

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09073

研究課題名(和文) 膵癌進展機構に関わるC4BPA-CD40 axisの機能解析および治療開発

研究課題名(英文) the elucidation of mechanism underlying C4BPA-CD40 axis in pancreatic cancer progression

研究代表者

佐々木 巨亮 (Sasaki, Kosuke)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：90836181

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)：膵癌患者術前後血清の網羅的蛋白解析より新規バイオマーカーとしてC4BPAを同定。さらに fucosylated C4BPAは健常人・膵炎よりも膵癌で有意に高値であった。膵癌切除検体では間質C4BPA、CD40は癌周囲に共発現し、高発現群では有意に予後良好。C4BPAはCTLと正の相関を認めた。膵癌細胞においてもC4BPAはCD40に特異的に作用し細胞増殖作用をもたらした。前臨床試験ではマウス膵癌モデルにおいてGnP+ICB+C4BPA peptide投与群は他群に比して腫瘍縮小効果を示し、腫瘍周囲のCTL集積をもたらした。C4BPA-CD40 Axisは膵癌の新規治療ターゲットになりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、腫瘍微小環境内における補体の役割については注目されつつあるものの、癌進展機構における補体の機能やそのメカニズムについては殆ど解明されていない。今回、補体因子C4BPAに着目し、C4BPAの膵癌における機能について解明するとともに、免疫療法における新規治療標的のひとつであるCD40との相関を明らかとした点で将来の治療ターゲットとして期待できる研究成果となった。これらの研究成果は国内外の学会で口演や上級演題による発表を行い、High impactなjournalにもpublishされており、今後の補体と癌免疫の分野における一つの知見として国内外へ広く発信できたと考える。

研究成果の概要(英文)：C4BPA was identified as a novel biomarker for PDAC by comprehensive protein analysis of pre- and postoperative sera of PDAC patients. Furthermore, we clarified that fucosylated C4BPA was significantly higher in PDAC patients than in healthy and pancreatitis patients. Fluorescent immunostaining of resected PDAC tissue revealed that stromal C4BPA and CD40 were co-expressed around the cancer cells, and immunohistostaining revealed that the prognosis was significantly better in patients with high expression groups of C4BPA and CD40. C4BPA expression was positively correlated with number of CTLs. In PDAC cell lines, C4BPA specifically acted on CD40 for cell proliferation. In preclinical studies using orthotopic transplantation model mice, the GnP/ICBs/mC4BPA peptide treatment induced a greater number of CTLs in the peripheral of PDAC tumors and the tumor regression than did the control treatment. C4BPA-CD40 Axis could be a novel therapeutic target for pancreatic cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 補体 バイオマーカー C4BPA CD40

1. 研究開始当初の背景

膵癌は予後不良な癌で罹患者数・死亡者数は年々増加傾向にある。膵癌に対しては手術療法をはじめ、化学療法、放射線療法などを組み合わせた集学的治療が予後延長に不可欠だが、他癌種と比較し治療法は未だ確立されていない。免疫療法は近年のがん治療における paradigm shift として注目されているが、膵癌では効果に乏しい。これは、膵癌は豊富な間質を有し、癌周囲の腫瘍免疫抑制状態である”cold tumor”であることが挙げられる。腫瘍細胞に対しては発癌当初より常に免疫細胞により認識・排除される免疫監視機構(immunosurveillance) が働くが、膵癌は免疫原性が低く、診断時には既に進行している症例が多い。膵癌固有のより早期(排除相や平衡相)の免疫応答の変化に反応する分子を同定することで膵癌の早期診断に繋がり、さらに逃避相に至るまでに獲得する免疫抑制能を解除する mechanism や因子を同定することで、今後の免疫治療を加味した新規治療戦略を構築するために重要と考える。

2. 研究の目的

本研究は、Tandem Mass Tags (TMT) labeling と LC-MS/MS を用いた網羅的蛋白解析の実験 から新規バイオマーカーとして同定された補体因子 C4b-binding protein alpha chain (C4BPA)に注目し、癌周囲微小環境内で C4BPA-CD40 Axis が癌進展機構にどのような寄与をするのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1)新規早期膵癌バイオマーカーとしての血清 C4BPA 値測定系の確立:

ヒト膵癌血清蛋白の網羅的解析により、新規早期膵癌バイオマーカーとして C4BPA を同定した。フコシル化糖鎖をターゲットにした測定系(LCA-lectin ELISA)を確立し、感度・特異度の高い血清 fucosylated (fuc) C4BPA 測定系を構築し、早期膵癌バイオマーカーとしての臨床応用を目指す。

