

令和 5 年 5 月 20 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08963

研究課題名（和文）染色体不安定性により生じる免疫制御遺伝子の不活化と免疫逃避機構

研究課題名（英文）Chromosomal instability in colorectal cancer

研究代表者

藤田 正太郎（Fujita, Shotaro）

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：20769640

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）：大腸癌の多くは染色体不安定性（CIN）を示す。本研究では、CIN大腸癌において、癌の進展や腫瘍免疫抑制に関連する候補遺伝子に着目し、マルチオミクス解析、免疫染色、in vitroでの機能解析などを用いて検討した。複数の解析候補遺伝子から、我々はPAICS遺伝子がCIN大腸癌において癌の進展に伴い負に発現制御され、またそれは染色体4番または染色体4番長腕レベルでの欠失に由来する可能性を示した。さらにこの遺伝子の発現低下は予後不良と関連していた。しかしながら、本研究においては当遺伝子の機能的意義の解明には至らなかった。今後は他の候補遺伝子について腫瘍免疫抑制やCINとの関連について検討を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの大腸癌は複数の遺伝子変異の蓄積と同時に染色体不安定性を示す。本研究では、染色体不安定性を示す大腸癌における特定の染色体の欠失とそれに関連する遺伝子発現低下、さらにその臨床的意義を示すことができた。大腸癌の発癌・進展における生物学的機構の解明や、大腸癌治療の個別化を目指す今後の癌研究の礎として寄与し得ると考える。

研究成果の概要（英文）：Colorectal cancer (CRC) is often characterized by chromosomal instability (CIN). In the present study, we investigated a set of candidate genes that are associated with tumor progression and immune suppression in CIN CRC, using multi-omics analysis, immunohistochemistry and in vitro functional assays. Among several candidates, we found that PAICS was significantly downregulated during tumor progression in CIN CRCs, potentially due to loss of chromosome 4 or chromosome arm 4q. Furthermore, we also demonstrated that the downregulation of this gene at transcriptional and protein levels was associated with poor survival outcomes. However, the functional roles of this gene remain to be elucidated, and our future studies will address the other candidate genes that are associated with immune suppression particularly in CIN CRCs.

研究分野：大腸癌

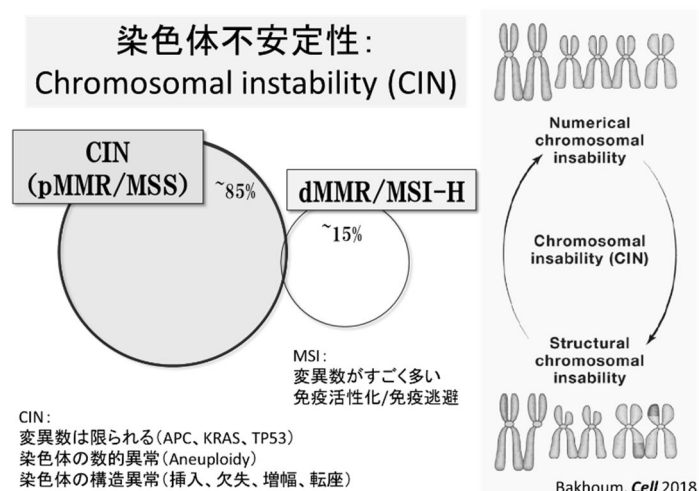
キーワード：大腸癌 染色体不安定性

1. 研究開始当初の背景

本研究課題が着目するのは染色体不安定性 (Chromosomal instability: CIN) である。CIN は癌の hallmark であり、染色体の数的異常 (aneuploidy) 構造異常 (欠失、増幅、転座) を来し、癌の不均一性や薬剤抵抗性をも惹起し予後不良に関連する。CIN は癌進展の中心的な driver と言える (Nat Rev Clin Oncol 2018)。しかしその全体像の理解は未だ乏しい。

近年になり、腫瘍免疫抑制と CIN を結びつける breakthrough を散見するようになった。CIN は、ウイルス防御機構である cGAS-STING 経路を不活化し I 型 IFN を抑制し腫瘍免疫抑制を誘導する (Cell 2018, Nature 2017, Nature 2018)。また癌組織における免疫細胞浸潤は、特異的な免疫関連遺伝子がコードされる染色体増幅・欠失に強く関連している (Immunity 2018)。さらに CIN のレベルが高いと、CD8 陽性 T 細胞などの免疫細胞浸潤が少なく、M2 マクロファージ (免疫抑制的・腫瘍促進的) が優位であり、免疫療法に抵抗性である (Science 2017)。従って CIN は、過去の想定より強力かつ能動的に腫瘍微小環境を制御し、免疫抑制を惹起している可能性がある。

