

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17686

研究課題名（和文）食道癌における腫瘍関連マクロファージによる化学療法耐性機構の解明と克服

研究課題名（英文）Elucidation and overcoming of the mechanism of chemoresistance by tumor-associated macrophages in esophageal cancer

研究代表者

裏川 直樹（Urakawa, Naoki）

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：20647763

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）：食道癌cStage II/III に対する術前化学療法は依然として予後不良であり、特に癌微小環境に存在する腫瘍関連マクロファージ（TAM）や腫瘍CD8陽性浸潤リンパ球（TIL）を中心とした化学療法に対する耐性機構の解明が必要である。今回の研究では、癌組織内CD163およびCD204陽性TAMの浸潤割合の増加傾向を認め、in vivoにおいても5-FUやシスプラチン下におけるTAMは抗腫瘍効果を抑制する機能が増強する傾向を認め、共培養実験系においてはINF- γ やTIL細胞数の変化は、TAMのTILへの増殖抑制効果を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌に対する化学療法の進展は目覚ましく、近年免疫療法などの導入も積極的に行われている。化学療法や免疫療法による腫瘍微小環境の変化を解明することは、食道癌治療成績の向上へ繋がることが期待される。今回の研究においては、化学療法下における特に腫瘍関連マクロファージの腫瘍進展への関与を解析しており、今後の治療の発展の一助になる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Preoperative chemotherapy for cStage II/III esophageal cancer remains associated with poor prognosis, and the mechanisms of resistance to chemotherapy, particularly tumor-associated macrophages (TAMs) and tumor CD8-positive infiltrating lymphocytes (TILs) in the cancer microenvironment, need to be clarified. In the present study, we observed a trend toward an increased percentage of CD163- and CD204-positive TAM infiltration in cancer tissues, a trend toward an enhanced ability of TAMs to suppress antitumor effects under 5-FU and cisplatin in vivo, and changes in INF- γ and TIL cell numbers in the experimental co-culture system. TAMs in the co-culture system suggested an inhibitory effect of TAMs on TIL proliferation.

研究分野：消化器外科

キーワード：食道癌 マクロファージ 化学療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 食道癌 cStage / に対する治療は、JCOG9907 試験 (Ando N, et al. Ann Surg Oncol. 2012) の結果を受けて、術前化学療法 + 手術が推奨される。しかし、依然として5年生存率は低く、シスプラチンや5-FUを用いた化学療法のみでは治療効果は十分ではない。免疫チェックポイント阻害剤などの新規治療薬併用も探索されており、食道癌に対する化学療法の影響、特に癌微小環境に存在する腫瘍関連マクロファージ (TAM) などを中心とした化学療法に対する耐性機構の解明が必要である。

(2) 近年の癌微小環境研究で注目される予後良好の予測因子である腫瘍 CD8 陽性浸潤リンパ球 (以下、TIL) に着目した。我々の施設では TIL の間質専有面積比率 (TIL score) を用いて食道扁平上皮癌で解析したが、術前化学療法 (シスプラチン + 5-FU、以下 FP 療法) を施行した cStage / 患者の手術検体において TIL と PD-L1 陽性免疫細胞の陽性率は化学療法後に増加することを確認したが、予後に相関は認めなかった (Fukuoka E, et al. *AntiCancer Res.* 2019)。以上から、食道癌術前 FP 療法は癌微小環境に TIL などの免疫細胞を動員することを

