

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07951

研究課題名（和文）膵がんの特徴的なCAFとTreg相互作用の遮断に基づく免疫抑制環境の解除

研究課題名（英文）Modulation of Immune suppressive tumor microenvironment based on inhibition of interaction between CAF and Treg in pancreatic cancer

研究代表者

青木 一教（Aoki, Kazunori）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：60270675

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）：免疫チェックポイント阻害剤は膵がんに対しては有効性を示せない。その原因は、膵がんが強固な免疫抑制微小環境を構築していることによる。本研究では、間質細胞を含めた免疫抑制ネットワーク機構の解明を進め、腫瘍内のがん関連繊維芽細胞（CAF）が制御性T細胞を誘導する機序を明らかとした。また、活性化しているCAFではTregが多いことも見出した。これらの成果は、膵がんに対する新しい治療開発に結び付く可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵がんは日本人のがん死因の4位を占め5年生存率は10%程度と低く、その理由の一つとして有効な治療法が少ないことがあげられる。免疫チェックポイント阻害剤も膵がんに対して効果を発揮しないため、新たな治療法を開発することが必要である。本研究では、膵がんの免疫抑制機構の一端を明らかとし、それに基づいて有望な治療標的を同定した。本研究結果は、将来的に免疫療法の開発に結び付く可能性があり、膵がんの治療体系に大きなインパクトがある。

研究成果の概要（英文）：Despite constant efforts to improve treatment, the prognosis of patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) remains poor, with an overall survival rate of 10%. PDAC is also resistant to immune therapies including immune checkpoint inhibitors. The reason for the resistance is considered that pancreatic cancer creates a highly immunosuppressive tumor microenvironment (TME), possibly due to reactive desmoplastic stroma. In this study, we analyzed the mechanism of immune suppressive network in PDAC and elucidated that the activated cancer-associated fibroblasts induce the regulatory T cells. This interaction may be a promising target for changing the immune suppressive TME of PDAC to an anti-tumor state.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：膵がん 腫瘍微小環境 がん関連繊維芽細胞 制御性T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵がんは日本人のがん死因の4位を占める。5年生存率は10%程度と低く、その理由の一つとして有効な治療法が少ないことがあげられる。免疫チェックポイント阻害剤は、メラノーマや肺がん等の多くのがん種に効果を発揮しがんの治療体系を変えてきたが、膵がんに対しては有効性を示さない。抵抗性の原因は、膵がんが強固な免疫抑制性微小環境を構築していることによると考えられ、このメカニズムを解明し膵がんに適した免疫療法を開発することが求められている。

(2) がん免疫微小環境は、細胞同士の複雑な相互作用により構築されている。従来、がん細胞と免疫細胞2者の関連の研究は進められてきたが、この関係だけではがんの免疫抑制環境がどのように構築されるかは十分に説明できず、がん間質の重要性が認識されるようになった。膵がんは間質成分に非常に富むことを組織学的特徴とする。しかし、がん関連線維芽細胞(cancer associated fibroblasts: CAF)等の間質細胞を含めた免疫抑制ネットワーク機構の解明は十分に進んでいない。

2. 研究の目的

(1) 膵がんの腫瘍内浸潤リンパ球の中でも、制御性T細胞(regulatory T cells: Treg)の絶対数やその免疫細胞における比率が多いほど、予後が不良であることが明らかとなっている¹。我々は、先行研究で、膵がん組織のCAFの免疫学的特徴を明らかとするために、CAFが産生するサイトカインを網羅的に解析したところ、CAFは膵がん細胞と比較して特徴的にActivin Aを産生しており、このActivin Aが多いほど組織内にTreg数が多いことから、Activin AがTregを誘導している可能性があることを見出した。Activin AはTGF- β スーパーファミリーに属するペプチド性増殖因子であり、細胞増殖、細胞分化、創傷治癒などの様々な生物学的機能に関与している²。

(2) 本研究の目的は、膵がんにおいて、CAFの産生するActivin Aを介したTreg誘導機序を解明し、その相互作用を阻害することにより免疫抑制環境を抗腫瘍性に変えることである。具体的に、本研究で明らかにしようとする課題は以下の3点である。

Activin AによるTreg誘導機序の解明：CAFの産生するActivin AによるTregの誘導に関して、Tregの分化・増殖・活性化のどの過程に関与しているかを検討する。

CAFのサブタイピングと特徴解析：膵がん組織の網羅的な遺伝子発現解析等を行い、特に活性化したCAFに着目して、膵がんCAFのサブタイプにおける免疫学的特徴を明らかにする。

CAFを標的とする新たな免疫療法の基礎開発：動物モデルにおいて、Activin A阻害剤により腫瘍内Tregを減少させて抗腫瘍免疫を誘導できるか検討する。

3. 研究の方法

(1) Activin AによるTreg誘導機序の解明

Activin AがTregを誘導するメカニズムを検討するために、外科切除標本から樹立した膵がんCAF株を、末梢血単核球やnaive CD4+T細胞と共培養し、Tregの分化・増殖・活性化に与える作用を検討する。

