータが得られている 20 症例の膵癌について、組織解析をベースとして定義・分類した上述の間質タイプ分類の関連を検討したところ、線維芽細胞の乏しい C タイプ症例は全例 Normal stroma に分類された (図 6)。反対に、F タイプやタイプ症例の約 70% は遺伝子発現的に Activated stroma に分類され、予後の観点でも組織解析をベースにした間質分類と Moffitt 等の間質サブタイプは関連が深いと考えられた。一方で、間質組成のみで分類したにもかかわらず C タイプ症例の全例が、Classical tumor サブタイプに分類されたことは興味深い。実際、C タイプにみられる癌腺管は腺管形成の明瞭なものが多い。

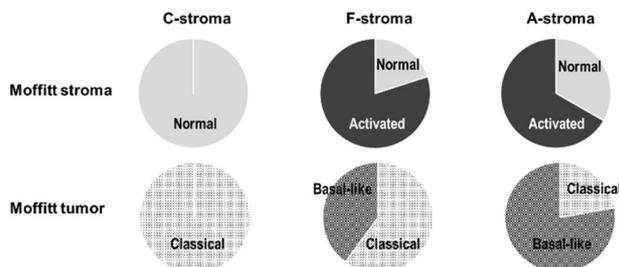


図6 膵癌間質タイプとトランスクリプトームサブタイプの関連

(6) 線維芽細胞亜型とコラーゲンの視点からみた癌・非癌における膵線維化の違い

膵癌切除検体では、癌から離れた膵小葉において、閉塞性膵炎などによる、膵管周囲や小葉間を主とする慢性膵炎様線維化がしばしばみられる。そこで、膵癌線維性間質と非癌における線維化との違いについて検討するため、定量解析を行ったテストセット 215 症例の内、癌領域から十分に離れた膵小葉を評価できる 146 症例について、非癌膵における線維芽細胞亜型とコラーゲンの定量解析を行った。非癌膵における線維化の程度は様々であり、それを反映してコラーゲン占有率 (平均 19.9%、範囲 0.007-76.0%)、ACTA2 発現優勢線維芽細胞占有率 (平均 10.8%、範囲 0.003-75.6%) は幅広かった。

図 7A に非癌膵における ACTA2 発現優勢線維芽細胞占有率と FAP 発現優勢線維芽細胞占有率の散布図を示す。FAP 発現優勢線維芽細胞は非癌領域ではほとんど認められないことが大変興味深い。図 7B に非癌膵ならびに膵癌組織 (間質タイプ別) のコラーゲン占有率と ACTA2 発現優勢線維芽細胞占有率の散布図を示す。生理的条件下においては、ACTA2 陽性細胞がコラーゲンの主な産生細胞であることが知られている。実際、非癌膵についてはコラーゲン占有率と

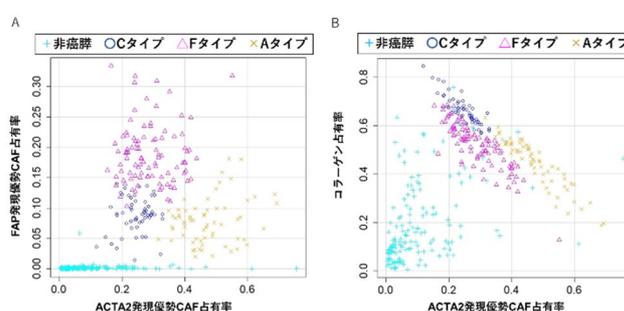


図7 癌と非癌における線維組成の違い

ACTA2 発現優勢線維芽細胞占有率が正の相関を示す (ピアソンの積率相関係数: 0.43) ところが、癌間質についてはいずれの間質タイプにおいても、コラーゲン占有率と ACTA2 発現優勢線維芽細胞占有率が負の相関を示す (ピアソンの積率相関係数: C タイプ, -0.87; F タイプ, -0.84; A タイプ -0.92)。非癌膵については、コラーゲン占有率と ACTA2 発現優勢線維芽細胞占有率ともに癌部に比較してかなり低く、線維化の程度が異なるため単純に比較はできないと思われるが、コラーゲン占有率と ACTA2 発現優勢線維芽細胞占有率の相関関係が逆であることは興味深い。癌間質には、癌細胞・マクロファージ・FAP 陽性線維芽細胞などが多量に存在し、コ

ラーゲン分解が亢進していることが主な原因と考察される。癌間質における ACTA2 陽性線維芽細胞は、生理的条件下でみられる ACTA2 陽性線維芽細胞よりもコラーゲン産生能が低いことも影響している可能性がある。

