

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：21601
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2021
課題番号：19K09151
研究課題名(和文) 大腸癌のゲノム・エピゲノム異常による短縮型癌関連糖鎖誘導と免疫抑制機構の解明

研究課題名(英文) Genetic and epigenetic regulation of cancer-associated glycan truncation in colorectal cancer

研究代表者
岡山 洋和 (Hirokazu, Okayama)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20583397
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌において、癌関連の短縮型糖鎖であるTn抗原が発現することが知られる。近年、Tn抗原のような腫瘍細胞表面の糖鎖は腫瘍微小環境において免疫抑制的なシグナルを誘導するとともに、それ自体が免疫チェックポイントとみなしうるということが示唆されている。当研究では、免疫組織学的検討により500例超の大腸癌・大腸腺腫を評価し、一部の大腸癌、特にdMMR大腸癌においてTn抗原強陽性症例の存在を確認した。dMMR大腸癌において、Tn抗原強陽性症例はCD8陽性T細胞浸潤が低く、PD-L1陽性率も低いことがわかった。このような腫瘍はTn抗原を標的とした治療の適応となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌、特にdMMR大腸癌において腫瘍免疫の抑制に重要な役割を果たすことが示唆されるTn抗原についてその臨床的意義を解明することは、大腸癌の進展や腫瘍免疫の生物学的機構を理解するために重要であり、または大腸癌治療の個別化にも寄与しうると考える。

研究成果の概要(英文)：Colorectal cancer (CRC) cells often express a tumor-associated truncated immature O-glycan, Tn antigen. It has recently been proposed that Tn antigen can also be considered a novel immune checkpoint that induces immunosuppressive signaling through glycan-binding lectins to lead effector T cell apoptosis. We here examined the expression of Tn antigen by immunohistochemistry in more than 500 CRCs and adenomas. We identified a small subset of CRCs displaying strong Tn antigen immunoreactivity that closely related to deficient MMR (dMMR). Moreover, Tn-Strong/dMMR tumors demonstrated low infiltration of CD8+ T cell and low levels of PD-L1 expression. Our finding suggests that the Tn-Strong-dMMR CRC may be treated with immunotherapeutic strategies targeting Tn antigen.

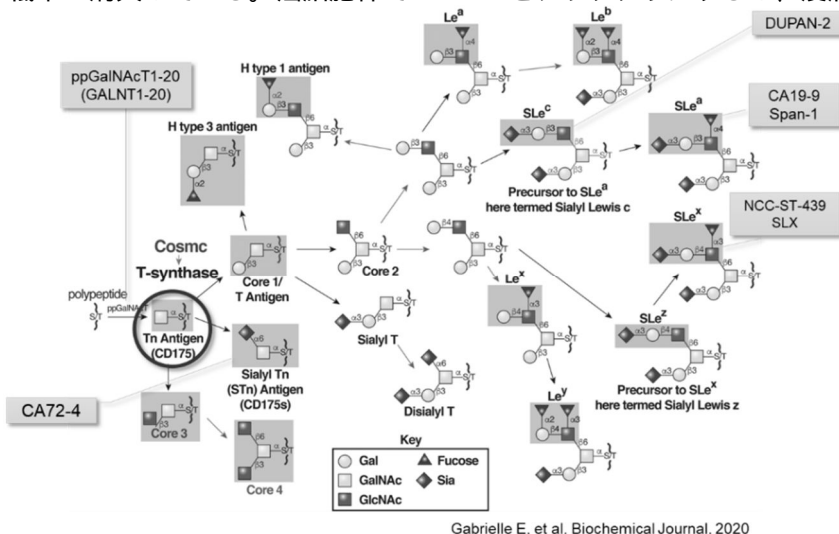
研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 糖鎖 Tn抗原