2)CD40 を介した C4BPA の癌進展機構の解明:

C4BPA が膵癌腫瘍に発現する CD40 に直接作用し効果を示す可能性、C4BPA が抗原提示細胞上の CD40 を介し腫瘍周囲の免疫を賦活化し抗腫瘍効果を増強している可能性、を考えた。ヒト膵癌切除組織の免疫染色では、C4BPA・CD40 は腫瘍周囲間質に発現し、間質での C4BPA・CD40 高発現群では有意に予後良好であった。

2-1)膵癌細胞株での CD40 発現を Western blot にて確認した。CD40 特異的 siRNA により CD40 発現を抑制し、さらに、CD40siRNA と recombinant human C4BPA(rhC4BPA) を用いた stimulation assay を行うことで、膵癌細胞における C4BPA-CD40 axis の作用を検討する。

2-2)ヒト末梢血単核球(PBMC)を単離・調整し、rhC4BPA にて刺激した際の免疫担当細胞の分布変化を Flow cytometry にて解析する。C4BPA が CD40 を刺激し、免疫担当細胞の変化を確認することで、C4BPA による抗原提示細胞上の CD40 の活性化を in vitro で確認する。

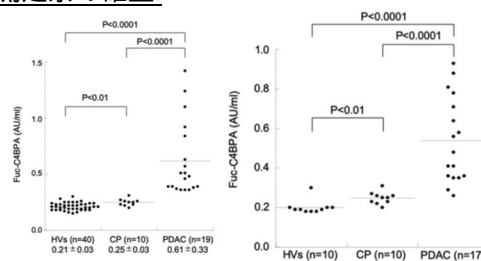
3)In vivo orthotopic transplantation model での C4BPA-CD40 axis の役割についての検討:

YFP が内因性に labeling されている膵癌改変マウスモデル(PKCY mice) の膵癌組織にて、マウスでの C4BPA-CD40 の発現を確認した。さらに、PKCY マウスの膵臓から単離・抽出したマウス膵癌細胞 PKCY cell を用い orthotopic transplantation model を作成、recombinant mouse C4BPA を腹腔内注射した際に、原発巣の腫瘍形成や転移形成能にどのような影響を及ぼすか解析し、C4BPA-CD40 の in vivo での役割を追求する。

4. 研究成果

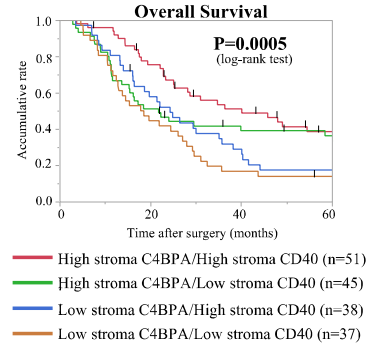
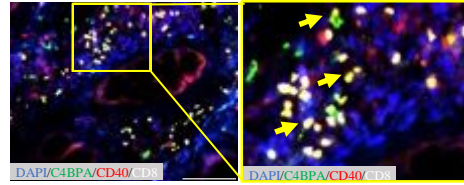
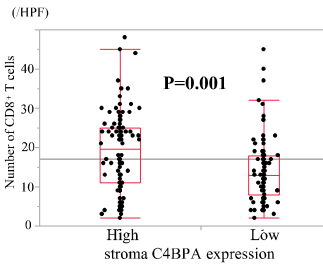
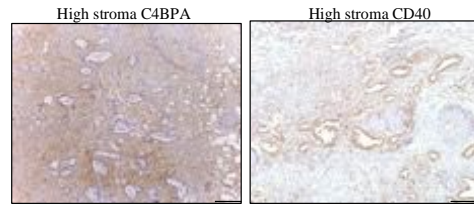
1)新規早期膵癌バイオマーカーとしての血清 C4BPA 値測定系の確立:

膵癌特異的血清 biomarker として、炎症や癌で上昇するフコシル化糖鎖をターゲットにした測定系(LCA-lectin ELISA)を確立した、感度・特異度の向上を目指した。血清 fucosylated (fuc) C4BPA 値は、total C4BPA 値と比較高い AUC 値を示し、早期膵癌バイオマーカーとしての可能性が示された。(右図;Oncol Lett 2021)

