

令和 4 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17620

研究課題名(和文) 膵癌におけるがん微小環境に関連した新規バイオマーカーと治療標的の探索

研究課題名(英文) Research for novel biomarkers and therapeutic targets related to cancer microenvironment in pancreatic cancer

研究代表者

松井 洋人 (Matsui, Hiroto)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60780781

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)：当初は免疫療法施行群に対する免疫染色を行う予定であったが、症例がいずれも古くパラフィンブロックの状態があまりよくないため、正確な免疫染色による評価が疑問視された。そのため、以前より教室では癌幹細胞に関与すると思われる分子：Calreticulinに注目してきたが、このようなCalreticulin高発現膵癌細胞における免疫逃避機構との関連を検証した。その結果、Calreticulin高発現細胞株においてPDL1発現が高くHLA-class1発現が低いことが示され細胞表面にCalreticulinを高発現した膵癌幹細胞は免疫監視からの逃避と関与している可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌におけるCalreticulin発現は膵癌幹細胞に対するマーカーであるとともに免疫逃避に関するバイオマーカーともなりうる。同時に今後、免疫チェックポイント阻害剤に対する治療効果予測の可能性ともなりうる。また、今後、免疫逃避機構におけるカスケードとCalreticulinの関与を検証することにより膵癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の治療効果の向上も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Initially, we planned to perform immunostaining on the immunotherapy-treated group, but as the samples of cases were mostly old and the paraffin blocks were not in good condition, the accurate assessment by immunostaining was questionable. Therefore, we have previously focused on a molecule that appears to be involved in cancer stem cells: calreticulin, and examined its association with immune escape mechanisms in pancreatic cancer cells that express high levels of calreticulin. The results showed that PDL1 expression was higher and HLA-class1 expression was lower in the Calreticulin-expressing cell lines, suggesting that pancreatic cancer stem cells with high cell surface expression of Calreticulin may be involved in escape from immune surveillance.

研究分野：消化器・腫瘍外科

キーワード：癌免疫 癌微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌の5年生存率は7.9%と極めて難治性の癌である。我々は根治切除後の膵癌患者に対し、標準的な術後補助化学療法に加えて、細胞傷害性T細胞による癌免疫療法を施行したところ、予後の改善が期待できる群があることは確認できたが、全体としての予後の改善には至らなかった。一方、近年、免疫チェックポイント阻害剤(抗PD1抗体等)により、様々な癌種での有効性が報告されているが、抗PD1/PD-L1抗体の膵癌に対する奏効率は0%であった。その原因として癌微小環境における免疫抑制性機構が挙げられる。膵癌は周囲に豊富な間質を伴い、癌関連線維芽細胞(CAF)による、線維化形成が物理的障壁となり抗癌剤や抗腫瘍免疫の主役を担うCD8T細胞の癌細胞への浸潤を阻害する。膵癌局所では、CAFに加え腫瘍関連マクロファージ(TAM)などの間質細胞が膵癌細胞を取り巻いており、TGF- $\beta$ 、IL-10、IL-6など様々な抑制性サイトカインが産生されているだけでなく、制御性T細胞(Treg)ならびに骨髄由来抑制細胞(MDSC)などの免疫抑制性細胞が存在する。その結果、膵癌では固形がんとしては平均的な数の遺伝子変異を有し、抗原性があるにもかかわらず、抗PD-1/PD-L1抗体や抗CTLA-4抗体が奏効していない。抗腫瘍免疫の主役を担うCD8陽性T細胞にもPD-1、TIM-3などの疲弊分子(免疫チェックポイント受容体)が高発現しており、機能不全の状態に陥っている。

膵癌微小環境を解明するべく我々は、免疫療法を施行した膵癌切除症例の腫瘍組織のRNAシーケンズを行ったところ、予後不良群で腫瘍の解糖系に関連する遺伝子群が有意に高発現していた。多くの癌細胞でみられる解糖系の異常な活性化(Warburg効果)は、臓器内部のような低酸素条件下で癌細胞が増殖するために必要な代謝産物(ヌクレオチド、アミノ酸等)を供給する役割を持つことが知られている。