1. 研究開始当初の背景

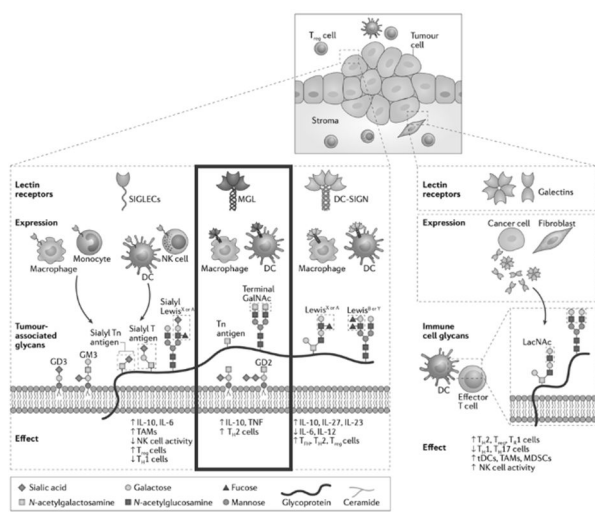
癌細胞表面には特徴的な糖鎖修飾が生じている。現在臨床現場で使用されている血清腫瘍マーカーの多くは癌特異的な糖鎖抗原である (CA19-9、NCC-ST-439、CA15-3、CA72-4 など)。これらは細胞機能の点からも重要であり、例えばシアリルルイス A (CA19-9) は、細胞間接着を介して転移を促進するとされ、血清 CA19-9 値は肝転移や予後不良と関連することが知られる。しかしながら、一つの糖鎖が単一の遺伝子にコードされるわけではなく、多数の糖鎖関連遺伝子がコードする酵素群により糖鎖の生合成が調節され、さらに細胞表面のタンパク質などのキャリア上で多彩な分枝構造をとるため、その配列や制御機構の解析は至難である。この複雑さが糖鎖研究の大きな壁であり、糖鎖研究はいまだ大きな可能性を秘めた分野とも言える。

発癌早期に糖転移酵素遺伝子がメチル化などでエピジェネティックに発現抑制されることで、正常型の糖鎖修飾が起こらず、短縮型 (truncated) の癌関連糖鎖が細胞表面に発現する。これは incomplete synthesis (糖鎖不全現象) と呼ばれる。当研究者らは近年、大腸癌のマルチオミクス解析から、糖転移酵素 pp-GalNAcT-6 をコードする遺伝子 GALNT6 のサイレンシングその臨床的意義、細胞機能への役割、incomplete synthesis を介した短縮型 (truncated) 癌関連 Tn 抗原高発現を報告した (Noda M, Okayama H et al. Clin Cancer Res 2018)。Tn 抗原は、最も単純化された O 型糖鎖の母核構造であり、癌細胞表面に露出するが、正常細胞では糖鎖修飾によりマスクされている。当研究者らの報告は次のような重要な知見を含んでいる。GALNT6 は、ミスマッチ修復欠損・マイクロサテライト不安定性 (dMMR/MSI-H) を示す大腸癌組織および癌細胞株で発現低下している。GALNT6 は正常粘膜に発現せず、腺腫で高発現し、メチル化により発現低下・消失している。癌細胞株で GALNT6 をノックダウンすると、浸潤・遊走能、5FU 抵抗性が誘導され、細胞表面の Tn 抗原が発現亢進する。脱メチル化処理により、GALNT6 が誘導され Tn 抗原発現が低下する。しかしながら Tn 抗原の制御は多彩な GALNT ファミリーに加え、Tn 抗原の伸長・修飾に関わる酵素の分子シャペロンである Cosmc の不活化 (主として変異とメチル化などによる) の影響があり、詳細な調節異常の機序は不明である。



Gabrielle E, et al. Biochemical Journal. 2020

近年、免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) の登場を契機として、腫瘍免疫を軸とした癌治療の变革が起きているといってもよい状況である。大腸癌領域では、dMMR/MSI-H 腫瘍は高い免疫原性・免疫細胞浸潤と同時に免疫チェックポイント分子高発現と免疫逃避を示すこと、ICI が有効であることが明らかにされた (NEJM 2015, Lancet Oncol 2017)。



Rodríguez E, et al. Nat Rev Immunol. 2018

Tn 抗原は腫瘍微小環境において、樹状細胞・マクロファージ上のレクチン MGL に認識され、腫瘍免疫抑制性のシグナルを誘導することが示唆されている (Nat Immunol 2006, Oncotarget 2015)。また Tn 抗原は Th1 細胞応答を抑制し、T 細胞の IL17 産生を誘導し、腫瘍細胞の免疫逃避に関連する (J Biol Chem 2011)。このような種々の知見の集積から、Tn 抗原を含む腫瘍細胞上の異常糖鎖は、"glyco-code" として新規の免疫チェックポイント分子とみなすことができ、治療標的となり得ることが示唆

