

令和元年9月6日現在

機関番号：87102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16564

研究課題名(和文)大腸癌の3D微少環境構築モデルを利用した薬物療法に対する新規バイオマーカーの開発

研究課題名(英文)Development of novel biomarkers of colorectal cancer using 3D microenvironment construction model

研究代表者

杉山 雅彦(Sugiyama, Masahiko)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・消化管外科医師

研究者番号：40751079

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文):免疫抵抗性を獲得しているがん細胞の一部に対して、抗PD-1抗体薬や抗CTLA-4薬などの免疫チェックポイント分子阻害薬を用いることで抗腫瘍免疫をひきだす治療が臨床応用されています。一方で大腸癌においてはPD-1/PD-L1をブロックするメカニズムを用いた免疫チェックポイント分子阻害薬の効果は限定的であることが知られています。

われわれは大腸癌症例での遺伝子不安定性と腫瘍免疫抵抗性に関わる分子の発現解析をおこないました。この結果遺伝子不安定性の高い症例において腫瘍先進部において抗原提示、腫瘍免疫反応が行われていることを解明し、また臨床病理学的にいくつかの予後不良因子を同定しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦における大腸癌の罹患率、死亡率は年々増加しており、治療に寄与するための病態解明が急務とされています。一方で複数の癌種において腫瘍の免疫抵抗性を解除することによって抗腫瘍免疫の再活性化をおこなう治療法が既に臨床の現場にもたらされており、多くの患者さんに福音となっています。大腸癌においても遺伝子不安定性の高い症例において治療が始まっています。

本研究は大腸癌と抗腫瘍免疫にかかわる分子の関わり的一端を臨床病理学的に明らかにしました。今後の大腸癌に対する抗腫瘍免疫治療の一助のなることが期待されます。しかし大腸癌に対する抗腫瘍免疫の効果は限定的であることからさらなる解明が求められることがわかりました。

研究成果の概要(英文):For the cancer that has acquired immune immune resistance, treatment with immune checkpoint inhibitors such as anti-PD-1 and anti-CTLA-4 has been applied clinically. On the other hand, in colon cancer, it is known that the effect of molecular inhibitors on immune checkpoints using molecular blocking mechanisms is limited. We performed analysis for the expression of molecules related to genetic instability and tumor immunoresistance in colorectal cancer. As a result, we clarified that antigen presentation and tumor immune response were performed at the tumor advanced site in cases with high genetic instability, and identified several prognostic factors in clinicopathologically.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：大腸癌 腫瘍免疫 癌幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)大腸癌の臨床

本邦における大腸癌の罹患率、死亡率は年々増加しており、現在女性の部位別癌死亡率の第一位である。新規薬剤の開発や分子標的薬を基に、集学的治療を行うことで年々大腸癌の生存率は改善が得られている。しかしながら局所再発や遠隔転移などを生じた場合は依然予後不良である。また薬物療法に対する応答性は個々の患者で異なるため、投与後に無効であることが一部の患者で判明する。感受性試験はかつて基礎研究がなされたものの現在 RAS 遺伝子の変異による抗EGFR抗体治療薬の適応性判断以外、実臨床で応用されているものは存在しない。他方、腫瘍免疫にかかわる分子の解明が加速度的に進んだ結果、癌による免疫回避のためのメカニズムが解明されつつあり、免疫抵抗性を獲得しているがん細胞の一部に対して、抗 PD-1 抗体薬や抗 CTLA-4 薬などの免疫チェックポイント分子阻害薬が注目されており、癌種横断的に臨床応用されつつある。

(2) 癌幹細胞に関する知見

正常組織における幹細胞は自己複製能とさまざまな方向に分化する多分化能を兼ね備えた未分化な細胞であり多種の組織を形成する根幹と考えられている。癌組織内においても幹細胞様の自己複製能・多分化能を有する細胞の存在が示され、これらの細胞は癌幹細胞と定義され、癌の増殖・転移に関与し、化学療法への治療抵抗性獲得の一因とされる (Nat Rev Cancer. 2005;5:275-284)。そのマーカーとして CD44variant が乳癌、胃癌、非小細胞肺癌等について報告されている (Nature. 2007;445(7123):111-115)。他方、現在大腸癌においてははまだ統一した見解が得られていない。

