

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09223

研究課題名（和文）子宮頸部腺癌の進展過程における免疫抑制性癌微小環境の経時的解析

研究課題名（英文）Immunosuppressive tumor microenvironment of uterine cervical adenocarcinoma

研究代表者

尾崎 聡 (Ozaki, Satoru)

金沢大学・保健学系・助教

研究者番号：40401921

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：子宮頸癌の組織型には、扁平上皮癌と腺癌の2種があるが、治療法は区別されていない。しかし、腺癌の生物学的特性および臨床挙動は扁平上皮癌と異なっており、より効果的な治療戦略構築のため、腺癌独自の癌進展機構の解明が必要とされている。本研究は、病理組織標本をデジタル化したバーチャルスライドを用いて、腫瘍標本全体の画像解析を行い、免疫関連細胞の種類と出現数を計測した。その結果、腫瘍細胞の免疫回避機構の一端において、両者の異同が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸癌の組織型には、扁平上皮癌と腺癌の2種があるが、治療法は区別されていない。しかし、腺癌の生物学的特性および臨床挙動は、扁平上皮癌と異なっており、より効果的な治療戦略構築のため、腺癌独自の癌進展機構の解明が必要である。本研究の免疫染色の画像解析結果により、細胞性免疫を担うTh1と液性免疫を担うTh2、および細胞性免疫を抑制するTregの出現数において、腺癌は扁平上皮癌に比し、Th1/Tregの出現比率が有意に低いことが示された。腺癌ではTregによる細胞性免疫の抑制がより強い環境にあり、Tregの誘導制御が腺癌の効果的な治療法の確立に寄与すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Although there are two histological types of cervical cancer, squamous cell carcinoma and adenocarcinoma, there is no distinction in treatment. However, the biological characteristics and clinical behavior of adenocarcinoma are different from those of squamous cell carcinoma, and it is necessary to elucidate the unique cancer progression mechanism of adenocarcinoma in order to develop more effective treatment strategies. In this study, we performed image analysis of the entire tumor specimen using virtual slides, which are digitalized histopathological specimens, and measured the type and number of immune-related cells. The results showed that there were differences in some aspects of the immune evasion mechanism of tumor cells between the two groups.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：子宮頸部腺癌 癌微小環境 腫瘍免疫回避

## 1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌は一時、減少傾向にあったが、2000 年を境にして若年層を中心に増加に転じており、抜本的な対策が求められている。頸癌の組織型は、主に扁平上皮癌と腺癌に分けられるが、近年、腺癌の発生件数が増加しており、頸癌全体に占める割合も、70 年代には 5% にすぎなかったが、近年では 20% を超えて、なお増加している。これまでは腺癌症例が少なく、区別する意義も不明であったことから、頸癌に関する多くの研究は、扁平上皮癌を対象としており、治療指針を定めた子宮頸癌 NCCN ガイドラインも、腺癌と扁平上皮癌を区別していない。しかし、近年、腺癌の全エクソームシーケンスによる解析で、扁平上皮癌で一般的な p53 や pRb 経路以外の遺伝子変異の存在が示されたほか (Chung, et al. Int J Cancer. 2015)、扁平上皮癌よりも腺癌の方が、予後が悪いことを示す臨床研究も報告された (Aoki, et al. J Obstet Gynaecol Res. 2014.)。このように、腺癌の生物学的特性および臨床挙動は、扁平上皮癌とは異なることが示唆されており、両者を区別した癌進展機構の解明は、より効果的な子宮頸癌の治療戦略につながると思われる。

癌はその組織周囲に、自身の増殖進展に適した癌微小環境を構築することが知られている。癌微小環境を特徴づける因子としては、免疫抑制細胞浸潤による宿主の免疫回避、筋線維芽細胞の誘導や上皮-間葉転換による間質浸潤の促進(間質反応)、血管新生による低酸素・低栄養環境への対応が知られているが、最近新たに、癌細胞による神経新生が、腫瘍の伸展を促進することが報告された (Moran, et al. Nature J. 2020.)。一方、子宮頸癌では、HPV と腫瘍細胞の両方に対する免疫寛容が成立している点で、子宮頸癌の癌微小環境は通常の癌とは異なることが予想される。近年、扁平上皮癌において、HPV 癌蛋白の E6/E7 が免疫抑制性サイトカインである IL-10 や TGF $\beta$  発現を誘導し、宿主の免疫応答を回避することが示された (Torres, World J Clin Oncol. 2014.)。しかし、腺癌においては、症例数が少ないことや区別する意義が不明であったため、腺癌独自の癌微小環境動態は研究されておらず、その特徴は不明であったが、近年の増加傾向によって腺癌症例が蓄積されてきたため、比較解析ができるようになった。両者の生物学的特性や臨床挙動には異同がみられることから、腺癌は扁平上皮癌とは異なった、癌微小環境を形成していることが予想される。

