

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07678

研究課題名(和文) 免疫逃避機構の解除による抗腫瘍効果の機序解明と膵癌微小環境制御に基づく治療法開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of anti-tumor effect by disabling the immune escape mechanism and development of treatment based on regulation of the pancreatic cancer microenvironment

研究代表者

鬼丸 学 (ONIMARU, Manabu)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：80529876

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)：膵癌は最も予後不良な癌の一つであり、生物学的悪性度が極めて高い。膵癌は癌関連線維芽細胞(CAFs)等より構成される、豊富な間質増生(desmoplasia)を特徴とし、治療抵抗性の一因と考えられており、間質増生を抑制することで薬剤送達率を改善する様々な試みがなされているが、未だ効果的な治療法は開発されていない。

今回手術検体を用いて食道癌のシングルセル解析を行い、化学療法前後でのT細胞やB細胞といった腫瘍免疫微小環境の変化を明らかにし、またPublic dataの膵臓癌のシングルセル解析を行うことで、膵癌のCAFの免疫チェックポイント分子の発現を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は非常に予後不良な癌の一つであり、その予後不良の一因である腫瘍免疫微小環境の解明は新規治療法に必要な課題である。本研究ではシングルセル解析を用いて、化学療法前後の食道癌の腫瘍免疫微小環境の変化を解明し、またPublic dataを用いて膵癌のCAFの免疫チェックポイント分子の発現を確認した。

化学療法前後の免疫細胞の変化は化学療法の効果を高める併用療法の開発につながる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is one of the poorest prognosis cancers and has an extremely high biological grade. Pancreatic cancer is characterized by abundant stromal proliferation (desmoplasia) composed of cancer-associated fibroblasts (CAFs), which is thought to contribute to the resistance to treatment.

In this study, we performed single cell analysis of esophageal cancer using surgical specimens to clarify the changes in tumor immune microenvironment such as T cells and B cells before and after chemotherapy, and single cell analysis of pancreatic cancer using public data to clarify the expression of immune checkpoint molecules in CAFs in pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 消化器癌 免疫逃避 免疫チェックポイント PD-L1 CTLA4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は最も予後不良な癌の一つであり、生物学的悪性度が極めて高い。膵癌は豊富な間質増生 (desmoplasia) を特徴とし、治療抵抗性の一因と考えられており、間質増生を抑制することで薬剤送達率を改善する様々な試みがなされているが、未だ効果的な治療法は開発されていない。近年、癌免疫療法が世界的に注目を浴びているが、他の癌種で有効な抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体といった免疫チェックポイント阻害薬が膵癌では効果が乏しい。

そこで我々は、膵癌において、免疫チェックポイントである PD-L1 経路や CTLA-4 経路以外の癌免疫応答にブレーキをかけている機序が存在するのではないかと考え、同定することを目指し、治療前・治療中・治療後の膵癌組織における免疫細胞のモニタリングを行うことを計画した。

2. 研究の目的

近年、マウスモデルを用いた膵癌免疫療法の研究では、抗 PD-1 抗体を FAK 阻害剤と Gemcitabine (GEM) と併用することでほとんどの膵癌細胞を消滅させることに成功した (Jiang H, et al. Nat Med, 2016) が、免疫チェックポイント阻害剤単独では効果が乏しいことが数多く報告されている。これは、PD-L1 経路や CTLA-4 経路の他にも癌免疫応答にブレーキをかけている分子が存在するため、十分な抗腫瘍効果が得られないことが一因と考えられる。本研究の目的は、膵癌における免疫逃避機構のメカニズムを経時的、機能的に、空間的に検討することで、新たな免疫逃避機構を解明し、その制御により持続的に抗腫瘍効果を回復させ自己の免疫細胞により癌細胞を排除し得る新たな治療アプローチを確立することである。これにより膵癌患者の予後改善に貢献しようと考えた。