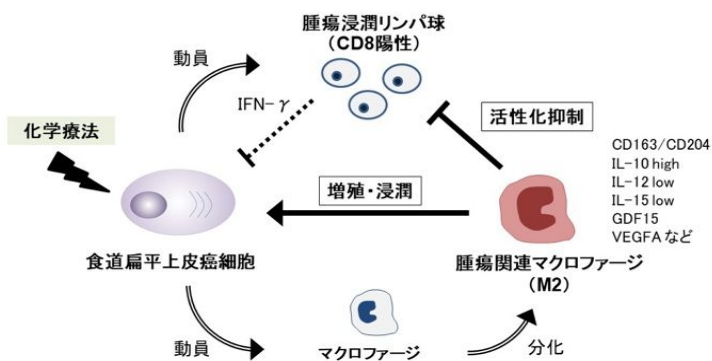


図1 食道癌微小環境内の腫瘍関連マクロファージによる化学療法耐性機構 (仮説) 化学療法の影響で癌微小環境に炎症が起こり、マクロファージ (M1) や腫瘍浸潤リンパ球が動員・増加する。マクロファージは腫瘍促進性のM2性質を獲得し、癌細胞の増殖・浸潤能を維持する。さらに、リンパ球のIFN- γ 産生を抑制し、抗腫瘍効果を抑制する。
(Urakawa N, et al. *Lab Invest.* 2015; Fukuoka E, et al, *Anti Cancer Res.* 2019)

を解明したが、TILの浸潤による予後の改善には至っておらず、TILの機能不全を誘導し化学療法耐性機構を構築する、強力な抑制機能を持つ免疫細胞の存在が示唆された (図1)。

(3) 化学療法下の腫瘍関連マクロファージの機能解析の必要性

強力な免疫抑制機能を持つ細胞の一つとして、TAMの存在が挙げられる。前述の結果ではFP療法によりPD-L1陽性免疫細胞陽性率が増加しており、前駆体であるマクロファージも癌微小環境に動員・増加することが示唆される。我々は、食道扁平上皮癌微小環境におけるTAMの機能解析を長年行ってきた。マクロファージは炎症作用を有するM1マクロファージ、腫瘍促進作用を有するM2マクロファージに大別される。術前未治療の手術検体を用いた解析では、食道扁平上皮癌組織内のマクロファージはM2表面マーカーであるCD163やCD204の陽性率が高くM2の性質を獲得しており、臨床病理学的因子や予後不良と強く相関することを明らかにした (Shigeoka M, Urakawa N, et al. *Cancer Sci.* 2014)。in vitroの研究では、ヒト末梢血から分離した単球をマクロファージに分化させ、食道扁平上皮癌細胞株から抽出した腫瘍培養上清液を用いてTAMに誘導するモデルを構築し、M2の特徴であるIL-10やVEGFA、MMPsなどの腫瘍促進因子の産生を確認した (Urakawa N et al. *Lab Invest.* 2015)。さらに、網羅的遺伝子比較解析で抽出したGDF15、CXCL8、NCAMなどの作用機序を解析し、特にGDF15やCXCL8は腫瘍細胞に対し増殖や浸潤を引き起こし、臨床病理学的因子や予後不良と強く相関することを確認した。以上から、食道扁平上皮癌微小環境においてM2マクロファージの性質を獲得し、腫瘍増殖・浸潤を促進することを明らかにした。

2. 研究の目的

我々のこれまでの研究も踏まえ、化学療法下での食道扁平上皮癌微小環境内のTAMの免疫抑制機序はであるか、さらに食道癌術前化学療法において、TAMは治療抵抗性を示す指標になるのかを学術的問いとし、食道癌術前化学療法5-FUおよびシスプラチンの影響下でのTAMの免疫抑制機序を解明し、食道扁平上皮癌微小環境の化学療法耐性機構を明らかにし、TAMのM2分化制御やTILの賦活化を試みる。

3. 研究の方法

(1) 食道癌FP療法後の病理組織標本を用いたTAMの免疫組織化学的解析

術前FP療法後に外科的に切除された食道扁平上皮癌の臨床検体 (病理組織標本) を用い、術前FP療法前後の癌組織内CD163/CD204陽性TAM浸潤率の変化を測定し、癌組織内へのTAMの動員・増加を明らかにする。