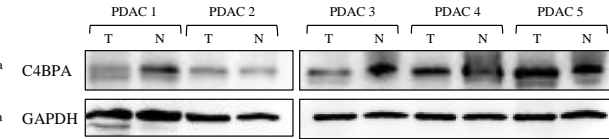
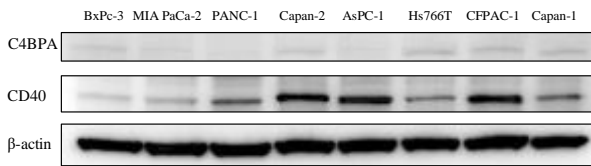


2)CD40 を介した C4BPA の癌進展機構の解明:

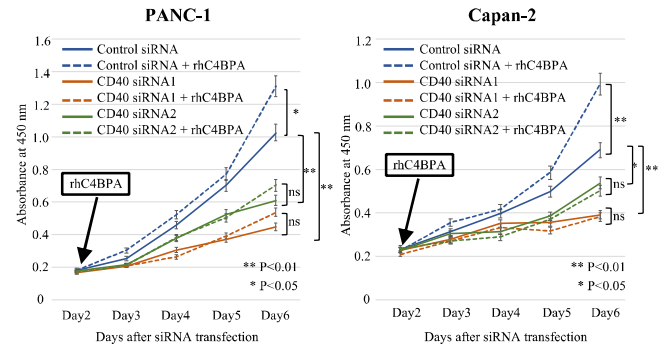
ヒト膵癌切除組織 171 例の免疫染色を施行すると、C4BPA は膵癌細胞では発現を認めず、腫瘍周囲間質に発現していた。間質での C4BPA・CD40 高発現群では有意に予後良好であった。さらに抗腫瘍免疫の代表である Tumor infiltrating lymphocytes (TIL)を評価するために CD8⁺ T cell の免疫染色を行うと、C4BPA 発現と TIL 数は正の相関関係を持ち、C4BPA・CD8 がともに高発現群において有意に予後良好であった。これら細胞の間質での局在を確認するために蛍光免疫染色を行うと、癌周囲の間質において C4BPA・CD40・CD8 は共発現しており、これらが癌間質において何らかのつながりを有していることが示唆された。



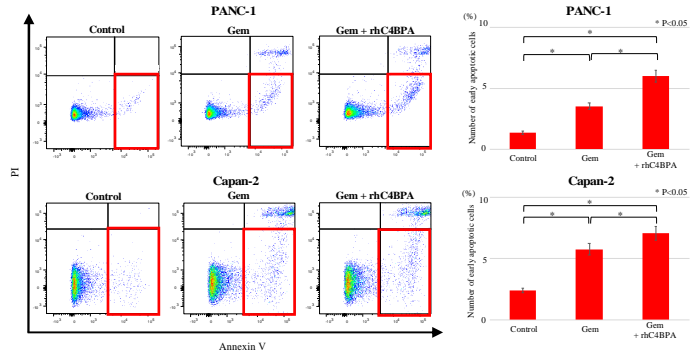
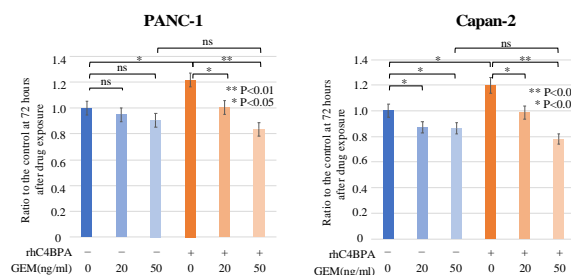
2-1)膵癌細胞株での CD40 発現を Western blot にて確認。C4BPA は膵癌細胞株では発現を認めないものの、患者切除検体(PANC1-5)より抽出した蛋白では発現しており、C4BPA は膵癌の腫瘍微小環境に存在することを確認した。



CD40 特異的 siRNA により CD40 発現を抑制し、さらに、CD40siRNA と recombinant human C4BPA(rhC4BPA) を用いた stimulation assay を行った。細胞増殖能はコントロール群に比して CD40 ノックダウン群では低下していた。コントロール群においては C4BPA 刺激により有意に細胞増殖が増加していた一方で、CD40 をノックダウン群ではいずれも C4BPA 刺激を行っても細胞増殖に有意な変化を認めなかった。これより、C4BPA が CD40 を介して細胞増殖に寄与していることが示された。