3. 研究の方法

抗 PD-1 抗体投与後の膵癌組織における immune response 解析

膵癌自然発癌モデルの KPC マウスを用い、抗 PD-1 抗体投与群、抗癌剤投与群、未治療群の 3 群に分け、膵癌組織における免疫細胞の変動を 3 群間で検討する。我々の pre の実験において、抗 PD-1 抗体投与 KPC 群の免疫染色では、未治療群と比較して CD8 陽性 T 細胞の割合が有意に増加していることが認められた。この結果から、免疫療法後の膵癌組織において免疫細胞の分布・発現・機能などに変動が生じることが示唆された。各群の膵組織採取後 single cell に調製し、BD Rhapsody を用いたターゲットシーケンスにて immune response 解析を行う。これにより、免疫逃避機構を制御している免疫細胞や分子を探索する。

位置情報を兼ね備えた遺伝子発現解析による免疫応答モニタリング

これまでの遺伝子発現解析では組織の位置情報までは得られなかったが、本研究では 10X Genomics の Chromium にてシングルセル RNA Seq を行うと同時に、組織サンプルを用い位置情報を持ったトランスクリプトーム解析も行う。これにより、腫瘍組織内に浸潤している免疫細胞と周辺に分布する免疫細胞の遺伝子発現の違いをマッピングし可視化する。解析サンプルは、未治療・治療中・治療後の KPC マウスの抗 PD-1 抗体治療モデルの膵癌組織を用いる。また、ヒト切除膵組織より癌細胞と間質細胞、免疫細胞をともに 3 次元共培養した PDO mixed immune cells モデルを樹立し、簡便にヒト膵癌微小環境を再現する。PDO mixed immune cells モデルに、現在の膵癌標準治療である GEM+nab-Paclitaxel 添加群、抗 PD-1 抗体添加群、未添加群に分け、マウスモデルと同様の位置情報を伴う遺伝子発現解析を行い、各群間および抗 PD-1 抗体添加前後における免疫応答のモニタリングを検討する。

免疫逃避機構の解除分子による新規個別化癌免疫療法の開発

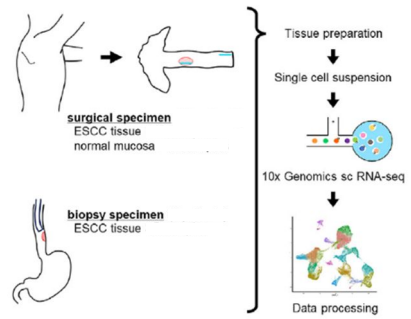
網羅的な immune response 解析により、免疫逃避機構のスイッチの ON/OFF に関わっている分子や、既存の免疫チェックポイント経路以外の別経路の存在が明らかになれば、膵癌で奏効率の低い抗 PD-1 抗体を有に上回る癌免疫療法への応用が期待できる。さらに、バイオプシー検体を用い PDO mixed immune cells モデルを樹立することで、同一患者の膵癌細胞、間質細胞、免疫細胞による in vitro モデルが再現できるため、同定した分子を用いた個別化治療の検討を行うことができる。以上のことから、免疫逃避機構を新たに解除する機序が明らかになれば、患者自身の免疫機能により抗腫瘍効果が得られるため、治療効果の長期持続を望むことができ、膵癌患者の予後改善に大きく寄与すると考えられる。

4. 研究成果

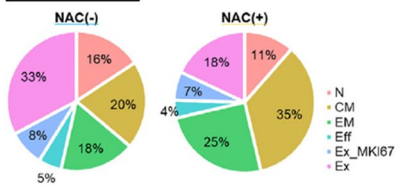
【1. 膵癌を含む消化管癌手術検体のシングルセル RNA-Seq 解析】

膵癌の single cell 解析のための検体処理に難渋したため、食道癌を中心に消化管癌の手術検体を用いて、10X Genomics の Chromium にてシングルセル RNA-Seq を行い、臓器横断的に消化管癌における免疫逃避機構に主に焦点を当て、腫瘍内に浸潤する免疫細胞の解析を行った。また、術前化学療法投与前後の免疫チェックポイント分子や T 細胞の疲弊化マーカーの経時的変化を観察するため、当院消化管内科とも協力して生検検体のサンプル解析も行った。化学療法前後で

