

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16840

研究課題名（和文）通常型膵癌に腫瘍浸潤T細胞を増加させる新規免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of new immunotherapy to increase tumor infiltrating T cells in conventional pancreatic cancer

研究代表者

加藤 真吾（KATO, Shingo）

横浜市立大学・附属病院・講師

研究者番号：20622583

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、遺伝子変異の少ない通常型の膵癌に対し、有効ながん免疫療法の開発を目指した。研究期間内に、マウス膵癌オルガノイドのセクレトーム解析から、膵癌細胞オルガノイドで有意に分泌が増加するケモカインを同定した。更に、膵癌モデルマウスを用いた解析で、このケモカインのシグナル伝達系から、治療標的となり得る腫瘍免疫関連遺伝子を同定した。この遺伝子のノックアウトマウスでは、野生型のマウスを宿主とした場合に比較して、膵癌の増大が有意に抑制された。今後は、体外からこの遺伝子の機能を抑制する物質を投与し、膵癌の治療薬として応用可能か検討する方針である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治癌である膵癌の新たな治療法開発の糸口となる所見を得た。腫瘍免疫療法は、原発臓器に関係なく効果が期待できる治療法である。しかし、膵癌においては治療効果が低いという臨床試験の結果があり、現状では使用されていない。今回の研究で、膵癌に効果的な免疫療法の経路の一つを明らかにした。今後は、この経路を標的とした薬剤の開発を行い、臨床応用を目指すこととした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop an effective cancer immunotherapy for conventional pancreatic cancer with few genetic mutations. Within the research period, we identified a chemokine whose secretion is significantly increased in pancreatic cancer cell organoids from secretome analysis of mouse pancreatic cancer organoids. Furthermore, using a mouse model of pancreatic cancer, we identified a tumor immunity-related gene from the signal transduction system of this chemokine that could be a therapeutic target. The growth of pancreatic cancer was significantly suppressed in knockout mice of this gene compared to wild-type mice as a host. In the future, we plan to examine the possibility of applying this gene as a therapeutic agent for pancreatic cancer by administering a substance that inhibits the function of this gene from outside the body.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：膵癌 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤 (Immune Checkpoint Inhibitor; ICI) は、様々ながん種に適応が拡大されているが、難治がんである膵癌では、複数の第一相、第二相臨床試験で腫瘍縮小効果が認められていない (Hilmi M et al. World J Gastroenterol. 2018;24:2137-51.)。ICI は、過剰な免疫反応を抑制する内在性の機構を阻害し、腫瘍特異的細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte; CTL) の機能を増強する。このため、ICI が高い抗腫瘍能を発揮するためには、投与された時点で多くの腫瘍特異的 CTL が腫瘍局所に存在する必要がある。しかし、ほとんどの膵癌では腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor infiltrating lymphocyte; TIL) が極めて少なく、ICI が十分に作用出来ないと考えられている (Hegde PS, et al. Clin Cancer Res 2016;22:1865-74)。

一方で、膵癌全体の約 2% と推定されているマイクロサテライト不安定性陽性例 (MSI-H) では TIL が多く、ICI の効果が極めて高くなることが報告されている。即ち、膵癌であっても TIL を増やすことが出来れば、ICI の効果は高くなると考えられる。MSI-H の症例では、DNA 修復遺伝子の異常から、がん細胞に多くの遺伝子変異が蓄積される。この結果、正常細胞と比較してがん細胞がより異質な細胞となり、免疫細胞に認識され易くなるため、ICI の効果が高いと考えられている。しかし、膵癌は遺伝子変異の少ない癌の代表であり、典型的な膵管上皮腺癌では KRAS と TP53 という二つの遺伝子の変異のみを認める症例が多い。通常型膵癌を MSI-H と同じ状態に変換することが可能であれば ICI の効果が期待出来るが、そのためには腫瘍内の全てのがん細胞に遺伝子変異を導入する必要があり、現実的ではない。以上から、膵癌を標的とした新規免疫療法を開発する際には、遺伝子変異の少ない通常型膵癌でも適応可能なものを開発する必要がある。

