

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19527

研究課題名（和文）癌微小環境の形質的・空間的多様性を介したがん細胞クローン拡大機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of cancer cell clonal expansion via phenotypic and spatial diversity in the cancer microenvironment.

研究代表者

竹原 徹郎（Takehara, Tetsuo）

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70335355

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：炎症の調節機構の破綻や、それを引き金にした癌微小環境における免疫細胞の形質的多様性が、膵癌の進展やがん免疫療法への抵抗性に関与している可能性が考えられるが、これまでに詳細な検討は行われていない。そこで膵癌の癌微小環境の形質的・空間的多様性に注目し、膵癌の発症や進展機序を明らかにすることを目的に研究を行った。ヒトやマウスの膵癌における癌微小環境解析の結果、炎症を基軸として発症する癌細胞と多核球系骨髄由来免疫抑制細胞、そしてCD8 T細胞の相互作用が、膵癌の進展において重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、膵臓内の組織微小環境で生じる慢性炎症が膵癌の発症や進展に与える影響が明らかとなり、その関係を繋ぐ重要な免疫細胞集団が同定されたことで、今後これらの細胞を標的とした治療薬開発に繋がる可能性が期待される。その結果非常に予後不良な膵癌患者の予後改善に寄与する可能性のある研究成果であり、その社会的意義は極めて大きいと考える。また、膵炎と膵癌を繋ぐ新たな分子機序の解明は、炎症と癌という近年注目されている学問領域の発展に寄与する研究成果であり、学術的にも重要な成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Disregulation of inflammation and the resulting triggering of phenotypic diversity of immune cells in the cancer microenvironment may be involved in the progression of pancreatic cancer and resistance to cancer immunotherapy, but this has not been investigated in detail. Therefore, we focused on the phenotypic and spatial diversity of the cancer microenvironment in pancreatic cancer with the aim of elucidating the pathogenesis and progression mechanisms of pancreatic cancer. Analysis of the cancer microenvironment in human and mouse pancreatic cancer revealed that the interaction between inflammation-based cancer cells, polymorphonuclear bone marrow-derived immunosuppressive cells and CD8 T cells is important in the progression of pancreatic cancer.

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 癌微小環境 多核球系骨髄由来免疫抑制細胞 慢性炎症

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は癌による死亡原因の第4位であり、10年以内に第2位になると推定されている。膵臓がん患者の予後は不良で、5年生存率は4.2%である。有効な治療薬と早期発見法の開発が急務である。慢性膵炎(CP)は膵癌の重要な危険因子であることが知られている。これまでの研究で、炎症とKras変異の組み合わせが膵臓癌の発生と進行を強く促進することが示されている。しかし、炎症が膵臓癌を促進する正確な分子メカニズムはまだ完全には解明されていない。自然免疫は、感染や組織損傷など様々な要因に応答し、疾患の発症や制御に重要な役割を果たしている。マクロファージや樹状細胞などの自然免疫細胞によって誘導される炎症反応は、病原体の排除など生体の恒常性維持に重要である。しかし、過剰な免疫応答や慢性炎症は、自己免疫疾患や慢性炎症性疾患の発症につながる。このため、炎症を誘導する炎症性サイトカインは、転写および転写後機構によって厳密に制御されている。これらの調節機構の破綻が膵癌の発症や進展に関与している可能性も考えられるが、これまでに明らかにはされていない。