されている。脱メチル化処理により、GALNT6 が誘導され Tn 抗原発現が低下する。しかしながら Tn 抗原の制御は多彩な GALNT ファミリーに加え、Tn 抗原の伸長・修飾に関わる酵素の分子シャペロンである Cosmc の不活化 (主として変異とメチル化などによる) の影響があり、詳細な調節異常の機序は不明である。

Tn 抗原は腫瘍微小環境において、樹状細胞・マクロファージ上のレクチン MGL に認識され、腫瘍免疫抑制性のシグナルを誘導することが示唆されている (Nat Immunol 2006, Oncotarget 2015)。また Tn 抗原は Th1 細胞応答を抑制し、T 細胞の IL17 産生を誘導し、腫瘍細胞の免疫逃避に関連する (J Biol Chem 2011)。このような種々の知見の集積から、Tn 抗原を含む腫瘍細胞上の異常糖鎖は、"glyco-code" として新規の免疫チェックポイント分子とみなすことができ、治療標的となり得ることが示唆

されるようになった (Nat Rev Immunol 2018, Semin Immunol 2020)。

2. 研究の目的

本研究では Tn 抗原を軸として、GALNT ファミリーのゲノム・エピゲノム異常を介した Tn 抗原誘導機構の解明、Tn 抗原と dMMR/MSI-H サブタイプ、免疫学的微小環境 (免疫細胞浸潤、免疫逃避) との関連、バイオマーカーとしての Tn 抗原、dMMR/MSI-H 大腸癌における抗 Tn 複合免疫療法の可能性、などに着目する。

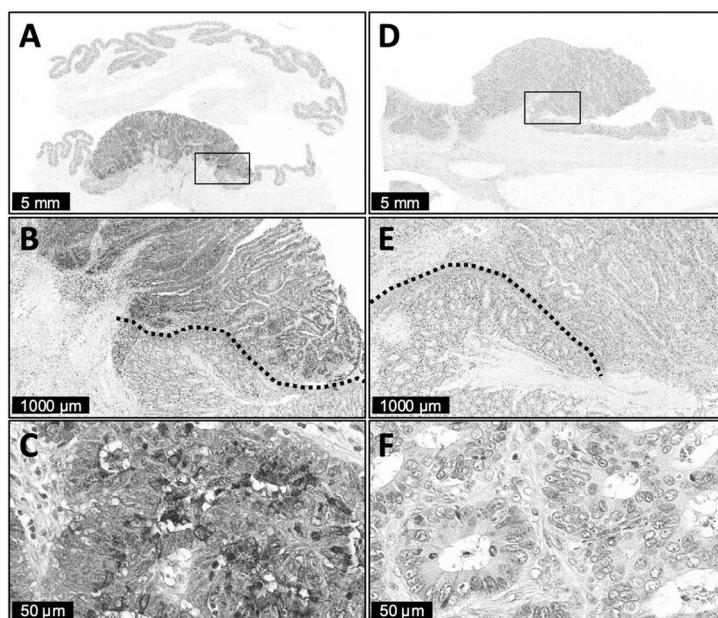
3. 研究の方法

本研究では下記のような方法を用いる (詳細は研究成果の欄に述べる)。

- ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) を用いた免疫組織学的検討
- 臨床病理学的情報、dMMR/MSI-H、免疫チェックポイント分子 (PD-L1)、免疫細胞浸潤 (CD4、CD8) の検討
- 各種統計学的解析
- 大腸癌細胞株を用いた細胞表面糖鎖の検討 (免疫染色、フローサイトメトリー)
- 各種機能的検討 (in vitro)

