

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08950

研究課題名(和文) 甲状腺未分化癌に対する新規免疫療法の開発のための研究

研究課題名(英文) Research for the development of novel immunotherapy for anaplastic thyroid carcinoma

研究代表者

井口 研子(間中研子)(Iguchi, Akiko)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50575644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺未分化癌は極めて予後不良で治療困難な癌である。本研究では甲状腺未分化癌のシングルセル遺伝子解析を行い、免疫細胞の特徴を解析することにより新規癌免疫療法の標的を探索する。また甲状腺未分化癌は分化癌からの未分化転化により発生するといわれ、シングルセル解析により未分化転化に関与する遺伝子を探索する。

甲状腺未分化癌、低分化癌、分化癌の手術検体から新鮮組織を採取し、うち8検体のシングルセルRNAシーケンスを行った。現在、各種のバイオインフォマティクス解析を行っている。また各検体のBRAF V600E等ドライバー遺伝子変異を検索し、臨床データとシングルセル解析との相関を解析している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲状腺未分化癌は希少であるが極めて予後不良で治療困難な癌であり、新規治療の登場が期待され、他の癌種同様に免疫チェックポイント阻害療法の効果が注目されている。本研究では甲状腺未分化癌のシングルセル網羅的遺伝子解析により癌免疫療法の標的を探索するもので、新規治療の開発に繋がるものである。また甲状腺未分化癌は分化型乳頭癌・濾胞癌から未分化転化して発生するといわれており、本研究で甲状腺癌の未分化転化に関与する遺伝子の探索を行うことにより、これまで不明であった未分化転化の機序の解明にも繋がるものである。

研究成果の概要(英文)：Anaplastic thyroid carcinoma is a difficult-to-treat cancer with an extremely poor prognosis, and the development of novel therapies is expected. In this study, we perform single-cell gene analysis of anaplastic thyroid carcinoma and analyze the characteristics of immune cells to search for new targets for cancer immunotherapy. Since anaplastic thyroid carcinoma is thought to arise by undifferentiated transformation from differentiated carcinoma, we search for genes involved in undifferentiated transformation by single-cell gene analysis.

Fresh tissues were collected from surgical specimens of anaplastic, poorly differentiated and differentiated thyroid carcinomas, and single-cell RNA sequencing was performed on 8 of the samples. Various bioinformatics analyses are currently underway. We are also searching for driver gene mutations such as BRAF V600E in each sample and analyzing the correlation between clinical data and single-cell gene analysis.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：甲状腺未分化癌 シングルセル遺伝子解析 免疫チェックポイント分子

1. 研究開始当初の背景

DNAM-1(CD226)は我々のグループが同定した分子で、T細胞やNK細胞に発現し、癌細胞に発現するCD155と結合し細胞傷害活性を誘導する活性化受容体である(Shibuya et al, *Immunity* 1996, Tahara et al, *Blood* 2006)。研究者はDNAM-1 KOマウスを作製して発癌実験を行い、DNAM-1は癌細胞に発現するCD155を標的として免疫監視を行い、発癌を抑制することを明らかにした(Iguchi et al, *J Exp Med* 2008)。またCD155のもう一つのリガンドとして2009年にTIGITが見出された。TIGITはT細胞やNK細胞に発現する抑制性受容体であり、新規免疫チェックポイント分子として注目されている。DNAM-1とTIGITはCD155を共有し、それぞれ活性化シグナルと抑制性シグナルの相反するシグナルを伝えるペア型受容体であり、TIGITを阻害することにより抗腫瘍免疫応答を活性化できることが明らかとなっている(Johnston et al, *Cancer Cell* 2014)。

さらに、CD155は膜型の他にスプライシングバリエーションの可溶型が存在する(Koike et al, *EMBO J* 1990)。研究者は癌患者において血清中の可溶型CD155濃度が高値となることを明らかにした(Iguchi et al, *PLoS One* 2016, *Breast Cancer* 2019)。また研究者は可溶型CD155を強制発現させた可溶型CD155産生腫瘍細胞を作製し、可溶型CD155を産生しないMock腫瘍細胞と同時にマウスに移植した。野生型マウスでは、可溶型CD155産生細胞を移植したマウスはMock細胞を移植したマウスより生存率が低く、またDNAM-1 KOマウスではどちらを移植したマウスも生存率が低かった。この結果から、可溶型CD155がDNAM-1に結合することにより、T細胞やNK細胞のDNAM-1と癌細胞の膜型CD155の結合が阻害され、活性化シグナルの誘導が阻害されることが示された。すなわち可溶型CD155は、我々が見出した新規の免疫チェックポイント分子である。

近年、分子生物学的研究を単一細胞レベルで行う「シングルセル解析」の技術開発が進み、癌研究においては腫瘍を構築する癌細胞と免疫細胞などの癌微小環境細胞を単一細胞別に網羅的遺伝子発現解析することができるようになった。どの細胞群に何が発現するのかを明確にすることにより、複雑な免疫応答を理解でき、また従来の網羅的遺伝子発現解析で問題となる腫瘍内不均一性について解決することができる。