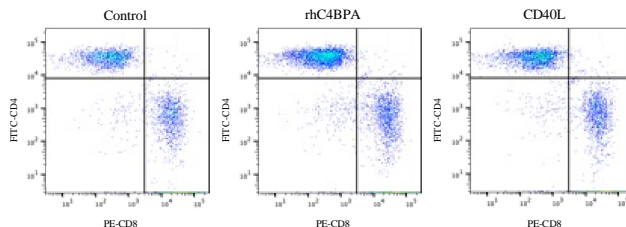


C4BPA は膵癌細胞に対して、直接的には腫瘍増殖効果をもたらしたため、C4BPA の腫瘍増殖作用が抗がん剤により相殺されるかを確認すべく、C4BPA 刺激細胞株に直接ゲムシタピン(GEM)を投与する、Cytotoxicity assay を施行した。いずれの細胞株においても C4BPA 刺激により細胞増殖を認めたものの、GEM 投与 24 時間にて濃度依存性に C4BPA の腫瘍増殖効果が相殺され、GEM 50ng/mL 投与により C4BPA の腫瘍増殖効果は完全に打ち消された。GEM 50ng/mL 投与後 6 時間の細胞の Apoptosis assay を行うと、GEM 投与群に比べ、GEM・C4BPA 投与群ではいずれもアポトーシス細胞が増加していた。これより、GEM の殺細胞効果が C4BPA 存在下において増強されたことが示された。



C4BPA は CD40 受容体を活性化させ細胞増殖に寄与していた。CD40 受容体をノックダウンすると細胞増殖は抑制され、C4BPA 刺激を加えても変化しないことより、膵癌細胞においても C4BPA-CD40 Axis が細胞増殖に寄与することが解明された。一方で、C4BPA は GEM の殺細胞効果を増強する、つまり膵癌細胞の化学療法感受性を高める効果を有していた。

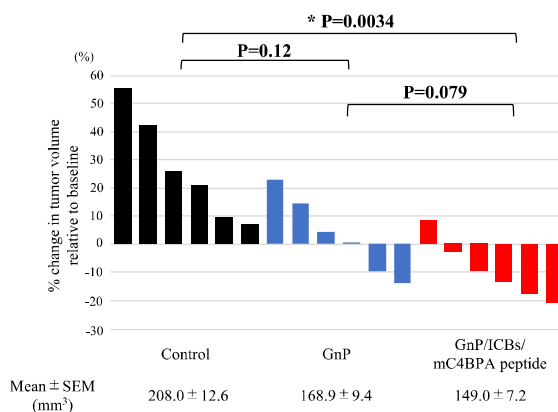
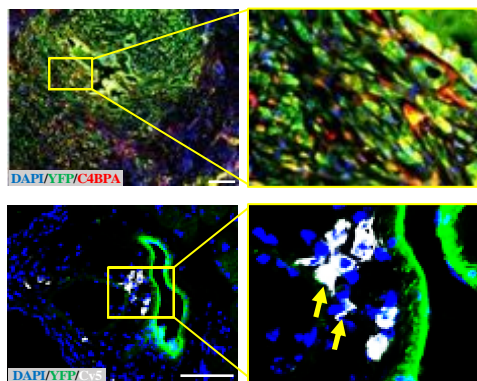
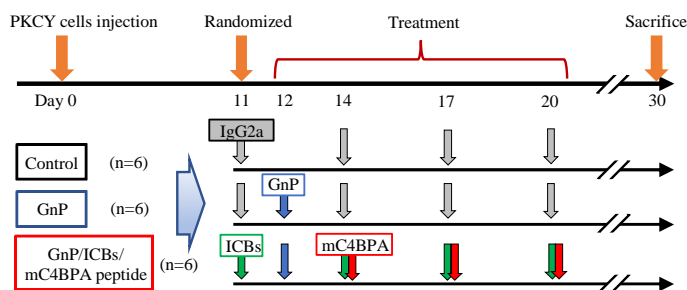
2-2) ヒト末梢血単核球(PBMC)を単離・調整し、rhC4BPA および CD40 ligand (CD40L)にて刺激した際の CD4⁺・CD8⁺ T cell の分布変化を Flow cytometry にて解析した。C4BPA 投与群は CD40L 投与群と同様に CD4⁺・CD8⁺ T cell の数を増加させることを確認した。一方で、CD4/8 比には変化をもたらさなかった。C4BPA が CD40L 同様に、T 細胞増殖能に寄与することを確認した。