(7) 膵癌微小環境における線維芽細胞亜型の分布と細胞間相互作用

一細胞トランスクリプトーム技術の普及により、遺伝子発現パターンの明確に異なる線維芽細胞亜型が近年次々に発見されている。例えば、Tuveson 等のグループは、膵癌マウスモデルやオルガノイドモデルにおいて、膵癌細胞に近接して局在する CAF と、癌細胞から離れて位置する CAF では、ACTA2 の発現強度に違いがあることを見出し、ACTA2 を強く発現する CAF を筋線維芽細胞との類似性から myofibroblastic CAF (myCAF) と呼ぶことを提唱した。また、線維芽細胞亜型は可塑性を持ち、その形質は微小環境における位置や細胞-細胞間相互作用に大きく依存することも明らかとなっている。Biffi 等は、腫瘍細胞により分泌される IL-1 がパラクライン的に膵星細胞に作用し、JAK/STAT シグナルを活性化することにより炎症性サイトカインの分泌で特徴づけられる inflammatory CAF (iCAF) が誘導されることを示した。一方、腫瘍細胞により分泌される TGF β は、近傍に位置する膵星細胞における TGF β シグナルを活性化し、IL1 レセプターの発現抑制を通じて iCAF 誘導シグナルに拮抗すると同時に、TGF β シグナルの下流として ACTA2 発現やコラーゲン産生などの myCAF 特異的形質を強く誘導することも示した。膵癌組織において我々が定義した ACTA2 発現優勢 CAF は、特にコラーゲン豊富型において癌腺管の周囲を薄く取り囲むように分布する myCAF と同様の空間分布を示す。このような特徴的分布を示す ACTA2 発現優勢 CAF にはリン酸化 SMAD2/3 や SMAD4 の核局在が確認されるため、一部の ACTA2 陽性線維芽細胞は myCAF に一致し、その誘導には TGF β シグナル活性化が関与することが示唆される。しかしながら、ヒト膵癌では上述したような分布を示さない領域や症例も多く、ACTA2 発現優勢 CAF や FAP 発現優勢 CAF が既報告のような分子メカニズム以外の機構でも制御されている可能性は高い。生体内における線維芽細胞亜型の分子制御機構について、今後の研究の展開が期待される。

(8) まとめ

マルチスペクトラムイメージング技術を用い、多症例における膵癌間質を解析することで、相互排他的に認識される線維芽細胞亜型を見出した。さらに、これらの線維芽細胞亜型をコラーゲンとともに定量解析することにより、膵癌線維性間質の腫瘍内および腫瘍間不均一を客観的に解析し、予後ならびに分子病理学的に特徴づけられる膵癌間質タイプを提唱した。本研究で得られた知見から、膵癌微小環境では癌細胞・免疫細胞・線維芽細胞が一定の分子基盤で相互に密接に関連しており、線維性間質不均一に基づく患者層別が、新規治療戦略創生の糸口となる可能性が示唆される。

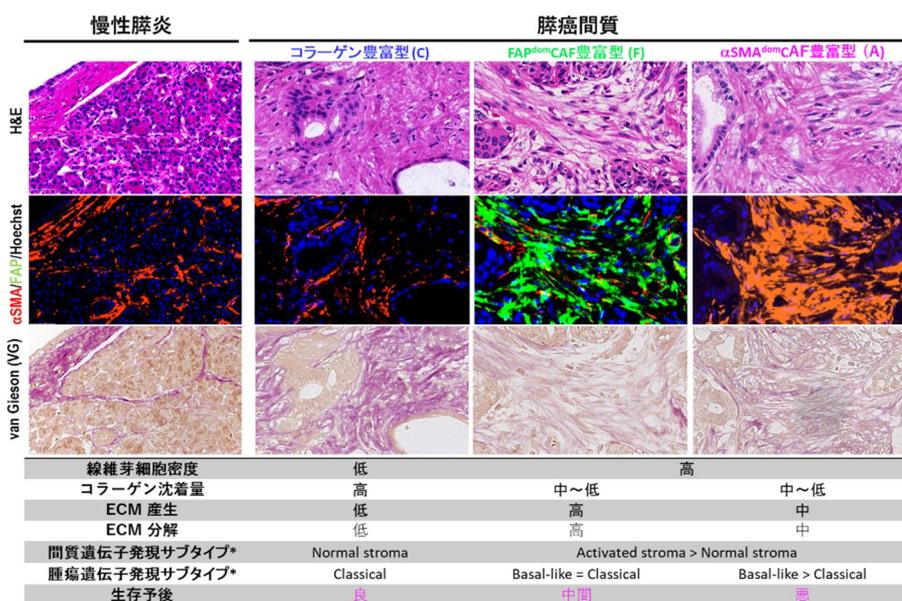


図8 予後ならびに分子病理学的に特徴づけられる膵癌間質タイプ

引用文献

- Ogawa Y, Masugi Y, et al. Three Distinct Stroma Types in Human Pancreatic Cancer Identified by Image Analysis of Fibroblast Subpopulations and Collagen. Clin Cancer Res. 2021;27:107-19
- Masugi Y. The Desmoplastic Stroma of Pancreatic Cancer: Multilayered Levels of Heterogeneity, Clinical Significance, and Therapeutic Opportunities. Cancers 2022;14:3293
- 眞杉洋平. 膵癌組織イメージングにより見出された3種類の膵癌間質タイプ. 胆と膵. 医学図書出版 2022;43:801-8
- 眞杉洋平. 【新しい技術で解明されてきた膵臓の病態】膵癌組織イメージングによる線維芽細胞サブタイプの同定, 膵癌間質多様性の特徴化. 膵臓. 日本膵臓学会. 2023;38:28-36

