

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16424

研究課題名（和文）単一細胞解析によるCAF細胞間クロストークからみた膵癌免疫逃避機序解明とその制御

研究課題名（英文）Elucidation and Control of Pancreatic Cancer Immune Evasion Mechanisms through Single-Cell Analysis of CAF-Cell Interactions.

研究代表者

武居 晋 (Takesue, Shin)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：30883425

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）：本研究は膵癌の形成初期から増大に伴う腫瘍微小環境内の変化を腫瘍組織のシングルセル発現解析によって明らかにし、膵癌細胞の免疫逃避機構に関わる新たな細胞集団を同定し、それらを制御する新規治療法を確立することを目的とした。

膵癌自然発癌マウス由来膵癌細胞をマウスに移植するモデル作成し、癌関連線維芽細胞（CAF）の微小環境への影響を探索した。CAFとの共移植により腫瘍形成が促進され、CD8陽性T細胞の浸潤が少ないことが明らかになった。また、膵癌手術検体から作成したオルガノイドを形態的に分類したところ、CAFが分泌する癌微小環境因子への依存度が、分化型膵癌ほど高いことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では膵癌の進展において癌間質中の癌関連線維芽細胞（CAF）が腫瘍抑制的に作用するCD8陽性リンパ球の誘導を抑制することにより膵癌の進展を促進する可能性が示された。

膵癌は極めて予後不良な癌種であり、薬物治療の進歩にも関わらず治療効果は限定的である。本研究の成果により癌関連線維芽細胞を免疫細胞の相互作用が新たな治療標的になる可能性が示唆され、膵癌の薬物治療の進歩を通して社会に貢献できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to elucidate the changes in the tumor microenvironment during the early stages of pancreatic cancer formation and progression, using single-cell expression analysis of tumor tissue. The study aimed to identify novel cell populations involved in the immune evasion mechanisms of pancreatic cancer cells and establish novel therapeutic strategies to control them.

A mouse model was created by transplanting pancreatic cancer cells derived from spontaneously developed pancreatic cancer in mice, and the impact on the tumor microenvironment by cancer-associated fibroblasts (CAFs) was explored. Co-transplantation with CAFs promoted tumor formation and revealed a reduced infiltration of CD8-positive T cells. Furthermore, morphological classification of organoids derived from surgical specimens of pancreatic cancer revealed a higher dependency on cancer microenvironmental factors secreted by CAFs in well-differentiated pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 シングルセル発現解析 癌微小環境 癌関連線維芽細胞 腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌に対する癌免疫療法は抗 PD-L1 抗体や抗 CTLA-4 抗体単剤では効果が乏しく、その原因として免疫逃避メカニズムが関わっているとされる。近年、免疫細胞を含む微小環境中の網羅的な解析手法としてシングルセル発現解析が様々な固形腫瘍において行われており、膵癌においても散見されるようになった。これらにより膵癌間質内の高度な heterogeneity と共に、Treg や MDSC、rDC など様々な腫瘍免疫抑制細胞の存在が明らかになってきている。

2. 研究の目的

シングルセル発現解析を用いた膵癌微小環境中の網羅的な解析により免疫逃避機構の構築において起点となる新たな細胞集団を同定し、新たな治療標的とすることで膵癌患者の予後改善という社会的要請にこたえることを目的とした。

3. 研究の方法

膵癌組織中に誘導される免疫細胞の解析

膵癌組織中に誘導される免疫細胞を免疫染色、FACS などで行い、癌組織特異的な免疫細胞を探索した。

ヒト膵癌オルガノイドの作製

ヒト膵癌切除組織から病理組織学的に様々な分化度のオルガノイドを樹立した。樹立したオルガノイドの分化度の違いによる癌微小環境への依存度を検討した。

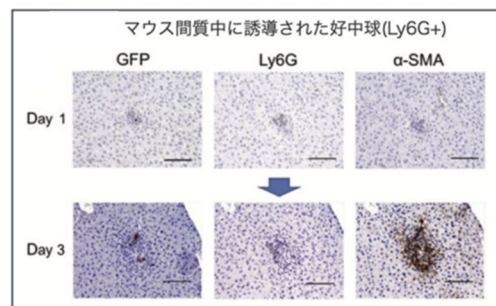
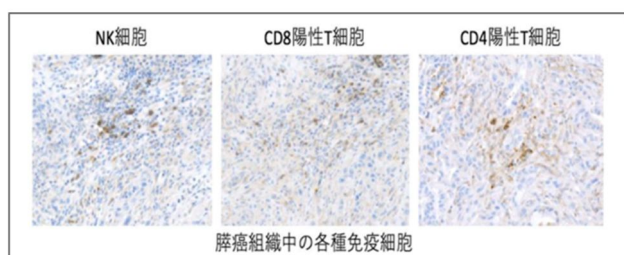
癌切除組織を用いたシングルセル発現解析

シングルセル解析は対象検体を単一細胞化したのちに drop-seq 技術を用いた網羅的な発現解析を行う技術であり、各細胞の機能的な遺伝子発現の違いを元にシングルセル解析専用の R パッケージを用いて評価を行った。