## 2. 研究の目的

本研究は、腺癌の増加傾向による症例蓄積によって、子宮頸癌を腺癌と扁平上皮癌に区別した、それぞれの癌微小環境の特徴解明が可能になる。本研究の成果は、より一層効果的な子宮頸癌治療戦略の構築に資する。本研究は、以下に示す 3 つの特徴を有する。生物学的特徴が異なる腺癌と扁平上皮癌を区別して解析することで、組織型に準じた子宮頸癌治療戦略への道が開けるという創造性がある。また同時に、浸潤癌の前駆病変も解析することで、癌微小環境の構築過程も明らかにできるという独自性がある。先行研究の標本解析は、標本のごく一部を対象に肉眼で判定する手法をとっており、得られる結果は客観性、正確性、再現性に乏しいという欠点がある。本研究では、免疫染色標本をバーチャルスライド化し、標本の全範囲を画像解析する手法 (Whole slide image 解析) を用いる。これにより、標本一枚あたり数百万個を超える細胞解析が可能となり、先行研究と比べてはるかに詳細で再現性の高い解析が実施できる独自性がある。これまでに行ってきた申請者の予備的研究で、免疫抑制環境における腺癌と扁平上皮癌の異同の一部が判明した。本研究の解析によって、組織型に準じた癌微小環境の特徴が明らかになる可能性は高く、新規治療ターゲットの探索にも寄与できる創造性がある。

癌は、自身の進展に適した微小環境を形成する。子宮頸部扁平上皮癌では、免疫抑制性の癌微小環境を形成することが示されている。一方、腺癌の生物学的特性や臨床挙動は扁平上皮癌とは異なることから、腺癌は独自の癌微小環境を形成していると考

えられ、腺癌と扁平上皮癌を区別した癌進展機構の解明が必要である。本研究により、腫瘍細胞の免疫回避機構の面から、腺癌と扁平上皮癌、それぞれの癌微小環境の動態を明らかにすることで、より効果的な子宮頸癌治療戦略の構築が望める。

### 3. 研究の方法

#### ・解析対象とする症例と臨床病理学的項目

これまで申請者は、腺癌 20 例、扁平上皮癌 10 例について免疫抑制微小環境の解析を行った。本研究では新たに症例を追加し、通常型腺癌や粘液癌を主体とした腺癌と扁平上皮癌各 100 例、計 200 例について解析を行った。また、癌が浸潤を開始し、伸展する過程の癌微小環境の動態を探るため、浸潤癌の前駆病変である上皮内腺癌と上皮内癌の症例も各々 50 例、計 100 例を解析した。さらに臨床病理学的特徴を抽出するために、年齢、組織型、腫瘍サイズ、腫瘍浸潤部のサイズと深さ、脈管浸潤の有無、リンパ節転移の有無などの項目情報を得た。

#### ・免疫組織化学的染色の実施

対象症例のパラフィン包埋切片を用いて、免疫組織化学的染色を実施し、癌微小環境に存在する各種細胞の出現数を計測し、癌微小環境における以下の 4 つの指標を解析した (図 1)。

A) 免疫抑制：免疫抑制に関わる細胞群の出現頻度を解析した。 骨髄由来免疫抑制細胞 (MDSC)：抗 IDO1 抗体で同定した。MDSC は Treg 細胞を誘導促進し、Th1/Th2 細胞バランスを Th2 優位にシフトさせ、細胞性免疫を抑制する。 腫瘍関連マクロファージ (TAM)：抗 CD163 抗体で同定した。TAM は上皮成長因子、血管新生因子、免疫抑制因子を産生する。 ヘルパー T 細胞：抗 CD4 抗体で同定した。Th1/Th2 細胞バランスの解析のため出現数を計測した。 Th1 細胞：抗 T-bet 抗体で同定した。細胞性免疫に関わるヘルパー T 細胞の一種である。 Th2 細胞：抗 GATA3 抗体で同定した。液性免疫に関わるヘルパー T 細胞の一種である。 Th17 細胞：抗 ROR 抗体で同定した。近年、同定されたヘルパー T 細胞の一種で、癌の進展を促進する因子を産生するとされる。 制御性 T 細胞 (Treg)：抗 FoxP3 抗体で同定した。免疫応答を抑制する T 細胞の一種である。

