

令和 7 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22H02922・23K24183

研究課題名（和文）マイクロバイオームと腫瘍関連好中球から見た膵がんミニエコシステム

研究課題名（英文）The Pancreatic Cancer Mini-Ecosystem: Roles of the Microbiome and Tumor-Associated Neutrophils

研究代表者

池永 直樹（IKENAGA, Naoki）

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：90759755

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、膵癌における免疫抑制性微小環境の形成にマイクロバイオームおよび腫瘍内好中球が関与するメカニズムを明らかにした。"Fusobacterium nucleatum"は膵癌細胞からCXCL1を誘導し、CXCR2経路を介して腫瘍内好中球と免疫抑制性骨髄由来細胞の腫瘍内浸潤を促進、CD8+T細胞の抑制を引き起こすことが分かった。さらに、腫瘍内好中球はNectin2を高発現し、T細胞の疲弊を誘導する免疫抑制性表現型を示した。Nectin2の阻害やERストレス抑制により腫瘍進展が改善された。これらの結果は、膵癌の免疫療法開発において腫瘍内好中球とマイクロバイオームを標的とする新たな可能性を示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、膵がんの進展を支える免疫抑制性微小環境の形成において、腫瘍関連好中球およびマイクロバイオームが果たす中心的な役割を明らかにした点で、極めて学術的意義が高い。特に、"Fusobacterium nucleatum"によるCXCL1-CXCR2経路の活性化や腫瘍関連好中球の免疫抑制分子Nectin2が、CD8+T細胞の抑制と腫瘍の悪性化に寄与していることを示した。本知見は、これら分子経路を標的とした免疫療法開発の新たな基盤となるものであり、膵がんの治療選択肢を広げる社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that the microbiome and tumor-infiltrating neutrophils play key roles in shaping the immunosuppressive microenvironment of pancreatic cancer.

"Fusobacterium nucleatum" induced CXCL1 in cancer cells, activating the CXCR2 pathway to recruit neutrophils and myeloid-derived suppressor cells, which suppressed CD8+ T cell function. In addition, tumor associated neutrophils highly expressed Nectin2, contributing to T cell exhaustion. Inhibiting Nectin2 or ER stress reduced tumor progression, suggesting new therapeutic strategies targeting neutrophils and the microbiome in pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：腫瘍関連好中球 TAN マイクロバイオーム Fusobacterium nucleatum CXCL1 CXCR2 Nectin2

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵がんは予後不良な悪性腫瘍であり、その治療成績の向上が急務である。膵がんは他のがん腫と比較して顕著な間質反応を示し、免疫細胞の浸潤を抑制する免疫抑制性微小環境 (tumor micro environment: TME) が形成されていることが、免疫療法の奏効率が極めて低い一因と考えられている。特に、腫瘍関連好中球 (tumor-associated neutrophils: TAN) は、その腫瘍促進的かつ免疫抑制的な役割が近年注目されており、膵がんの進展に深く関与している可能性がある。

また、近年のメタゲノム解析の進展により、膵がん組織内にも多様なマイクロバイオーームが存在することが示され、それらが免疫細胞やがん細胞と相互作用することで、TME の形成や腫瘍免疫の制御に影響を与えていることが示唆されている。中でも歯周病菌である *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) は他がん種でも免疫抑制や腫瘍進展との関連が報告されており、膵がんにおける機能解明が求められていた。本研究では、マイクロバイオーームと TAN に着目し、これらがどのように連携して免疫抑制性 TME を形成するかを明らかにすることで、膵がんの新たな治療標的を探索することを目的とした。

2. 研究の目的

腫瘍内で多様なマイクロバイオーームががん細胞や免疫細胞、膵星細胞と共生する様子は、一種の“ミニエコシステム”といえる。膵がんが自己の進展のために独自の免疫抑制性環境を形成していることは容易に想像される。免疫チェックポイント阻害剤の成功が示すように、免疫が正しく機能すればがんは排除可能である。本研究では、膵星細胞、好中球、マイクロバイオーームによって形成される免疫抑制性微小環境のメカニズムを解明し、それを抗腫瘍性に転換する方法の探索を目的とする。

