

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09180

研究課題名（和文）大腸癌間質トランスクリプトミクスを応用した個別的微小環境戦略の確立

研究課題名（英文）The tumor microenvironment in colorectal cancer

研究代表者

大木 進司 (Ohki, Shinji)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：20381361

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）：本研究では間質特異的かつTGFβ反応性の遺伝子セットを用いて遺伝子発現シグネチャーを作成し、大腸癌におけるTGFβ依存的な間質活性化を評価した。マイクロアレイ、RNAシーケンス、免疫染色などにより、複数の大腸癌コホートを解析した。マイクロサテライト不安定性（MSI）を示す大腸癌において、TGFβにより活性化した間質を伴うサブグループを同定した。このサブグループは、血管新生、腫瘍促進的マクロファージの浸潤、不良な予後などにより特徴づけることができた。一方でMSI大腸癌において、間質活性化の有無と遺伝子変異、T細胞浸潤、免疫チェックポイント遺伝子発現との明確な関連は指摘できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、特にマイクロサテライト不安定性を示す大腸癌において、間質TGFβの意義について報告した。将来的な大腸癌治療の個別化の礎として寄与し得ると考える。

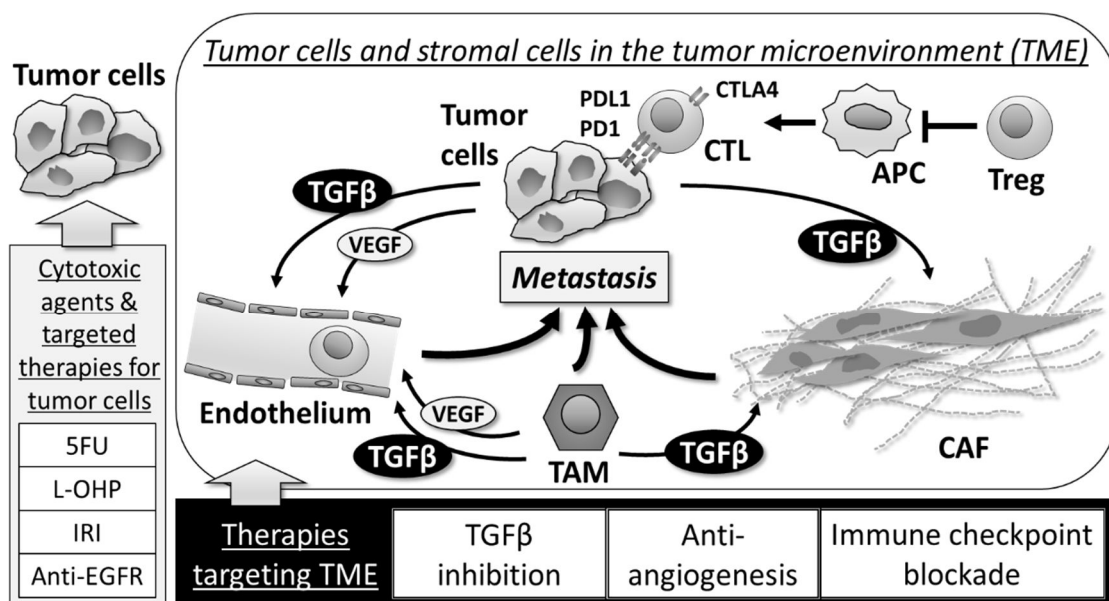
研究成果の概要（英文）：In the present study, we developed a transcriptional signature on the basis of stroma-specific, TGFβ-responsive genes to estimate the levels of TGFβ-dependent stromal activation in colorectal cancer (CRC). Using multiple cohorts of CRC analyzed on several platforms, including microarray, RNA-sequence and immunohistochemistry, we identified a subgroup of CRC exhibiting TGFβ-activated stroma and microsatellite instability (MSI). We demonstrated that this subgroup was characterized by angiogenesis, infiltration of tumor-promoting macrophages and poor survival outcomes. However, no significant difference was found between MSI CRC with and without stromal activation in terms of oncogene mutations, tumor mutation burden, immune checkpoint expression or T cell infiltration.