3) In vivo orthotopic transplantation model での C4BPA-CD40 axis の役割についての検討:

YFP が内因性に labeling されている膵癌改変マウスモデル(PKCY mice) の膵癌組織にて、マウスでの C4BPA-CD40 が十分発現していることを確認した。さらに、PKCY マウスの膵臓から単離・抽出したマウス膵癌細胞 PKCY cell を用い orthotopic transplantation model を作成し、C4BPA および多剤投与時の抗腫瘍効果を検討した。なお、C4BPA は full length ではなく、CD40 と結合する C 末端から 30 塩基のペプチドを合成(mC4BPA peptide、Cy5 を標識)し使用した。

膵癌 orthotopic transplantation model に mC4BPA peptide 単剤を投与すると、腫瘍体積には有意差を認めないものの腫瘍周囲の CD8⁺ T cell が増加しており、C4BPA により腫瘍微小環境に CD8⁺ T cell が recruit されたことが示唆された。さらに、コントロール群、GEM+nab-PTX(GnP) 投与群、GnP+ICBs+mC4BPA peptide 群の 3 群での preclinical study を行った。薬剤投与群は対照群に比して腫瘍体積の減少を認めた。また、mC4BPA peptide に標識した Cy 5 は腫瘍周囲に発現しており、投与した mC4BPA peptide が腫瘍周囲微小環境まで到達し、機能を有した可能性が示唆された。(SASAKI K, et al. J Exp Clin Cancer Res 2022)



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 Sasaki Kosuke, Takano Shigetsugu, Tomizawa Satoshi, Miyahara Yoji, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Takada Mamoru, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 40
2. 論文標題 C4b-binding protein γ -chain enhances antitumor immunity by facilitating the accumulation of tumor-infiltrating lymphocytes in the tumor microenvironment in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-021-02019-0	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 Sogawa Kazuyuki, Yamanaka Sakino, Takano Shigetsugu, Sasaki Kosuke, Miyahara Yoji, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Takizawa Hiroataka, Nomura Fumio, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Fucosylated C4b-binding protein γ -chain, a novel serum biomarker that predicts lymph node metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.12388	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐々木巨亮、高野重紹、賀川真吾、古川勝規、高屋敷吏、久保木知、鈴木大亮、酒井望、三島敬、細川勇、小西孝宜、大塚将之
2. 発表標題 膵癌に対する新規治療法としての、CD40を介した補体因子C4BPAの抗腫瘍効果の解明
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 Kosuke Sasaki, Shigetsugu Takano, Shingo Kagawa, Masayuki Ohtsuka
2. 発表標題 C4BPA identified as a novel biomarker is associated with favorable outcome of patients with pancreatic cancer via CD40
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木巨亮、高野重紹、吉富秀幸、賀川真吾、古川勝規、高屋敷史、久保木知、鈴木大亮、酒井望、三島敬、中台英里、大塚将之
2. 発表標題 膵癌微小環境内のC4BPAとCD40発現の意義
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 佐々木巨亮、高野重紹、吉富秀幸、賀川真吾、古川勝規、高屋敷史、久保木知、鈴木大亮、酒井望、三島敬、中台英里、大塚将之
2. 発表標題 膵癌におけるCD40を介した補体因子C4BPAの抗腫瘍効果の解明
3. 学会等名 第29回 日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木巨亮、高野重紹、吉富秀幸、賀川真吾、古川勝規、高屋敷史、久保木知、鈴木大亮、酒井望、三島敬、中台英里、大塚将之
2. 発表標題 膵癌におけるCD40を介したC4BPAの抗腫瘍効果の解明
3. 学会等名 第51回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木巨亮、高野重紹、賀川真吾、古川勝規、高屋敷史、久保木知、鈴木大亮、酒井望、三島敬、中台英里、大塚将之
2. 発表標題 膵癌に対する新規治療法としての、CD40を介した補体因子C4BPAの抗腫瘍効果の解明
3. 学会等名 第120回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021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	高野 重紹 (Takano Shigetsugu) (20436380)	千葉大学・医学部附属病院・講師 (12501)	
研究分担者	大塚 将之 (Ohtsuka Masayuki) (90334185)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	賀川 真吾 (Kagawa Shingo) (90507302)	千葉県がんセンター(研究所)・肝胆膵外科・主任医長 (82504)	

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