DNAM-1はT細胞やNK細胞以外にマクロファージや樹状細胞などにも発現するが、抗腫瘍免疫応答抑制作用を持つ腫瘍関連マクロファージでの活性化受容体DNAM-1の発現状態や機能などは未だ不明である。また癌細胞のCD155の発現は不均一と考えられるが、どのような癌細胞で発現が高いのかは不明である。シングルセル遺伝子解析で癌微小環境のどの細胞にDNAM-1が発現し、どのような癌細胞でCD155の発現が高いかを解析することにより、癌微小環境におけるDNAM-1とCD155の相互作用の全体像を明らかにでき、DNAM-1の抗腫瘍免疫応答を活性化する新規免疫チェックポイント阻害療法の探索に有用であると考えられる。

甲状腺癌は組織型により分化癌、髄様癌、低分化癌、未分化癌に分類される。分化癌は全体の95%を占め、10年生存率は90%以上と比較的予後良好な癌である。一方で未分化癌は頻度が少なく甲状腺癌全体の1~2%程度であるが、進行が極めて速く予後は極めて不良で、診断からの生存期間中央値は4か月程度、1年生存率は20%以下であり、極めて治療困難である。2015年にチロシンキナーゼ阻害剤のレンパチニブが適応となったが、腫瘍縮小効果を見込める一方で重篤な有害事象の発現率が高い。今後も新規治療の登場が期待され、他の癌種同様に免疫チェックポイント阻害療法が注目されている。

未分化癌腫瘍は腫瘍浸潤免疫細胞が多いことが知られており、研究者は免疫染色で未分化癌の腫瘍浸潤免疫細胞にDNAM-1が発現していることを確認した。また未分化癌組織においてCD155の遺伝子発現が上昇していると報告されている(Giannini et al, *J Clin Endocrinol Metab* 2019)。研究者はTCGAデータを用いて癌組織の膜型CD155と可溶型CD155の遺伝子発現量は比例することを示しており(Iguchi et al, *Breast Cancer* 2019)、未分化癌組織では可溶型CD155の発現も高いと考えられ、未分化癌において可溶型CD155は治療標的となる可能性がある。未分化癌のシングルセル網羅的遺伝子解析で、癌微小環境における免疫細胞のDNAM-1と癌細胞のCD155の相互作用を明らかにすることにより、可溶型CD155をより有効に阻害しDNAM-1による抗腫瘍免疫応答を活性化する機序を探索し、新規治療開発に繋げることができると考えた。また未分化癌は先行病変の分化癌から未分化転化して発生すると考えられており、シングルセルの網羅的遺伝子解析を生かし、同時に腫瘍内に混在する未分化癌細胞と先行病変の分化癌細胞を単一細胞別に解析することにより、未分化転化に関与する遺伝子を明らかにし、未分化転化の機序の解明に繋げることができると考えた。

2. 研究の目的

甲状腺未分化癌のシングルセル網羅的遺伝子解析を行い、甲状腺未分化癌の癌微小環境を構築する免疫細胞群の特徴を解析することにより新規癌免疫療法の標的を探索する。また甲状腺癌の未分化転化に関与する遺伝子の探索を行うことにより、未分化転化の機序を明らかにする

ことを目的とする。

3．研究の方法

新鮮甲状腺癌組織(未分化癌、低分化癌、乳頭癌、濾胞癌)から癌細胞、癌微小環境細胞を生細胞の状態でシングルセルに分離し、シングルセル RNA シークエンス法にて単一細胞レベルでの網羅的 RNA シークエンスを行い、各細胞群の遺伝子発現情報をバイオフィンフォマティクス解析の各手法により分析する。

4．研究成果

研究開始当初は甲状腺癌のシングルセル RNA シークエンスの報告がなかったため、新鮮甲状腺癌組織からのシングルセル化と保存の至適条件検討を行った。その条件下で甲状腺未分化癌、低分化癌、濾胞癌、乳頭癌の手術検体から約 30 検体の収集、保存を行った。うち 8 検体のシングルセル RNA シークエンスを行った。現在、バイオフィンフォマティクス解析にて各種手法での分析を行っており、各細胞の遺伝子発現パターンにより細胞種分類を行い、軌道解析や遺伝子ネットワーク推定等を行っている。また各検体の組織を用いて、甲状腺癌で腫瘍の発生やプログレッションに関与するといわれているドライバー遺伝子の BRAF V600E、TERT プロモーターなどの遺伝子変異の発現検索を PCR またはシークエンスにて行い、組織型、進行度、予後などの臨床データとシングルセル解析の結果とともに相関を解析している。

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 1件）

1. 著者名 Matsuo Tomohei, Iguchi Manaka Akiko, Shibuya Akira, Shibuya Kazuko	4. 巻 113
2. 論文標題 CD155 mutation (Ala67Thr) increases the binding affinity for and the signaling via an inhibitory immunoreceptor TIGIT	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4001 ~ 4004
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15526	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 松尾知平、井口研子、渋谷彰、渋谷和子
2. 発表標題 CD155 mutation (Ala67Thr) increases the binding affinity for and the signaling via an inhibitory immunoreceptor TIGIT.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井口研子、松尾知平、原尚人、渋谷和子、渋谷彰
2. 発表標題 新規免疫チェックポイント阻害療法開発への取り組み
3. 学会等名 第34回日本内分泌外科学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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