近年、様々ながん腫に免疫チェックポイント阻害剤を中心としたがん免疫療法や血管新生阻害剤等の分子標的薬が用いられ、癌微小環境はがん治療の重要な標的となっている。一方最難治がんである膵癌ではこれらの臨床試験は成功せず、他がん腫と異なる癌微小環境の存在が想定される。申請者はこれまで膵癌原発・肝転移組織を用いて、がん細胞のシングルセル遺伝子発現プロファイルの取得を行ってきた。その結果転移巣のがん細胞においてHLA分子の発現が低下しており、免疫監視機構からの逃避が転移促進に寄与している可能性を見出した。一方、癌微小環境の単一細胞網羅的遺伝子発現データのクラスタリング解析から、既存の細胞マーカーにより分類される様々な免疫細胞・間質細胞も画一的な集団ではなく、さらにサブクラスターに細分化され形質的に多様であることが認められた。膵癌においては癌微小環境の間質細胞を標的とした創薬の臨床試験が成功しておらず、その原因の一つにこの形質的多様性が関与していると考えた。そこで膵癌の予後改善を目指した創薬開発には、これらの多様な形質を有する間質細胞の中からがん細胞の生存や増殖に真に寄与した細胞を同定することが必要であり、そのためには細分化された各間質細胞集団ががん細胞のクローナリティに与える影響を理解することが極めて重要であると考えに至った。炎症の調節機構の破綻や、それを引き金にした癌微小環境における免疫細胞の形質的多様性が、膵癌の進展やがん免疫療法への抵抗性に関与している可能性が考えられるが、これまでに詳細な検討は行われていない。この癌微小環境を取り巻く多様性を明らかにすることは、膵癌の新規治療標的の同定やひいては膵癌患者の予後改善において極めて重要な課題と考えられる。

2. 研究の目的

膵癌の癌微小環境の形質的・空間的多様性に注目し、膵癌の発症や進展機序を明らかにする。

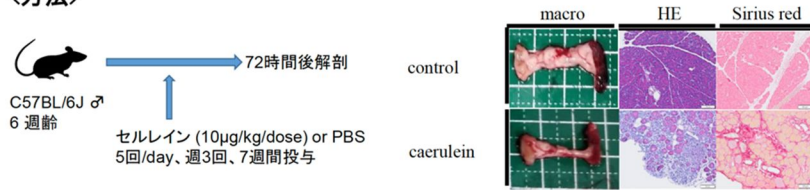
3. 研究の方法

C57BL6/J由来膵特異的Kras活性化p53欠失マウスから採取した膵癌細胞の単一クローンから均一的な形質を有する細胞株を樹立した。また、この細胞株を免疫能を保持した野生型マウスの膵臓内に同種同所移植することで、ヒト膵癌組織に似た間質増生の強い膵癌を作成した。この腫瘍組織を用いて10x Visium社のChromiumによる空間的単一細胞トランスクリプトーム解析を実施した。これは組織標本上において空間的な位置情報を保持したまま、各単一細胞の遺伝子発現を網羅的に解析できる技術である。これにより、各単一細胞のトランスクリプトームデータからそこに存在する各CAF・免疫細胞の抽出とセルタイプの同定を行い、がん組織中の位置情報に合わせて視覚化を行った。また、腫瘍細胞をシングルセル化し、単一細胞トランスクリプトーム解析を実施した。これらにより同定した細胞集団に関して、これらの単離培養、輸注、抗体による除去実験を行い、腫瘍増殖に与える影響を検討した。また、セルレイン投与や膵管結紮による慢性膵炎マウスモデルを作成し、炎症関連分子の発現を検討した。膵癌患者切除検体を用いて、各種免疫細胞と予後との関係を検討した。

4. 研究成果

マウスとヒト膵癌組織の検討から、Arg1、Nos2、S100A8、S100A9、TGF- β などを産生する腫瘍促進的な多核球系骨髄由来免疫抑制細胞が増加している集団が一定割合で存在していることを見出した。また、これらの細胞が存在している膵癌患者では切除後の無再発生存率や全生存期間が有意に不良となることを見出した。また、癌微小環境内へのこの免疫抑制細胞の遊走や活性化には、腫瘍や腫瘍関連マクロファージなどが産生するIL-1が重要な働きをしていることを明らかにした。さらに、セルレイン投与や膵管結紮による慢性膵炎マウスモデルを用いた検討の結果、慢性膵炎組織においても炎症細胞浸潤に伴ってIL-1発現が亢進し、これらの細胞の遊走を促すケモカインであるCxc11やCxc12の発現が上昇していることを見いだした(次項図1)。IL-1を膵癌細胞株に添加した結果、腫瘍細胞からのCXCL1、CXCL2などのケモカインが増加することを見出した(次項図2)。