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5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 Suzuki T., Masugi Y.(co-first), Inoue Y., Hamada T., Tanaka M., Takamatsu M., Arita J., Kato T., Kawaguchi Y., Kunita A., Nakai Y., Nakano Y., Ono Y., Sasahira N., Takeda T., Tateishi K., Uemura S., Koike K., Ushiku T., Takeuchi K., Sakamoto M., Hasegawa K., Kitago M., Takahashi Y., Fujishiro M.	4. 巻 113
2. 論文標題 KRAS variant allele frequency, but not mutation positivity, associates with survival of patients with pancreatic cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3097 ~ 3109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15398	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 MASUGI Yohei	4. 巻 38
2. 論文標題 Pancreatic cancer stromal heterogeneity characterized by multiplex immunohistochemistry-based image analyses	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Suizo	6. 最初と最後の頁 28 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2958/suizo.38.28	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 眞杉 洋平	4. 巻 43
2. 論文標題 【膵臓の発生・生理・解剖から膵炎・膵癌の病態解明に至る最新の知見】膵癌組織イメージングにより見出された3種類の膵癌間質タイプ	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 801-807
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 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 坂元 亨宇, 眞杉 洋平, 波多野 悦朗, 正宗 淳.	4. 巻 84
2. 論文標題 膵癌の診断・治療の近未来.(座談会)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 肝胆膵	6. 最初と最後の頁 245-255
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 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 Y. Masugi, T. Abe, K. Yamazaki, A. Ueno, M Sakamoto	4. 巻 28
2. 論文標題 Three Distinct Stroma Types in Human Pancreatic Cancer Identified by Image Analysis of Fibroblast Subpopulations and Collagen-Response	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 427
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.Ccr-21-3693	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 眞杉 洋平	4. 巻 84
2. 論文標題 【膵癌診療のパラダイムシフト】膵癌研究における最近の知見 膵癌における線維性間質、線維芽細胞サブタイプの意義	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 肝胆膵	6. 最初と最後の頁 239-244
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 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 Ogawa Y., Masugi Y., Abe T., Yamazaki K., Ueno A., Fujii-Nishimura Y., Hori S., Yagi H., Abe Y., Kitago M., Sakamoto M.	4. 巻 27
2. 論文標題 Three Distinct Stroma Types in Human Pancreatic Cancer Identified by Image Analysis of Fibroblast Subpopulations and Collagen.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Cancer Res	6. 最初と最後の頁 107-119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1078-0432.CCR-20-2298	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 Masugi Yohei	4. 巻 14
2. 論文標題 The Desmoplastic Stroma of Pancreatic Cancer: Multilayered Levels of Heterogeneity, Clinical Significance, and Therapeutic Opportunities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3293 ~ 3293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14133293	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 辰典, 眞杉 洋平, 高松 学, 濱田 毅, 田中 麻理子, 国田 朱子, 中野 容, 立石 敬介, 小池 和彦, 牛久 哲男, 坂元 亨宇, 竹内 賢吾, 北郷 実, 藤城 光弘.
2. 発表標題 Droplet digital PCR for KRAS mutations in pancreatic cancer: An analysis of clinical samples in a multicenter cohort.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会 臓器別シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 眞杉 洋平
2. 発表標題 膵管癌の悪性度を規定する特徴的病理像に係る分子病理基盤の解析
3. 学会等名 第68回日本病理学会秋季特別総会 学術研究賞演説（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 眞杉 洋平, 阿部 時也, 山崎 剣, 上野 彰久, 西村 瑶子, 北郷 実, 坂元 亨宇
2. 発表標題 Pancreatic cancer subtypes according to immune/stromal heterogeneity: real-world data from pathology imaging informatics.
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会 臓器別シンポジウム2 肝胆膵がんにおける基礎および臨床研究の進展
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞杉 洋平, 北郷 実
2. 発表標題 膵癌組織イメージングによる線維芽細胞亜型の同定：間質多様性の意義に係る新知見
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会 ワークショップ2 臨床研究の基盤になる膵臓の発生、解剖、生理、病理の新知見
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 眞杉洋平、阿部時也、山崎剣、上野彰久、西村瑶子、坂元亨宇
2. 発表標題 線維芽細胞亜型とコラーゲン量により規定される膵がん間質3タイプの分子病理学的特徴
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学医学部病理学教室 坂元研究室 研究内容・成果
http://www.keio-pathology.net/sakamoto_research.html

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