この、『遺伝子変異の少ない通常型膵癌』を模倣可能であり、かつ担がん個体の腫瘍免疫応答を解析可能な動物モデルの作成は、既存の技術では難しかった。平面培養のマウス膵癌細胞株としては Panc02 が知られているが、平面培養の細胞株は、継代により未知の遺伝子変異の蓄積が起こることが知られている。また、マウスの胎生期から膵臓特異的に遺伝子変異を導入するモデルも多数報告されているが、胎生期から膵臓全体に遺伝子変異が導入されるため、局所の免疫応答に導入された遺伝子変異が影響を与える可能性がある。この問題に対し、申請者は、マウス膵管上皮オルガノイド細胞株に、KRAS の変異と、CRISPR/CAS9 システムによる TP53 のノックアウトを導入し、この二つの遺伝子変異のみを持つマウス膵癌オルガノイド細胞株を樹立した。オルガノイド細胞株は、生体の組織から得た細胞をマトリゲル内で 3 次元培養するものであり、平面培養と比較して、細胞の継代による未知の遺伝子変異の蓄積が少ないことが知られている。この細胞株は、膵臓への同所移植において、ヒト膵癌と類似した豊富な間質増生を呈し、間質を含めた膵癌微小環境の包括的な解析が可能である。

通常の炎症組織では、所属リンパ節で抗原提示を受けた T 細胞は、炎症組織内の血管内皮にトラップされ、ケモカインによって組織内部へ誘導される。がん細胞は、腫瘍微小環境に働きかけ、抗腫瘍免疫を制御していることが知られているが、膵癌微小環境ではこれらの T 細胞の浸潤過程が障害されている可能性がある。以上の背景から、本研究課題では申請者が独自に樹立した通常型ヒト膵癌と同じく遺伝子変異の少ないマウス膵癌オルガノイド細胞株を用いて、TIL の数を増加させる最も効果的な手段を探索し、新規免疫療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

本研究は、通常型膵癌に TIL を増加させる新規免疫療法の開発を目的とする。新たな免疫療法開発のためには、適切な標的を選択することが重要である。標的候補の選択には、抗腫瘍免疫に与える影響の大きさと、その改変のし易さを考える必要がある。本研究では、まず TIL の浸潤に影響する因子を一つのモデルで解析し、標的候補を絞る。本研究課題の創造性は、実現可能な膵癌新規免疫療法の開発であり、標的候補の解析で終了しないことを目指す。このため、治療法開発の段階では試薬として購入可能なものなど、実現可能性の高い物から解析を進める。

3. 研究の方法

(1) フローサイトメトリーによる腫瘍血管内皮細胞の解析

マウス膵癌オルガノイド同所移植モデルから腫瘍を摘出後、腫瘍を細切し、酵素処理 (Liberase DL0.025 mg/ml、37°C、30 分) により細胞を分離した。フローサイトメトリーにより腫瘍内血管内皮細胞の解析を行った。

(2) 腫瘍血管内皮細胞の機能障害解析

マウス膵癌オルガノイド細胞株同所移植モデルの腫瘍組織、アルギニン誘発膵炎モデルの膵

臓組織、未処置の正常膵臓組織をそれぞれ酵素処理し、細胞を分離した。磁器ビーズを用いた細胞分離試薬 (Mojosort™、Biolegend) を用いて、CD31 陽性細胞を単離した。それぞれの細胞に、*in vitro* で Lipopolysaccharide (LPS) 刺激し、E/P-selectin、VCAM、ICAM の mRNA レベルの発現量を Real Time PCR 法により解析した。

