

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18736

研究課題名（和文）口腔がん腫瘍微小環境の解明を目指した多重免疫染色による新規バイオマーカー探索

研究課題名（英文）Investigation of the specific biomarkers for elucidation of the tumor microenvironment using multiplex immunohistochemistry in oral cancer

研究代表者

川嶋 理恵（KAWASHIMA, RIE）

自治医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10814444

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）：口腔癌患者の個別化治療を目指し、1枚のパラフィン切片で多重免疫染色を行うことにより効率的な腫瘍微小環境の評価、解析を可能とするための腫瘍微小環境評価パネルを確立した。このパネルはリンパ球系細胞、骨髄球系細胞、T細胞機能分類の評価に加え、癌関連線維芽細胞(CAFs)や血管内皮細胞、上皮間葉転換、線維化反応など腫瘍間質反応を反映しており、細胞、分子レベルでのプロファイリングを行うことで、免疫多様性の解析を行い早期診断や治療選択基準、予後予測となりうるバイオマーカーの探索を目指すことが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌における腫瘍微小環境の病理組織学的網羅的解析を行うことで、癌の発生制御、適切な治療選択、転移制御を可能とするバイオマーカーを特定し、口腔癌の生存率向上を目指すことを目的に、本研究を開始した。腫瘍微小環境評価パネルの確立は、目的に応じターゲットとする細胞/分子を自由に選択でき、将来的に口腔癌のみならず様々な疾患に応用可能である。また臨床応用を考え、重複する試薬のコストダウンが見込める点、蛍光免疫染色と比較し染色手技が比較的簡便で蛍光顕微鏡などコストのかかる設備投資が必要ない点、入手可能なソフトウェア上で定量解析を行う点でも実用化しやすく、社会的意義が非常に高いと考える。

研究成果の概要（英文）： We established the tumor microenvironment panel for the multiplex immunohistochemical staining (IHC) in a paraffin section of each oral cancer patient. Our aim of this study is to analysis the comprehensive pathological tumor microenvironment in oral cancer patients.

Our panel is including the marker of lymphocytes, myeloid cells, T cell classification, cancer-associated fibroblasts, endothelial cells, epithelial mesenchymal transition, and desmoplastic reaction. To comprehend tumor immune microenvironment in each patient of a different reaction to the treatment leads to the personalized cancer treatment. By using this new panel for the multiplex IHC, we believe that it enables to discover the specific marker for the cancer treatment selection and prognostic prediction in the near future.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔癌 腫瘍微小環境 免疫組織化学染色

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 腫瘍微小環境において、リンパ球系細胞・骨髄球系細胞などの腫瘍浸潤免疫細胞や線維芽細胞などの間質細胞は、免疫多様性の観点から癌の発生や増殖、転移に非常に重要である。がん形成過程には、がん細胞自体の因子に加え様々な免疫細胞が複雑に関与しており、腫瘍微小環境における免疫多様性の評価は非常に重要である。
- (2) “ 口腔癌の制御 = 生存率向上 ” を目指した治療戦略のためには、癌の発生制御、個々の患者に対する適切な治療選択、転移制御が必須である。しかしながら “ 口腔癌の制御 ” を可能とする病理組織学的バイオマーカーは存在せず、これらのバイオマーカーの特定が急務である。

2. 研究の目的

- (1) 口腔癌における腫瘍微小環境の病理組織学的網羅的解析を行うことで、癌の発生制御、適切な治療選択、転移制御を可能とするバイオマーカーを特定し、口腔癌の生存率向上に貢献できるのではないかと考えた。よって本研究の目的は、口腔癌の腫瘍微小環境を反映する免疫細胞、免疫チェックポイント、間質反応を反映するマーカーを用いて細胞、分子レベルでのプロファイリングを行うことで、免疫多様性の解析を行い診断や治療選択基準、予後予測となりうるバイオマーカーの探索を目指すことである。
- (2) 国内での将来的な臨床応用に繋げるため、効率的で正確、かつ簡便で高価な機器を必要とせず安定した多重免疫染色法を行うため、本研究にてターゲットとするマーカーを検出するための腫瘍微小環境評価パネルを確立する。

