

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19530

研究課題名(和文)空間情報を伴うscRNAseqによる癌微小環境内APCの多様性と新たな役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of diversity and novel roles of APCs in the cancer microenvironment by scRNAseq with spatial gene expression analysis

研究代表者

大内田 研宙 (OHUCHIDA, Kenoki)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：20452708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、3次リンパ濾胞構造(TLS)が癌微小環境における抗腫瘍免疫に関与し、APCの一つであるB細胞がTLSの形成に重要な役割を果たしていることが報告されている。本研究では食道癌におけるTLSの意義や役割について検討した。その結果、食道癌においてTLSの存在と成熟度は良好な予後と有意な相関を認めた。また、TLSが多い症例ではAPCである樹状細胞が有意に多く、TLSにおける濾胞性ヘルパーT細胞が樹状細胞を活性化させる可能性が示唆された。今後、腫瘍免疫微小環境におけるTLSとAPCの細胞間相互作用を空間的遺伝子発現解析(Visium)により評価する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、scRNA-seqを用いた腫瘍微小環境の解明が急速に進んでおり、これまで判明していなかった細胞集団や遺伝子発現に基づいた分類が報告されている。腫瘍免疫の分野ではAPCの多様性が示唆されているものの、一定の見解はなく、ヒト腫瘍微小環境中のAPCの局在や機能的差異、そして他の細胞種との相互作用についての報告は少ない。本研究により消化器癌における、APCを中心とした腫瘍免疫メカニズムの理解が深まることで、免疫療法の新たな治療アプローチの可能性を生み出す礎になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Recently, tertiary lymphoid structures (TLS) have been reported to be involved in anti-tumor immunity in the tumor microenvironment, and B cells, which are one of the antigen-presenting cells (APCs), play an essential role in TLS formation. The present study investigated the significance and role of TLS in esophageal squamous-cell carcinoma (ESCC). As a result, the presence and maturity of TLS in ESCC were significantly correlated with better prognosis. In cases with a high number of TLS, dendritic cells, which are APCs, were significantly more abundant. Moreover, the present study showed that follicular helper T cells in TLS may activate dendritic cells. In the future, we are planning to use spatial gene expression analysis (Visium) to evaluate the intercellular interactions between TLS and APCs in the tumor microenvironment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：消化器癌 腫瘍微小環境 抗原提示細胞 B細胞 樹状細胞 食道癌 scRNA-seq

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害薬は癌治療における革新的な治療であるが、奏効率は未だ十分なものではない。その一因として、免疫チェック分子の発現は細胞種や症例によって不均一であり、腫瘍微小環境の腫瘍免疫のメカニズムについて不明な点が多い。近年、single-cell RNA-sequencing (scRNA-seq)が開発により、単一細胞レベルでの網羅的遺伝子発現解析が可能となり、腫瘍微小環境の解明が急速に進んでいる。代表者は以前より腫瘍微小環境に着目した研究を行っており、scRNA-seqが開発されたのち、早期から scRNA-seq を本研究室に導入し、scRNA-seq 用いた腫瘍微小環境の解明に取り組んできた。Preliminary な検討として、MHC-class II を発現する様々な細胞集団の抗原提示細胞 (antigen presenting cell: APC) が存在し、それぞれの細胞集団において免疫賦活や疲弊、再活性化に関わる因子を発現しており、機能的に異なった集団であることを明らかにした。腫瘍局所では癌抗原刺激が長期にわたって慢性炎症微小環境を形成しているという認識が腫瘍免疫を解明する上で重要と考えられるが、これまでの研究では免疫細胞の疲弊化機序は制御性 T 細胞や細胞障害性 T 細胞(CTL)における報告が多い。一方、APC は腫瘍免疫の中心的な役割を担うが、APC の同定の困難さ、解析の困難さからこれまで臨床サンプルを用いた十分な解析がなされてこなかった。真に腫瘍免疫の活性化、疲弊化機序を明らかにするためには、長期の抗原刺激によって変動する APC の不均一性を明らかにすることが重要と考えられる。以上から、本研究では腫瘍微小環境中の APC の多様性に着目し、scRNA-seq を用いた APC の機能的な多様性を明らかにすることを目的とした。さらに位置情報を保存したまま網羅的電子発現解析を行う Visium を用いて、腫瘍局所の細胞間相互作用を含めたヒト腫瘍免疫における抗原刺激-免疫賦活/疲弊/再活性の機序を解明することで、革新的な免疫治療の開発の一助になる可能性と考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