<方法>



qPCR

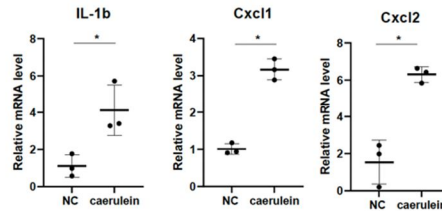
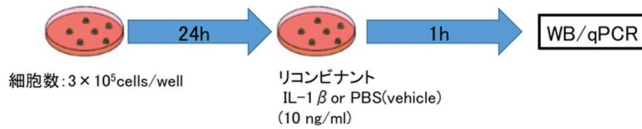


図1. 慢性膵炎マウスモデルの膵組織ではIL-1β、Cxcl1、Cxcl2発現が亢進している

<方法>

細胞株: panc-1



qPCR

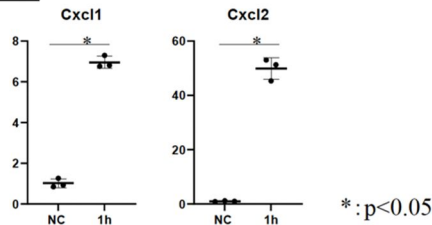


図2. 膵癌細胞においてIL-1β刺激によりCxcl1、Cxcl2発現が亢進する

以上から、膵癌の微小環境における炎症が IL-1 産生を誘導し、多核球系骨髄由来免疫抑制細胞を腫瘍内へと浸潤させていると考えられた。次に、この多核球系骨髄由来免疫抑制細胞を単離し、膵癌細胞株とともに野生型マウスの膵臓内に同種同所移植した結果、腫瘍増殖は有意に促進した(次項図3)。逆に、膵癌細胞株を野生型マウスの膵臓内に同種同所移植した後に、抗体を用いてこの多核球系骨髄由来免疫抑制細胞を除去した結果、腫瘍増殖は有意に抑制された。以上から、膵の炎症により産生される IL-1 が膵癌細胞からのケモカイン発現を誘導し、これにより微小環境内に遊走した多核球系骨髄由来免疫抑制細胞が膵癌の形成や進展を促すという新たな炎症による膵癌進展機構を見出した。

次にこの腫瘍増殖に対する影響の分子機序を検討するために、様々な免疫細胞の解析を行った結果、多核球系骨髄由来免疫抑制細胞が強く浸潤している腫瘍組織においては、CD8 T細胞の浸潤が少なく、また、腫瘍内における IFN やグランザイム産生、FasL 発現が低下していることを見出した。そこで、抗体を用いた CD8T 細胞除去実験を行った結果、この多核球系骨髄由来免疫抑制細胞浸潤による腫瘍増殖促進効果は認められず、この多核球系骨髄由来免疫抑制細胞が CD8 T細胞からの IFN やグランザイム産生、FasL 発現を抑制させることで、抗腫瘍免疫を減弱させていることが明らかになった。

すなわち、癌微小環境内において、炎症を基軸として発症する癌細胞と多核球系骨髄由来免疫抑制細胞、そして CD8 T細胞の相互作用が、膵癌の進展において重要であることが明らかになった。以上の結果について論文化を行った。

本研究により、膵臓内の組織微小環境で生じる慢性炎症が膵癌の発症や進展に与える影響が明らかとなり、その関係を繋ぐ重要な免疫細胞集団が同定されたことで、今後これらの細胞を標的とした治療薬開発に繋がる可能性が期待される。その結果非常に予後不良な膵癌患者の予後改善に寄与する可能性のある研究成果であり、その社会的意義は極めて大きいと考える。また、膵