3. 研究の方法

- (1) 申請者が以前開発した、1つのパラフィン組織切片上で最大12マーカーの細胞/分子を免疫組織化学染色で検出、定量を行い、局在の解析を可能とする多重免疫染色定量解析法 (引用文献1)を応用し、さらにターゲットとするマーカーを増やして染色を行う。

(2) 主な解析項目

使用検体：口腔癌患者の切除検体、ヒト正常扁桃組織 (ポジティブコントロール)

リンパ球系免疫細胞パネル (引用文献1)

(T細胞分類、T細胞サブセット、B細胞、免疫チェックポイントの評価)

Cycle1	Cycle2	Cycle3	Cycle4	Cycle5	Cycle6	Cycle7	Cycle8	Cycle9	Cycle10	Cycle11	Cycle12
HE	PD1	CD3	Th17	NK	CD8	Th1	Th2	PDL1	CD45	Treg	CD20

骨髄球系免疫細胞パネル(引用文献1)

(マクロファージ分類、樹状細胞分類、免疫チェックポイントの評価)

Cycle1	Cycle2	Cycle3	Cycle4	Cycle5	Cycle6	Cycle7	Cycle8	Cycle9	Cycle10	Cycle11	Cycle12
HE	CD68	CSF1R	DC	DC	CD66b	MHCII	CD163	PDL1	CD45	CD3/20/NK	Tryptase

T細胞機能分類パネル(引用文献1)

(T細胞増殖、T細胞活性、T細胞疲弊、免疫チェックポイントの評価)

Cycle1	Cycle2	Cycle3	Cycle4	Cycle5	Cycle6	Cycle7	Cycle8	Cycle9	Cycle10	Cycle11	Cycle12
HE	CD4	CD3	PD1	Ki67	CD8	EOMES	Th1	GrzB	CD45	ICOS	CD45

腫瘍間質反応評価パネル

(癌関連線維芽細胞、血管内皮細胞、上皮間葉転換、線維化反応の評価)

SMA, Desmin, CD34, Zeb1

4 . 研究成果

研究開始当初は、上記①～③のパネルにて各患者検体のパラフィン切片計 3 枚 (各パネルにつきパラフィン切片 1 枚) を使用予定であった。しかしながら研究を進めていくにあたり、腫瘍微小環境を評価するためには腫瘍関連線維芽細胞(CAFs)や血管内皮細胞、上皮間葉転換(EMT)、線維化反応など間質反応の評価が重要であること、貴重な臨床検体の使用を必要最低限に留めたいと考えるようになった。そこで筆者らが以前報告した 29 色多重免疫染色法 (引用文献 2) を参考に、1 枚のパラフィン切片から、より多数のマーカーを検出、解析し、抗体、試薬の重複使用を避け時間、経費削減などさらなる効率化を図るため、上記①～③のマーカーに新たに上記④のマーカーを加え、これらすべてのマーカーを 1 枚のパラフィン切片上で検出する「30 色腫瘍微小環境評価パネル」(表 1) を確立した。

表 1. 30 色腫瘍微小環境評価パネル (論文発表前のため染色順、濃度などの実験手技詳細は省略)