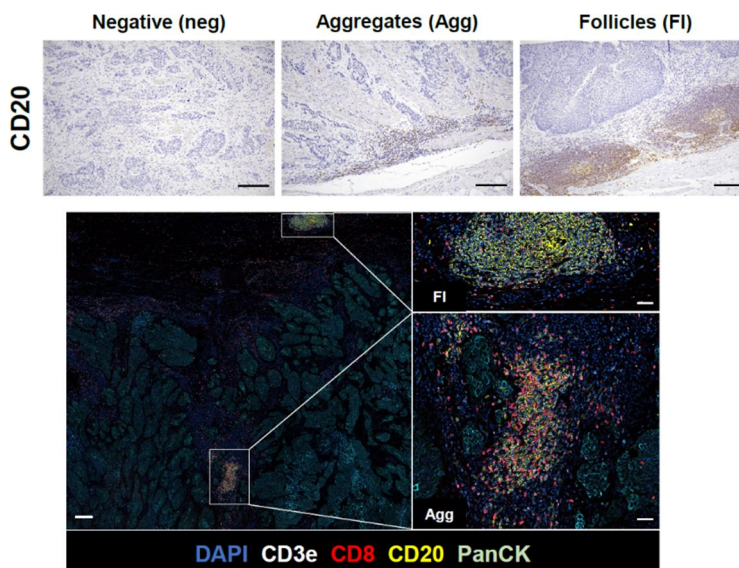
免疫チェックポイント阻害薬の登場は癌治療にパラダイムシフトを起こし、近年、腫瘍免疫微小環境の解明が急速に進んでいる。しかし、腫瘍免疫微小環境のメカニズムについては未だ不明な点が多い。本研究は腫瘍免疫微小環境の重要な構成成分である APC に着目し、scRNA-seq を用いて、APC を中心とした腫瘍免疫微小環境を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

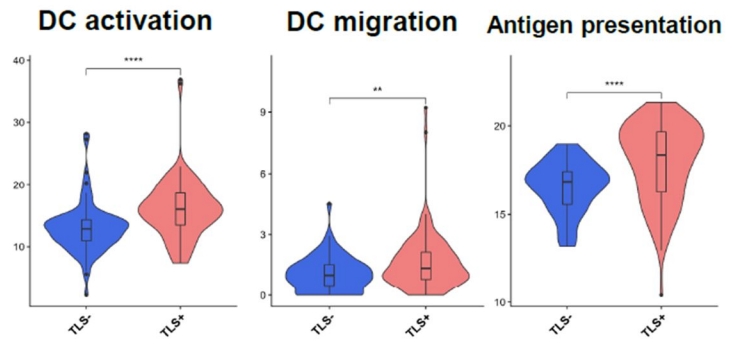
近年、3 次リンパ濾胞構造 (TLS)が癌微小環境における抗腫瘍免疫に関与することが報告されており、APC の一つである B 細胞が TLS の形成に重要な役割を果たしている。本研究では食道癌における TLS の意義や役割について検討した。ESCC における TLS の重要性や機能的意義を評価するために、食道癌手術により採取したヒト ESCC 180 検体を用いて TLS の成熟度に着目して病理学的に評価し、ESCC において TLS の存在が予後に与える影響について検討した。次に、ESCC 14 検体を用いて scRNA-seq を行い、TLS の有無による免疫細胞の機能関連遺伝子の差異について検討を行った。TLS において重要な役割を果たす B 細胞や樹状細胞などの APC、そして CD8 陽性 T 細胞や濾胞性ヘルパー T 細胞 (Tfh)を解析の対象とした。

4. 研究成果

食道癌における TLS を免疫組織化学染色により評価し、TLS の存在と成熟度は良好な予後と有意な相関があることを確認した (右図)。TLS が多い症例では APC である樹状細胞が有意に多く、TLS における濾胞性ヘルパー T 細胞が樹状細胞を活性化させる可能性が示唆された。また、TLS が存在する症例における CD8 陽性 T 細胞では細胞障害性機能関連遺伝子の発現が濃縮していた。さらに、細胞間相互作用ツールを用いた検討では、TLS における Tfh のある分子が樹状細胞を活性化する可能性が示された。免疫組織化学染色では TLS が存在する症例は TLS が存在しない症例と比較して、腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞、抗体分泌細胞、樹状細胞が有意に多かった。さらに、TLS が存在する症例では TLS がない症例と比較して、DC の活性化・遊走能・抗原提示機能関連遺伝子の発現が有意に高値で



