

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17606

研究課題名（和文）cGAS-STING経路の活性化と抗腫瘍免疫機構に対する影響の検討

研究課題名（英文）Investigation of cGAS-STING pathway activation and its effects on anti-tumor immune mechanisms

研究代表者

新部 彩乃（樺嶋彩乃）（NIIBE, AYANO）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・特任助教

研究者番号：20445448

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）：自然免疫機構の一つとされるcGAS-STINGシグナルは抗腫瘍機構においても免疫促進作用を有することが知られている。本研究課題では膵臓癌組織検体中のシグナル活性化レベルを解析し、その増強に基づく新規治療戦略の提案を目的とし検討を進めた。膵臓癌症例の約50%でcGASおよびSTING両方の発現が観察され、活性が維持されていた。また、そのシグナル活性と細胞傷害性T細胞の間質-腫瘍組織への浸潤レベルには正の相関が認められ、更に癌関連線維芽細胞の性質にも相違を認めた。以上のことから、癌細胞を取り巻く癌関連線維芽細胞自身の性質もまた腫瘍免疫効果を担う細胞傷害性T細胞の浸潤に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓癌は一般的に種々の治療に対して抵抗性の性質を有することが知られる。その原因としては、膵臓癌組織特有の豊富な間質組織が乏血状態を形成し、治療薬剤の局所への到達を妨げていることなどが挙げられているが、本研究課題内で明らかにした膵臓癌症例におけるcGAS-STINGシグナルの有無と細胞傷害性T細胞浸潤比率の相関性はcGAS-STINGシグナルが免疫細胞の癌局所浸潤に関与することだけでなく、癌細胞周囲の特異的な間質細胞の存在および特徴もまた腫瘍免疫反応に関与する可能性を示した。このことは奏効性が低いとされる膵臓癌における癌免疫治療効果改善への足掛かりとなるものと思われる。

研究成果の概要（英文）：cGAS-STING, a part of the innate immunity system pathway has been described to provide anti-tumor immune effects. In this project, we aimed to discover the activity and efficacy of its pathway in pancreatic cancer and to propose a novel therapeutic strategy for this dismal disease. Both cGAS and STING expression was observed in approximately 50% of pancreatic cancer cases, suggesting that the signaling was intact. The signal activation and the tissue infiltration ratio of cytotoxic T-lymphocytes were positively correlated, in addition, characteristic differences were also observed in the stromal tissue surrounding the cancer cells corresponding to the presence or absence of the signal. These findings suggest that the characteristics of the cancer-associated fibroblasts might also be involved in the infiltration of cytotoxic T cells and anti-tumor immune effects.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：cGAS-STING 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

種々の癌における免疫療法が近年適応拡大する一方で、膵臓癌においては未だその感受性は極めて低い。主要組織中の免疫抑制遺伝子の発現レベルが高いほど生存率が低いという分析結果もあることから、膵臓癌においても少なからず免疫機構が生存性に影響を与えていることが推測される。したがって、膵臓癌に対する新たな治療戦略を構築するうえで、免疫療法の感受性を上げるための試みは必須となる。

近年広く研究されているパターン認識受容体 (Pattern Recognition Receptors; PRRs) を介するシグナルは、ウイルス感染などの際に細胞質内に取り込まれた異物である外来 DNA を生体内から排除するため、感染細胞に細胞死をもたらすよう周囲の免疫システムを活性化させる。この機構は正常組織のみならず一部の腫瘍組織においても引き起こされることがこれまで知られており、腫瘍細胞にも細胞死をもたらす手段となりうる。この PRRs の一つである cGAS-STING シグナル経路は細胞質内 DNA をリガンドとして Type-I interferon などの発現を促進する。これにより癌免疫のエフェクターとされる細胞障害性 T 細胞 (Cytotoxic T Lymphocytes; CTLs) や樹状細胞 (Dendritic Cells; DCs) などの活性化を促すことで感染細胞をプログラム死に導き、恒常性の維持に働く。これまでいくつかの癌腫でこのシグナル経路が抑制されていることなどが報告されているが、膵臓癌における報告はなかった。膵臓癌においては多くの場合免疫チェックポイント阻害薬の効果が低い傾向にあるが、その理由として腫瘍間質から分泌される免疫抑制物質などにより、CTL の癌細胞への浸潤が阻害されることが主として挙げられる。膵臓癌症例における cGAS-STING シグナルの活性化状態を明らかにし、シグナルを実際にコントロールすることが可能となれば、腫瘍免疫増強を狙った新規の治療戦略の足掛かりとなると考えた。