炎と膵癌を繋ぐ新たな分子機序の解明は、炎症と癌という近年注目されている学問領域の発展に寄与する研究成果であり、学術的にも重要な成果であると考えられる。

<方法>

C57BL/6Jマウスにマウス膵癌細胞株MPKC1と共にCD11b⁺細胞を同種同所移植して腫瘍増殖を検討

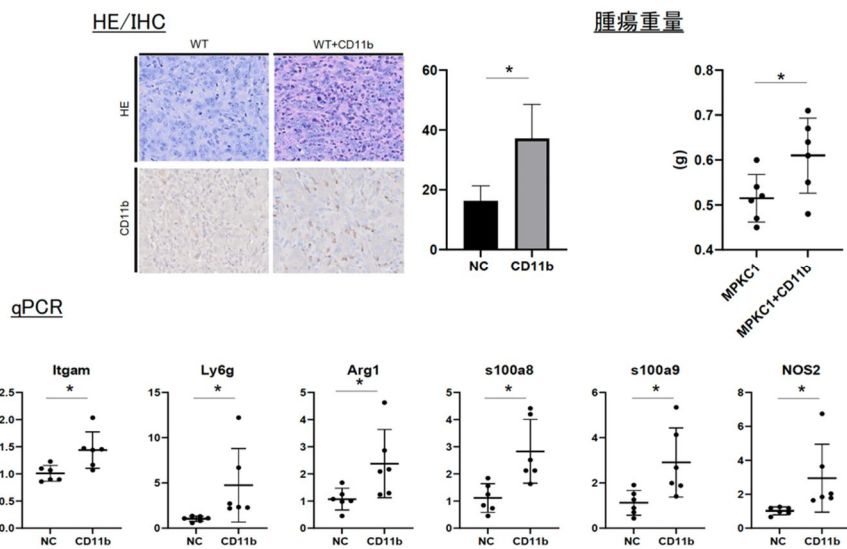


図3. 膵癌細胞とCD11b⁺細胞を共移植すると腫瘍増殖は促進する

*p<0.05

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 1件）

1. 著者名 Okabe Junya, Kodama Takahiro, Sato Yu, Shigeno Satoshi, Matsumae Takayuki, Daiku Kazuma, Sato Katsuhiko, Yoshioka Teppei, Shigekawa Minoru, Higashiguchi Masaya, Kobayashi Shogo, Hikita Hayato, Tatsumi Tomohide, Okamoto Toru, Satoh Takashi, Eguchi Hidetoshi, Akira Shizuo, Takehara Tetsuo	4. 巻 42
2. 論文標題 Regnase-1 downregulation promotes pancreatic cancer through myeloid-derived suppressor cell-mediated evasion of anticancer immunity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-023-02831-w	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 Sato Katsuhiko, Hikita Hayato, Shigekawa Minoru, Kato Seiya, Sasaki Yoichi, Shinkai Kazuma, Fukuoka Makoto, Kudo Shinnosuke, Sato Yu, Fukumoto Kenji, Shirai Kumiko, Myojin Yuta, Sakane Sadatsugu, Murai Kazuhiro, Yoshioka Teppei, Nishio Akira, Kodama Takahiro, Sakamori Ryotaro, Tatsumi Tomohide, Takehara Tetsuo	4. 巻 113
2. 論文標題 Pentraxin 3 is an adipose tissue related serum marker for pancreatic cancer cachexia predicting subsequent muscle mass and visceral fat loss	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4311 ~ 4326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15569	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 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岡部 純弥、小玉尚宏、竹原 徹郎
2. 発表標題 炎症制御分子 Regnase-1 を介した膵がん発症・進展機構の解明
3. 学会等名 第54回日本膵臓学会大会
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
研究 分 担 者	小玉 尚宏 (Kodama Takahiro) (10623275)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	

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