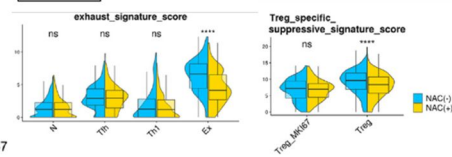
解析を行うと CD8 では Effector Memory CD8 が増加し、ExhaustCD8 が減少していた。また、CD4T 細胞では ExhaustCD4 の疲弊化の程度が化学療法後に減少していることや、制御性 CD4 (Treg) の抑制性が減少していることが判明した。また、B 細胞では化学療法後に遊走能が低下し、一方抗体産生能が上昇していることが分かった。このように化学療法が腫瘍免疫微小環境を改善することが示唆された。



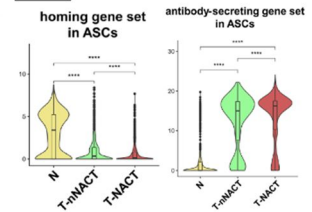
CD8T細胞



CD4T細胞



B細胞

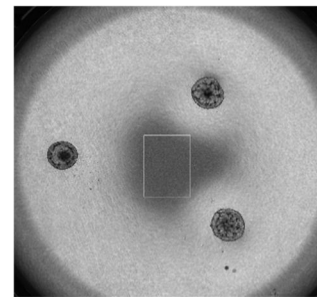


【2. 免疫細胞を含めた微小環境を再現する3次元培養の確立】

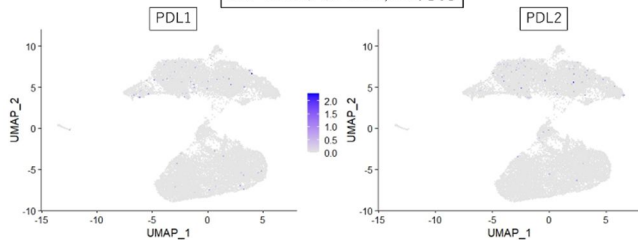
マウスの KPC 細胞株、免疫細胞を用いて3次元モデルの作成を行い、免疫微小環境の解析を行った。今後は切除膵組織を用いて Patient derived organoid (PDO) mixed immune cells モデルの作製を進めている。

【3. 膵癌線維芽細胞に発現する PD-L1】

Public data (Junya Peng et al, Cell Research, 2019)を用いて膵癌 single cell で PD-L1 及び PD-L2 の発現を評価したところ、膵癌間質の線維芽細胞にも PD-L1 及び PD-L2 の発現を認めた。豊富な間質増生を病理学的特徴とする膵癌において、新たな免疫逃避機構の一つとなる可能性がある。