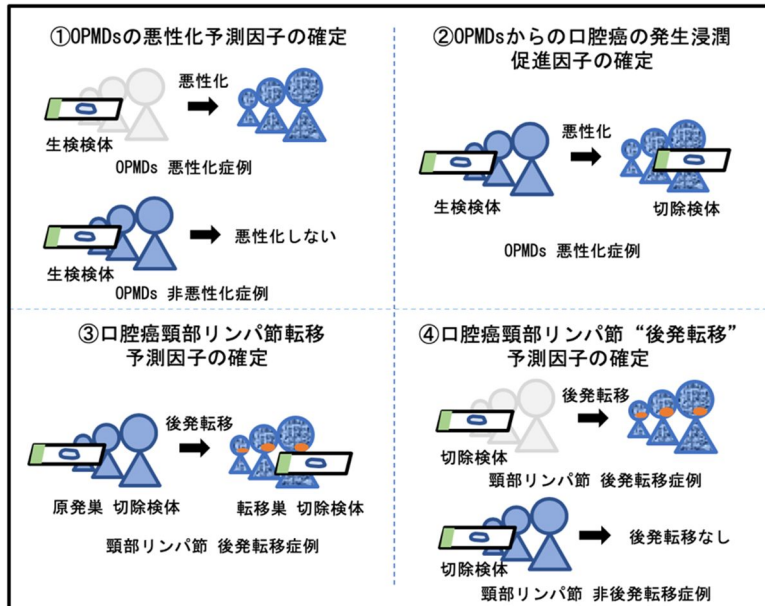
Cycle1	Cycle2	Cycle3	Cycle4	Cycle5	Cycle6	Cycle7	Cycle8	Cycle9	Cycle10	Cycle11	Cycle12	Cycle13	Cycle14	Cycle15	Cycle16
Round1	R2	R5	R7	R9	R11	R13	R15	R17	R19	R21	R23	R25	R27	R29	R30
Hematoxylin	CD45	T-bet	RORgt	CD8	Ki67	CD20	NKp46	CD68	DC-SIGN	MHC II	PD1	PDL1	SMA	Zeb1	Pan-CK
	R3	R6	R8	R10	R12	R14	R16	R18	R20	R22	R24	R26	R28		
	CD3	GATA-3	Foxp3	GzmB	EOMES	tBTK	CSF1R	CD163	DC-LAMP	CD66b	Tryptase	Desmin	CD34		
	R4														
	CD4														

この腫瘍微小環境評価パネルには、リンパ球系細胞、骨髄球系細胞、T 細胞機能分類評価に加え、癌関連線維芽細胞(CAFs)や血管内皮細胞、上皮間葉転換、線維化反応などの評価項目が追加されており、腫瘍微小環境における間質反応を詳細に反映するマーカー構成となっている。このあらたなパネルを確立したことで、貴重な臨床検体の使用を必要最低限とし、効率的網羅的な腫瘍微小環境の解析が可能となった。また、将来的な臨床応用を考えると、重複する試薬のコストダウンが見込める点、蛍光免疫染色と比較し染色手技が比較的簡便で、蛍光顕微鏡などコストのかかる設備投資が必要ない点、入手可能なソフトウェア上で定量解析を行う点などから、各医療機関で比較的取り入れやすい点も現実的に実用化しやすいポイントである。

また目的に応じターゲットとする細胞/分子を自由に選択でき、将来的に口腔癌のみならず様々な疾患に応用可能である。実際に、この腫瘍微小環境評価パネルを用いて消化器癌や子宮癌、皮膚疾患である乾癬などの他臓器、他疾患にも応用し、結果を得ている。

今後は本研究にて確立した 30 色腫瘍微小環境評価パネルを用いて、図 1 の臨床検体を用いて多重免疫染色を行い、解析を進めていく予定である。

図 1. 各症例における比較検討



<引用文献>

1. Tsujikawa T, Kumar S, Borkar RN, Azimi V, Thibault G, Chang YH, Balter A, **Kawashima R**, Choe G, Sauer D, El Rassi E, Clayburgh DR, Kulesz-Martin MF, Lutz ER, Zheng L, Jaffee EM, Leyshock P, Margolin AA, Mori M, Gray JW, Flint PW, Coussens LM. Quantitative Multiplex Immunohistochemistry Reveals Myeloid-Inflamed Tumor Immune Complexity Associated with Poor Prognosis. *Cell Reports*. 2017;19(1):203-217
2. Grace Banik, Courtney B. Betts, Shannon M. Liudahl, Shamilene Sivagnanam, **Kawashima R**, 他7名: High-dimensional multiplexed immunohistochemical characterization of immune contexture in human cancers. *Methods Enzymol*. 2020;635:1-20.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------