

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15586

研究課題名（和文）新規免疫治療標的やバイオマーカー同定のための胃癌腹膜播種の動的免疫微小環境の解析

研究課題名（英文）Deciphering the dynamic immune microenvironment in gastric cancer with peritoneal metastasis to identify novel immunotherapeutic targets and biomarkers

研究代表者

山下 晃平（Yamashita, Kohei）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特定研究員

研究者番号：00867202

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：近年、免疫チェックポイント阻害剤に代表される免疫治療が臨床試験での有効な治療成績を基に臨床応用されているが、胃癌の最多の転移形式である胃癌腹膜播種への治療効果は乏しく、胃癌腹膜播種特有の腫瘍免疫微小環境の解明が望まれる。本研究では、胃癌癌性腹水細胞を解析し、癌性腹水中に胃癌細胞と骨髄系細胞の両方の特徴を有する細胞亜集団が同定された。また、生物統計学的手法を用いて、癌性腹水に含まれる細胞の系統樹解析を行い、分岐系統ではなく、線形系統の進化系統が予想され、この進化系統に関わる可能性のある遺伝子群が同定された。今後、抽出された細胞亜集団や遺伝子群の詳細な機能解析を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行胃癌のうち、腹膜播種は治療抵抗性であり予後不良である。近年のがん免疫治療の進歩は胃癌の予後向上に資する可能性があり、腹膜播種の腫瘍免疫微小環境の解明は、新規治療標的や治療効果予測のバイオマーカー創出につながる。本研究により、胃癌腹膜播種における進化系統やそれに関与する遺伝子変異群が推定された。今後、胃癌腹膜播種の進行を食い止めるための免疫治療の役割がクローズアップされることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Immunotherapies such as immune checkpoint inhibitors have been clinically applied based on effective results in clinical trials for gastric cancer. However, their efficacy against gastric cancer peritoneal metastasis, the most common form of metastasis in gastric cancer, remains limited. There is a pressing need to elucidate the tumor immune microenvironment specific to gastric cancer peritoneal metastasis.

This study analyzed gastric cancer ascites cells and identified a subpopulation of cells in the ascitic fluid that exhibit characteristics of both gastric cancer cells and myeloid cells. Using biostatistical methods, a phylogenetic analysis of cells in the ascitic fluid was conducted. The analysis suggested a linear evolutionary lineage rather than a branching one, and a group of genes potentially involved in this lineage was identified. Future work will involve detailed functional analysis of the identified cell subpopulations and gene groups.

研究分野：腫瘍生物学、消化器外科学

キーワード：胃癌 腹膜播種 腫瘍免疫微小環境 サブクローン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、免疫チェックポイント阻害剤に代表されるがん免疫治療が、切除不能/再発胃癌での臨床試験での有効な治療成績を基に臨床応用されるに至った。しかし、胃癌の最多の転移形式である胃癌腹膜播種への治療効果は乏しく、胃癌腹膜播種特有の腫瘍免疫微小環境の解明が望まれる。特に、胃癌腹膜播種の腫瘍免疫微小環境の治療誘導性の変化に関する報告はなく、腫瘍自身の増大進展や治療による修飾に応じた動的変化に関する知見は、免疫治療抵抗性の解明の手がかりとなる可能性がある。