あった (右図)。今後、腫瘍免疫微小環境における TLS と APC の相互作用を空間的遺伝子発現解析 (Visium) を用いて評価し、腫瘍免疫微小環境内における APC の詳細な役割についてさらに解明する予定である。



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 2件）

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Okuda Sho, Ohuchida Kenoki, Nakamura Shoichi, Tsutsumi Chikanori, Hisano Kyoko, Mochida Yuki, Kawata Jun, Ohtsubo Yoshiki, Shinkawa Tomohiko, Iwamoto Chika, Torata Nobuhiro, Mizuuchi Yusuke, Shindo Koji, Moriyama Taiki, Nakata Kohei, Torisu Takehiro, Morisaki Takashi, Kitazono Takanari, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Neoadjuvant chemotherapy enhances anti-tumor immune response of tumor microenvironment in human esophageal squamous cell carcinoma | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 106480 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2023.106480 | 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 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Nakamura S, Ohuchida K, Ohtsubo Y, Yamada Y, Tsutsumi C, Okuda S, Hisano K, Mochida Y, Shinkawa T, Iwamoto C, Torata N, Mizuuchi Y, Shindo K, Nakata K, Moriyama T, Torisu T, Nagai E, Morisaki T, Kitazono T, Oda Y, Nakamura M. | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Single cell transcriptome analysis reveals functional changes in tumour infiltrating B lymphocytes after chemotherapy in oesophageal squamous cell carcinoma | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Clinical and Translational Medicine | 6. 最初と最後の頁 e1181 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ctm2.1181 | 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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 中村祥一、大内田研宙、堤親範、久野恭子、奥田翔、大坪慶志輝、寅田信博、水内祐介、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、中村雅史 |
| 2. 発表標題 シングルセル解析を用いた食道癌における制御性B細胞の検討 |
| 3. 学会等名 第123回日本外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 奥田翔、大内田研宙、寅田信博、永吉絹子、水内祐介、進藤幸治、池永直樹、森山大樹、仲田興平、中村雅史 |
| 2. 発表標題 scRNA-seqを用いた食道扁平上皮癌浸潤マクロファージに対する術前化学療法の影響の解明 |
| 3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中村祥一、大内田研宙、奥田翔、大坪慶志輝、寅田信博、水内祐介、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、中村雅史 |
| 2. 発表標題 scRNA-seqを用いた術前化学療法に伴う食道癌内B細胞の不均一性の変動の解析 |
| 3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Chikanori Tsutsumi, Kenoki Ohuchida, Shoichi Nakamura, Sho Okuda, Kyoko Hisano, Yoshiki Otsubo, Koji Shindo, Taiki Moriyama, Yusuke Mizuuchi, Kohei Nakata, Masafumi Nakamura |
| 2. 発表標題 Functions of CD8-positive T cells in gastric non-solid type poorly differentiated adenocarcinoma |
| 3. 学会等名 INTERNATIONAL GASTRIC CANCER CONGRESS 2022 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 堤 親範, 大内田 研宙, 中村 祥一, 奥田 翔, 久野 恭子, 大坪 慶志輝, 寅田 信博, 進藤 幸治, 森山 大樹, 水内 祐介, 仲田 興平, 中村 雅史 |
| 2. 発表標題 Single cell RNA sequenceを用いたpor2胃癌におけるcancer associated fibroblastのheterogeneityの解明 |
| 3. 学会等名 第94回日本胃癌学会総会 |
| 4. 発表年 2022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 |
|-----------|--------------------------------------|-------------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 木庭 遼 (Koba Ryo) (10866776) | 九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|--|---------------------------------|----|
| 研究分担者 | 小園 真吾 (KOZONO Shingo) (40706850) | 九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102) | |
| 研究分担者 | 三好 圭 (MIYOSHI Kei) (70755272) | 九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102) | |

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 |
|---------|---------|
| | |