

令和 6 年 6 月 1 2 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15589

研究課題名（和文）大腸癌網羅的mRNA発現解析による高転移性癌予測サイトカインマーカーの探索

研究課題名（英文）Exploration of Cytokine Markers for Predicting Highly Metastatic Colorectal Cancer through Comprehensive mRNA Expression Analysis

研究代表者

中嶋 智之（Nakajima, Tomoyuki）

信州大学・医学部附属病院・主任臨床検査技師

研究者番号：10898232

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：大腸癌は、日本のみならず世界中で罹患者数及び死亡数が極めて多い癌種であり、死亡例の大部分は遠隔転移の経過を辿る。本研究では、癌微小環境におけるサイトカイン発現をトランスクリプトーム解析によって網羅的に解析し、ターゲットを探索、同定し研究を進めた。その結果、予後予測バイオマーカーとしてOsteopontin(SPP1)、CXCL13を見出した。癌微小環境におけるこれらの発現性を解析し、産生細胞や周囲の免疫細胞の種類、組織学的な特徴を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Osteopontin (SPP1)は大腸癌の浸潤前線に位置するマクロファージ様細胞によって産生されることが確認された。このタンパク質の高発現は、高度なtumor buddingと関連しており、独立した予後予測因子であることが示された。

CXCL13の低発現は大腸癌の予後不良の因子であると同定された。さらに、CXCL13陽性細胞数はCD8+リンパ球数およびCrohn's-Like Lymphoid Reactionの増加と関連しており、腫瘍部の抗腫瘍免疫応答の促進に寄与する可能性があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Colorectal cancer is a type of cancer that has an extremely high incidence and mortality rate not only in Japan but also worldwide, with the majority of deaths following the course of distant metastasis. In this study, cytokine expression in the tumor microenvironment was comprehensively analyzed through transcriptomic analysis to explore and identify targets for further research. As a result, Osteopontin (SPP1) and CXCL13 were identified as prognostic biomarkers. The expression of these cytokines in the tumor microenvironment was analyzed, along with the types of producing cells, surrounding immune cells, and histological characteristics.

研究分野：腫瘍学

キーワード：大腸癌 サイトカイン Osteopontin SPP1 CXCL13

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は本邦のみならず世界的に見ても罹患数・死亡数の極めて多い癌腫であり、死亡例の大多数は遠隔転移の経過を辿る。癌組織は癌細胞のみならず種々の細胞によって構築され、近年、癌微小環境における抗腫瘍免疫状態と腫瘍の侵襲性の関連が明らかになってきている。抗腫瘍免疫は様々な細胞から分泌される抗腫瘍免疫促進性サイトカインと抗腫瘍免疫抑制性サイトカインの発現バランスによって制御されており、抗腫瘍免疫抑制性サイトカインの発現が高い腫瘍は腫瘍免疫抑制環境を構築し、高い浸潤性、転移性を獲得すると考えられる。しかし、癌微小環境を構成する癌細胞と周囲の細胞の相互作用については未だ不明確である。

### 2. 研究の目的

本研究では実際に病理診断に使用された臨床検体を用いて、大腸癌組織を種々の細胞を含む腫瘍組織として俯瞰的に捉え、網羅的 RNA 発現解析を実施する。それらにより、大腸癌微小環境におけるサイトカインによって特徴づけられる腫瘍免疫状態と、臨床病理学的特徴とを結びつけ、これにより高転移性大腸癌予測マーカーとなり得るサイトカインを同定し、新たな病理診断的要素の創出を目指した。

### 3. 研究の方法

当院における大腸癌手術症例の中から、採取部位、ホルマリン固定時間、ミスマッチ修復タンパク質の発現性等を評価し症例を選定した。

対象症例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を用いて次世代シーケンサー (NGS) による網羅的 RNA 発現解析を実施した。

得られた網羅的 RNA 発現データと公開データベースにある大腸癌 RNAseq データを基に種々の *in silico* 解析を実施しマーカー候補遺伝子を選定した。