研究分野：消化器癌

キーワード：大腸癌 腫瘍微小環境

1. 研究開始当初の背景

近年の大腸癌トランスクリプトームデータ集積により、癌間質を軸として大腸癌パラダイムに変化が生じている。転写レベルで予後不良サブタイプを規定するのは、腫瘍細胞ではなく、腫瘍微小環境 (tumor microenvironment : TME) に由来する遺伝子発現であり、その主役を担うのが癌関連線維芽細胞 : Cancer-associated fibroblast (CAF) である (Nat Genet 2015)。一方、我々は、CAF および腫瘍血管内皮細胞に高発現し術後再発と関連する間質特異的遺伝子を同定した (Carcinogenesis 2016)。さらに近年、大腸癌サブタイピングコンソーシアムにより、大腸癌分類システム (CMS) が提唱された (Nat Med 2015)。これらの報告において一貫して示された知見は、TGFシグナル依存的な間質細胞活性化に伴う癌進展の促進であり、この間質機構が臨床的に高悪性度・予後不良群と一致することである。発癌後期に癌細胞では SMAD 遺伝子異常等により TGFシグナル系が不活化される一方、TGFは間質のみで腫瘍促進的かつ免疫抑制的に働くと考えられている。これら間質の重要性は、既存の抗癌剤や分子標的薬を用いた対「腫瘍細胞」戦略の限界を示唆しており、我々は、癌間質の分子メカニズムに基づいた対「微小環境」戦略の確立が今後の癌治療において最重要課題のひとつであると考えられる。



近年の PD1-PDL1 シグナルに対する免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) の登場は大腸癌領域にも大きなブレイクスルーをもたらした。同薬剤はマイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability : MSI) を示す症例においてのみ、極めて高い効果と長期奏功が得られるがマイクロサテライト安定 (MSS) 大腸癌にはほぼ無効である (NEJM 2015, Lancet Oncol 2017)。ゲノム異常に基づいた個別化免疫療法時代の幕開けとも言えるが、同時に解決すべき点も明瞭化してきた。MSI 症例に等しく ICI が有効というわけではないこと、過去に言われていた PD-L1 発現は効果予測マーカーとしては極めて限定的であること、異なる作用機序の ICI 同士や分子標的薬の併用により治療効果の上乗せがかなり期待できること、などである。以上から本研究は、腫瘍微小環境に基づく MSI 症例のさらなる層別化と、ICI 併用療法による個別化免疫療法の可能性に迫るものである。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下である。