2. 研究の目的

膵臓癌症例中の cGAS-STING の活性化について観察することを初めの目標とした。また、これまでの研究で研究代表者はミトコンドリアにおける分子的細胞死誘導メカニズムに主に着目して検討を進めてきた背景から、cGAS-STING シグナルを効率的に活性化するためのリガンドとしてミトコンドリア DNA に着目した。ミトコンドリア阻害を引き起こすための薬剤に関してはこれまで BH3 mimetics として数多くの薬剤が開発されている。効率的なミトコンドリア阻害による間接的な cGAS-STING シグナルの活性化を最終目標とし、検討を進めた。

3. 研究の方法

本研究課題では以下の項目にしたがって検討を進めた。

(1) ヒト膵臓癌組織及び細胞における cGAS-STING シグナル活性レベルの観察

cGAS-STING シグナルに関しては大腸癌や胃癌でその活性化レベルについての報告があったものの、膵臓癌における報告はなかった。したがって本研究課題では、まず臨床検体を用いてその活性化レベル評価を行った。外科的に切除された膵臓癌症例 78 例およびヒト膵臓癌細胞株 5 種に対し免疫組織化学染色およびウエスタンブロッティングを行い、cGAS および STING の発現を調べた。臨床検体は染色後病理組織学的に観察し、発現レベルごとに分類した。

(2) cGAS-STING シグナルレベルと抗腫瘍免疫担当細胞浸潤レベルの観察

前項のシグナルレベル結果と各症例における抗腫瘍関連免疫細胞浸潤との関連について免疫組織化学染色を用い観察した。更に細胞株を用い cGAS knock-out 株を作成、trans well チャンバーを用いて cGAS-STING シグナルの有無と免疫細胞の実際の遊走に関し相関性を直接観察できるモデルを構築した。

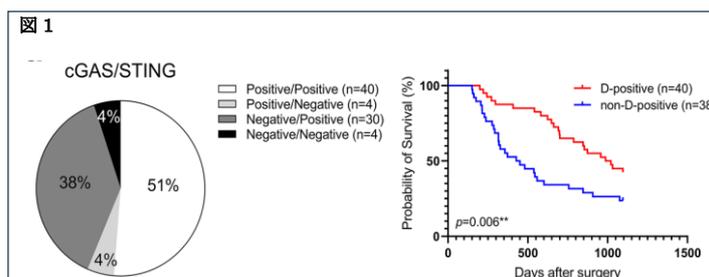
(3) BH3 mimetics による cGAS-STING シグナル活性化の観察

BH3 mimetics である Navitoclax 用い、ミトコンドリア損傷に基づく cGAS-STING シグナル活性化誘導の可否について検討した。シグナル経路の下流にある転写因子のリン酸化レベルをウエスタンブロッティングおよびレポーターアッセイにて評価した。

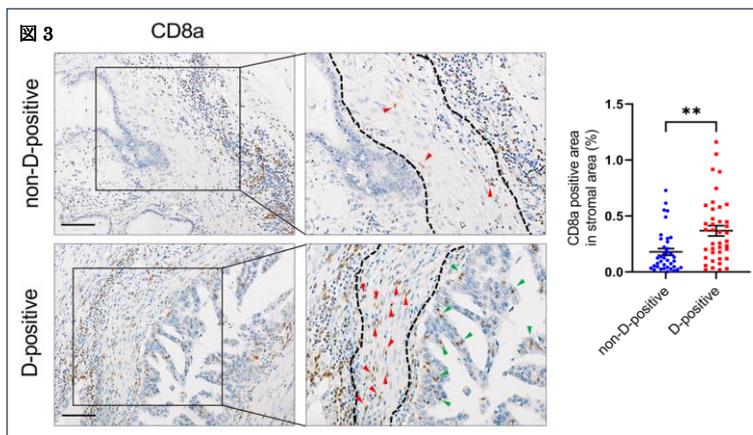
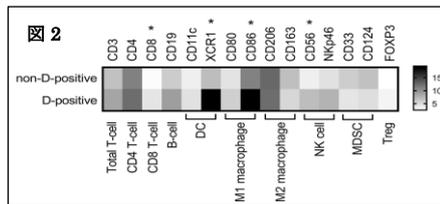
4. 研究成果