3. 研究の方法

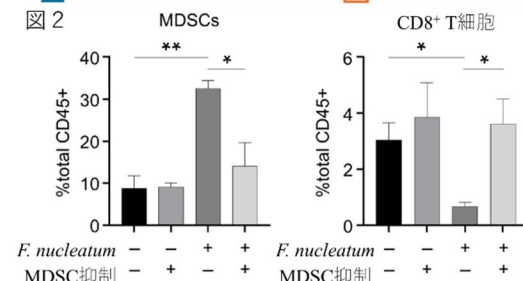
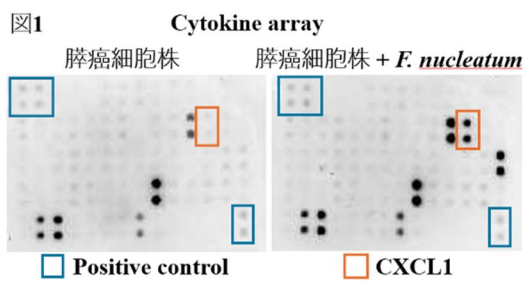
まず、マイクロバイオーームの微小環境への影響を検討するため、in vitro では *F. nucleatum* と膵がん細胞の共培養モデルでの遊走能・浸潤能アッセイ、in vivo ではマウス膵がん皮下移植モデルへの *F. nucleatum* の腫瘍内投与による評価を行う。変化が認められた場合には、*F. nucleatum* と膵がん細胞の培養上清の cytokine array からセクレトームを網羅的に同定する。同定したセクレトームをヒト腫瘍組織の qRT-PCR で評価する。セクレトームの受容体阻害剤や中和抗体を用いたマウス治療実験を実施し、免疫抑制機構を明らかにする。また、*F. nucleatum* の腫瘍内投与によって好中球をはじめとした免疫細胞の変化を観察し、原因と考えられる免疫細胞に着目し中和抗体による薬理的減少の影響を評価する。

一方で、ヒト白血病細胞株 HL-60 を分化誘導して得られた好中球に、膵がん細胞株 (SUIT-2 および MIAPaCa-2) の培養上清を添加し、TAN を誘導する。得られた TAN は既知の免疫抑制性分子の発現を qRT-PCR、ウエスタンブロットの手法で解析し、免疫抑制性の表現型であることを確認する。また、これら TAN とマウス膵がん皮下移植モデルの腫瘍から分離した腫瘍内好中球のマイクロアレイを行い、TAN の腫瘍促進性を特徴づける候補分子を同定する。同定した分子の siRNA ノックダウンを行い、TAN の表現型変化と腫瘍増殖への影響を調べる。さらに、ヒト膵がん組織切片を用いて免疫染色を行い、TAN および免疫チェックポイント分子 Nectin2 の発現を評価した。公開されているヒト scRNA-seq データも用いて、TAN のクラスター分類と遺伝子発現プロファイルを解析し、免疫抑制性サブセットの同定を行った。

これらの手法を通じて、膵がん微小環境における TAN とマイクロバイオーームの相互作用を多面的に解析し、免疫抑制性因子の同定とその制御手法を探究した。

4. 研究成果

本研究により、まず歯周病菌 *F. nucleatum* が膵がん微小環境に与える影響を明らかにした。*F. nucleatum* 陽性腫瘍は、より大きく浸潤性が高い傾向を示し、予後不良と関連していた。*F. nucleatum* は膵がん細胞において CXCL1 の分泌を促進した (図 1)。CXCL1 の受容体である CXCR2 の阻害剤および CXCL1 中和抗体の投与によって、*F. nucleatum* による腫瘍進展が有意に抑制された。腫瘍内の免疫細胞の評価により CXCL1-CXCR2 シグナルが TAN および免疫抑制性骨髄由来細胞 (MDSC) の腫瘍内リクルートを誘導し、CD8+ T 細胞の浸潤を抑制することが判明した (図 2)。マイクロバイオーームが TAN および腫瘍内 MDSC の増加を引き起こし、免疫抑制性環境を強化している可能性が示された。



(Hayashi M, Ikenaga N, et al. Intratumor *Fusobacterium nucleatum* promotes the progression of pancreatic cancer via the CXCL1-CXCR2 axis. *Cancer Sci.* 2023;114(9):3666-3678.)

さらに、膵がん患者の腫瘍組織では、TANの浸潤が顕著であり、その量は予後不良と有意に相関していた。in vitro と in vivo の両方から採取したTANのマイクロアレイから、TANは免疫チェックポイント分子Nectin2を高発現していることが判明した(図3)。Nectin2の機能阻害実験では、中和抗体およびsiRNAを用いてTANでのNectin2発現を抑制した結果、腫瘍内CD8+ T細胞のグランザイムBおよびIFN- γ の発現が回復し、マウス腫瘍モデルで腫瘍縮小効果が確認され(図4)、CD8+ T細胞の疲弊化や抗腫瘍機能低下に関与していた(図5)。(Luo H, Ikenaga N, et al. Tumor-associated neutrophils upregulate Nectin2 expression, creating the immunosuppressive microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2024;43(1):258.)