(3) 腫瘍内浸潤免疫細胞サブセットの継時的な変動の解析

マウス膵癌オルガノイド細胞株同所移植モデルの腫瘍組織を用いて、2 週・4 週・6 週の時点で主要な腫瘍内浸潤免疫細胞サブセット変動を解析した。

(4) マウス膵癌オルガノイドのセクレトーム解析

正常マウス膵管上皮細胞に、Kras 変異のみを導入したオルガノイド (前がん病変細胞のモデル) と、Kras 変異に加えて TP53 ノックアウトを導入したオルガノイド (浸潤性膵癌細胞のモデル) を用いて、培養上清中に分泌されるタンパク質の網羅的解析 (セクレトーム解析) を行った。

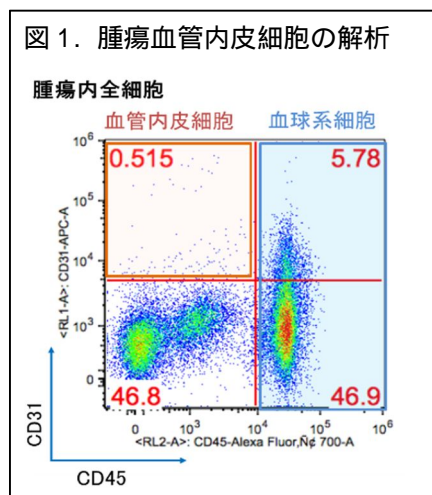
(5) 遺伝子 A ノックアウトマウスを用いた膵癌増殖能評価試験

野生型マウスと遺伝子 A ノックアウトマウスを用いて、マウス膵癌同所移植モデルを作成し、6 週間後に腫瘍を摘出して腫瘍体積を比較した。

4 . 研究成果

(1) フローサイトメトリーによる腫瘍血管内皮細胞の解析

マウス膵癌オルガノイド同所移植モデルを用いて、フローサイトメトリーによる腫瘍内血管内皮細胞の検出・解析が可能かをまず検討した。腫瘍全細胞中の血球系細胞 (CD45⁺細胞) は約 50% を占めており、ヒト膵癌に近い値であった。非血球系細胞 (CD45⁻細胞) の中で、CD31 陽性群が血管内皮細胞と考えられるが、その割合は 0.5 ~ 1% と少ない値であった (図 1)。事前に計画していた、血管内皮細胞上の E/P-selectin、VCAM、ICAM などの各表面抗原は問題なく検出可能であった。



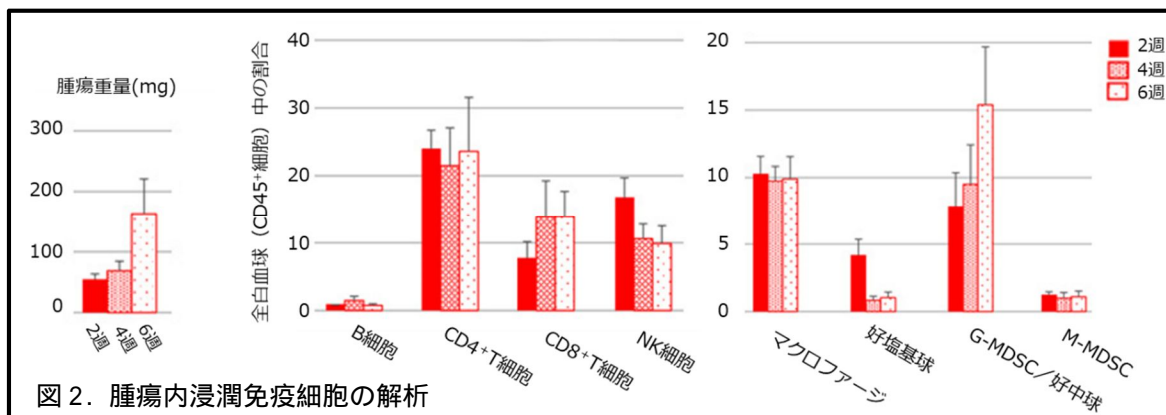
(2) 腫瘍血管内皮細胞の機能障害解析

非腫瘍性炎症組織において、所属リンパ節で活性化された T 細胞は、炎症組織内の血管に到達した際にトラップされる。この際、血管内皮細胞は種々の T 細胞接着分子を発現するが、腫瘍組織では腫瘍血管内皮細胞がこれらの分子を発現できず、腫瘍特異 T 細胞をトラップできていない可能性がある。炎症により血管内皮細胞に発現が増加する T 細胞接着因子は組織により異なるため、膵臓組織をコントロールとして用いた。