いくつかの癌腫において cGAS または STING の発現抑制が起こることがシグナルの低下につながっていることが示されている。臨床検体膵癌組織における cGAS および STING の免疫組織化学染色を行ったところ、約半数の症例で同一組織内での cGAS および STING 両方の発現が確認された (double-positive)。また、

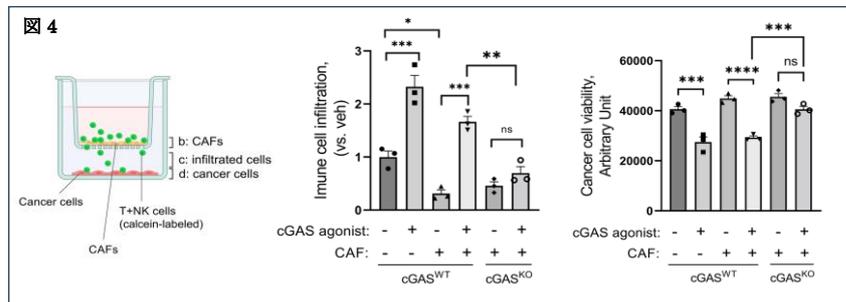
double-positive 群とそれ以外の症例に分け術後生存率を比較したところ、double-positive 群で有意に生存率が高まることを明らかにした (図 1)。また、double-positive 群とそれ以外の群では CTLをはじめとして、樹状細胞や Natural Killer (NK) 細胞など腫瘍免疫の中心となる免疫細胞群の浸潤レベルに違いがあり、cGAS および STING の発現両方の発現が高い症例で高度に保たれることを明らかにした (図 2)。膵臓癌組織ではしばしば高度に線維化した特有の虚



血性の組織が形成され、このことが各種薬剤や免疫細胞の癌組織への浸透などを妨げる要因になっていることが示されている。CTLの浸潤について組織像についてより詳細に観察を進めたところ、**cGAS** および **STING** の **double-positive** 群では癌細胞に隣接する間質部から癌組織内部にかけて多数の CTL の浸潤像が見られるのに対し(図3 赤矢印)、それ以外の **non double-positive** 群では CTL は間質組織を隔てた一部に存在し、癌細胞への浸潤が顕著に低下していた(図3 緑矢印)。続いて、この浸潤レベルの相違が間質細胞の量によるものかどうかを検証するため、各症例の α -SMA 細胞染色から線維化レベルの評価を行い、CTLの浸潤レベルとの相関性を解析したが、有意な相関は認められなかったため、間質細胞の性質について解析を進めた。近年の研究で癌間質細胞にも **heterogeneity** があることが示されており、その性質は癌促進性のものと抑制性のものに分類される。癌抑制性のマーカーとされる **Meflin** と **TIMP-1** の発現について調べたところ、**double-positive** 症例においてより両者の発現が亢進しているこ

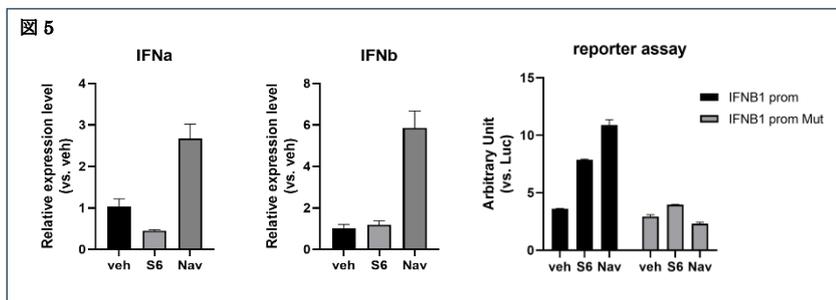


とが示された。Trans well チャンバー(図4左)を用いた癌-間質-免疫細胞の共培養系では、**cGAS-STING** シグナル活性化処理をしない群では癌間質細胞における **Meflin** と **TIMP-1** の発現が低下するとともに CTL の下部チャンバーへの浸潤はコントロール群と有意な差はなかったが、**cGAS-STING** シグナル活性化を行った群では癌間質細胞における **Meflin** および **TIMP-1** の発現は保たれ、CTL の下部チャンバーへの浸潤誘導(図4中)とそれに伴う癌細胞傷害が起こった(図4右)。