2. 研究の目的

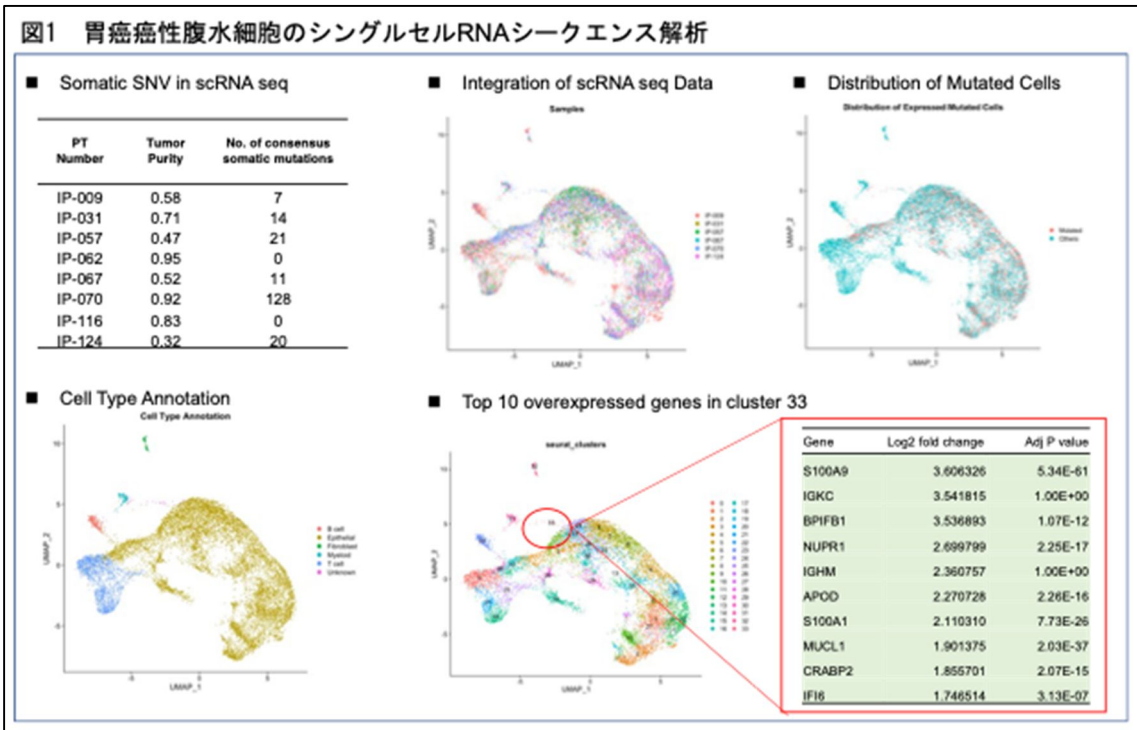
本研究の目的は、胃癌腹膜播種における腫瘍免疫微小環境の動的変化を明らかにする事である。胃癌腹膜播種患者の癌性腹水を利用し、シングルセル RNA シークエンスや全エクソームシークエンスを行い、遺伝子変異シグニチャーの網羅的解析を行い、抽出された遺伝子変異やシグナル経路の機能解析を行うことで、胃癌腹膜播種に特有な腫瘍免疫微小環境の進展のメカニズムを明らかとし、新規治療標的や治療効果予測のバイオマーカーの探索を行う。

3. 研究の方法

まず、免疫治療による胃癌腹膜播種の免疫プロファイルの経時的変化を同定するために、胃癌腹膜播種患者の免疫治療前後の癌性腹水を探索した。治療詳細を含む臨床情報から計 31 症例の適格症例を同定したが、その大半が免疫治療をごく短期間受けた後に死亡した症例であり、免疫治療による腹腔内の腫瘍免疫微小環境のリモデリングを十分に観察できない可能性が示唆された。そのため、同一患者の治療前後の比較ではなく、治療経過や採取時期の異なる患者の腹水検体を用いて、生物統計学的手法にて腹水がん細胞のサブクローン進化構造を解明し、機能解析へつなげる方針とした。

4. 研究成果

胃癌腹膜播種患者 8 症例の癌性腹水を採取し、シングルセル RNA シークエンス(single cell RNA sequencing; scRNA seq)と全エクソームシークエンス(Whole genome sequencing; WES)へ提出した。scRNA seq では、8 症例のデータを統合解析し、体細胞変異を認める細胞亜集団や細胞マーカーによる細胞腫の同定を行った(図 1)。細胞クラスタリングを行うと、上皮系マーカーである EPCAM と骨髄系マーカーの S100A9 の両方を発現する細胞亜集団を同定した。この細胞亜集団は癌細胞と骨髄系細胞の両方の特徴を有する可能性が示唆された。この細胞亜集団のうちで発現が上昇している遺伝子群を確認し、in vitro での機能解析を行いながら、これらの細胞亜集団が胃癌腹膜播種の癌性腹水において、どのような役割を担っているのか、また免疫治療抵抗性との関連があるのかについて検討している。