4. 研究成果

(1) 大腸粘膜、大腸腺腫、大腸癌における Tn 抗原発現



500 例を超える大腸癌切除 FFPE 組織を用いて、免疫染色により Tn 抗原発現を評価した。

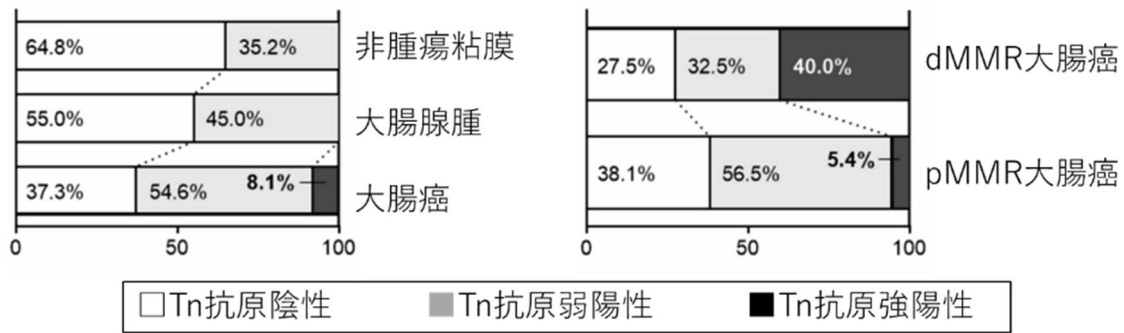
Tn 抗原はこれまで知られてきた通り、多くの大腸癌組織において癌細胞の細胞膜、細胞質に染色され、非腫瘍粘膜における上皮細胞や腺腫においても一定の染色が見られた。

一方、一部の大腸癌組織では、著しく Tn 抗原を高発現する症例 (Tn 抗原強陽性) があった。大腸癌の約 8% が Tn 抗原強陽性であったが、非腫瘍粘膜や腺腫ではそのような染色性を示す症例はなかった。

(2) 臨床病理学的因子や既存のバイオマーカーとの関連

Tn 抗原強陽性は、年齢、性別、脈管侵襲、リンパ節転移、遠隔転移、ステージといった臨床病理学的因子とは有意な関連はなかったが、腫瘍の主座 (右側結腸) 分化度 (低分化) な腫瘍、粘液癌などと有意に関連していた。PD-L1 発現や CD4・CD8 陽性 T 細胞浸潤との有意な関連は診

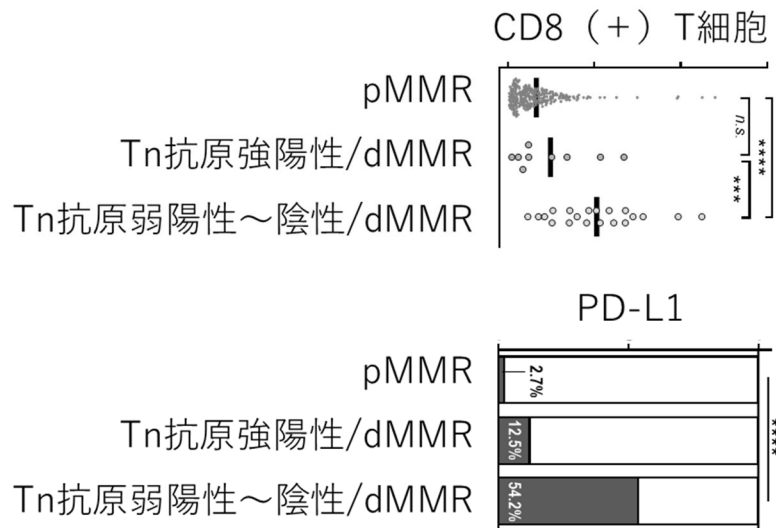
られなかった。一方、Tn 抗原強陽性はミスマッチ修復欠損と強く関連しており ($P < 0.0001$), dMMR 症例は約半数が Tn 抗原強陽性であった。



(3) dMMR 大腸癌における Tn 抗原

dMMR 大腸癌における Tn 抗原強陽性の意義を検討した。dMMR 大腸癌において、Tn 抗原強陽性は、年齢、性別、腫瘍の主座、分化度、組織型、TNM 因子、ステージなど、いずれの臨床病理学的因子においても有意な関連を認めなかった。

一方、Tn 抗原強陽性症例では、弱陽性～陰性症例と比較して、有意に CD8 陽性 T 細胞浸潤が低く、腫瘍細胞の PD-L1 陽性率も低いことがわかった。



(4) 大腸癌における Tn 抗原の制御機構

以前の当研究者の研究 (Clin Cancer Res 2018) から、GALNT6 のメチル化による発現抑制が Tn 抗原高発現を誘導することが示唆されていた。本研究において、免疫染色を用いて、Tn 抗原と GALNT6 発現を評価したが、両者の発現に一定の傾向はみられず、明確な結論には至らなかった。癌において、他の GALNT ファミリー発現異常・サイレンシングや Cosmc 遺伝子変異などの複数の因子が協調的ないし競合的に Tn 抗原を制御しているためと考えられる。