(3) 腫瘍免疫に関する知見

免疫にかかわる分子の解明が加速度的に進んだ結果、癌による免疫回避のためのメカニズムが解明されたと同時に、免疫抵抗性を獲得しているがん細胞の一部に対して、抗 PD-1 抗体薬や抗 CTLA-4 薬などの免疫チェックポイント分子阻害薬を用いることで治療効果があることが報告されている (N Engl J Med 2012; 366: 2455-2465)(J Clin Oncol 2014; 32: 1020-1030)。消化器をはじめとする固形癌でも、このような免疫抵抗性、抑制状態が生じていることが考えられ、一部のがんでは、EMT や癌幹細胞とともに治療抵抗性の原因の一つとも予想されている (J Natl Cancer Inst 2014; 1061)(Eur J Cancer 2013; 49: 2233-2242)。免疫チェックポイント阻害剤の化学療法の併用により、一部の抗癌剤抵抗性が克服できる可能性がある。癌免疫治療は劇的な進歩の途上にある (Curr. Opin. Immunol.2014;27:1-7)。癌種によっては高い治療効果を示すものの臨床効果をもたらす仕組みについては、未だ不明な部分が多くさらなる解明が望まれている。特に大腸癌においては PD-1/PD-L1 をブロックするメカニズムを用いた免疫チェックポイント分子阻害薬の効果は極めて限定的であることが知られており、その原因として Micro Sattelite Instability(MSI)との関連が報告されているほかは、いまだに未解明な部分が多い。他方、近年の画像処理技術の向上によって、それぞれの免疫組織化学染色を行ったスライドを連続切片で撮影の上合成し、コンピューター上で 3D 再構築を行うことによってマイクロレベルでがん微小環境、すなわち癌細胞と、これを取り巻く線維芽細胞・炎症細胞・免疫細胞・血管やリンパ管等の正常細胞で構成される構造との相互作用に関して立体的な関係を明らかにすることが可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、

大腸癌の 3D 微小環境構築モデルを利用しつつ癌幹細胞、腫瘍免疫に関する解析により薬物療法の開発につながるバイオマーカーの同定をめざすものである。

3. 研究の方法

1) 大腸癌臨床検体における腫瘍免疫関連分子の発現検討

MSI-H 大腸癌における PD-L1 発現と臨床病理学的因子の相関に関して 1994 年から 2015 年の期間において当科において手術を施行した大腸癌症例 499 例に対して DNA シーケンサーを用いたマイクロサテライト不安定性試験を行い、MSI-H 症例 48 例、MSS 症例 451 例を同定した。この症例に対して性別、大腸癌臨床病期に基づく傾向スコアマッチングのうえ、PD-L1 が検討不能な症例を除いた MSI-H36 例、MSS37 例を対象とした。組織標本に対して以下に示す抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。PD-L1 (clone SP142, Spring Bioscience, Pleasanton, CA)、PD-1 (clone D4W2J, Cell Signaling Technology, MA)、CD8 (clone C8/144B, Dako, Carpinteria, CA)、CD68 (clone KP1, Dako)。発現の評価は 400 倍でランダムに 3~5 視野 (1 視野に 400~500 個の腫瘍細胞) を観察し、染色強度(陰性、陽性、強陽性)と発現部位に関して腫瘍内部または Invasive front (腫瘍浸潤部と正常組織の境界領域) に分類した。

2) 大腸癌臨床検体における癌幹細胞の関連分子の発現検討

当科において大腸癌に対して 1994 年から 2009 年までの間に手術を行った 186 例に対して、組織標本に対して癌幹細胞マーカーとして抗 CD44v9 抗体(clone LKG-M001, Cosmo Bio)を用いた免疫組織化学染色を行った。評価は発現強度(陰性または弱陽性、中間、強陽性)と陽性細胞の腫瘍全体に占める割合を四分率別に評価し、スコア化を行った。