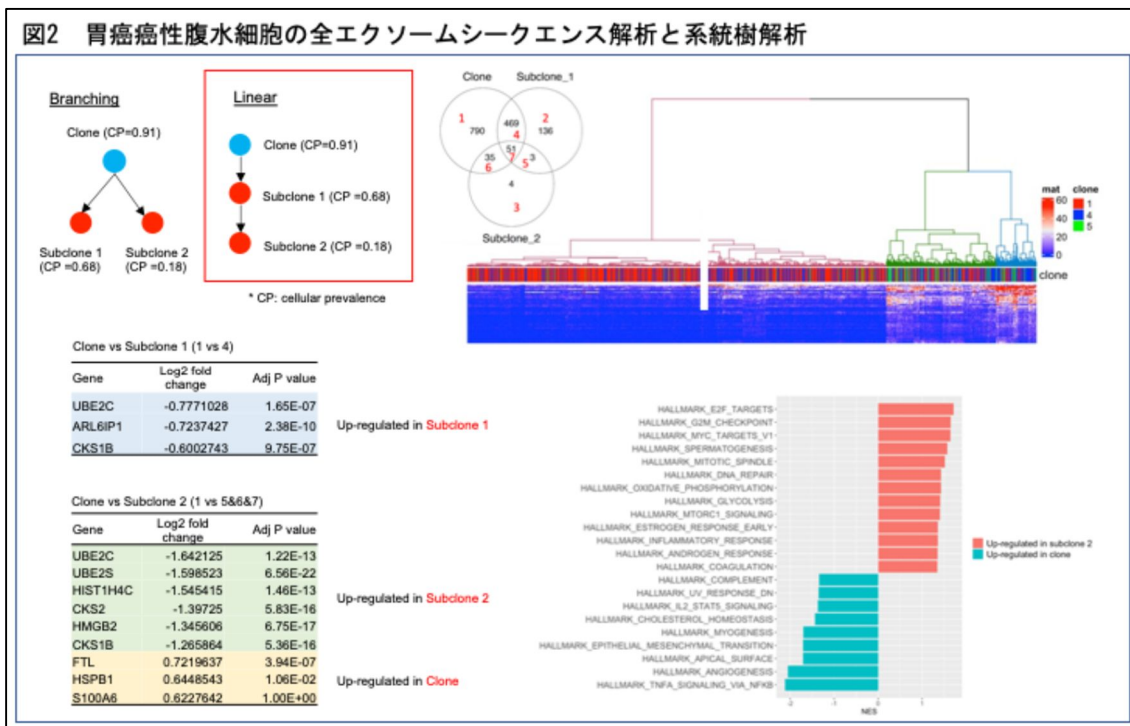


続いて、scRNAseq および WES のデータを用いて、癌性腹水中の細胞におけるサブクローン進化の系統樹を詳細に構築した（図 2）。SNV 変異のクラスタリングを行う生物統計学的手法を採用し、多変量解析を通じてデータを精査した結果、Clone から Subclone 1 や Subclone 2 へ派生する分岐系統ではなく、Clone、Subclone 1、Subclone 2 という順序で線形系統の進化が想定された。この線形の進化パターンは、Clone や Subclone ごとに特異的な遺伝子に基づいたクラスタリング分析でも同様に確認され、それぞれのサブクローンにおける特徴的な遺伝子発現パターンが明らかになった。

この遺伝子クラスタリングの結果を基に、さらなる分析を進め、Clone と Subclone 1、そして Clone と Subclone 2 の間で行われた遺伝子発現の比較分析を通じて、いくつかの重要な遺伝子変異が同定された。特に Subclone 1 では、UBE2C、ARL6IP1、CKS1B 遺伝子が顕著に up-regulation しており、これらの遺伝子は細胞周期の進行および分裂に関与していることから、サブクローンの増殖力と密接に関連している可能性が示唆された。また Subclone 2 においても UBE2C、UBE2S、HIST1H4C、CKS2、HMGB2、CKS1B などの遺伝子が up-regulation しており、これらが示す細胞の生物学的特性は、進行性の癌細胞に見られる典型的な特徴を反映している。

一方で、Clone では FTL、HSPB1、S100A6 といった遺伝子が up-regulation しており、これらの遺伝子はストレス応答や細胞保護機能に関与している。これにより、Clone が比較的安定した状態を保っている可能性や、治療に対する感受性が異なる可能性が考えられる。

また、Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)では、Clone と Subclone 2 との比較において、Clone においては血管新生や上皮間葉転換及び NFkB や IL2-STAT などの細胞内シグナル関連の遺伝子群が Enrich されている一方で、Subclone 2 においては、細胞周期シグナル関連や細胞分裂関連の遺伝子群が Enrich されていることがわかった。すなわち、胃癌腹膜播種細胞においては線形系統進化を示しながらより細胞増殖に関わる遺伝子群が重要な役割を担うようになることが示唆された。これらの個々の遺伝子変異が胃癌腹膜播種におけるサブクローンの進化構造にどのように関与しているか、進化構造に決定的な遺伝子変異群があるのか、そしてこれらが治療抵抗性にどのような影響を与えているかという点について、さらなる検討を行う予定である。特に、UBE2C や CKS1B といった遺伝子は、過去の研究で予後不良や治療抵抗性との関連が報告されており、これらの遺伝子を中心とした機能解析を行うことで、胃癌腹膜播種特有の腫瘍免疫微小環境下での細胞間相互作用が明らかとなる可能性がある。これらの研究により胃癌腹膜播種の治療戦略の改善や新しい治療標的の同定に繋がる可能性があり、今後は網羅的解析の追加によりゲームチェンジャーとなりうる特定遺伝子の抽出を行い、機能解析をすすめることを予定している。



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
---------	---------