検討した。Navitoclax 処理後のミトコンドリア分画ウエスタンブロッティングにおいて、ミトコンドリア DNA 結合タンパク質である **TFAM** の減少が確認され、ミトコンドリア DNA の放出の誘導が確認できたとともに、**cGAS-STING** シグナルレポーターアッセイにおいては転写活性上昇および標的であるサイトカインの発現上昇が認められ、Navitoclax による **cGAS-STING** シグナル活性化する手段として有効であることを示した(図5)。

本研究課題により膵臓癌における **cGAS-STING** シグナルの活性化レベルと腫瘍免疫機構への関わりを明らかにすることができた。これまでこのシグナルが免疫細胞の活性かおよび局所へのリクルートを促進するものであることは知られていたが、周囲の癌間質細胞の性質とも直接相関があることは知られていなかった。以前まで癌間質細胞は一様に癌の進展を促進するものとして理解されていたが、近年では同一組織内でも癌間質細胞に **heterogeneity** があり、その役割は一様でないことが示されている。本研究の成果により、**cGAS-STING** シグナルと癌間質細胞の特徴の相関に関しては更なる細胞単体レベルでの詳細な解析の必要性が明確となった。膵臓癌治療において **cGAS-STING** シグナル活性化に加え、癌間質細胞標的による免疫細胞浸潤の障壁を突破することが膵臓癌における癌免疫療法適応への強力なブレイクスルーとなることが示唆された。



膵臓癌における癌免疫療法適応への強力なブレイクスルーとなることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kabashima A, Matsuo Y, Ito S, Akiyama Y, Ishii T, Shimada S, Masamune A, Tanabe M, Tanaka S.	4. 巻 12
2. 論文標題 cGAS-STING signaling encourages immune cell overcoming of fibroblast barricades in pancreatic cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10466
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-14297-5	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 Akasu M, Shimada S, Kabashima A, Akiyama Y, Shimokawa M, Akahoshi K, Kudo A, Yamaoka S, Tanabe M, Tanaka S	4. 巻 11
2. 論文標題 Intrinsic activation of β -catenin signaling by CRISPR/Cas9-mediated exon skipping contributes to immune evasion in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-021-96167-0	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 Ayano Kabashima, Shu Shimada, Masahiro Shimokawa, Yoshimitsu Akiyama, Minoru Tanabe, Shinji Tanaka	4. 巻 28
2. 論文標題 Molecular and immunological paradigms of hepatocellular carcinoma: Special reference to therapeutic approaches	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 62-75
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jhbp.874	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 EeeLN H. Buckarma, Nathan W. Werneburg, Caitlin B. Conboy, Ayano Kabashima, Daniel R. O'Brien, Chen Wang, Sumera Rizvi and Rory L. Smoot	4. 巻 18
2. 論文標題 The YAP-Interacting Phosphatase SHP2 Can Regulate Transcriptional Coactivity and Modulate Sensitivity to Chemotherapy in Cholangiocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1574-1588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-20-0165	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石井武、秋山好光、下川雅弘、浅野大輔、石川喜也、上田浩樹、赤星径一、新部彩乃、島田周、小川康介、小野宏晃、工藤篤、田邊稔、田中真二
2. 発表標題 膵癌におけるヒストン修飾酵素SETD1Aの新規標的遺伝子の同定と臨床的意義の解明
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

「cGAS-STINGシグナルは免疫細胞の膵臓癌線維芽細胞バリエード突破を促進する」 https://www.tmd.ac.jp/press-release/20220630-1/

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
研究協力者	正宗 淳 (Masamune Atsushi)		

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		
米国	Mayo Clinic		