

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18151

研究課題名（和文）膀胱癌におけるCD73を介した細胞外アデノシン依存性免疫環境の理解

研究課題名（英文）Single-Cell Phenotyping of CD73 Expression Reveals the Diversity of the Tumor Immune Microenvironment and Reflects the Prognosis of Bladder Cancer

研究代表者

井澤 水葵（Izawa, Mizuki）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：80868761

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではCD73の発現が現在臨床で用いられている膀胱癌治療とどのように関連するのかに着目して研究計画を立案した。当院で手術が施行された膀胱癌156例を対象とし、組織マイクロアレイを作成した。5種の細胞マーカー（CD3、CD8、Foxp3、PD-1、PD-L1）とCD73との共発現を、多重蛍光染色と自動画像定量システムで可視化した。腫瘍内に存在する多様な細胞種毎にCD73発現の階層化をおこない、細胞種に応じたCD73発現と生命予後・治療効果の統計学的な解析をおこなった。免疫細胞におけるCD73の発現量の増加は、腫瘍微小環境の特性に依存し、進行のリスクと相関することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌研究におけるCD73依存的な細胞外アデノシン代謝の役割は、多岐にわたる分野で注目されているが、膀胱癌領域における報告は少ない。本研究ではCD73の発現が現在臨床で用いられている膀胱癌治療との関連について着目した。近年の腫瘍免疫学の発展によって、膀胱癌はヒトの癌のなかでも遺伝子変異が多く、免疫チェックポイント阻害剤が有効であることは周知の事実となった。CD73を通して癌免疫応答を解明することで、BCG注入療法の治療効果予測因子を確立するのみならず、転移・切除不応性膀胱癌の臨床で用いられている抗PD-1/PDL-1抗体の適応や最適な免疫チェックポイント阻害剤の併用についても理解が進んだ。

研究成果の概要（英文）：We focused on expression of CD73 to clarify the state of CD73 positivity in bladder cancer (BCa) immunity. We utilized clinical tissue microarrays of human BCa and simultaneously performed fluorescent staining of cell type-specific markers (CD3, CD8, Foxp3, PD-1, and PD-L1) and CD73 together with DAPI. In total, 156 subjects were included. Multiplexed cellular imaging revealed a unique interaction between CD73 expression and CD8+ cytotoxic T cells (CTLs) and Foxp3+ Treg cells in human BCa, showing the high infiltration of CD8+CD73+ CTLs and Foxp3+CD73+ Treg cells in tumors to be associated with tumorigenesis and poor prognosis in BCa. In conclusion, the present results on the status of CD73 in cancer immunity suggest that CD73 expression on specific T-cell types has a negative immunoregulatory function. These findings may provide further insights into the immunobiological landscape of BCa, which may be translationally linked to improvements in future immunotherapy practice.

研究分野：膀胱癌

キーワード：膀胱癌 CD73 癌微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

CD73 は ATP・ADP・AMP を加水分解してアデノシンを産生する膜型酵素である(Fig.1)。細胞外 ATP は、CD39 による AMP を経て、CD73 により細胞外アデノシンへと分解される。細胞外アデノシンは、各細胞表面上の受容体のひとつである A2RAR に結合して、ヘルパーT 細胞や樹状細胞を抑制する一方で、制御性 T 細胞(Treg 細胞)を活性化する。つまり、CD73 は細胞外アデノシンを増加させることで免疫応答を抑制するはたらきを持つ。

近年、CD73 は様々な癌組織に高発現し、細胞外アデノシン産生を介した癌細胞への免疫抑制機構を呈することが明らかになってきた(Stagg J et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2010)。癌細胞は CD73 を介してアデノシンを自律的に産生することで、自らを攻撃する可能性のある NK 細胞や細胞障害性 T 細胞の活性化を抑制し(即ち抗腫瘍免疫の抑制)、癌細胞に対する抗腫瘍効果を減弱させる(Fig.2)。実際に CD73 欠損マウスでは抗腫瘍免疫が増強し、腫瘍の進展・再発が抑制されることが確認されている(Wang L et al, J Clin Invest 2011)。

CD73 は A2RAR を活性化することで、PD-1 等の T 細胞の免疫チェックポイントのアップレギュレーションを起こす作用も報告されている(Paul AB et al, Oncoimmunol 2015)。CD73 を既に臨床応用されている抗 PD-1/PDL-1 抗体の治療効果予測因子であり、更に抗 CD73 モノクローナル抗体を抗 PD-1/PDL-1 抗体との併用薬として用いる可能性が示唆されている(Robert D et al, J Immunother Cancer 2018)

しかしながら、このように急速に癌微小環境に着目した創薬や臨床研究が進められるなかでも、膀胱癌での報告は極めて少ないうえに、実際に癌細胞上に CD73 の発現数を規定するゲノム異常・エピゲノム異常については未解明である。