(2) CAFのサブタイピングと特徴解析

がん細胞と同様にCAFも不均一な細胞集団と考えられているが、膵がんCAFサブタイピングや、免疫抑制環境構築に関わっているCAFサブタイプの特徴はこれまで明らかとなっていない。そこで遺伝子発現解析や空間的トランスクリプトーム解析により、膵がん組織でのCAFの特徴や、Activin Aを含めた免疫関連遺伝子の発現などの免疫学的特徴を検討する。また、膵がん組織でのActivin A発現と予後等の臨床病理学的因子との関連を解析し、Activin Aの創薬標的としての臨床的有用性を検証する。

(3) CAFを標的とする新たな免疫療法の基礎開発

免疫療法開発に適したモデルとして、ヒト膵がん組織と同様に間質の豊富な組織像を示し、またActivin Aの発現レベルが高くTregの頻度が上昇している膵がんマウスモデルを確立する。本モデルを用いて、CAFが産生するActivin Aを介したTreg誘導が膵がん免疫抑制微小環境の構築に中心的な役割をはたしていることを検証するために、Activin A阻害剤等をマウスに投与し、腫瘍内のTregが減少し腫瘍特異的免疫が誘導できるかを検討する。

4. 研究成果

膵がん外科切除標本38検体を取得し、網羅的遺伝子発現解析(RNA-seq)(n=30)、フローサ

イトメトリーによる腫瘍内浸潤リンパ球のプロファイル解析(n=16 例)、空間的トランスクリプトーム解析 (n=2) CAF 株の樹立(n=14)を行った。

(1) Activin A による Treg 誘導機序の解明

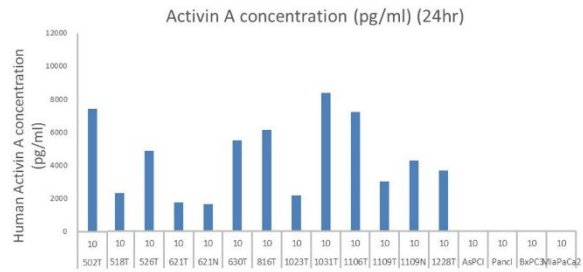
RNaseq 解析と腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)解析を行った。様々な免疫関連サイトカイン遺伝子の発現と TIL ポピュレーションの関連を解析したところ、Activin A の発現は Fr. 分画の naive Treg の頻度と正の相関を示した(P=0.03)。

ELISA を用いて、膵がん外科切除標本から樹立した CAF 14 株の培養上清中の Activin A 産生濃度を測定した。14 の CAF 株すべてで Activin A の産生がみられ、一方、膵がん細胞株では、検討した 4 株いずれでも Activin A の産生は認められなかった (図 1)。

CAF と末梢血リンパ球を共培養すると、Activin A の濃度依存的に naive Treg 及び effector Treg が誘導された(図 2)。一方、膵がん細胞株の培養上清では、Treg の頻度は変化しなかった。Activin A 阻害剤 (Follistatin) を培養液に添加すると、CAF による Treg 誘導効果は有意に減少した。

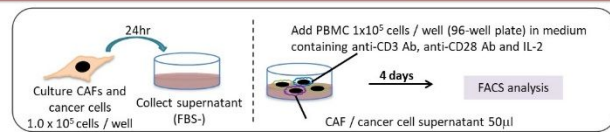
また、末梢血リンパ球の培養液に、組み換え Activin A タンパク質を添加するだけで Treg の誘導が増強されたため、CAF の産生する他のサイトカインとの相互作用は必要とせず、Activin A 単独で Treg を誘導できるものと考えられた。

図1 CAF株におけるActivin Aの産生

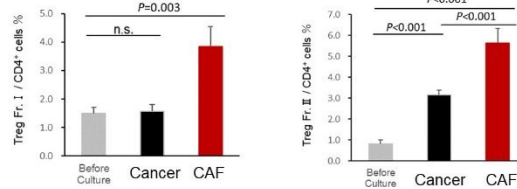


➤ 全ての膵がんCAF株においてActivin Aの産生が高く、膵がん細胞では産生が見られなかった

図2 CAF培養上清は制御性T細胞の数を増やす



膵がんCAF培養上清によるTreg分画への影響

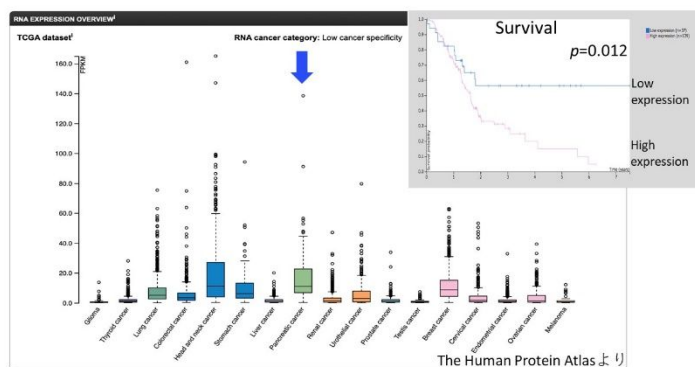


➤ CAFの培養上清は、がん細胞よりもnaive及びeffector Tregの割合を増やす効果が強い

(2) CAF サブタイピングと特徴解析

膵がん組織の RNA-seq 解析により、CAF が活性化しているほど Activin A の発現が高いこと、それらが naive Treg 頻度と相関していることを明らかとした。また、空間的トランスクリプトーム解析により、Activin A は間質部分で発現しており、CAF サブタイプによって発現状況が異なること、Activin A 発現 CAF と Treg が近接することを見出した。また、TCGA data では、他のがん種と比較して膵がんにおいて Activin A の発現が高く、発現レベルが高い症例は有意に予後不良であり、Activin A の臨床的意義を明らかとした (図 3)。