選定したマーカー候補について、病理組織検体を用いて解析するため tissue microarray を作製した。

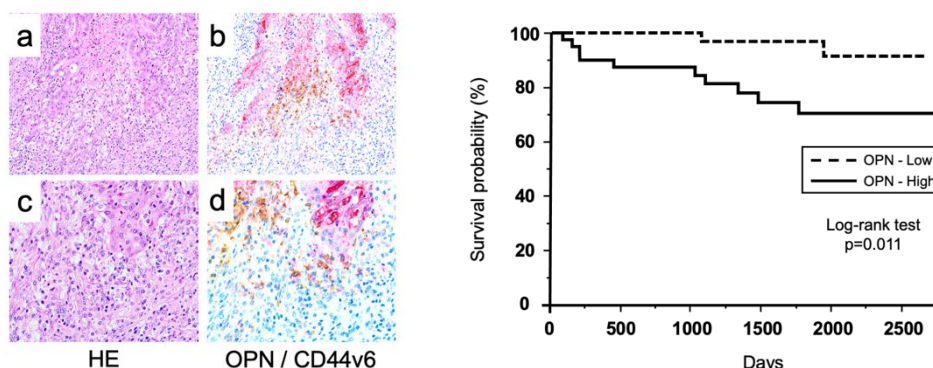
免疫組織化学染色、RNA *in situ* hybridization を用いて組織学的発現性について解析した。

予後や臨床病理学的所見との関連性について統計学的に解析した。

空間トランスクリプトーム分析を実施し、発現領域やその周囲にどのような細胞が局在するか解析した。

### 4. 研究成果

本研究では、まず大腸癌の FFPE サンプルから RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いた RNA-seq を実施した。このデータと、公開データベースにある大腸癌 RNAseq データを照らし合わせて解析を実施した。解析の結果、Osteopontin (SPP1) が予後不良と関連する可能性が示唆された。Osteopontin は、多機能なリン酸化糖蛋白であり、骨のリモデリング、免疫応答、組織再生、腫瘍進行などの多くの生理学的プロセスに関与していることが知られている。大腸癌の FFPE サンプルにおいて実施した Osteopontin の免疫染色は、このタンパク質が浸潤前線に存在するマクロファージ様細胞によって産生されていることを明らかにした。さらに、Osteopontin の高発現は高度な tumor budding と関連し、独立した予後予測因子であることが確認された。