一方、近年、腫瘍細胞はグルコースを枯渇させ周囲の酸性度と乳酸濃度を上げ、T細胞の解糖系を阻害することで抑制性免疫をアプレギュレートさせることが報告されている。膵癌のように癌微小環境の強力な癌種においては単純な免疫チェックポイント分子だけではなく、これらの癌代謝因子が免疫チェックポイント阻害剤の抵抗性に関与していると考えられる。そのため、これらの因子を解明することは膵癌の中で免疫チェックポイント阻害剤の有効な群の同定につながる可能性がある。その中でもIL13Raは乳癌において腫瘍細胞に発現しており腫瘍の成長と転移に関わる因子として報告されているが、膵癌との関連は報告に乏しい。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は膵癌における解糖系関連遺伝子群の中から免疫抑制に関連する因子としてIL13受容体サブユニット(IL13Ra)に着目し、膵癌の予後不良バイオマーカーとなりうるかを検証することである。

本研究は癌代謝と癌免疫の観点から膵癌のバイオマーカーを検索することで高いオリジナリティを有し、その中から免疫チェックポイント阻害剤に対する感受性を同定することを目的としている。本研究により全く新規のバイオマーカーとしてのIL13Raの有用性を検証し、免疫チェックポイント阻害剤のコンパニオン診断薬を創出する。この新規バイオマーカー開発は、その分子そのものに対する新規抗体薬の開発にも応用可能な発展性のある研究であると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1)IL13Raサブユニットによる切除標本を用いた免疫染色を行う。

(2)切除標本を用いたqPCRによる定量と実際の臨床データからの予後の解析を行う。

(3)IL13Raサブユニットをノックイン/ノックダウンした細胞株を用いて免疫チェックポイント分子(PD-1, PD-L1, TIM3, TIGITなど)の発現をフローサイトメトリーにより解析する。

(4)同様の細胞株と健常者の細胞傷害性T細胞、及び免疫チェックポイント阻害剤(抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、LAG3-Ig)を用いたXcelligencによる細胞傷害アッセイを行う。

## 4. 研究成果

当初は免疫療法施行群に対する免疫染色を行う予定であったが、症例がいずれも古くパラフィンブロックの状態があまりよくないため、正確な免疫染色による評価が疑問視された。

そのため、以前より教室では癌幹細胞に関与すると思われる分子: Calreticulin に注目してきたが、このようなCalreticulin高発現膵癌細胞における免疫逃避機構との関連を検証した。そ

の結果、Calreticulin 高発現細胞株において PDL1 発現が高く HLA-class1 発現が低いことが示され細胞表面に Calreticulin を高発現した膵癌幹細胞は免疫監視からの逃避と関与している可能性があると考えられた。今後は前向きに膵癌患者の免疫学的サブセットと膵癌 Calreticulin 発現を検証し、より詳細な免疫逃避のカスケードを検証する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiroto Matsui, Hazama Shoichi, Nakajima Masao, Xu Ming, Matsukuma Satoshi, Tokumitsu Yukio, Shindo Yoshitaro, Tomochika Shinobu, Yoshida Shin, Iida Michihisa, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Yoshino Shigefumi, Ueno Tomio, Oka Masaaki, Nagano Hiroaki	4. 巻 70
2. 論文標題 Novel adjuvant dendritic cell therapy with transfection of heat-shock protein 70 messenger RNA for patients with hepatocellular carcinoma: a phase I/II prospective randomized controlled clinical trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 945 ~ 957
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-020-02737-y	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 該当する

1. 著者名 Nakajima Masao, Hazama Shoichi, Tamada Koji, Udaka Keiko, Saito Akira, Doi Shun, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Matsukuma Satoshi, Kanekiyo Shinsuke, Tokumitsu Yukio, Tomochika Shinobu, Iida Michihisa, Yoshida Shin, Nakagami Yuki, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Nagano Hiroaki	4. 巻 69
2. 論文標題 A phase I study of multi-HLA-binding peptides derived from heat shock protein 70/glypican-3 and a novel combination adjuvant of hLAG-3Ig and Poly-ICLC for patients with metastatic gastrointestinal cancers: YNP01 trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 1651 ~ 1662
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-020-02518-7	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松井洋人
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害剤を基軸とした汎用性の高い新規免疫治療の開発
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松井洋人
2. 発表標題 樹状細胞ワクチンによる肝細胞癌術後補助療法（第I/II相臨床試験）-最終報告と今後の展望-
3. 学会等名 第41回癌免疫外科研究会
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