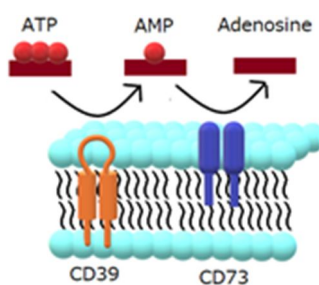


Fig.1

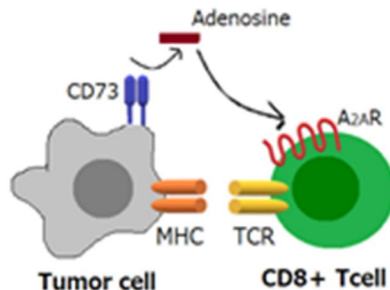


Fig.2

## 2. 研究の目的

現在の筋層非浸潤性膀胱癌の再発・進展予防ならびに治療は多様化を示しながらも、依然として進化が望まれる BCG 治療が主軸のままで、新規治療戦略の開発が急務である。本研究は、癌微小環境における CD73 の役割を明らかにし、膀胱癌に特異的なゲノム異常との関係性を見出すことで、CD73 に着目した新たな治療戦略の確立を目的とする。CD73 は腫瘍内の細胞外アデノシン代謝に深く関与し、免疫寛容に通じる。臨床では抗 CD73 抗体が、例えば抗 PD-1 抗体 Pembrolizumab との併用で臨床試験が進む。膀胱癌で BCG や PD-1 阻害薬等が免疫治療に一定の効果を示すのは、癌微小環境に癌免疫が密接に関わっているからである。更に我々は本研究で、転移性・切除不応膀胱癌における CD73 発現にも着目し、抗 PD-1/PDL-1 抗体の適応や最適な免疫チェックポイント阻害剤の併用についても基礎的エビデンスを確立したい。

## 3. 研究の方法

当院で手術が施行された膀胱癌(BCa)156 例を対象とし、組織マイクロアレイを作成した。5 種の細胞マーカー (CD3、CD8、Foxp3、PD-1、PD-L1) と CD73 との共発現を、チラミドシグナル増幅法を用いた多重蛍光染色で可視化し、自動イメージング定量システムでシングルセル解析した。

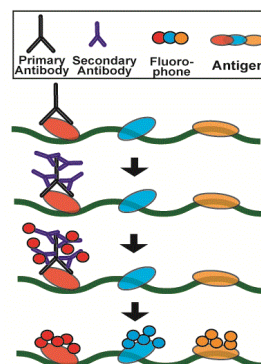


Fig.3 Phenolmager HT Vectra Polaris(Akoya Biosciences) Fig.4

## 4. 研究成果

膀胱癌 156 例から合計 2,435,522 細胞が同定され、CD73 陽性率は全体の 18%であった。腫瘍内全細胞の CD73 陽性率は、筋層浸潤性膀胱癌と筋層非浸潤性膀胱癌の間に有意差を認めなかったが、T 細胞 (CD8 + CTL・Foxp3 + Treg) に着目した CD73 発現解析では、筋層浸潤性膀胱癌で CD73 陽性率は著しく増加していた。これらの結果から、免疫細胞における CD73 の発現量の増加は、腫瘍微小環境の特性に依存し、進行のリスクと相関することが示唆された。生存解析では、単純な CD73 high vs CD73 low の比較で全生存期間 (OS) に差を認めなかった。一方、多重染色法による生存解析では、CD8 high CD73 high 腫瘍群がその他の群と比較して、OS が有意に短いことが明らかになった。さらに、Foxp3 high CD73 high 腫瘍群もその他の群と比較して、OS が有意に短かった。このことは、Foxp3+CD73+ Treg 細胞が腫瘍微小環境における免疫抑制に寄与していることを示唆している。

また、CD73+ T 細胞が、代表的な免疫チェックポイント分子である PD-1+ T 細胞や PD-L1+ がん細胞と相互作用するメカニズムについても検討した。細胞間距離の解析では、腫瘍空間の CD73+ CTL と CD73+Treg 細胞は、それぞれ CD73 - CTL と CD73 - Treg 細胞と比較して、同一組織内の PD-L1+細胞から離れた場所に存在しており、CTL・Treg 細胞の空間分布に対する CD73 発現の影響が示唆された。

結論として、多重化単一細胞病理学的検査により、ヒト BCa における CD73 発現と CD8+ CTL および Foxp3+ Treg 細胞の間のユニークな相互作用が明らかになり、腫瘍における CD8+CD73+ CTL および Foxp3+CD73+ Treg 細胞の高い浸潤が、腫瘍悪性度および予後の悪さと関連していることが示された。さらに、CD73+ CTL と CD73+ Treg 細胞はともに、腫瘍の浸潤性と異型度の上昇に伴い、PD-1 を共発現する傾向が見られた。さらに、これらの細胞は、腫瘍内の PD-L1+細胞から離れた場所に位置する空間的ニッチを占めている可能性が示された。これらの知見を統合すると、病理標本の CD73 染色がコンパニオン診断として治療戦略の決定に寄与する可能性がある。また、CD73 と PD-1/PDL-1 が発揮する免疫寛容が空間的に乖離している場合、抗 CD73 モノクローナル抗体が併用治療薬として有効である可能性が示唆された。

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 Izawa M, Tanaka N, Murakami T, Anno T, Teranishi Y, Takamatsu K, Mikami S, Kakimi K, Imamura T, Matsumoto K, Oya M.	4. 巻 103
2. 論文標題 Single-Cell Phenotyping of CD73 Expression Reveals the Diversity of the Tumor Immune Microenvironment and Reflects the Prognosis of Bladder Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 10040
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.labinv.2022.100040	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 井澤水葵
2. 発表標題 Understanding the CD73-mediated extracellular adenosine-dependent tumor immune microenvironment in bladder cancer
3. 学会等名 日本泌尿器科学会総会110回
4. 発表年 2023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
---------	---------