腫瘍微小環境プロファイルに基づく大腸癌サブタイプの確立

ゲノム異常、特に MSI との関連

- その臨床的意義の解明
- その機能的意義の解明
- バイオマーカーへの応用の可能性
- 特異的治療への展開

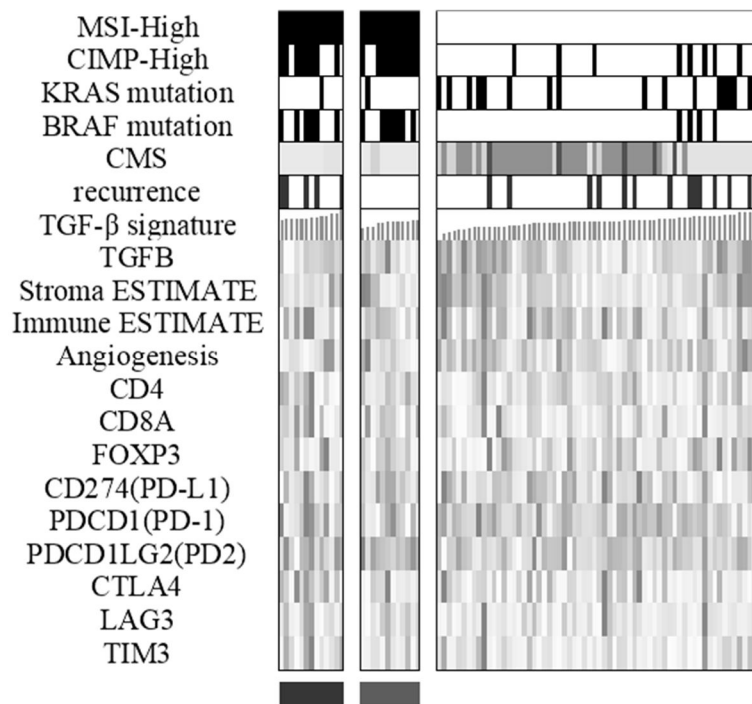
### 3. 研究の方法

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）切片を用いた免疫組織学的検討
- 臨床病理学的情報、MSS、MSI、免疫細胞浸潤（CD4、CD8）の検討
- マルチオミクスデータ解析（マイクロアレイ、RNA シークエンスなど）
- 各種統計解析
- 各種機能的検討（in vitro）

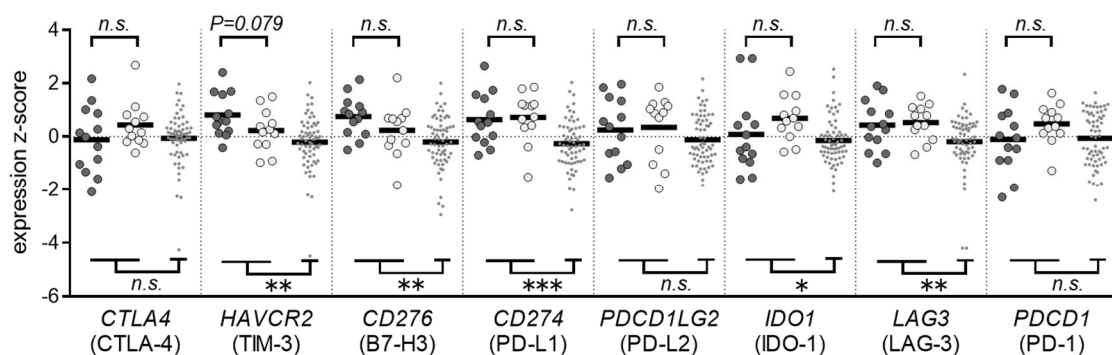
### 4. 研究成果

我々の過去の報告において、TGF $\beta$  に応答し間質細胞で誘導される遺伝子群を抽出しており（Carcinogenesis 2016）それらを用いて遺伝子発現 signature を作成し、大腸癌の網羅的遺伝子発現データを使用した。当 signature と同時にゲノム、エピゲノム異常（MSI、メチル化形質、KRAS・BRAF 変異など）、臨床情報（再発など）、免疫学的プロファイル（CD8 や免疫チェックポイントなど）を解析した（下図）。

