

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07243

研究課題名(和文) 膵癌における腫瘍促進性好中球の機能獲得機序解明と新規抗体医薬開発

研究課題名(英文) Elucidation of the tumor-associated neutrophil creating the immunosuppressive microenvironment in pancreatic cancer

研究代表者

堀岡 宏平 (HORIOKA, Kohei)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10783699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌微小環境において、腫瘍関連好中球(TAN)の浸潤が膵癌の予後と腫瘍内CD8+ T cellの浸潤に関連することが示された。さらに、膵癌細胞が分泌するCCL5がTANの腫瘍促進的な機能の獲得に関与していることを明らかにした。また、網羅的遺伝子発現解析によりTANに特徴的に発現する遺伝子Xを同定した。遺伝子Xを標的とした治療により、腫瘍内CD8+ T cellの活性化をもたらす、腫瘍を縮小させることを膵癌同所移植マウスモデルを用いて示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤の登場により、多くの癌種において劇的な治療成績改善が示されている一方、膵癌では免疫療法による効果は乏しい。近年、免疫微小環境における腫瘍関連好中球の存在が明らかにされているが、その腫瘍促進性の獲得に関与する因子や、腫瘍を促進させるメカニズムについては明らかになっていない。本研究において、膵癌細胞の分泌するCCL5がTANの腫瘍促進的な機能の獲得に関与していることを明らかにした。CCL5、遺伝子Xを標的とした治療は、抑制性免疫微小環境の改変をもたらすことで腫瘍縮小が期待でき、新規治療法の開発が強く望まれている膵癌において、有望な新規治療法の候補となりうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, the infiltration of tumor-associated neutrophil (TAN) was shown to be associated with the prognosis and the number of tumor-infiltrated CD8+ T cells in patients with pancreatic cancer. Furthermore, we found that CCL5 secreted by pancreatic cancer cells is involved in the acquisition of tumor-progressive functions of TANs. Microarray-based gene expression analysis identified gene X, which is significantly up-regulated in TAN. Finally, we revealed that the treatment targeting gene X suppressed the tumor-growth with activation of tumor-infiltrated CD8+ T cells in an orthotopic mouse model of pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 好中球 TAN CCL5 腫瘍免疫微小環境 腫瘍免疫

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は早期より浸潤、転移を生じるものの臨床症状が乏しく、診断時には既に進行しており、治癒切除が可能な症例は約 20%に留まる。全体の 5 年生存率は約 8%と予後不良であるその理由としては、高い転移・再発率、及び低い治療奏率が挙げられる。

膵癌の組織学的特徴として豊富な間質の増生 (desmoplasia) がある。微小環境中には間質細胞や免疫細胞など多様な細胞が存在している。好中球は、体内で感染・炎症に対する最初の防御機構として機能し、組織中での炎症反応の引き金となる。発癌早期においても好中球は早期に間質に動員され、細胞増殖や EMT の誘導に関与しており (de Oliveira S, Nat Rev Immunol.2012)、固形腫瘍における好中球/リンパ球の比率の増加と患者の予後不良との相関が示され (Shen, PLoS One,2014) バイオマーカーとしての可能性が提示されている。一方、近年では、好中球は可塑性を示し、腫瘍の微小環境中では腫瘍の増殖に対して相反する機能を持つタイプが存在することが報告されている。腫瘍関連好中球 (Tumor associated neutrophil; TAN) の phenotype の変化には腫瘍細胞由来の TGF- $\beta$  や 1 型 IFN が関与している報告があるが (Fridlender, Cancer Cell 2009) (Pylaeva, Front Immunol. 2016) 一方でこれらを阻害するだけでは腫瘍の縮小は得られていない。また、腫瘍の発生から進行における各段階において、腫瘍組織中の好中球の表現型も異なることも示されている (Patel, Nat Immunol. 2018)。

以上より、腫瘍微小環境中の因子が TAN の分化に大きく影響していることは予想されるが、腫瘍促進性に働く好中球が、どのように分化が誘導され、どのようなメカニズムで腫瘍を促進させるのかは明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、癌組織内で腫瘍促進性に働く好中球を分化させるメディエーターを同定し、腫瘍促進をもたらすメカニズムを解明することである。特に膵癌の特徴である豊富な間質組織が、好中球の分化とそれに伴う抗腫瘍免疫環境の形成にどのように影響しているのかに着目する。

### 3. 研究の方法

#### (1) TAN と膵癌予後の関連

当科で切除した膵癌患者 52 例の膵癌切除組織を用いて、好中球のマーカである MPO を IHC で観察し、予後との関連を検討した。

#### (2) TAN の膵癌細胞への影響

Human Progenitor cell に ATRA+DMSO を添加して好中球への分化を誘導し、さらに膵癌細胞の培養上清で刺激して TAN を作成した (右図)。TAN の培養上清を膵癌細胞に添加して膵癌細胞の浸潤能を観察した。さらに、TAN に特徴的な分泌因子をサイトカインアレイにより同定し、これが治療標的となりうるかを in vivo で検証した。