4. 研究成果

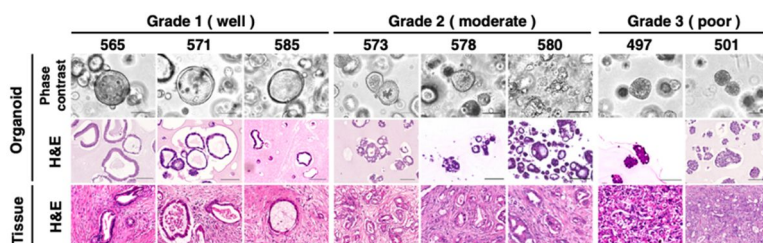
膵癌間質中の免疫細胞の解析

膵癌間質中の免疫細胞を免疫染色で評価したところ、NK 細胞、CD 8 陽性 T 細胞、CD 4 陽性 T 細胞がみられた(下図左)。また、GFP を導入した膵癌細胞を脾臓に注入する肝転移モデルマウスを用いて、転移巣で誘導される好中球及び癌関連線維芽細胞(CAF)を免疫染色で確認した。癌細胞注入後 1 日目から微小転移巣に好中球の集簇がみられ、それに引き続いて、2 日目以降に SMA 陽性の CAF の集簇が認められた(下図右)。



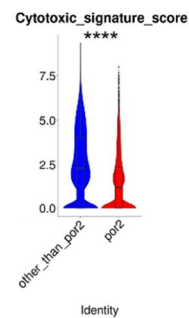
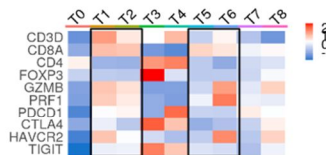
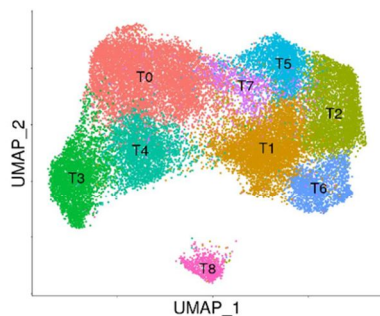
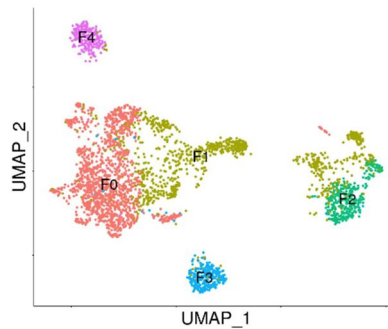
各分化度のオルガノイドの作成

ヒト膵癌切除組織から各分化度のオルガノイドを作成した(右図)。高分化度のオルガノイドは低分化度のオルガノイドと比較して CAF が分泌する niche 因子に依存していることを明らかにした。さらに解析を進め、RSPO3 が niche 因子として高分化度のオルガノイドの維持に関与していることを見出し、論文にて報告を行った。



胃癌組織のシングルセル発現解析

ヒト胃癌切除組織を用いてシングルセル発現解析を行った。特に間質が豊富な低分化型 (Por2) 胃癌の CAF を対象に解析を行ったところ、遺伝子発現のパターンが異なる複数のサブタイプがあることが判明した。また、T リンパ球を対象にシングルセル発現解析を行うと Por2 胃癌では CD8 陽性 T 細胞の細胞障害性機能関連遺伝子は Por2 以外の胃癌と比較して有意に低く、Por2 胃癌では CD8 陽性 T 細胞が活性化しにくい腫瘍微小環境である可能性が示唆された。



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 Shinkawa Tomohiko, Ohuchida Kenoki, Mochida Yuki, Sakihama Kukiko, Iwamoto Chika, Abe Toshiya, Ideno Noboru, Mizuuchi Yusuke, Shindo Koji, Ikenaga Naoki, Moriyama Taiki, Nakata Kohei, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 41
2. 論文標題 Subtypes in pancreatic ductal adenocarcinoma based on niche factor dependency show distinct drug treatment responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-022-02301-9	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 Chika Iwamoto, Kenoki Ohuchida, Tomohiko Shinkawa, Sho Okuda, Yoshiki Otsubo, Takashi Okumura, Akiko Sagara, Kazuhiro Koikawa, Yohei Ando, Koji Shindo, Naoki Ikenaga, Kohei Nakata, Taiki Moriyama, Yoshihiro Miyasaka, Takao Ohtsuka, Masatoshi Eto, Koichi Akashi, Masafumi Nakamura	4. 巻 512
2. 論文標題 Bone marrow-derived macrophages converted into cancer-associated fibroblast-like cells promote pancreatic cancer progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 15-27
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.canlet.2021.04.013.	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 0件）

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、持田郁己、小山虹輝、林昌孝、松本奏吉、岩本千佳、進藤幸治、池永直樹、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 分化型膵癌は癌関連線維芽細胞由来の微小環境因子に依存して分化度を保持している
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩本千佳、大内田研宙、新川智彦、相良亜希子、奥田翔、小山虹輝、進藤幸治、池永直樹、仲田興平、森山大樹、中村雅史
2. 発表標題 造血幹細胞由来CAF subsetが腫瘍内heterogeneityを高度化する
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 持田郁己、大内田研宙、寅田信博、堤親範、中村祥一、久野恭子、奥田翔、新川智彦、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 シングルセル解析を用いた膵臓癌の間質相互作用による化学療法抵抗性機序の検討
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 堤親範、大内田研宙、中村祥一、奥田翔、久野恭子、大坪慶志輝、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

1. 発表者名 新川智彦、大内田研宙、持田郁己、井手野昇、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 異なる薬物治療反応性を示す微小環境因子依存性に基づいた新たな膵癌サブタイプ分類
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

〔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
---------	---------