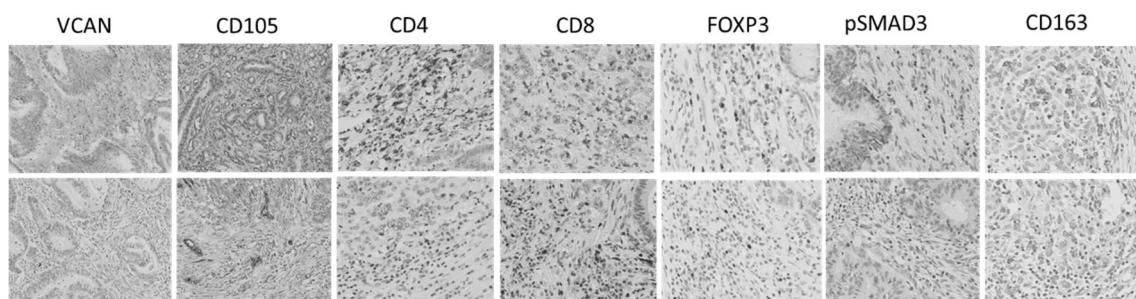


当 signature により、MSI 大腸癌を亜分類することができた。TGF $\beta$  依存的な間質活性化を示す群とそうでない群である。前者と後者を比較すると、T 細胞浸潤や変異個数、ドライバー変異の頻度などについては統計学的に有意な差はなく、次ページ図に示すように免疫チェックポイント遺伝子発現についても明らかな差はなかった。一方で、前者は血管新生や腫瘍促進的な腫瘍関連マクロファージ浸潤などにより特徴づけられるとともに、臨床的には特に予後不良である可能性が示された。

また同様の解析を複数の大腸癌コホートについて行い、再現性の高い結果を得ることができた。



大腸癌組織を用いて免疫染色を行った（下図）。TGF $\beta$  によって CAF に誘導される VCAN タンパクを高発現する MSI 症例は、血管新生が豊富であり、予後不良であった。一方で免疫細胞浸潤については明瞭な結果が得られなかった。



上述のような、新規の知見を得ることができた一方で、本研究においてはいくつかの limitation があった。

特に、大腸癌細胞株を用いた実験では、機能的意義の解明に至ることはできなかった。またバイオマーカーとしての利用という点でもどのようなプラットフォームでどのように判定するかなどいまだ大きな壁がある状況である。

しかしながら、本研究課題は、当研究室における次のテーマへ発展的につなげることができつつある。本研究課題の経験を活かし、新規の網羅的アプローチや、特定の免疫チェックポイント分子への着目、in vitro での実験系の組み合わせにより、それら遺伝子の臨床的意義、機能的意義、腫瘍免疫との関連について、検討を行っているところである。

## 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 0件）

1. 著者名 Kaneta Akinao, Nakajima Shotaro, Okayama Hirokazu, Matsumoto Takuro, Saito Katsuharu, Kikuchi Tomohiro, Endo Eisei, Ito Misato, Mimura Kosaku, Kanke Yasuyuki, Saito Motonobu, Saze Zenichiro, Fujita Shotaro, Sakamoto Wataru, Onozawa Hisashi, Momma Tomoyuki, Ohki Shinji, Kono Koji	4. 巻
2. 論文標題 Role of the cGAS-STING pathway in regulating the tumor-immune microenvironment in dMMR/MSI colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-022-03200-w	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 Min Aung Kyi Thar, Mimura Kosaku, Nakajima Shotaro, Okayama Hirokazu, Saito Katsuharu, Sakamoto Wataru, Fujita Shotaro, Endo Hisahito, Saito Motonobu, Saze Zenichiro, Momma Tomoyuki, Ohki Shinji, Kono Koji	4. 巻 70
2. 論文標題 Therapeutic potential of anti-VEGF receptor 2 therapy targeting for M2-tumor-associated macrophages in colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 289 ~ 298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-020-02676-8	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 大木 進司, 岡山 洋和, 千田 峻, 坂本 渉, 藤田 正太郎, 齋藤 元伸, 門馬 智之, 佐瀬 善一郎, 河野 浩二	4. 巻 48
2. 論文標題 High Risk Stage II大腸癌におけるGlasgow Prognostic Scoreの意義と治療戦略	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 癌と化学療法	6. 最初と最後の頁 1770-1773
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 -