免疫逃避機構を標的とした標的免疫療法の登場は、近年の癌診療現場に大きなインパクトをもたらしたが、効果の不均一性、危険性、コストなどから、現在求められているのは個々の腫瘍免疫形質に応じた診療の個別化であり、免疫逃避を来すゲノム異常・分子機構の解明と、それを検出するマーカーの開発が急務である。



CIN と免疫抑制をリンクする

近年の研究 (Science 2017, Immunity 2018, Cell 2018) の多くは、10000 例を超える多数の癌腫横断的なゲノム解析に基づいている。一方、本研究では大腸癌を研究対象としている。大腸癌にはおおまかに 2 つの型があり、約 15% は高度のマイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability high: MSI-H) を示し、残り 85% はマイクロサテライト安定 (microsatellite stable: MSS) であるが、通常は CIN を示す。それぞれ MSI-H および MSS/CIN と称することができ、その遺伝学的基盤のみならず、臨床的特徴・腫瘍学的予後・治療感受性が大きく異なる。特に MSI-H 大腸癌は腫瘍免疫学的に際立ったサブタイプであり、高い免疫原性と免疫細胞浸潤、免疫チェックポイント分子による免疫抑制を特徴としている。従って、MSS/CIN における免疫抑制機構を検討するうえで、MSI-H は重要な比較対照になり得ると考えるからである。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下である。

- 大腸癌において、特定の染色体上にコードされ、染色体不安定性により発現変動し、遺伝子機能の修飾が生じ得る候補遺伝子の抽出
- その発現制御機構の解明
- その機能的意義の検証
- その臨床的意義の検討、バイオマーカーへの応用の可能性

3. 研究の方法

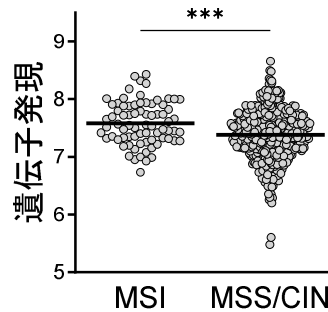
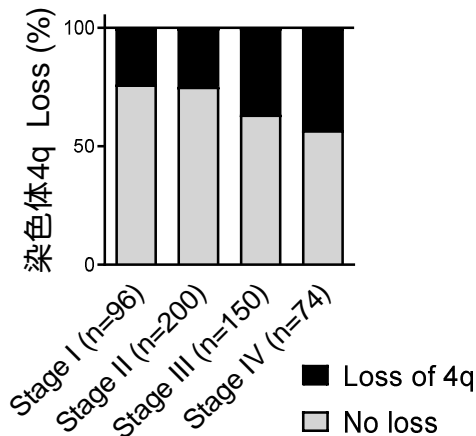
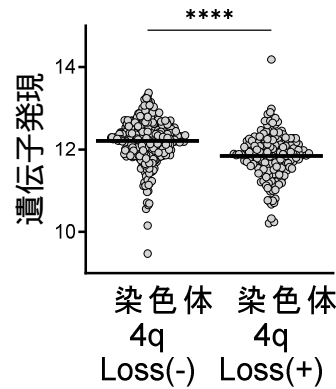
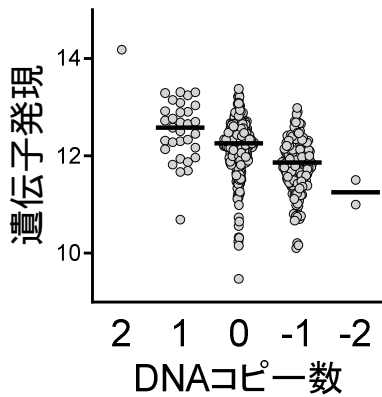
本研究では下記のような方法を用いる（詳細は研究成果の欄に述べる）。

- 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、CIN、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、DNA コピー数解析、変異解析）
- 各種統計解析
- 各種機能的検討（in vitro）

