

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：82713

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20841

研究課題名（和文）胃癌腹膜播種転移初期過程における腫瘍関連マクロファージを標的とした新規治療薬開発

研究課題名（英文）Identification of tumor-associated macrophages promoting early-stage metastasis during peritoneal dissemination in gastric cancer

研究代表者

川瀬 航（Kawase, Wataru）

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・臨床研究所がん治療学部・研究員

研究者番号：70966605

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：腹膜播種は胃癌において頻度の高い転移形式の一つであり、予後不良の重要な予測因子である。しかしながら、腹膜播種形成のメカニズムは依然として不明であり、有効な治療法も確立されていない。本研究では、腹膜播種初期過程から転移形成に関与する細胞種を明らかにし、がん細胞との相互作用機構を解明することで胃癌腹膜播種に有効な新規治療標的を同定することを目的とした。我々は、フローサイトメトリック解析を用いて細胞診陽性胃癌洗浄腹水中に腫瘍関連マクロファージ（TAM）が豊富に存在することを明らかにした。単一細胞RNA-seq解析から細胞診陽性洗浄腹水中のTAMで治療標的となりうる複数の遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌腹膜播種は極めて予後不良であるが、腹膜播種形成のメカニズムは不明であり、有効な治療法の確立されていない。胃癌腹膜播種転移の初期過程において、どのようなTAMがPro-tumorに機能し、がん細胞と相互作用しているのかという問いを解明することで術後腹膜播種再発の予測因子や免疫チェックポイント阻害薬に関するバイオマーカーの探索に有用なだけでなく、胃癌腹膜播種に対する画期的な新規治療薬の開発にも繋がると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Peritoneal dissemination (PD) is the most frequent metastasis pattern in gastric cancer (GC) and is a significant predictor of poor prognosis. However, the mechanisms underlying PD formation remain unclear, and a PD-specific signature has not been identified. PD development is thought to be influenced by various changes occurring in GC tumor cells and immune cells present in the peritoneal cavity. In this study, we aimed to identify the specific cell type responsible for promoting metastasis during the early stage of PD in GC. We demonstrated the abundant presence of tumor-associated macrophages (TAMs) in CY1 GC ascites using flow cytometry analysis and identified several genes that were significantly expressed in CY1 TAMs using single-cell RNA-seq analysis. Furthermore, we evaluated the potential of these genes to serve as therapeutic targets for the treatment of PD in GC.

研究分野：腫瘍学

キーワード：腹膜播種 胃癌 腫瘍関連マクロファージ 転移

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腹膜播種は胃癌において頻度の高い転移形式の一つで、癌性腹水貯留や消化管閉塞などを来すことにより、患者の Quality of Life、栄養状態を著しく低下させ、治療を難渋させる病態を示す。胃癌現病死の死因として最も多く、1 年生存率は約 40% と極めて予後不良である。しかしながら、腹膜播種の形成メカニズムは完全に理解されておらず、適切な治療標的も特定されていない為、腹膜播種に十分な効果がある治療法は未だに確立されていない。そのため、腹膜播種の形成過程を理解し、有効な新規治療薬の開発することが求められている。腹膜播種の形成過程には腹腔内に存在する胃癌腫瘍細胞と免疫細胞に様々な変化が生じるとされています。なかでも、腫瘍関連マクロファージ (TAM) は様々な癌種において浸潤や血管新生、増殖因子産生、免疫抑制、前転移ニッチ形成といった様々な転移過程に密接に関与している (*Nat Rev Clin Oncol.*, 14:399-416, 2017)。実際に、免疫抑制性に働く M2 型 TAM は、胃癌腹膜播種症例において早期胃癌などのコントロールと比較して腹水中に有意に多く存在し、胃癌細胞株と共培養すると癌細胞の増殖・浸潤を促進することが報告されている (*Gastric Cancer.*, 19:1052-1065, 2016, *Oncoimmunology.*, 22:8(12), 2019)。近年、Single-cell RNA sequence (scRNA-seq) を用いたがん組織の遺伝子発現の解析結果より、TAM は従来のような M1/M2 型といった単純な分類ではなく、より複雑で細分化されたスペクトラムを有していることが報告され (*Cell.*, 174, 1293-1308.e1236, 2018)、個々の TAM の特徴を同定し、癌細胞との相互作用を包括的に検討することの重要性が強調されてきている。

2. 研究の目的

胃癌洗浄腹水中細胞の分子病理学的特徴を同定するため、細胞診陽性 (CY1) 症例の胃癌洗浄腹水中細胞の RNA-seq を実施した。遺伝子プロファイルを原発巣でも発現し、さらに腹水中細胞で発現上昇する遺伝子群を抽出することにより、85 遺伝子まで絞り込むことに成功した。これらの遺伝子には TAM に関連する遺伝子が含まれており (図 1)、腹膜播種転移の初期過程から腹腔内に豊富に存在する可能性が強く示唆された。しかしながら、胃癌腹膜播種転移のどの段階から作用し、がん細胞と相互作用しているのかは不明である。本研究では、胃癌腹膜播種転移の初期過程において、どのような TAM が pro-tumor に機能し、がん細胞と相互作用しているのかを明らかにすることを目的とする。