マウス膵癌オルガノイド細胞株同所移植モデルの腫瘍組織、膵炎モデルの膵臓組織、未処置の正常膵臓組織より、それぞれ血管内皮細胞を単離し、*in vitro* で LPS 刺激を行った。E/P-selectin、VCAM、ICAM の mRNA レベルの発現量を Real Time PCR 法により解析したが、結果のばらつきが大きく、再現性のある結果が得られなかった。

(3) 腫瘍内浸潤免疫細胞サブセットの継時的な変動の解析

上記 と並行して、マウス膵癌オルガノイド細胞株同所移植モデルの腫瘍組織を用いて、腫瘍内浸潤免疫細胞サブセットの継時的な変動を解析した (図 2)。全白血球に対する CD8 陽性

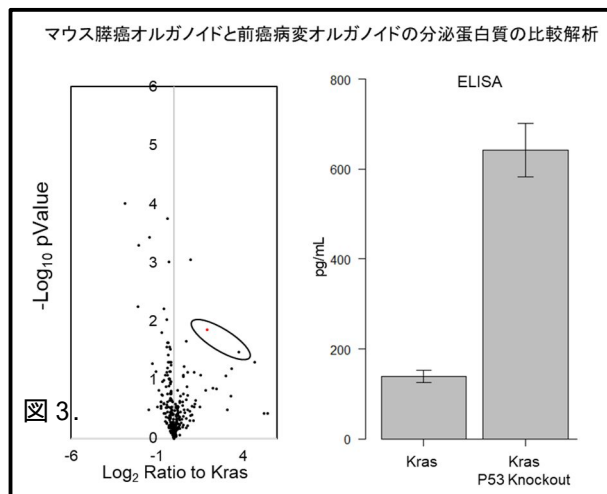


T 細胞の割合は 2 週目と 4 週目では若干の増加を認めましたが、4 週目から 6 週目では、ほぼ横ばい

であった。その他の細胞群も大きな変化は認めなかったが、骨髄由来抑制細胞 (MDSC) と考えられるサブセットが継続的に増加していた。このサブセットは、表面抗原の CD11b と Ly6G が共に陽性となる集団としてここでは定義しているが、この判別法だけでは好中球と区別が出来ないことが知られている。このため、図中では G-MDSC/好中球と記載した。

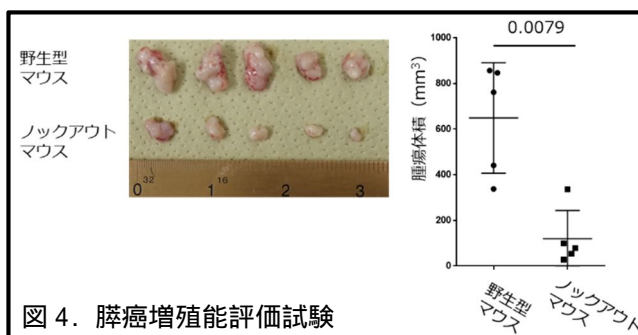
(4) マウス膵癌オルガノイドのセクレトーム解析

膵癌細胞が周囲の免疫細胞に及ぼす影響を解析するため、正常マウス膵管上皮細胞に、膵前がん病変細胞オルガノイド (Kras 変異のみ) 浸潤性膵癌細胞オルガノイド (Kras 変異 + TP53 ノックアウト) を用いて、培養上清中に分泌されたタンパク質の網羅的解析を行った。解析の結果、浸潤性膵癌細胞オルガノイドで有意に分泌が増加している 2 種類のタンパク質を同定した (図 3)。その内、ケモカインの一種であった X に着目し、解析を進めた。まず、ELISA 法にて、実際にケモカイン X が浸潤性膵癌細胞オルガノイドで有意に分泌が増加していることを確認した。