3) 3D 微小環境立体構築モデルによる大腸癌臨床検体の発現解析

ホルマリン固定の上パラフィン包埋された大腸癌切除標本のうち 6mm 厚の組織片より 5 μ 厚、合計 1200 枚のスライドを作成した。ヘマトキシリンエオジン染色並びに次に示す免疫組織化学染色として PD-L1 (clone SP142; Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA)、CD8 (clone C8/144B; Dako,

Carpinteria, CA, USA), CD31 (clone JC70A; Dako)、D2-40[clone D2-40(7); Dako]を順に行った。これをスライドスキャナー (Axio scan) をもちいて画像をコンピューター上に取り込み、ソフトウェア (Amira 6) 上で3D イメージ化を行った。3D イメージは任意の方向から断面、立体構築が可能であり連続したイメージを動画として記録することが可能である、

4. 研究成果

1) 大腸癌臨床検体における腫瘍免疫関連分子の発現検討

PD-L1 発現は陽性 42 例 (うち強陽性 23 例)、陰性 31 例であった。MSI-H 症例における PD-L1 陽性症例は 13 例 36% であり、陰性症例に対して有意差をもって低分化 ($P=0.049$)、リンパ管侵襲 ($P=0.049$)、脈管侵襲 ($P=0.030$) という予後不良因子を有することが明らかになった。また PD-L1 発現の局在は腫瘍細胞のみならず間質細胞にもみられた。間質細胞に発現が見られる症例は Stage I, II と進行度の低い症例に多く見られ間質へのリンパ球、マクロファージの浸潤が関与しているものと考えられた。さらに PD-L1, CD8, CD68 陽性細胞の局在に関しては MSI-H 症例では、腫瘍先進部の腫瘍細胞及び M2 マクロファージに PD-L1 が発現していることが明らかになった。他方 MSS 症例ではそのような発現が見られず MSI-H 症例において、抗原提示、腫瘍免疫反応が腫瘍先進部において行われていることが明らかになった。MSI-H 症例ではミスマッチ修復機構に異常が生じており Neoantigen が産生され腫瘍の抗原提示能力が非常に高いとされ、今回の研究からはこれを認識したキラー T 細胞が腫瘍先進部へ浸潤し、引き続き PD-L1 陽性 M2 マクロファージが腫瘍先進部に集簇していることが明らかになった。PD-L1 陽性 M2 マクロファージが腫瘍先進部においてははたしている機能や詳細なメカニズムは不明である。これまでの知見を総合すると抗腫瘍免疫の回避に関与している可能性があるが、今後この機能の解明が期待される。

2) 大腸癌臨床検体における癌幹細胞の関連分子の発現検討

発現解析の結果 CD44v9 低発現群 165 例、高発現群 21 例であった。これらに対して臨床病理学的因子との関連を求めた結果、CD44v9 高発現群において脈管侵襲陽性との有意な相関 ($P=0.0462$) を認めた。さらに生存解析では CD44v9 高発現群において全生存率が良好である傾向が見られた ($P=0.0514$)。他癌種においては CD44v9 高発現群は予後が不良である報告が発表されており、今回の結果に関してさらに検討が必要であると考えられた。今般、胃癌に対して CD44v9 を治療ターゲットとした臨床治験が日本国内で開始されており (Gastric Cancer 2017; 20: 1004-1009.)、注目されている。今後細胞内における染色の分布の違いの検討を行い、CD44v9 発現と、薬物療法に対する反応の違いに関して研究を継続する。