#### (3) TAN の CD8+T cell への影響

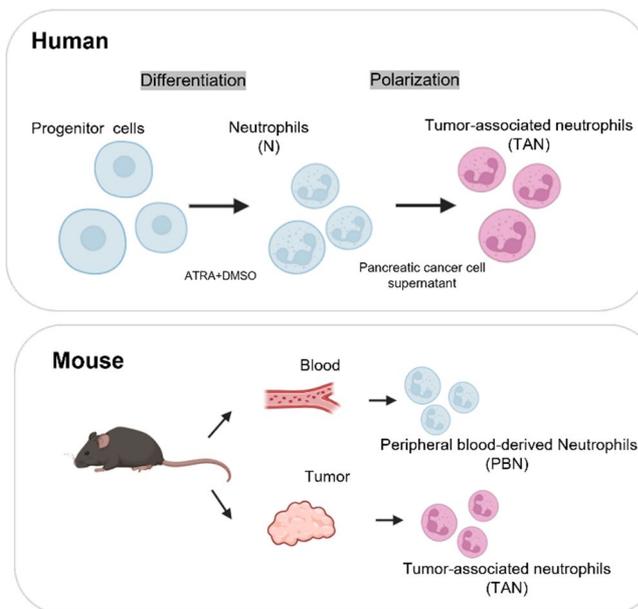
マウスの腫瘍内から sorting した TAN と脾臓から分離した CD8+T cell を共培養し、CD8+T cell の活性を FACS で評価した。

#### (4) マイクロアレイ発現解析による TAN に特徴的な遺伝子の探索

ヒト Progenitor cell から分化させた、Neutrophil と膵癌細胞の培養上清で刺激した TAN の遺伝子発現をマイクロアレイ発現解析で比較した。さらにマウス末梢血由来好中球 (Peripheral blood-derived Neutrophil; PBN) と腫瘍から sorting した TAN も同様に発現解析を行った。

#### (5) 好中球が発現する遺伝子 X を標的とした治療効果の検討

TAN に特徴的に発現する遺伝子 X を標的とした治療を膵癌マウス同所移植モデルを用いて検討した。

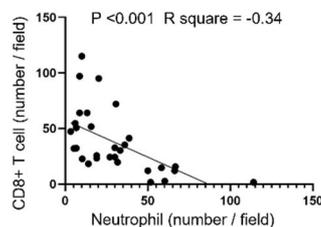
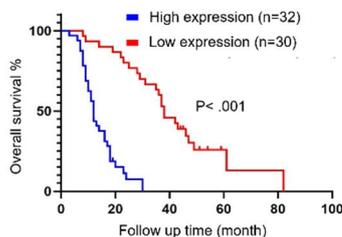


### 4. 研究成果

#### (1) TAN と膵癌予後の関連

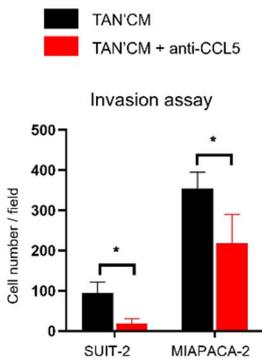
当科で切除した膵癌患者の切除標本を用いて膵癌微小環境中の TAN と予後の関連を IHC で検

討したところ、MPO 高発現群は低発現群と比較して有意に予後不良であった(右図)。さらに、同一症例内での MPO 発現と CD8a の発現分布をみると、両者に負の相関があることが分かり、TAN が CD8+ T cell の活性を抑制している可能性が示唆された(右図)。

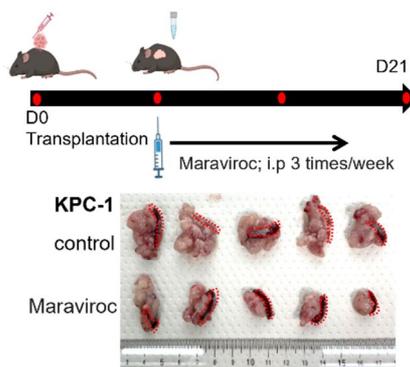


## (2) TAN の膵癌細胞への影響

Human Neutrophil と TAN の培養上清を膵癌細胞に添加すると、TAN の培養上清で刺激した膵癌細胞では有意に浸潤能が増加していた。膵星細胞の培養上清で刺激した Neutrophil でも同様の実験を行ったが、癌細胞の培養上清で刺激した方がより強く浸潤能を亢進させた。これらのことから、膵星細胞よりも膵癌細胞の方が微小環境中の好中球への影響がより大きいと考え、膵癌細胞と好中球の関心に焦点を当てることとした。