#### ・染色標本の評価方法と結果の解析

免疫染色で同定された各種細胞の出現数を、バーチャルスライドを用いた、標本の全範囲を画像解析する手法によって、腫瘍部・境界部・間質部に分けて、計測した (図 2)。得られた結果の統計学的解析により、免疫抑制・間質反応・血管新生・神経新生の 4 つの面から、腺癌と扁平上皮癌の癌微小環境の動態が明らかになる。具体的な解析手順は、免疫染色標本をバーチャルスライドスキャナ NanoZoomer (浜松ホトニクス、JPN) で読み込む 画像解析ソフトウェア Qupath (University of Edinburgh, UK) で、標本上のすべての腫瘍胞巣を取り囲み (アノテーション作成)、腫瘍部とする 陽性細胞を自動計測する アノテーションを拡大し、拡大した領域を境界部や間質部として陽性細胞を計測する の 4 ステップである。各免疫染色標本の解析で得られた、腫瘍部・境界部・間質部における単位面積あたりの細胞数を Welch's 検定によって統計学的に解析し、腺癌と扁平上皮癌における癌微小環境動態の特徴およびその異同を解析した。また、Bonferroni-Dunn 法等による多変量解析によって、各臨床病理学的項目から癌微小環境の動態を説明できる独立予後因子を検索した。

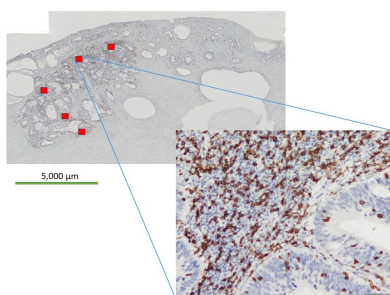


図 1. 浸潤性腺癌における CD4 陽性細胞の検出

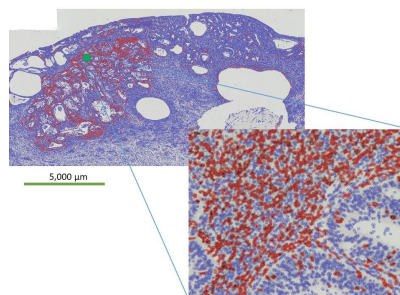


図 2. CD4 陽性細胞の自動計測画像

#### 4. 研究成果

##### ・ 腺癌は上皮内腺癌に比して免疫関連Tリンパ球の出現が抑制されている

腺癌と上皮内癌における単位腫瘍細胞あたりの各種 T リンパ球の出現数を比較した結果、CTL ( $p=0.0333$ ), Th1 ( $p=0.0081$ ), Th2 ( $p=0.0433$ ) の出現数は、上皮内癌に比して腺癌で有意な減少が認められた (図 4)。