3) 3D 微小環境立体構築モデルによる大腸癌臨床検体の発現解析

3D 微小環境立体構築モデルによる大腸癌臨床検体の発現解析に関する検討を行ったが細胞間の立体的な関係が明瞭に得られる一方、構築に際して多量の検体組織を要する。このため後日抗原を追加して解析することが不能であることから多くの症例に対して網羅的な解析を行うためには方法の再検討が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. **Sugiyama M**, 他 7 名 Clinical Outcomes of Esophagojejunostomy in Totally Laparoscopic Total Gastrectomy. Surgical Laparoscopy, Endoscopy & Percutaneous Techniques. 査読有, 27. 2017. 87-91
2. Nakanishi R, **Sugiyama M** (7 番目), 他 9 人. Monitoring trifluridine incorporation in the peripheral blood mononuclear cells of colorectal cancer patients under trifluridine/tipiracil medication. Scientific Reports. 査読有, 7. 2017.
3. Nakanishi R, **Sugiyama M** (11 番目), 他 13 人. Sarcopenia is an independent predictor of complications after colorectal cancer surgery. 査読有, 48. 2017. 151-157.
4. Sasaki S, **Sugiyama M** (2 番目), 他 7 人. Anal metastasis of rectal cancer? adenocarcinoma of squamous cells: a case report and literature review. Surgical Case Reports. 査読有, 3. 2017.
5. **Sugiyama M**, 他 5 人. Laparoscopic Proximal Gastrectomy Maintains Body Weight and Skeletal Muscle Better Than Total Gastrectomy. World J Surg. 査読有, 42. 2018. 3270-3276.
6. Moriwaki T, **Sugiyama M** (17 番目), 他 24 人. Propensity Score Analysis of Regorafenib Versus Trifluridine/Tipiracil in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Refractory to Standard Chemotherapy (REGOTAS): A Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum Multicenter Observational Study. Oncologist. 査読有, 23. 2018. 7-15.
7. Nakanishi R, **Sugiyama M** (17 番目), 他 24 人. Sarcopenia is an independent predictor of complications after colorectal cancer surgery. Surg Today. 査読有, 48. 2018. 151-157.
8. Nakaji Y, **Sugiyama M** (5 番目), 他 8 人. Prognostic value of BRAF V600E mutation and

microsatellite instability in Japanese patients with sporadic colorectal cancer. J Cancer Res Clin Oncol. 査読有, 143. 2018. 151-160.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 杉山雅彦、腹腔鏡下噴門側胃切除術Double tract 再建法の短期成績の検討、第117回日本外科学会、2017年4月27日-29日、横浜
2. 杉山雅彦、局所進行直腸癌に対する術前治療戦略の現状と問題点、第72回日本消化器外科学会、2017年7月20日-22日、石川
3. 杉山雅彦、当科における腹腔鏡下噴門側胃切除術と腹腔鏡下胃全摘術の短期成績の検討、第27回九州内視鏡下外科手術研究会、2017年9月2日、福岡
4. 杉山雅彦、大腸癌肝転移に対する薬物療法から肝切除に至る症例の原発腫瘍部位の検討、第42回日本大腸肛門病学会九州地方会、2017年9月16日、熊本
5. 杉山雅彦、Who is the candidate of conversion hepatectomy for initially unresectable colorectal liver metastasis、第118回日本外科学会、2018年4月5日-7日、東京
6. 杉山雅彦、diverting stomaとして回腸人工肛門を造設した患者における術後合併症の検討、第73回日本消化器外科学会、2018年7月11日-13日、鹿児島
7. 杉山雅彦、conversion手術に至る大腸癌肝限局転移例の治療戦略、第16回日本臨床腫瘍学会、2018年7月19日-21日、神戸
8. 杉山雅彦、高齢者大腸癌手術症例の特徴、第26回日本消化器関連学会(JDDW2018)、2018年11月1日-4日、神戸
9. 杉山雅彦、当院におけるTaTME併用括約筋温存直腸切除術の現況、第73回日本大腸肛門病学会、2018年11月9日-10日、東京
10. 杉山雅彦、下部直腸癌に対する術前化学放射線療法の検討、第80回日本臨床外科学会、2018年11月22日-24日、東京
11. 杉山雅彦、当院における腹腔鏡下TaTME併用括約筋温存直腸切除術の検討、第31回日本内視鏡外科学会、2018年12月6日-8日、福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

- 1) 独立行政法人国立病院機構九州がんセンター
<https://www.ia-nkcc.jp/>
- 2) 九州大学大学院 消化器・総合外科
<http://www.kyudai2geka.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 雅彦 (Sugiyama Masahiko)
国立病院機構九州がんセンター
臨床研究センター 消化管外科医師
研究者番号：40751079

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。