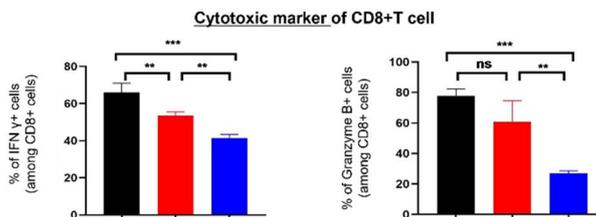
## Block CCL5-CCR5 axis



Neutrophil と TAN の分泌因子をサイトカインアレイで比較したところ、正常 Neutrophil と比較して、TAN では CCL5 の分泌が高値であることが分かった。抗 CCL5 を投与すると、膵癌細胞の浸潤能も改善を認め、TAN の分泌する CCL5 を介して膵癌細胞の浸潤能を上昇させていることが示唆された(右図)。さらに、in vivo 実験で Maraviroc を用いて CCL5-CCR5 を阻害したところ、コントロールと比較して腫瘍形成が抑制された(右図)。

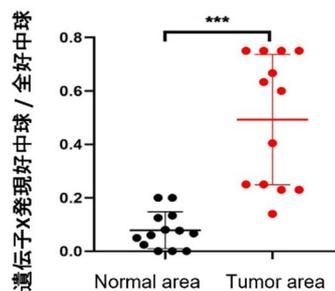
## (3) TAN の CD8+ T cell への影響

マウス末梢血由来の PBN とマウス腫瘍由来の TAN を、それぞれ脾臓から分離した CD8+ T cell と共培養して CD8+ T cell の活性化を FACS で評価したところ、TAN と共培養した CD8+ T cell は、PBN と共培養した場合と比較して IFN $\gamma$ , Granzyme B の発現が低下することが分かった(右図)。



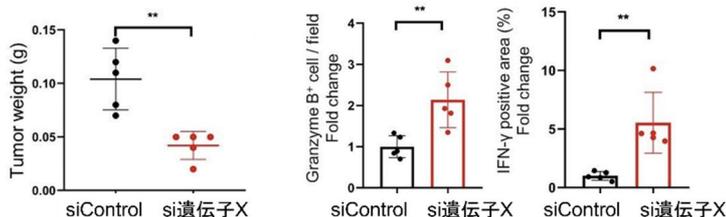
## (4) マイクロアレイ発現解析による TAN に特徴的な遺伝子の探索

ヒト由来の正常 Neutrophil と TAN, マウス由来の PBN と TAN のそれぞれの遺伝子発現をマイクロアレイ発現解析により比較した。ヒト、マウスの TAN でいずれも発現が上昇している 34 遺伝子を同定し、その中から候補遺伝子として遺伝子 X を同定した。ヒト膵癌組織において、遺伝子 X は正常部と比較して癌部で発現が高く(右図)、マウス由来 TAN においても PBN と比較して有意に発現が上昇していることを確認した。



## (5) 好中球が発現する遺伝子 X を標的とした治療効果の検討

遺伝子 X を発現する TAN と細胞障害性 CD8+ T cell との分布を多重免疫染色で検討したところ、遺伝子 X 陽性 Neutrophil の浸潤と、Granzyme B 陽性 CD8+ T cell の浸潤には負の相関を認め、遺伝子 X 発現 TAN が CD8+ T cell の細胞障害性を抑制することで腫瘍促進的に働く可能性が示唆された。最終的に、膵癌同所移植マウスモデルを用いて、遺伝子 X を標的とした siRNA を腫瘍内に投与すると、有意に腫瘍形成が抑制され、さらには腫瘍内 CD8+ T cell の活性化が促進された(右図)。



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 1件）

1. 著者名 Shinkawa Tomohiko, Ohuchida Kenoki, Nakamura Masafumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Heterogeneity of Cancer-Associated Fibroblasts and the Tumor Immune Microenvironment in Pancreatic Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3994
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14163994	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Haizhen Luo, Naoki Ikenaga, Kohei Nakata, Masataka Hayashi, Pingshan Zhong, Date Satomi, Koki Oyama, Nobuhiro Higashijima, Akihiro Kubo, Chika Iwamoto, Kenoki Ohuchida and Masafumi Nakamura
2. 発表標題 Tumor neutrophils achieve the pro-tumor ability through the interaction with pancreatic cancer cells
3. 学会等名 54th Annual American Pancreatic Association Meeting（国際学会）
4. 発表年 2023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 LOCAL NEUTROPHILS CAN DIFFERENTIATE INTO PMN - MDSC IN GASTRIC CANCER
3. 学会等名 Digestive Disease Week2022（国際学会）
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	寅田 信博  (TORATA Nobuhiro)  (00398075)	九州大学・大学病院・臨床検査技師    (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	三好 圭  (MIYOSHI Kei)  (70755272)	九州大学・医学研究院・共同研究員    (17102)	

	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
研究協力者	羅 海珍  (Luo Haizhen)		

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