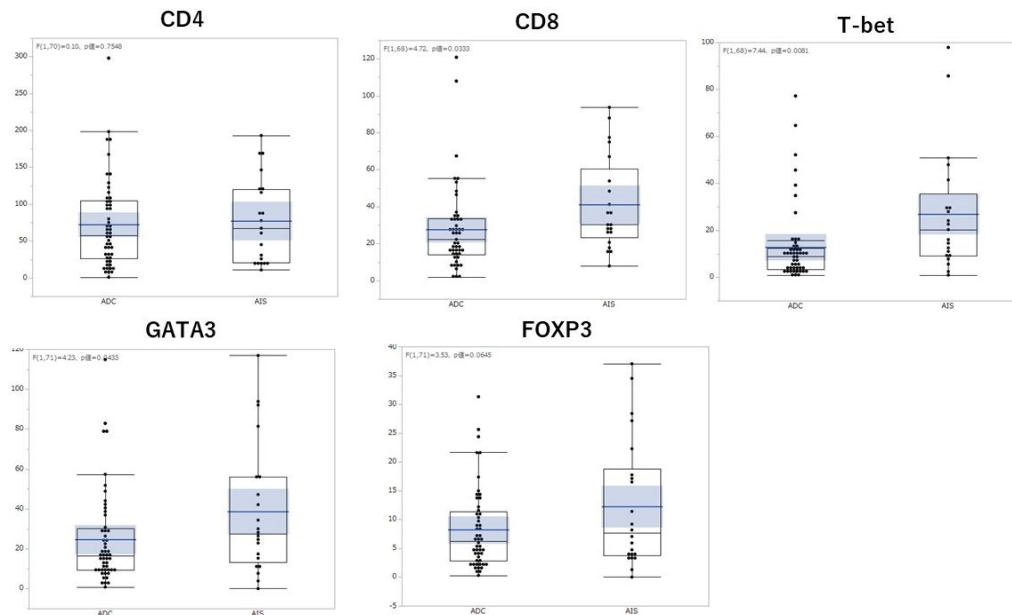


図 4 . 腺癌(ADC)と上皮内癌(AIS)における単位腫瘍細胞あたりの各種 T リンパ球出現数

##### ・ 腺癌は扁平上皮癌に比して強い Th1 抑制状態にある

腺癌と扁平上皮癌における単位腫瘍細胞あたりの各 T リンパ球の出現数を比較した結果、Th1 出現数は、扁平上皮癌に比して腺癌で有意な減少が認められた ( $p=0.0416$ ) (図 5)。

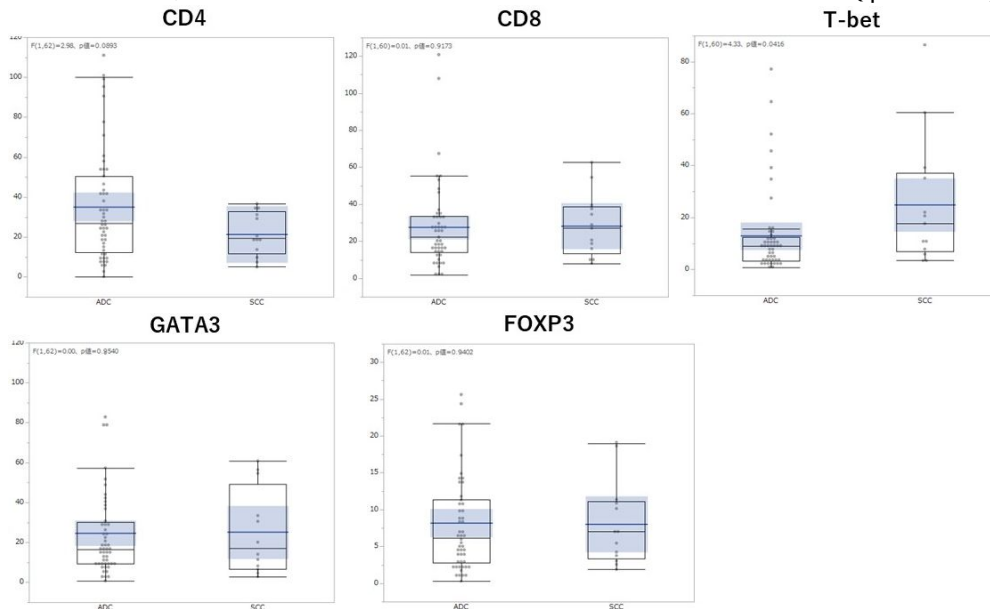


図 5 . 腺癌(ADC)と扁平上皮癌(SCC)における単位腫瘍細胞あたりの各種 T リンパ球出現数

##### ・ 腺癌は上皮内腺癌に比して、Treg 細胞による高い Th1 抑制状態にある

腺癌と上皮内癌における Th1/Th2 バランス (T-bet 出現数 / GATA3 出現数) および Th1/Th2 バランスに対する Treg 細胞との関連性 (T-bet 出現数 / FOXP3 出現数、GATA3 出現数 / GATA3 出現数) を比較した結果、腺癌は上皮内癌に比して、Treg 細胞による高い Th1 抑制状態にあることが認められた ( $p=0.0296$ ) (図 6)。

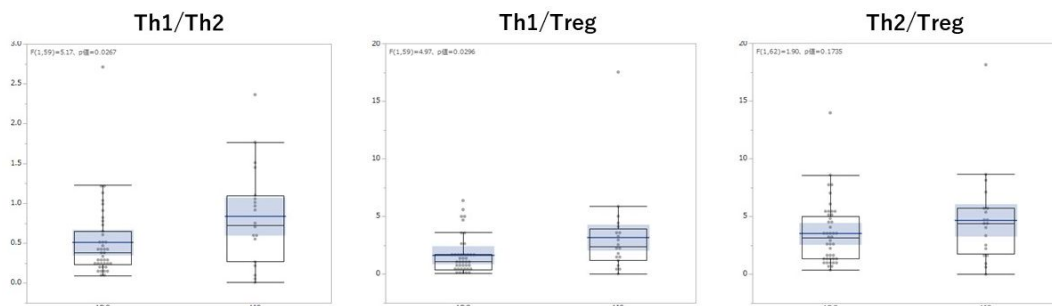


図 6 . 腺癌(ADC)と上皮内癌(AIS)における Th1/Th2 バランスと Treg 細胞の関連

**・ 腺癌は扁平上皮癌に比して、Treg 細胞による高い Th1 抑制状態にある**

腺癌と扁平上皮癌における Th1/Th2 バランス (T-bet 出現数 / GATA3 出現数) および Th1/Th2 バランスに対する Treg 細胞との関連性 (T-bet 出現数 / FOXP3 出現数、GATA3 出現数 / GATA3 出現数) を比較した結果、腺癌は扁平上皮癌に比して、Treg 細胞による高い Th1 抑制状態にあることが認められた (p=0.0374) (図 7)。