図3 各種がん組織における ActivinAの発現 (TCGA)



➤ TCGA dataで、膵がん組織においてActivin Aの発現が高い症例では予後不良である

(3) CAF を標的とする新たな免疫療法の基礎開発

3 種の K-ras 遺伝子変異マウス膵がん細胞の皮下移植腫瘍モデルを組織学的に検討し、免疫療法の開発に適切な in vivo モデルとして、間質の多い組織像を示すタイプを選別した。そのモデルを用いて、Activin A 阻害剤が抗腫瘍効果を示すことを明らかとし、新たな治療法開発に結びつく可能性を示した。

< 引用文献 >

- Ino Y, et al. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. Br J Cancer 5:914, 2013.
- Werner S, Alzheimer C. Roles of activin in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease. Cytokine Growth Factor Rev. 17:157-71, 2006.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Aoki K, Nishito N, Motoi N, Arai Y, Hiraoka N, Shibata T, et al.	4. 巻 3
2. 論文標題 Tumor-infiltrating lymphocyte profiling defines three immune subtypes of NSCLC with distinct signaling pathways and genetic alterations	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Res Communications	6. 最初と最後の頁 1026-8211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2767-9764.CRC-22-0415.	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 Mitsunaga S, Ikeda M, Imaoka H, Sasaki M, Watanabe K, Sato A, Aoki K, Ochiai A, Makikawa M, Nishidate M, Yamaguchi K, Terao K, Sawada N, Fujitomo T, Fujii E, Kato A, Tsunoda H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Fibroblast inhibition by tocilizumab enabled gemcitabine/nab-paclitaxel rechallenge for pancreatic cancer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 4006-4019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15929.	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 Ohashi K, Nishito Y, Fukuda H, adahiro R, Yoshida Y, atanabe S, Motoi N, Sonobe Y, Mizuno M, Tsunoda H, Tatsumi K, uzuki T, Ochiai A, Aoki A.	4. 巻 14
2. 論文標題 Neutrophil-to-lymphocyte ratio is a prognostic marker reflecting immune condition of tumor microenvironment in squamous cell lung cancer.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Sci Rep	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/s41598-023-50378-9.	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 -
1. 著者名 Fukuda H, Arai K, Mizuno H, Nishito Y, Motoi N, Arai Y, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular subtypes of lung adenocarcinoma presents distinct immune tumor microenvironment.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Sci	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） 10.1111/cas.16154	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 M Zhang, T Kiyono, K Aoki, N Goshima, S Kobayashi, K Hiranuma, K Shiraishi, H Saya, T Nakahara	4. 巻 113
2. 論文標題 Development of an in vitro carcinogenesis model of HPV-induced cervical adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 904-915
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15246.	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 G Furuya, H Katoh, S Atsumi, I Hashimoto, D Komura, R Hatanaka, S Senga, S Hayashi, S Akita, H Matsumura, A Miura, H Mita, M Nakakido, S Nagatoishi, A Sugiyama, R Suzuki, H Konishi, A Yamamoto, H Abe, N Hiraoka, K Aoki, Y Kato, T Ushiku, Y Seto, C Yoshimura, K Miyadera, K Tsumoto, S Ishikawa	4. 巻 114
2. 論文標題 Identification of pH-selective Dual-specific Human Antibodies with Therapeutic Applicability Dominated through Tumor-driven Epitope Spreading	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 48-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15596	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 M Karayama, Y Mizoguchi, Y Inoue, H Hozumi, Y Suzuki, K Furuhashi, T Fujisawa, N Enomoto, Y Nakamura, N Inui, T Suda, S Kitano, K Aoki, Y Yamada,	4. 巻 4
2. 論文標題 An increase in peripheral blood CD86-positive plasmacytoid dendritic cells is associated with immune-related adverse events after immune checkpoint inhibitor therapy in patients with non-small cell lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Global Health Medicine	6. 最初と最後の頁 301-308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35772/ghm.2022.01052	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 A Hirata, E Sawai, M Henmi, C Shibasaki, Y Mizoguchi, K Narumi, K Aoki.	4. 巻 45
2. 論文標題 Imatinib mesylate exerted antitumor effect by promoting increased infiltration of effector T cells in tumor.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 34-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b21-00493	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0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 青木一教	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 220
3. 書名 実験医学（増刊）がん微小環境に1細胞レベルで挑む	

〔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
---------	---------