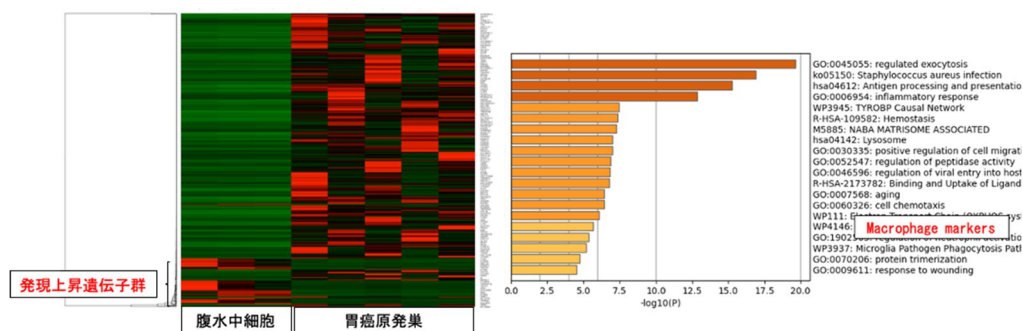


図 1. 胃癌原発巣と CY1 症例洗浄腹水の RNA-seq 解析

3. 研究の方法

() CY 陽性症例と CY 陰性症例について胃癌洗浄腹水中免疫細胞成分を比較する
胃癌腹水中の微小環境を理解するため、CY1 症例と CY 陰性 (CY0) 症例から採取した胃癌洗浄腹水の細胞成分を用いて、FACS Aria (BD Bioscience) にて TAM など各細胞集団を解析する。

() シングルセル解析を用いて新規 TAM signature gene を同定する

(a) まず、CY1 症例の CD68⁺/CD163⁺ 集団と CY1 症例の CD68⁺/CD163⁻ 集団を分離し、RNA-seq による発現解析を行い、CY1 腹水中 M2 TAM の発現変動遺伝子 (DEG) を同定する。

(b) 新規 TAM signature gene を同定するため、CY0・CY1・癌性腹水の各症例から CD11b⁺ 集団について、シングルセル RNA-seq を実施し、CY1 症例に特徴的なクラスターの DEG を同定する。

(-a) の DEG と Gene set enrichment analysis (GSEA)、gene ontology 解析、IPA 解析、インタラクトーム解析を実施し、新規 TAM signature gene を選出する。

- () 臨床検体を用いて同定した新規 TAM signature genes を検証する
- (a) 胃癌切除症例の洗浄腹水中細胞における TAM signature genes の発現量を定量的 RT-PCR を用いて測定し、腹膜播種再発との相関について検討する。
- (b) 胃癌切除検体における TAM signature genes の発現量と発現細胞について免疫組織染色を用いて検証する。癌間質での発現が確認された分子について、Tissue microarray を用いて臨床病理学的因子との関連を検討する。
- () マウス腹膜播種モデルを用いて TAM 関連標的分子阻害薬による抗腫瘍効果を検討する
- () と () で検証された TAM 関連標的分子に対する阻害薬を選出する。胃癌細胞株またはヒト胃癌オルガノイドをヌードマウスの腹腔内に移植し、腹膜播種モデルを作製する。腹腔内に腫瘍が生着したのを確認後、TAM 関連標的分子阻害薬(±パクリタキセル)を週1回×3週間腹腔内投与する。投与後4週間で腫瘍を摘出し、腫瘍重量、腹水の有無を検討する。

4. 研究成果

胃癌患者の腹腔内の微小環境を理解するために、胃癌患者の腹膜洗浄液または胃癌癌性腹水のフローサイトメトリー解析を行った。その結果、CY1 症例と胃癌癌性腹水症例において TAM が豊富に存在することを確認した。各症例における TAM の特徴を明らかにするため、CD11b⁺細胞集団を分離し scRNA-seq を実施した。得られた scRNA-seq データをクラスター解析したところ、各症例において特徴的な TAM の集団が存在することが明らかとなった。CY1 症例の TAM に特徴的な性質を調べるため、CY1 に特異的なクラスターにおける遺伝子発現を解析した。CY1 症例の TAM クラスターには、血管新生の促進や免疫反応の抑制に関連する遺伝子が含まれていた。これらの結果から CY1 症例における TAM は血管新生の促進や免疫反応抑制を介して腹腔内に存在する腫瘍細胞の生存や増殖を促進している可能性が示唆された。また、scRNA-seq データから治療標的となる可能性のある複数の転写因子遺伝子の同定も行った。これら治療標的候補である転写因子遺伝子の予後的価値を調べるため、TCGA バルク RNA-seq データを用いて生存解析を行ったところ、治療標的候補遺伝子の発現が高い胃癌患者は、これらの遺伝子の発現が低い患者と比較して生存率が悪かった。これらの結果から、同定した複数の治療標的転写因子遺伝子は有望な治療標的となりうる可能性がある。

現在、治療標的候補因子について、治療効果を評価する計画を実施予定である。治療効果の評価を含めた本研究の詳細に関しては、論文出版後に改めて報告する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 川瀬航, 廣島幸彦, 佐藤慎哉, 大島貴, 宮城洋平
2. 発表標題 胃癌腹膜播種転移初期過程における腫瘍関連マクロファージを標的とした新規治療薬の開発
3. 学会等名 2022年度若手支援技術講習会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Wataru Kawase, Yukihiro Hiroshima, Itaru Hashimoto, Shizune Onuma, Mitsuhiro Furuta, Takashi Oshima, Yohei Miyagi
2. 発表標題 Characterization of TAMs promoting early-stage metastasis during peritoneal dissemination in gastric cancer
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Wataru Kawase, Yukihiro Hiroshima, Itaru Hashimoto, Shizune Onuma, Mitsuhiro Furuta, Nozomu Machida, Takashi Oshima, Yohei Miyagi
2. 発表標題 Identification of tumor-associated macrophages promoting early-stage metastasis during peritoneal dissemination in gastric cancer
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024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
---------	---------