(5) 遺伝子 A ノックアウトマウスを用いた膵癌増殖能評価試験

次に、ケモカイン X に関連する遺伝子群として、遺伝子 A に着目した。遺伝子 A ノックアウトマウスを用いて、遺伝子 A がマウス膵癌同所移植モデルにおける腫瘍の増殖に影響を及ぼすかを検討した。その結果、遺伝子 A ノックアウトマウスでは、野生型マウスに比較して、腫瘍の増大が有意に抑制された。



(6) 考察と今後の展望

本研究計画では、当初、腫瘍内血管を中心に解析する予定であった。しかし、初年度に実際に解析を行うと、予想以上に腫瘍内血管上皮細胞の細胞数が少なく、評価可能な系を構築することが困難であった。そこで、『通常型膵癌に TIL を増加させる新規免疫療法の開発』という原点に戻り、まずは主要免疫細胞サブセットの推移を解析した。この解析の結果、再現性をもって継続的に増加している細胞群として、G-MDSC/好中球を同定した。一方、目的の CD8 陽性 T 細胞の割合は一定の割合で頭打ちになっている印象であった。

当初の予定では、この後にケモカインアレイを行い、TIL を増加させる因子を検索する予定であった。しかし、この頃同時期に進めていた胆嚢癌モデルのプロジェクト (Kato S. et al. Oncogenesis: 2021;10:33) の中で、網羅的遺伝子発現解析を経験し、本計画の内容を修正した。胆嚢癌モデルの解析では、腫瘍組織全体を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。この結果、組織内に炎症細胞浸潤が強かったこともあり、発現変動遺伝子として検出されたものは、炎症細胞由来と思われるものが大部分を占めていた。この経験から、網羅的解析は解析対象をできるだけシンプルにしないと何を解析しているのか判別できなくなると考え、一度 in vitro の系に戻り、セクレトーム解析を行った。この結果、ケモカイン X に着目し、更に関連する遺伝子群として、遺伝子 A の解析を開始した。

免疫細胞の応答に関する遺伝子 A のノックアウトマウスでは、図 4 に示した通り、野生型マウスに比較して、腫瘍の増大が有意に抑制された。研究計画全体として、TIL からやや離れたものの、実現可能な方向に修正し、膵癌新規免疫療法の開発の糸口を掴んだと考えている。今後は、体外からこの遺伝子 A の機能を抑制する物質を投与し、膵癌の治療薬として応用可能か検討する方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Shingo Kato, Kazufumi Honda	4. 巻 7
2. 論文標題 CA19-9 as a therapeutic target in pancreatitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of translational medicine	6. 最初と最後の頁 S318
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/atm.2019.09.161	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 Shingo Kato, Akito Iwasaki, Yusuke Kurita, Jun Arimoto, Toh Yamamoto, Sho Hasegawa, Takamitsu Sato, Kento Imajo, Kunihiro Hosono, Noritoshi Kobayashi, Masato Yoneda, Takuma Higurashi, Kensuke Kubota, Daisuke Utsunomiya, Atsushi Nakajima	4. 巻 14
2. 論文標題 Three-dimensional analysis of pancreatic fat by fat-water magnetic resonance imaging provides detailed characterization of pancreatic steatosis with improved reproducibility.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0224921
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0224921	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 Matsuura T, Maru Y, Izumiya M, Hoshi D, Kato S, Ochiai M, Hori M, Yamamoto S, Tatsuno K, Imai T, Aburatani H, Nakajima A, Hippo Y	4. 巻 41
2. 論文標題 Organoid-based ex vivo reconstitution of Kras-driven pancreatic ductal carcinogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 490,501
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgz122	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shingo Kato, Tetsuya Matura, Atsushi Nakajima
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF A NOVEL GALLBLADDER CANCER MOUSE MODEL USING ORGANOID CELL LINES
3. 学会等名 Digestive Disease Week（国際学会）
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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