4. 研究成果

本研究では種々の解析を経て、PAICS 遺伝子に着目するに至った。下図(左上)のように、PAICS 遺伝子発現、PAICS 遺伝子の DNA コピー数と負の相関を示す。したがって、ゲノムレベルでのコピー数低下が同遺伝子の発現下方制御に関連することが示唆された。

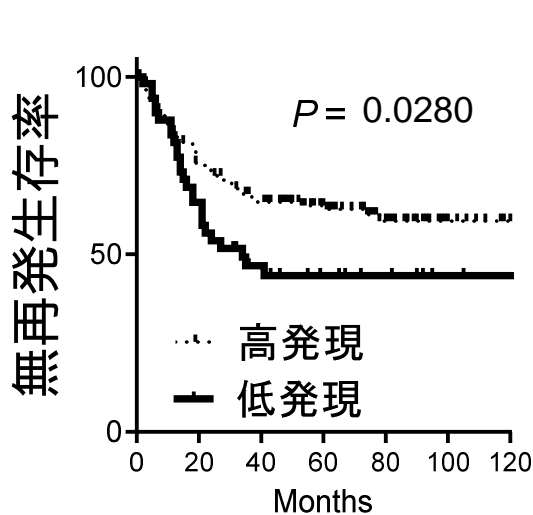
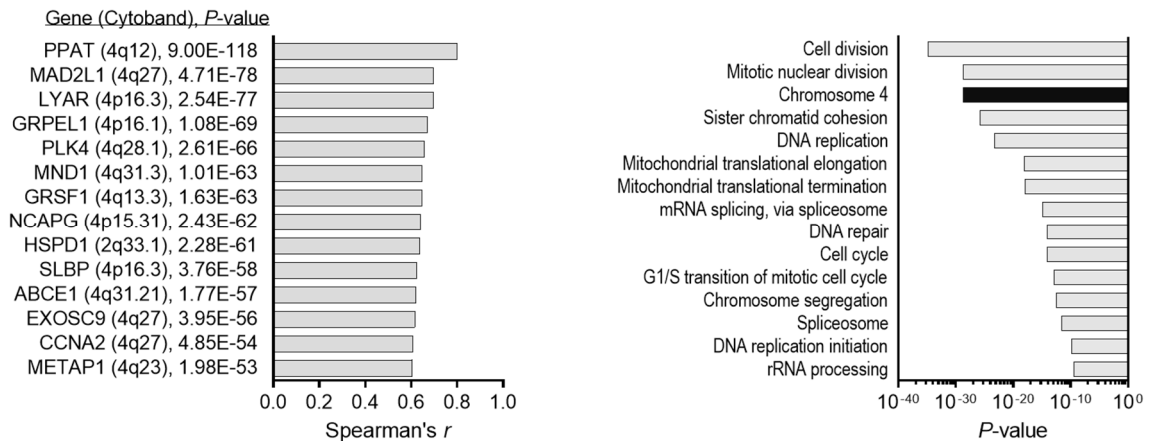
さらに、PAICS 遺伝子は染色体 4 番長腕（4q）にコードされている。下図（右上）のように、同遺伝子発現は染色体 4q の loss に伴い低下しており、同遺伝子座の focal な loss でなく、chromosome-level あるいは arm-level での大きな loss が同遺伝子発現を負に制御している可能性が示唆された。



上図（左下）に示すように、染色体 4q loss の頻度はステージの進行に依存して増加する。また上図（右下）のように、MSI 大腸癌に比して、MSS ないし CIN 大腸癌では同遺伝子発現は低下している。

以上の解析から、特に CIN 大腸癌において、腫瘍の進展 (progression) に伴い染色体 4q の loss が生じ、また染色体 4q の loss に伴い PAICS 遺伝子発現低下が生じるものと考えられる。