(2) 5-FU/シスプラチン暴露TAMモデルの確立と発現解析

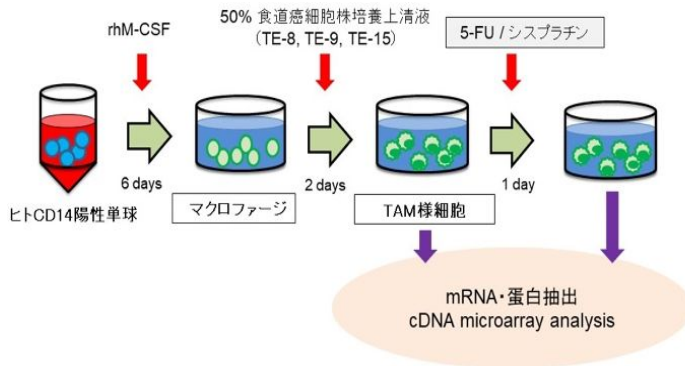


図2 *in vitro* TAM様細胞への5-FU/シスプラチン投与の実験モデル
 健常者血液よりヒト単球を採取し、rhM-CSFでマクロファージに分化させる。
 食道癌細胞株上清液を用いてTAM様細胞を確立し、5-FUとシスプラチンに
 暴露させ比較検討を行う。(Urakawa N, et al. *Lab Invest.* 2015より一部引用)

自動細胞分離装置 (autoMACS Pro Separator)を用いて、健常者血液から単離したCD14陽性単球をrhM-CSF(25 ng/mL)で6日間刺激しマクロファージ様細胞を作成する。50%食道扁平上皮癌由来細胞 (TE-8, TE-9, TE-15) 培養上清液を2日間作用させることでTAM様細胞を作成し、さらに5-FUやシスプラチンを含む培養液で1日間暴露する(図2)。

上記過程で作成したTAM様細胞のmRNAや蛋白抽出、培養上清液を用いて、腫瘍促進因子の定量的変化を測定し、FP療法によるTAMの腫瘍増殖や浸潤能の促進を明らかにする。

(3) 食道癌FP療法後の手術検体におけるTAMの遺伝子発現および機能解析

術前FP療法後の手術検体を用い、CD204陽性マクロファージを標的としたシングルセルRNAシーケンスの解析を行い、TAMの生体機能評価を行う。前述のIL-10やIL-12、IL-15、GDF15、CXCL8の発現の有無を確認し、研究の結果の妥当性を明らかにし、手術検体でのIL-15やIL-12の産生能を確認する。

(4) 5-FU/シスプラチン暴露TAMモデルとCD8陽性T細胞の共培養実験系の確立

TAMモデル同様に、健常者血液からCD8陽性T細胞を単離する。共培養実験を行い、CD8陽性T細胞数の測定や培養液中のINF- γ の定量を行い、TAMモデル存在/非存在下での比較を行う。これにより、TAMのTILへの増殖抑制効果を明らかにする。

4. 研究成果

食道扁平上皮癌組織内のCD163およびCD204陽性TAMの浸潤割合の増加傾向を認め、*in vivo*においても5-FUやシスプラチン下におけるTAMは、抗腫瘍効果を抑制する機能が增强することを確認した。また、共培養実験系におけるINF- γ やTIL細胞数の変化は、TAMのTILへの増殖抑制効果を示し、現在さらに追加解析を行っている。

また、近年腫瘍微小環境下の細胞として注目されているCD4陽性T細胞リンパ球に関しても、癌疾患との関連性や、癌微小環境下におけるCD8陽性T細胞との関連性を明らかにする目的で、追加で研究、解析を行った。腫瘍微小環境内のCD4⁺T細胞は肥満環境では著しく減少し、programmeddeath-1(PD-1)の発現が増加し、CD107aの発現やINF- γ 、TNF- α などのサイトカインの産生が減少し、機能不全を示した。肥満による癌微小環境下におけるCD4⁺T細胞の減少と機能不全が、CD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞の両方の抗腫瘍反応の低下を招き、最終的にがんの進行を加速させることを示唆した(図3、図4 Yamada K, Urakawa N, et al. *Cells.* 2022)。これらの発見は、肥満に伴う癌の予後不良の要因にCD4陽性T細胞が強く関与することを明らかにするものと考えられた。これらの結果も、癌微小環境下機能の解明の一助になることが期待され、化学療法における癌微小環境の変化や機能解析がさらに明らかになることが期待された。

