

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17651

研究課題名(和文) 直腸癌術前化学放射線療法後の腫瘍免疫微小環境の解明

研究課題名(英文) Elucidation of tumor immune microenvironment after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer

研究代表者

阿河 杏介 (Agawa, Kyosuke)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70870343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：マウス大腸癌放射線治療モデルを作成し、CD8+T細胞の動態解析を行い、腫瘍内CD8+T細胞の増加の再現を行った。疲弊の程度に合わせて、3つに分画に分類し、PD-1+Tim3+CD8+T細胞が著明に増加し、その分画におけるIFN- γ 産生が増強していた。次に、大腸癌におけるTIMEの構成細胞の高精度検出を実現するため、直腸癌NACRT後の標本を用いて、染色を行いvirtual slideを作成した。それらの細胞を、AIにて識別させた。結果は、腫瘍におけるCD8+T細胞の数が再発率、組織学的奏功度に関係していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

直腸癌に対する術前化学放射線療法(NACRT)で組織学的奏功度を得ることは、治療成績の向上につながる。病理学的完全奏功(pCR)は予後良好であり、患者にとって大いなる福音となるが、現実的には、標準治療とはならず、一つのオプションに止まる。実際、pCR率は20%未満と低いことが要因といえる。NACRT後の腫瘍内CD8+T細胞の動態を解析することで、術前治療のより有用なバイオマーカーの開発にもつながり、さらにAIを用いた解析は、革新的な技術で多くの情報を迅速かつ客観的に取得することが可能となると考え、pCR率の向上を目指すために学問的にも意義深い研究である

研究成果の概要(英文)：A mouse colorectal cancer radiotherapy model was created to analyze CD8+ T cell kinetics and reproduce the increase in CD8+ T cells in the tumor. The cells were classified into three fractions according to the degree of exhaustion. PD-1+Tim3+CD8+ T cells were markedly increased, and IFN- γ production in that fraction was enhanced. Next, to achieve highly accurate detection of TIME component cells in colorectal cancer, we created virtual slides by staining rectal cancer specimens after NACRT. These cells were then identified by AI. The results showed that the number of CD8+ T cells in the tumor was related to the recurrence rate and histological response.

研究分野：消火器外科

キーワード：直腸癌 術前化学放射線療法 CD8(+T細胞

1. 研究開始当初の背景

直腸癌術前化学放射線療法(Neoadjuvant chemoradiotherapy: NACRT)の治療的課題は、病理学的完全奏効(pathological complete response: pCR)率の向上である。免疫チェックポイント阻害剤(check point inhibitor: CPi)との併用にその期待を集めるが、症例選択に有用なバイオマーカーはない。レジメンの著明な進歩がない一方、pCR 症例は予後良好な点に端を發し、Watch and wait policyとしてNACRT後clinical CR例に手術なしで観察する治療が注目された。現在はオプション治療に止まっており、その原因はpCR率が20%未満と低いことにあるといえる。このため、今後の直腸癌NACRT治療の目指すべき方向はpCR率の向上である。

2. 研究の目的

直腸癌NACRTのpCR率の向上のため、CPiとの併用にその期待を集めるが、症例選択に有用なバイオマーカーはない。腫瘍免疫微小環境(Tumor immune microenvironment: TIME)が良好に誘導される症例を絞り込むためのバイオマーカーの同定を目的とした研究である。良好なTIMEにはTLSの成熟度が重要な要素と考えており、マウス大腸癌放射線治療モデルにおけるCD8+T細胞の動態解析、TIME関連バイオマーカーの同定を行い、直腸癌NACRTのpCR率向上の一助としたいと考えた。

3. 研究の方法

マウス大腸癌放射線治療モデルにおけるCD8+ T細胞の動態解析
AIを用いたTIME関連の有用なバイオマーカーの同定

4. 研究成果

マウス大腸癌放射線治療モデルを作成し、CD8+T細胞の動態解析を行い、腫瘍内CD8+T細胞の増加の再現を行った。疲弊の程度に合わせて、3つに分画に分類し、PD-1+Tim3+CD8+T細胞が著明に増加していた。その分画におけるIFN- γ 産生が増強していることも分かった(図1)。一方、照射量の違い(放射線未治療, 2Gy, 10Gy, 15Gy)で検討したところ、2Gyでは放射線未治療群と比較してわずかに腫瘍縮小効果がみられるだけであった。10Gy以上の用量では、他の群と比較して腫瘍縮小効果をもっとも効果的に認めた。しかし、用量を10Gyから15Gyに増やしても、腫瘍縮小効果は改善されなかった。10Gy以上の用量漸増は、放射線治療における抗腫瘍効果を改善せず、これらのデータから、10Gyの単回投与における放射線治療が腫瘍縮小効果に最も有効であることを示した(図2)。

放射線治療に応答するCD8(+)+T細胞の機能的な遺伝子発現や、分化に関連する遺伝子を特徴付けるために、CD45(+), CD8(+)+T細胞中のPD-1, Tim3の各fractionでソーティングした細胞をRNA-seqで現在解析中である(図3)。この結果を踏まえて、どのようにCD8+T細胞が増加するか、疲弊のメカニズムのさらなる検討を行う予定である。