CAFにおけるPDL1,2の発現



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 3件）

1. 著者名 Okuda Sho, Ohuchida Kenoki, Nakamura Shoichi, Tsutsumi Chikanori, Hisano Kyoko, Mochida Yuki, Kawata Jun, Ohtsubo Yoshiki, Shinkawa Tomohiko, Iwamoto Chika, Torata Nobuhiro, Mizuuchi Yusuke, Shindo Koji, Moriyama Taiki, Nakata Kohei, Torisu Takehiro, Morisaki Takashi, Kitazono Takanari, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 26
2. 論文標題 Neoadjuvant chemotherapy enhances anti-tumor immune response of tumor microenvironment in human esophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 106480
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2023.106480	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 Nakamura S, Ohuchida K, Ohtsubo Y, Yamada Y, Tsutsumi C, Okuda S, Hisano K, Mochida Y, Shinkawa T, Iwamoto C, Torata N, Mizuuchi Y, Shindo K, Nakata K, Moriyama T, Torisu T, Nagai E, Morisaki T, Kitazono T, Oda Y, Nakamura M	4. 巻 13
2. 論文標題 Single cell transcriptome analysis reveals functional changes in tumour infiltrating B lymphocytes after chemotherapy in oesophageal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical and Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 e1181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ctm2.1181	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 Shinkawa Tomohiko, Ohuchida Kenoki, Mochida Yuki, Sakihama Kukiko, Iwamoto Chika, Abe Toshiya, Ideno Noboru, Mizuuchi Yusuke, Shindo Koji, Ikenaga Naoki, Moriyama Taiki, Nakata Kohei, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 41
2. 論文標題 Subtypes in pancreatic ductal adenocarcinoma based on niche factor dependency show distinct drug treatment responses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-022-02301-9	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuki Mochida, Kenoki Ohuchida, Nobuhiro Torata, Tomohiko Shinkawa, Toshiya Abe, Noboru Ideno, Naoki Ikenaga, Kohei Nakata, Masafumi Nakamura
2. 発表標題 Single-cell RNA sequence-based evaluation of the mechanism of CAF-related chemo-resistance of PDAC
3. 学会等名 第53回日本膵臓学会大会・第26回国際膵臓学会（IAP・JPS2022）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 持田郁己、大内田研宙、寅田信博、堤親範、中村祥一、久野恭子、奥田翔、新川智彦、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 シングルセル解析を用いた膵臓癌の間質相互作用による化学療法抵抗性機序の検討
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥田翔、大内田研宙、大坪慶志輝、中村祥一、久野恭子、持田郁己、新川智彦、寅田信博、水内祐介、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、中村雅史
2. 発表標題 Single-cell RNA-sequenceを用いた食道扁平上皮癌の免疫環境についての解析
3. 学会等名 第29回日本消化器関連学会週間（JDDW 2021）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村祥一、大内田研宙、奥田翔、大坪慶志輝、寅田信博、水内祐介、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、中村雅史
2. 発表標題 シングルセル解析による食道癌内の腫瘍浸潤マクロファージの食作用の評価
3. 学会等名 第29回日本消化器関連学会週間（JDDW 2021）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久野恭子、水内祐介、大内田研宙、中村祥一、奥田翔、大坪慶志輝、佐田政史、永吉絹子、寅田信博、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、永井俊太郎、中村雅史
2. 発表標題 Single cell RNA sequenceを用いた家族性大腸腺腫症におけるmacrophageのheterogeneityの解明
3. 学会等名 第29回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥田翔、大内田研宙、大坪慶志輝、寅田信博、進藤幸治、森山大樹、水内祐介、仲田興平、永井俊太郎、中村雅史
2. 発表標題 scRNA-seqを用いた食道扁平上皮癌におけるCD8 + T細胞をとりまく免疫微小環境の解明
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村祥一、大内田研宙、奥田翔、寅田信博、水内祐介、進藤幸治、仲田興平、森山大樹、永井俊太郎、中村雅史
2. 発表標題 シングルセル解析による食道扁平上皮癌内の腫瘍浸潤NK細胞の評価
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大坪慶志輝、大内田研宙、奥田翔、中村祥一、久野恭子、持田郁己、新川智彦、松本奏吉、相良亜希子、岩本千佳、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、永井俊太郎、水元一博、中村雅史
2. 発表標題 胃癌TME中CD4 + T cellのheterogeneityの解析とその機能的役割の検討
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 奥田翔、大内田研宙、大坪慶志輝、進藤幸治、森山大樹、仲田興平、永井俊太郎、大塚隆生、水元一博、中村雅史
2. 発表標題 Single-cell RNA-sequenceを用いた食道扁平上皮癌微小環境の解明
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 大坪慶志輝, 大内田研宙, 中村雅史
2. 発表標題 scRNAseq用いた胃癌領域リンパ節を含む腫瘍免疫微小環境のheterogeneityに関する検討
3. 学会等名 第33回バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2020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	寅田 信博 (TORATA Nobuhiro) (00398075)	九州大学・大学病院・臨床検査技師 (17102)	
研究分担者	千々岩 芳朗 (CHIJIWA Yoshiro) (60783701)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	永吉 絹子 (NAGAYOSHI Kinuko) (90761015)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	中村 祥一 (NAKAMURA Shoichi)		
研究協力者	奥田 翔 (OKUDA Sho)		

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