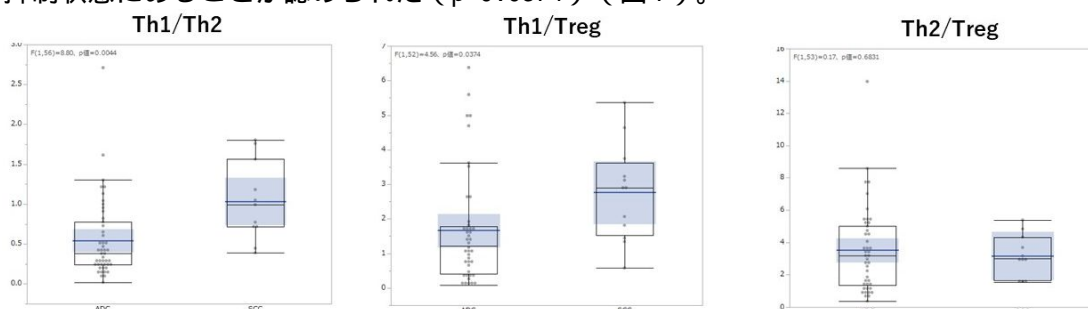


図 7 . 腺癌(ADC)と扁平上皮癌(SCC)における Th1/Th2 バランスと Treg 細胞の関連

**・ 考察**

固形腫瘍の微小環境中には、Th1 および Th2 サブセットが存在している。Th1 細胞は転写因子 T-bet によって制御されているのに対し、Th2 細胞分化は GATA3 によって制御されているが、CD4+ T ヘルパー-1 (Th1) 細胞は、腫瘍血管新生を抑制し、抗原提示細胞 (APC) および NK 細胞の動員を介する抗腫瘍特性を持ち、インターロイキン-2 (IL-2) やインターフェロン (IFN-) などのサイトカインを産生することによって CD8+細胞の機能をサポートしている。一方、Th2 細胞は殺腫瘍性好酸球を動員する IL-4 および IL-13 サイトカインを産生することによって抗腫瘍反応に寄与している。FOXP3 転写因子を発現する制御性 T 細胞 (Treg) は、免疫学的恒常性および自己寛容の維持に重要とされている (Balkwill. Lancet. 2001., Medzhitov. Nature. 2008, Coussens. Nature. 2002, Yang. Cell Death Differ. 2014)。Treg は他の T 細胞サブセットを阻害し、腫瘍進展を促進すると考えられている。Treg は、IL-10、TGF- $\beta$  の産生、および細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 (CTLA4) の関与を介して免疫反応を抑制することによって、CTL などの殺腫瘍細胞による抗原認識および腫瘍細胞のクリアランスを抑制すると言われている (Kim. Cancer Immunol Res. 2014, Anestakis. Int J Mol Sci. 2015)。本研究では、腺癌は扁平上皮癌と比べて、Th1 細胞抑制による細胞性免疫抑制機能が強い状態にあることが示されたことから、癌微小環境におけるリンパ球サブセット構成の違いが、腺癌と扁平上皮癌の腫瘍進展や臨床的予後の異同に関わっていることが示唆された。加えて、腺癌では扁平上皮癌よりも CD4 出現細胞数が有意に多いことから、Th17 のような Th1, Th2 以外の T 細胞サブセットについても検討する必要があると思われる。また、上皮内腺癌に比して腺癌でよりこの細胞性免疫抑制に関する T リンパ球の出現数が多かったことから、上皮内腺癌がより強い細胞性免疫抑制環境を構築しながら、浸潤性腺癌へと進展していく経路の存在が示された。本研究の結果により、細胞性免疫抑制のメカニズムが、腺癌治療の新たなターゲットとなることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	笠島 里美  (Ksashima Satomi)  (20444200)	金沢大学・保健学系・教授   (13301)	
研究分担者	中村 充宏  (Nakamura Mitsuhiro)  (50377397)	金沢大学・医学系・講師   (13301)	

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