

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15533

研究課題名（和文）転移性大腸癌に対する癌免疫療法の有効性からみる免疫細胞浸潤機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of Immune Cell Infiltration in the Efficacy of Cancer Immunotherapy for Metastatic Colorectal Cancer

研究代表者

弓削 亮（Yuge, Ryo）

広島大学・病院（医）・講師

研究者番号：70794791

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：約100例の大腸癌標本を用いた免疫染色による解析で、inflamed typeに比較して excluded type, desert typeの症例において間質量が有意に多いことが示され、また肝転移症例については phenotypeにかかわらず原発巣と肝転移巣で間質量が相関することが示された。肝転移マウスモデルでは Inflamed typeの肝転移モデルではコントロール群に比較してPD-1単剤投与で有意な抗腫瘍効果を示した。一方、Excluded typeの肝転移モデルでは各単剤投与群では明らかな抗腫瘍効果を認めず、併用群においてコントロール群、各単剤投与群と比較しは有意な転移抑制効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な癌種、特に大腸癌においては免疫チェックポイント阻害剤（ICI）の効果を増強させる有効性の高い併用薬が見出だせていないのが現状である。本研究成果によって、PDGFR阻害剤の投与は、間質量を減少させ免疫細胞を癌巣に浸潤しやすくするだけでなく、癌間質相互作用に作用して転移抑制効果が期待でき、ICIとの併用効果が確認できたことで、ICI単剤では奏功しなかった転移性大腸癌症例に対する新規治療法の同定につながり、さらに腫瘍免疫におけるCAFの役割や腫瘍免疫細胞浸潤機構の解明が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Immunostaining analysis of approximately 100 colorectal cancer specimens showed that intermasses were significantly higher in excluded and desert type cases than in inflamed type cases, and in liver metastasis cases, intermasses were correlated between primary and liver metastases, regardless of phenotype. In the case of liver metastases, the intermasses were correlated between the primary tumor and liver metastases regardless of phenotype. In the mouse model of liver metastasis, the Inflamed liver metastasis model showed a significant antitumor effect of PD-1 monotherapy compared to the control group. On the other hand, in the Excluded type liver metastasis model, the single agent group showed no clear antitumor effect, while the combination group showed significant metastasis inhibition compared to the control group and the single agent group.

研究分野：癌間質相互作用

キーワード：免疫チェックポイント 癌間質 大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転移を有する大腸癌の予後は不良であり、その死因の3分の1が肝転移によるとされる。近年、様々な癌種で癌免疫療法の有効性が報告される一方、大腸癌においてはその効果が限定的である。大腸癌は癌蜂巢周囲の間質成分が豊富であり、間質内に免疫細胞が集積する組織像から、申請者は癌間質の主な構成成分である癌関連線維芽細胞 CAF が癌免疫療法の障壁であると考えている。本研究では、CAF を標的とした PDGFR 阻害剤の併用が抗 PD-1 抗体による癌免疫療法の感受性を上げるとする仮説の元、腫瘍免疫における3つの組織学的 phenotype を再現した同系免疫応答大腸癌肝転移マウスモデルを作製し、以下の検討を行うことで、本併用療法の有効性の立証及び、免疫細胞浸潤機構の解明を目指す。

- [1] 原発巣と肝転移巣の間質量に着目したヒト大腸癌外科切除標本の免疫組織学的解析
- [2] CAF の単離及び組織学的 phenotype 別の肝転移を再現したマウスモデルの作成
- [3] 上記の肝転移モデルに対する抗 PD-1 抗体及び PDGFR 阻害剤による転移抑制効果の検証
- [4] 腫瘍微小環境の変化を多面的に解析し併用療法の有効性及び免疫細胞浸潤機構を検証

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウス大腸癌肝転移モデルにおいて CAF を標的とした治療と癌免疫療法を併用することで大腸癌肝転移の制御を試み、腫瘍免疫における CAF の機能や免疫細胞浸潤との関連性を解明することである。本研究では癌細胞と共に単離した CAF を共移植することで、大腸癌における豊富な間質反応を再現し、CAF が転移や転移巣に与える影響や投与薬剤が転移巣の腫瘍免疫微小環境に与える影響をより正確に反映した検討を行う。また移植から肝転移が生じ増大していく過程や、治療により転移が抑制される様子を経時的に *in vivo* イメージングにてモニタリングし、治療により生じる腫瘍免疫微小環境の変化はフローサイトメトリーに加えて免疫染色及び RNAseq の解析まで行う。多面的かつ詳細に治療効果を検討する。

3. 研究の方法

[1] 原発巣と転移巣の間質量に着目したヒト大腸癌外科切除標本の免疫組織学的解析
大腸癌の外科切除標本を用いて CAF マーカーである FAP (Fibroblast activated protein) による免疫染色を行う。原発巣における CAF マーカーの陽性面積を定量化し、原発巣における CAF 量と腫瘍免疫 phenotype 分類との関連、予後を含めた臨床病理学的因子との関連を解析する。肝転移症例では肝転移巣と原発巣での CAF 量を比較検討し、原発巣での CAF 量と肝転移巣での CAF 量がどのような相関を示すかを検討する。

[2] CAF の単離及び組織学的 phenotype 別の肝転移を再現したマウスモデルの作成
間質成分が豊富な大腸癌肝転移モデルを作成するために BALB/c マウスからの CAF の単離を行う。GFP 標識した BALB/c 由来マウス大腸癌細胞株 CT26 を BALB/c の盲腸壁に移植し、生着後約4週で移植腫瘍を切除細断、ディスパーゼ液にて分解後培養する。癌細胞と線維芽細胞が混合された状態で数日培養した後に FCM にて線維芽細胞のみを単離する。次に単離した CAF 及び CT26 を使用して3つの phenotype の大腸癌肝転移モデルを作成する。excluded type モデルでは BALB/c マウスの脾臓に CT26 と CAF を混合して移植する。inflamed type モデルでは BALB/c マウスの脾臓に CT26 のみを移植する。desert type モデルはヌードマウスの脾臓に CT26 のみを移植する。