図3 Significantly upregulated genes in TANs

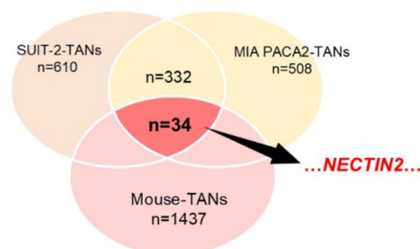


図4 Nectin2抑制で腫瘍縮小

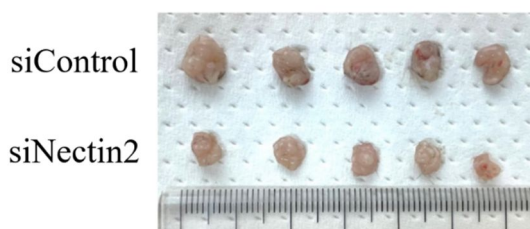
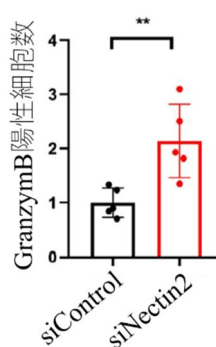
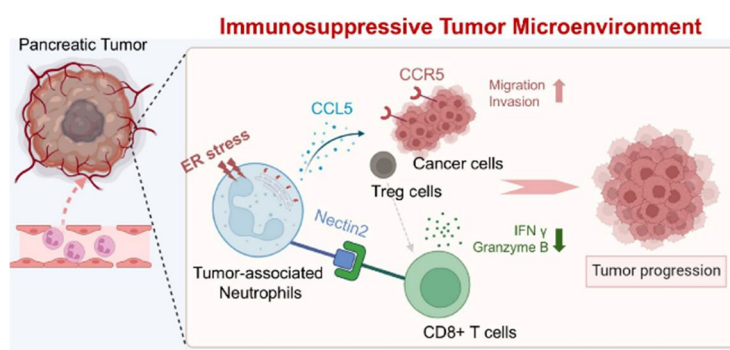


図5



以上の結果から、TANおよび *F. nucleatum* を中心としたマイクロバイオームが膵がんにおける免疫抑制性微小環境を構築し、その中核を担う因子としてNectin2およびCXCL1-CXCR2経路が同定された。これらは膵がんにおける新たな免疫制御型治療標的となりうる可能性が高く、本研究はがん間質と免疫細胞の相互作用に関する理解を深化させ、今後の免疫療法戦略の基盤を提供するものである。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 Luo Haizhen, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Higashijima Nobuhiro, Zhong Pingshan, Kubo Akihiro, Wu Chenyi, Tsutsumi Chikanori, Shimada Yuki, Hayashi Masataka, Oyama Koki, Date Satomi, Abe Toshiya, Ideno Noboru, Iwamoto Chika, Shindo Koji, Ohuchida Kenoki, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 43
2. 論文標題 Tumor-associated neutrophils upregulate Nectin2 expression, creating the immunosuppressive microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13046-024-03178-6	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 Hayashi Masataka, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Luo Haizhen, Zhong Pingshan, Date Satomi, Oyama Koki, Higashijima Nobuhiro, Kubo Akihiro, Iwamoto Chika, Torata Nobuhiro, Abe Toshiya, Yamada Yutaka, Ohuchida Kenoki, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 114
2. 論文標題 Intratumor Fusobacterium nucleatum promotes the progression of pancreatic cancer via the CXCL1 CXCR2 axis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3666 ~ 3678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15901	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 池永直樹	4. 巻 44
2. 論文標題 膵癌が主導する腸内細菌叢の改変	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 285-290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Masataka Hayashi, Naoki Ikenaga, Kohei Nakata, Haizhen Luo, Pingshan Zhong, Koki Oyama, Nobuhiro Higashijima, Akihiro Kubo, Satomi Date, Chika Iwamoto, Kenoki Ohuchida, Masafumi Nakamura
2. 発表標題 BIOLOGICAL EFFECTS OF INTRATUMOR PERIODONTAL PATHOGENS IN PANCREATIC CANCER
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 Haizhen Luo, Naoki Ikenaga, Kohei Nakata, Masataka Hayashi, Pingshan Zhong, Date Satomi, Koki Oyama, Nobuhiro Higashijima, Akihiro Kubo, Chika Iwamoto, Kenoki Ohuchida, 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 Masataka Hayashi
2. 発表標題 INTRATUMOR FUSOBACTERIUM NUCLEATUM PROMOTES THE PROGRESSION OF PANCREATIC CANCER VIA THE CXCL1/IL-8-CXCR2 AXIS
3. 学会等名 Digestive Disease Week (国際学会)
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	佐田 政史 (SADA Masafumi) (10783508)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	水内 祐介 (MIZUUCHI Yusuke) (20849088)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	永吉 絹子 (NAGAYOSHI Kinuko) (90761015)	九州大学・大学病院・助教 (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
研究協力者	林 昌孝 (HAYASHI Masataka)		
研究協力者	羅 海珍 (LUO Haizhen)		
研究協力者	松吉 隆仁 (MATSUYOSHI Takahito)		

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