図1

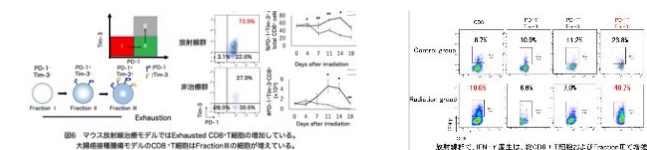


図2

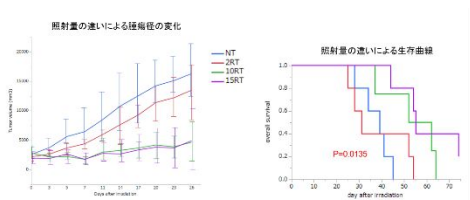
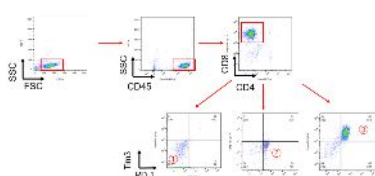


図3



まず、大腸癌における TIME の構成細胞や組織構造の高精度検出を実現するため、直腸癌 NACRT 後の標本を用いて、染色を行い、virtual slide を作成した。それらを、リンパ球、マクロファージ、間質細胞、癌細胞、CD8 陽性細胞等を、AI にて識別するように作成した Cu-Cyto viewer というソフトを用いて、解析した(図 4)。AI による病理組織解析は、多重免疫染色および携帯認識による細胞識別、細胞の位置情報のデータが特徴であり、同一の組織切片からより多くの情報を迅速かつ客観的に取得することが可能となる。AI に対し、アノテーション作業を継続し、さらなる精度向上に取り組んでいる。現時点での結果として、CD8+T 細胞を識別、定量化し解析すると、腫瘍における CD8+T 細胞の数が再発率、組織学的奏功度に関係していることが分かり、AI イメージングサイトメトリーを用いても、前述の結果を再現することに成功した(図 5)。今後、免疫染色における染色の程度と細胞形態をアノテーションすることで、より高度なデータ集積が可能となる。また、さらなる症例の集積により、迅速に高い客観性を有する術前治療のバイオマーカーの開発に活かせるように解析を行っている。

図 4

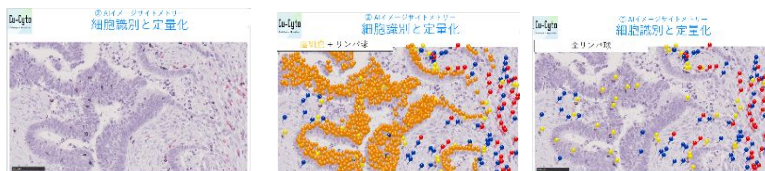
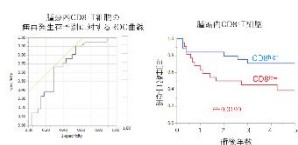


図 5



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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Agawa K, Matsuda T, Yamashita K, Hasegawa H, Takiguchi G, Urakawa N, Kanaji S, Oshikiri T, Nakamura T, Suzuki S, Kakeji Y	4. 巻 41
2. 論文標題 Feasibility and Safety of Lateral Pelvic Lymph Node Dissection After Neoadjuvant Chemoradiotherapy for Elderly Patients With Locally Advanced Rectal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 7983,7989
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-021-09872-5	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 Agawa K, Yamashita K, Nakagawa A, Yamada K, Watanabe A, Mukohyama J, Saito M, Fujita M, Takiguchi G, Urakawa N, Hasegawa H, Kanaji S, Matsuda T, Oshikiri T, Nakamura T, Suzuki S, Kakeji Y.	4. 巻 41
2. 論文標題 Simple Cancer Stem Cell Markers Predict Neoadjuvant Chemotherapy Resistance of Esophageal Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 4117, 4126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15214.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿河 杏介、山下 公大、向山知佑、山田 康太、渡部 晃大、裏川 直樹、長谷川 寛、金治 新悟、松田 武、押切 太郎、掛地 吉弘
2. 発表標題 Intratumoral CD8 + T cell by radiotherapy contributing to antitumor effects
3. 学会等名 第31回日本サイトメトリー学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下 公大、向山知佑、阿河 杏介、山田 康太、渡部 晃大、裏川 直樹、長谷川 寛、金治 新悟、松田 武、押切 太郎、掛地 吉弘
2. 発表標題 The location of tumor infiltrating CD8 + T cells in rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy and the prognosis
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下 公大、福岡 英志、渡部 晃大、阿河 杏介、山田 康太、瀧口 豪介、裏川 直樹、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、松田 武、押切 太郎、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 放射線治療は新たに浸潤するCD8+T細胞を増強し、腫瘍内CD8+T細胞の増加と抗腫瘍効果に寄与する。
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿河 杏介、山下 公大、山田 康太、渡部 晃大、瀧口 豪介、裏川 直樹、長谷川 寛、山本 将士、金治 新悟、松田 佳子、松田 武、押切 太郎、中村 哲、鈴木 知志、掛地 吉弘
2. 発表標題 放射線治療は、腫瘍内CD8+T細胞の増加とサイトカイン産生を増強し、抗腫瘍効果に寄与する
3. 学会等名 第31回日本消化器癌発生学会総会
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