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- $\beta$ -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 Kikuchi Tomohiro, Mimura Kosaku, Ashizawa Mai, Okayama Hirokazu, Endo Eisei, Saito Katsuharu, Sakamoto Wataru, Fujita Shotaro, Endo Hisahito, Saito Motonobu, Momma Tomoyuki, Saze Zenichiro, Ohki Shinji, Shimada Kazunori, Yoshimura Kiyoshi, Tsunoda Takuya, Kono Koji	4. 巻 69
2. 論文標題 Characterization of tumor-infiltrating immune cells in relation to microbiota in colorectal cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 23 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-019-02433-6	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 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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大木進司, 千田峻, 岡山洋和, 小野澤寿志, 坂本渉, 藤田正太郎, 齋藤元伸, 門馬智之, 佐瀬善一郎, 三村耕作, 河野浩二
2. 発表標題 High risk stage 大腸癌におけるGlasgow prognostic scoreの意義と治療戦略
3. 学会等名 第43回日本癌局所療法研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三村耕作, 菊池智宏, 岡山洋和, 藤田正太郎, 坂本渉, 齋藤元伸, 門馬智之, 佐瀬善一郎, 吉村清, 角田卓也, 河野浩二.
2. 発表標題 大腸癌腫瘍微小環境における腸内細菌叢に伴う免疫抑制について
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近内政美, 中嶋正太郎, 菅家康之, 花山寛之, 渡辺洋平, 小野澤寿志, 早瀬傑, 岡山洋和, 坂本渉, 藤田正太郎, 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 大腸癌腫瘍微小環境における腫瘍関連マクロファージの浸潤傾向について
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遠藤英成, 岡山洋和, 加瀬晃志, 山内直人, 山田玲央, 氏家大輔, 坂本渉, 藤田正太郎, 遠藤久仁, 齋藤元伸, 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 dMMR 大腸癌再発例における癌微小環境の特徴
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤英成, 岡山洋和, 加瀬晃志, 山田玲央, 氏家大輔, 藤田正太郎, 坂本渉, 遠藤久仁, 齋藤元伸, 佐瀬善一郎, 門馬智之, 大木進司, 三村耕作, 河野浩二.
2. 発表標題 dMMR大腸癌におけるTGF- $\beta$ 活性型腫瘍微小環境の同定
3. 学会等名 第26回日本遺伝性腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遠藤英成, 岡山洋和, 加瀬晃志, 山田玲央, 氏家大輔, 藤田正太郎, 坂本渉, 遠藤久仁, 齋藤元伸, 佐瀬善一郎, 門馬智之, 大木進司, 三村耕作, 河野浩二.
2. 発表標題 dMMR/MSI-H大腸癌におけるTGF- $\beta$ 活性型腫瘍微小環境の同定
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 大木進司, 小野澤寿志, 岡山洋和, 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, 河野浩二.
2. 発表標題 Stage II 大腸癌の再発予後予測因子としての複合炎症栄養マーカーの有用性に関する検討
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 遠藤英成, 岡山洋和, 佐藤孝洋, 菊池智宏, 青砥慶太, 多田武志, 渡辺洋平, 花山寛之, 坂本渉, 藤田正太郎, 遠藤久仁, 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 大腸癌間質に基づく個別化治療の可能性
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 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, 齋藤元伸, 門馬智之, 大木進司, 河野浩二
2. 発表標題 大腸癌におけるMSI status と, PD-L1発現およびCD8 陽性細胞浸潤数の関連
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 大木進司, 千田俊, 岡山和洋, 藤田正太郎, 坂本渉, 遠藤久仁, 齋藤元伸, 門馬智之, 佐瀬善一郎, 河野浩二
2. 発表標題 Stage II, III大腸癌に対する複合バイオマーカーを用いた新規予後予測スコアの開発
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 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57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松石彬, 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 大腸癌における腫瘍関連マクロファージの分布
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 遠藤英成, 加瀬晃志, 仲野宏, 山田玲央, 氏家大輔, 遠藤久仁, 藤田正太郎, 坂本渉, 齋藤元伸, 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 大腸癌における腫瘍血管新生の評価
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

〔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	岡山 洋和  (Okayama Hirokazu)  (20583397)	福島県立医科大学・医学部・講師   (21601)	
研究分担者	遠藤 英成  (Endo Eisei)  (80836271)	福島県立医科大学・医学部・博士研究員   (21601)	

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
---------	---------