同様に、Tn 抗原発現の制御機構および Tn 抗原の腫瘍免疫における機能的意義について in vitro での検討を試みたが、効果的にこれらを検証できるような実験系を確立するに至らなかった。今後の課題となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsumoto Takuro, Okayama Hirokazu, Nakajima Shotaro, Saito Katsuharu, Nakano Hiroshi, Endo Eisei, Kase Koji, Ito Misato, Yamauchi Naoto, Yamada Leo, Kanke Yasuyuki, Onozawa Hisashi, Fujita Shotaro, Sakamoto Wataru, Saito Motonobu, Saze Zenichiro, Momma Tomoyuki, Mimura Kosaku, Kono Koji	4. 巻 21
2. 論文標題 Tn Antigen Expression Defines an Immune Cold Subset of Mismatch-Repair Deficient Colorectal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9081 ~ 9081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21239081	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 Endo Eisei, Okayama Hirokazu, Saito Katsuharu, Nakajima Shotaro, Yamada Leo, Ujiie Daisuke, Kase Koji, Fujita Shotaro, Endo Hisahito, Sakamoto Wataru, Saito Motonobu, Saze Zenichiro, Momma Tomoyuki, Ohki Shinji, Mimura Kosaku, Kono Koji	4. 巻 18
2. 論文標題 A TGF β -Dependent Stromal Subset Underlies Immune Checkpoint Inhibitor Efficacy in DNA Mismatch Repair-Deficient/Microsatellite Instability-High Colorectal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1402 ~ 1413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-20-0308	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Ujiie Daisuke, Okayama Hirokazu, Saito Katsuharu, Ashizawa Mai, Thar Min Aung Kyi, Endo Eisei, Kase Koji, Yamada Leo, Kikuchi Tomohiro, Hanayama Hiroyuki, Fujita Shotaro, Sakamoto Wataru, Endo Hisahito, Saito Motonobu, Mimura Kosaku, Saze Zenichiro, Momma Tomoyuki, Ohki Shinji, Kono Koji	4. 巻 41
2. 論文標題 KRT17 as a prognostic biomarker for stage II colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 591 ~ 599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgz192	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Ashizawa Mai, Okayama Hirokazu, Ishigame Teruhide, Thar Min Aung Kyi, Saito Katsuharu, Ujiie Daisuke, Murakami Yuko, Kikuchi Tomohiro, Nakayama Yuko, Noda Masaru, Tada Takeshi, Endo Hisahito, Fujita Shotaro, Sakamoto Wataru, Saito Motonobu, Saze Zenichiro, Momma Tomoyuki, Ohki Shinji, Mimura Kosaku, Kono Koji	4. 巻 17
2. 論文標題 microRNA-148a-3p regulates immunosuppression in DNA mismatch repair-deficient colorectal cancer by targeting PD-L1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1403-1413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-18-0831	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kikuchi Tomohiro, Mimura Kosaku, Okayama Hirokazu, Nakayama Yuko, Saito Katsuharu, Yamada Leo, Endo Eisei, Sakamoto Wataru, Fujita Shotaro, Endo Hisahito, Saito Motonobu, Momma Tomoyuki, Saze Zenichiro, Ohki Shinji, Kono Koji	4. 巻 18
2. 論文標題 A subset of patients with MSS/MSI-low colorectal cancer showed increased CD8(+) TILs together with up-regulated IFN-	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 5977-5985
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2019.10953	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 NEUPANE PRAJWAL, MIMURA KOSAKU, NAKAJIMA SHOTARO, OKAYAMA HIROKAZU, ITO MISATO, THAR MIN AUNG KYI, SAITO KATSUHARU, ONOZAWA HISASHI, FUJITA SHOTARO, SAKAMOTO WATARU, SAITO MOTONOBU, SAZE ZENICHIRO, MOMMA TOMOYUKI, KONO KOJI	4. 巻 41