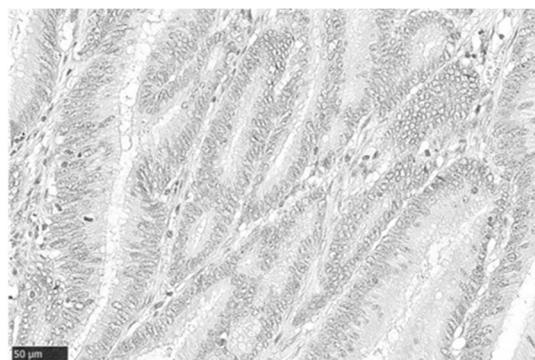
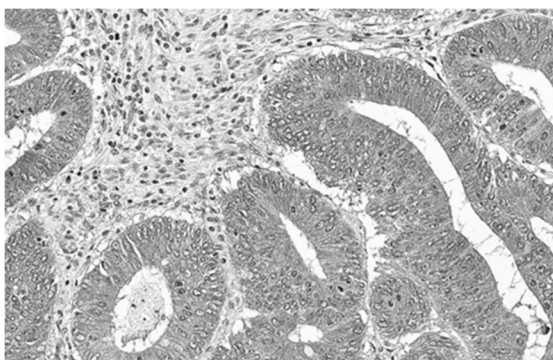
さらに、co-expression analysis により、同遺伝子発現と強く相関する遺伝子を抽出した(下図、左)。抽出された遺伝子はいずれも染色体 4 番にコードされるものであり、またパスウェイ解析により、これら遺伝子群は染色体 4 番に加え、細胞分裂、細胞周期などに関連付けられることがわかった(下図、右)。



同遺伝子発現により大腸癌を高発現例、低発現例にわけ予後解析を行った。左図 Kaplan-Meier 曲線に示すように、同遺伝子の発現低下症例は予後(無再発生存率)が不良であった。

免疫染色を用いて、同遺伝子がコードするタンパク発現を検討したところ、遺伝子発現と同様に、タンパクレベルにおいても発現が消失する症例があり(下図、左:陽性、右:陰性)またそのような症例は予後不良であることがわかった。

以上より、当該遺伝子は、主として CIN 大腸癌(非 MSI 大腸癌)において、染色体 4 ないし 4q の loss に伴い発現低下が生じるものと考えられる。また遺伝子またはタンパクレベルでの発現低下を示す症例は臨床的に予後不良であり、バイオマーカーとして利用できる可能性が示唆される。



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

特に、大腸癌細胞株を用いて、siRNA を用いた上記遺伝子のノックダウン等の実験を行ったが、再現性のある機能的意義を見出すことはできなかった。当遺伝子の発現低下は染色体レベルまたは染色体腕 (arm) レベルでの変化に由来するものである。そのような大きな染色体欠失は同染色体上にコードされるかなり多数の遺伝子発現に影響するため、染色体レベルでの異常に伴う表現型を、単一遺伝子の機能喪失で説明することは困難であったのではないかと推測することができる。したがって、当該遺伝子の発現低下はそれ単独では大腸癌細胞の機能的変化を誘導しない可能性がある。一方で、臨床的には、当該遺伝子の発現は予後バイオマーカーとなる可能性がある。

もう一点の limitation としては、本研究課題の当初の意図であった染色体不安定性と腫瘍免疫との関連への十分な解明には至らなかったことであつたしかしながら、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の組み合わせにより、上記とは別個の遺伝子セットの抽出に成功しており、染色体不安定性における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2件（うち査読付論文 2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 Kobayashi Yusuke, Kumamoto Kensuke, Okayama Hirokazu, Matsumoto Takuro, Nakano Hiroshi, Saito Katsuharu, Matsumoto Yoshiko, Endo Eisei, Kanke Yasuyuki, Watanabe Yohei, Onozawa Hisashi, Fujita Shotaro, Sakamoto Wataru, Saito Motonobu, Momma Tomoyuki, Takenoshita Seiichi, Kono Koji	4. 巻 16
2. 論文標題 Downregulation of PAICS due to loss of chromosome 4q is associated with poor survival in stage III colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0247169
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0247169	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 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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田正太郎, 門馬智之, 伊藤美郷, 加瀬晃志, 仲野宏, 山田玲央, 松本拓朗, 山内直人, 金田晃尚, 菅家康之, 花山寛之, 渡辺洋平, 小野澤寿志, 早瀬傑, 坂本渉, 齋藤元伸, 佐瀬善一郎, 河野浩二
2. 発表標題 MSI 検査の現況
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 岡山洋和, 松本拓朗, 中嶋正太郎, 加瀬晃志, 仲野宏, 遠藤英成, 菅家康之, 早瀬傑, 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 染色体不安定性による癌抑制遺伝子の欠失と腫瘍免疫抑制機構
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

〔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	芦澤 舞 (Ashizawa Mai) (10791535)	福島県立医科大学・医学部・助教 (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
---------	---------