[3] 上記肝転移モデルに対する抗 PD-1 抗体及び PDGFR 阻害剤による転移抑制効果の検証
各モデルでマウス抗 PD-1 抗体(4H2)及び PDGFR 阻害剤(ダサチニブ)による治療実験を行う。ダサチニブは 50 mg/kg/day の容量を連日経口投与し、4H2 は推奨濃度である初回 20mg/kg、以後6日毎に 10mg/kg を腹腔内投与する。1)control, 2) 4H2 単剤, 3)ダサチニブ単剤, 4)ダサチニブ+4H2 併用の4群に分け、各群10匹にて治療実験を行う。CT26 には LUC 遺伝子を導入し、肝転移の発生や腫瘍量変化を IVIS にて経時的にモニタリングする。移植直後または移植後2週間で治療を開始、薬剤投与後3週間で犠死、抗腫瘍効果を IVIS データや腫瘍容積等で評価する。

[4] 腫瘍微小環境の変化を多面的に解析し併用療法の有効性及び免疫細胞浸潤機構の検証
[3]により肝転移巣の腫瘍免疫微小環境にどのような変化が生じたかを、免疫染色 RNAseq FCM にて詳細に解析する。では CAF の共転移の状態や免疫細胞の浸潤様式に注目し、臨床検体を用いた[1]での解析結果との関連性も含めて各 phenotype、各治療群別に組織学的に比較検討する。に関しては PD-1 単剤では奏功が期待できない excluded type において PDGFR 阻害剤の併用がどのような相乗効果をもたらすのか、という点に注目して PD-1 単剤群と併用群との

比較を中心に行う。両群の肝転移腫瘍から RNA を抽出し、RNAseq 解析を行った後に KEGG パスウェイ解析、GO 解析、GSEA 解析を行うことで、併用療法によって変動したパスウェイや遺伝子群の同定を行う。また、肝転移巣から単細胞浮遊液を作成し、CD45 でゲート後に CD45 陽性細胞中の CD4、CD8 陽性細胞の割合の増減、CD44、CD69 陽性細胞の割合の増減、CD8 陽性 T 細胞中のグラナザイム B 及び IFN- γ 陽性細胞の割合の増減を見ることで各群での免疫活性を比較検討する。

4 . 研究成果

[1] 原発巣と転移巣の間質量に着目したヒト大腸癌外科切除標本の免疫組織学的解析

約 100 例の大腸癌外科切除標本を用いた免疫染色による解析を行い、inflamed type に比較して excluded type, desert type の症例において間質量が有意に多いことが示され、また肝転移症例については phenotype にかかわらず原発巣と肝転移巣で間質量が相関することが示された。

[2] CAF の単離及び組織学的 phenotype 別の肝転移を再現したマウスモデルの作成

同所移植 腫瘍から PDGFR 陽性、CD45 陰性、EpCAM 陰性の CAF を単離し、それを用いて inflamed type 及び excluded type の大腸癌肝転移を再現した肝転移マウスモデルを作成した。免疫組織学的検討を行い、各 type の腫瘍免疫微小環境が再現していることを確認した。

[3] 上記肝転移モデルに対する抗 PD-1 抗体及び PDGFR 阻害剤による転移抑制効果の検証

Inflamed type の肝転移モデルではコントロール群に比較して PD-1 単剤投与で有意な抗腫瘍効果を示した。一方、Excluded type の肝転移モデルでは各単剤投与群では明らかな抗腫瘍効果を認めず、併用群においてコントロール群、各単剤投与群と比較して有意な転移抑制効果を認めた。

[4] 腫瘍微小環境の変化を多面的に解析し併用療法の有効性及び免疫細胞浸潤機構の検証

抗 PD-1 抗体単剤群の両群の肝転移腫瘍からそれぞれ RNA を抽出し、RNAseq 解析及び GSEA 解析を行ったところ、併用 群において PDGFR 軸を含む複数の間質形成に関連する経路が抑制され、T 細胞、B 細胞、サイトカイン関連などの腫瘍免疫に関わる複数の経路が活性化されていた。また、肝転移巣から単細胞浮遊液を作成し、腫瘍内の CD8 及び CD4 陽性 T 細胞の活性化をフローサイトメトリーで解析したところ、併用群において CD62L 陰性で CD44 陽性、CD69 陽性の活性化 CD8 及び CD4 陽性 T 細胞の割合がそれぞれ有意に増加していた。

以上の結果から、本併用療法はこれまで ICI 単剤では奏功しなかった転移性大腸癌症例に対する新規治療法の同定につなが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 Hiroki Kadota	4. 巻 14(24)
2. 論文標題 Anti-Programmed Cell Death-1 Antibody and Dasatinib Combination Therapy Exhibits Efficacy in Metastatic Colorectal Cancer Mouse Models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 6146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14246146	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiroki Kadota
2. 発表標題 Combination effect of anti-PD-1 antibody and PDGFR inhibitor on metastasis of colorectal cancer
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroki Kadota
2. 発表標題 Combination effect of anti-PD-1 antibody and PDGFR inhibitor on metastasis of colorectal cancer
3. 学会等名 日本癌転移学会
4. 発表年 2021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
---------	---------