2. 論文標題 The Expression of Immune Checkpoint Receptors and Ligands in the Colorectal Cancer Tumor Microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4895 ~ 4905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.15303	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Momma Tomoyuki, Okayama Hirokazu, Kanke Yasuyuki, Fukai Satoshi, Onozawa Hisashi, Fujita Shotaro, Sakamoto Wataru, Saito Motonobu, Ohki Shinji, Kono Koji	4. 巻 13
2. 論文標題 Validation of Gene Expression-Based Predictive Biomarkers for Response to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Locally Advanced Rectal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4642 ~ 4642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13184642	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 Ujiie Daisuke, Okayama Hirokazu, Kono Koji	4. 巻 13
2. 論文標題 The role of KRT17 in colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aging	6. 最初と最後の頁 19950 ~ 19951
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/aging.203471	査読の有無 無
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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松本拓朗, 岡山洋和, 加瀬晃志, 仲野宏, 遠藤英成, 伊藤美郷, 山田玲央, 小野澤寿志, 藤田正太郎, 坂本渉, 齋藤元伸, 三村耕作, 佐瀬善一郎, 門馬智之, 河野浩二.
2. 発表標題 大腸癌におけるTn 抗原の発現
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡山洋和, 遠藤英成, 加瀬晃志, 仲野宏, 山内直人, 松本拓朗, 佐瀬善一郎, 門馬智之, 大木進司, 河野浩二.
2. 発表標題 Novel mechanisms of immune suppression in colorectal cancer
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本拓朗, 岡山洋和, 仲野宏, 遠藤英成, 山田玲央, 中嶋正太郎, 齋藤元伸, 佐瀬善一郎, 門馬智之, 三村耕作, 河野浩二
2. 発表標題 dMMR大腸癌におけるTn抗原の発現
3. 学会等名 第33回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 氏家大輔, 岡山洋和, 多田武志, 花山寛之, 渡辺洋平, 坂本渉, 遠藤久仁, 藤田正太郎, 権田憲士, 齋藤元伸, 門馬智之, 佐瀬善一郎, 三村耕作, 大木進司, 柴田昌彦, 河野浩二
2. 発表標題 Stage II 大腸癌における根治切除後再発予測バイオマーカーの同定
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加瀬晃志, 氏家大輔, 佐藤孝洋, 遠藤英成, 千田峻, 菊池智宏, 楡井東, 多田武志, 花山寛之, 渡辺洋平, 岡山洋和, 坂本渉, 遠藤久仁, 藤田正太郎, 齋藤元伸, 権田憲士, 佐瀬善一郎, 門馬智之, 三村耕作, 大木進司, 河野浩二
2. 発表標題 stage II 大腸癌における脈管侵襲とミスマッチ修復タンパク欠損の意義
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東孝泰, 菊池智宏, 三村耕作, 佐藤孝洋, 岡山洋和, 遠藤久仁, 坂本渉, 藤田正太郎, 門馬智之, 佐瀬善一郎, 河野浩二
2. 発表標題 大腸癌における腫瘍浸潤マクロファージ (TAM) の検討
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okayama H, Endo E, Ujiie D, Kikuchi T, Saito M, Saze Z, Momma T, Mimura K, Ohki S, Kono K
2. 発表標題 Multi-omics approaches towards precision medicine in colorectal cancer
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 氏家大輔, 岡山洋和, 遠藤英成, 山田玲央, 坂本渉, 藤田正太郎, 遠藤久仁, 齋藤元伸, 門馬智之, 佐瀬善一郎, 大木進司, 河野浩二
2. 発表標題 Stage II 大腸癌における再発予後予測因子としてのKRT17
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山裕也, 菊池智宏, 三村耕作, 岡山洋和, 藤田正太郎, 遠藤久仁, 坂本渉, 齋藤元伸, 門馬智之, 大木進司, 河野浩二
2. 発表標題 dMMR/MSI-high大腸癌患者におけるCD4, CD8T細胞の腫瘍への浸潤度
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 COLON CANCER PROGNOSIS BIOMARKER	発明者 Ujiie D, Okayama H, Kono K	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、WO/2020/162523	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 特願2019-021987	発明者 氏家大輔, 岡山洋 和, 河野浩二	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-021987	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------