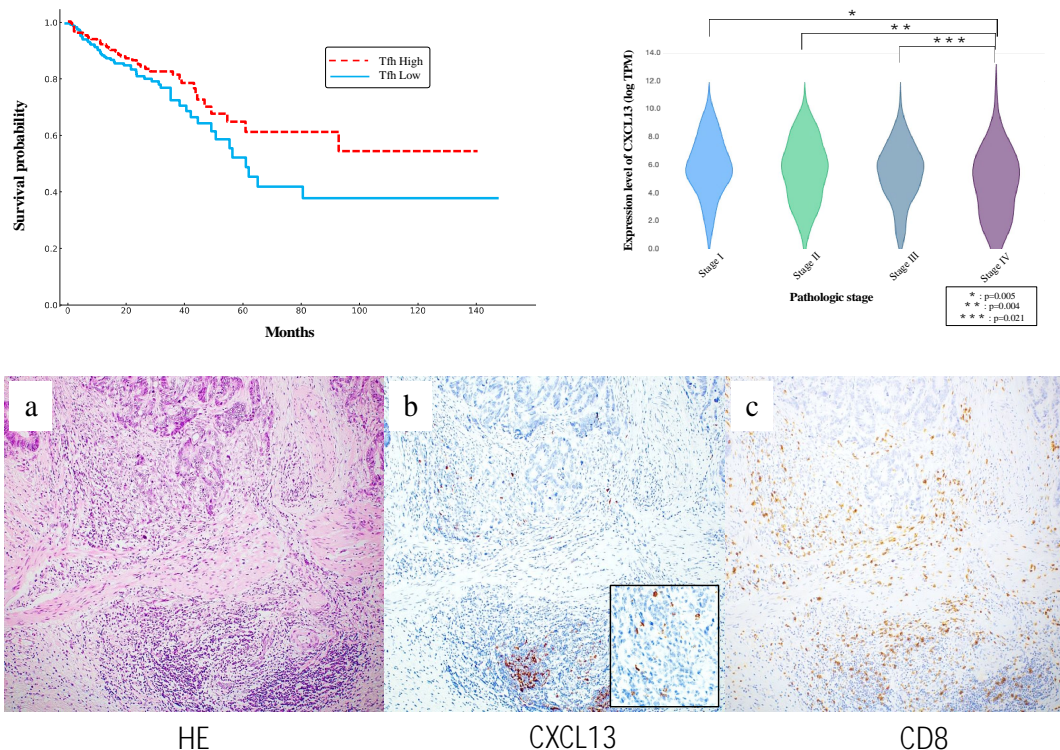


さらに、Osteopontin のレセプターである CD44v6 が多くの症例の癌細胞で発現していた。CD44v6 は細胞接着分子であり、Osteopontin と結合することで細胞遊走や浸潤を促進すると考えられている。したがって、マクロファージ様細胞と癌細胞が Osteopontin を介して相互作用し、腫瘍の進行と転移を助長する可能性が考えられた。これらの研究成果を学会発表し論文で報告した。Osteopontin expression in the invasive front stroma of colorectal adenocarcinoma is associated with tumor budding and prognosis. *Pathol. Res. Pract.* **2022**, 240, 154190. )

RNA-seq データの解析から、CXCL13 も新たな解析ターゲットとして同定された。CXCL13 は、B

細胞誘導性のケモカインであり、特にリンパ組織の形成および機能に重要な役割を果たす。CXCL13 はリンパ節、脾臓、扁桃などのリンパ器官において B 細胞の移動とホーミングを誘導するため、正常な免疫応答の調整に不可欠である。

本研究から原発巣における CXCL13 の低発現は予後不良の因子であり、また病期ステージの進行とともに有意に低下することが明らかになった。CXCL13 の発現量と濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh) の割合が正の相関を示すことがわかった。CXCL13 の検出は免疫染色では困難であったため、mRNA in situ hybridization を用いて検出した。CXCL13 陽性細胞数は、CD8+リンパ球数と Crohn's-Like Lymphoid Reaction と呼ばれる腫瘍部におけるリンパ濾胞形成の増加と関連していた。この結果から、CXCL13 は抗腫瘍免疫応答を示唆している。



CD8+リンパ球の誘導メカニズムに関して、CXCL13 は腫瘍微小環境において特定のケモカインレセプターである CXCR5 を介して作用する。CXCL13 が CXCR5 と結合することで、CD8+リンパ球は腫瘍部位に向かって移動しやすくなる。また、CXCL13 の存在は腫瘍部位でのリンパ濾胞の形成を促進し、これにより局所的な免疫反応が活性化される。これらのリンパ濾胞は、抗原提示細胞と T 細胞の相互作用を促進し、CD8+リンパ球の活性化と増殖を助ける。このように、CXCL13 は直接的および間接的に CD8+リンパ球の腫瘍への浸潤と活性化を促進し、強力な抗腫瘍免疫応答を引き起こす可能性がある。さらに、CXCL13 の産生細胞及びその近傍に局在する細胞種を詳細に解析するために、空間トランスクリプトーム解析が実施した。この成果に基づく論文は現在、投稿中である。

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 0件）

1. 著者名 Nakajima Tomoyuki, Uehara Takeshi, Iwaya Mai, Matsuda Kazuyuki, Wada Megumi, Nagaya Tadanobu, Ehara Takehito, Ota Hiroyoshi	4. 巻 240
2. 論文標題 Osteopontin expression in the invasive front stroma of colorectal adenocarcinoma is associated with tumor budding and prognosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 154190 ~ 154190
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prp.2022.154190	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中嶋 智之
2. 発表標題 Upregulation of SPP1 in the invasive front stroma of CRC is associated with Tumor budding and patient survival
3. 学会等名 The 81st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中嶋 智之
2. 発表標題 Prognostic significance of CXCL13 expression in colorectal carcinoma linked to anti-tumor immunity through CD8+ TILs
3. 学会等名 The 82nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
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
---------	---------