図3

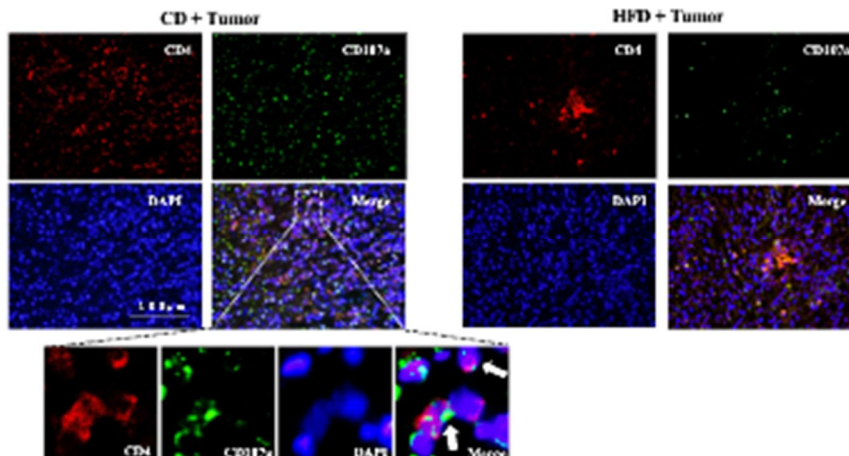
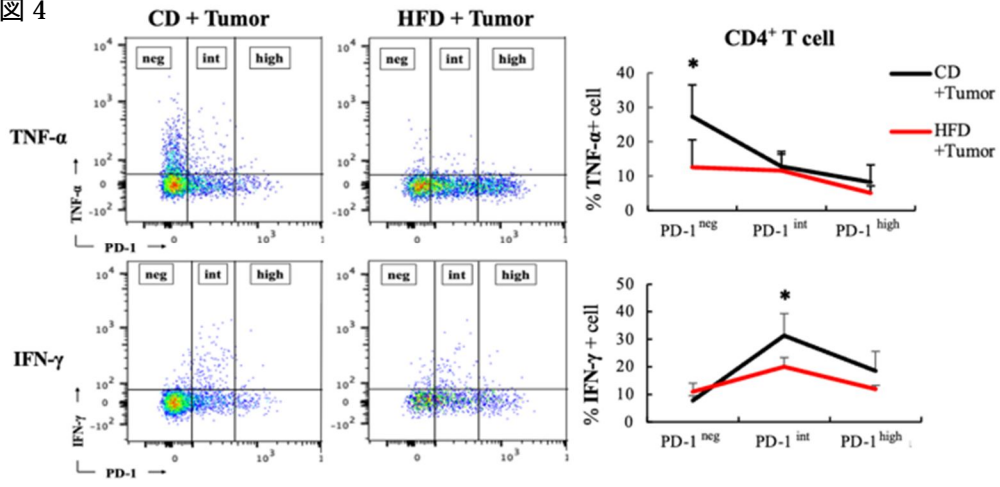


Figure 4



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 KYOSUKE, YAMASHITA KIMIHIRO, NAKAGAWA AKIO, YAMADA KOUTA, WATANABE AKIHIRO, MUKOHYAMA JUNKO, SAITO MASAFUMI, FUJITA MITSUGU, TAKIGUCHI GOSUKE, URAKAWA NAOKI, HASEGAWA HIROSHI, KANAJI SHINGO, MATSUDA TAKERU, OSHIKIRI TARO, NAKAMURA TETSU, SUZUKI SATOSHI, KAKEJI YOSHIHIRO	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 Research	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 -

1. 著者名 Yamada Kota, Saito Masafumi, Ando Masayuki, Abe Tomoki, Mukoyama Tomosuke, Agawa Kyosuke, Watanabe Akihiro, Takamura Shiki, Fujita Mitsugu, Urakawa Naoki, Hasegawa Hiroshi, Kanaji Shingo, Matsuda Takeru, Oshikiri Taro, Kakeji Yoshihiro, Yamashita Kimihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Reduced Number and Immune Dysfunction of CD4+ T Cells in Obesity Accelerate Colorectal Cancer Progression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 86 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12010086	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
---------------------------	-----------------------	----

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