

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08779

研究課題名(和文) 膵癌におけるマクロファージ免疫チェックポイント dual mechanism の解明

研究課題名(英文) Macrophage immune checkpoint dual mechanism in pancreatic cancer

研究代表者

岩本 千佳 (Iwamoto, Chika)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：10752842

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)：膵癌はPD-L1の発現やneoantigenの発現も少なく、組織内への免疫細胞浸潤も乏しい為、免疫チェックポイント阻害薬が効きにくい。一方、造血器腫瘍ではマクロファージ免疫チェックポイントの制御により腫瘍細胞が減少し、強力な奏功が報告されているが、膵癌における有効なマクロファージ免疫チェックポイント分子やその作用機序はほとんど解明されていない。そこで、マクロファージ免疫チェックポイントによる膵癌微小免疫環境の維持機構を解明しようと考えた。NACにより増加した腫瘍内細菌が、免疫細胞の腫瘍内浸潤やマクロファージのphenotypeや貪食機能を変化させることで、癌の進展を促していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌において、NACにより増加した腫瘍内細菌が腫瘍内に浸潤する免疫細胞のphenotypeや機能を変化させることで、癌進展を促す可能性があることを見出した。これにより腫瘍浸潤免疫細胞の機能を変化させることで、腫瘍免疫微小環境を改変させ、持続的な抗腫瘍効果が期待できる治療戦略に役立つ成果であり、学術的意義が高いと言える。また、腫瘍内細菌に着目した膵癌患者における新たな治療戦略の道を切り開くことになる可能性があり、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is less likely to respond to immune checkpoint inhibitors because of its low expression of PD-L1 and neoantigen and poor immune cell infiltration into the tissue. On the other hand, although strong responses have been reported in hematological malignancy due to the regulation of macrophage immune checkpoints, effective macrophage immune checkpoint molecules and their mechanisms of action in pancreatic cancer have not been elucidated to date. Therefore, we sought to elucidate the mechanism of maintenance of the pancreatic cancer immune microenvironment by the macrophage immune checkpoint. It was suggested that intratumor bacteria increased by NAC promote cancer progression by altering immune cell infiltration into the tumor and macrophage phenotype and phagocytic functions.

研究分野：腫瘍免疫学、分子腫瘍学

キーワード：膵癌 腫瘍免疫微小環境 マクロファージ

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は早期発見が難しく治療抵抗性を示すことから予後不良な癌の一つである<sup>1</sup>。近年、癌免疫治療の有用性が様々な癌腫で報告されており、肺癌、乳癌、大腸癌、胃癌など多くの癌腫において、現在臨床応用されている免疫チェックポイント阻害剤(抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体)による治療が進められている。膵癌においてもこれらの免疫チェックポイント阻害剤の有効性が期待されたが、良好な効果は得られていない。その原因として、膵癌は PD-L1 の発現が低くかつリンパ球が少ない腫瘍で、腫瘍特異的変異抗原(neoantigen)の発現も少なく、これら T 細胞関連の免疫チェックポイント阻害剤の効きにくい癌腫とされていることが挙げられる<sup>2</sup>。しかし、最近、膵癌免疫療法の新たな標的候補としてマクロファージ(M<sub>1</sub>)上に発現している分子 VISTA が特定された。VISTA は T 細胞を不活性化することで知られており、活性化 VISTA 経路が PD-L1 による阻害以上に腫瘍での活性化 T 細胞を抑制することがわかった<sup>3</sup>。M<sub>1</sub> の主な働きの一つが食作用であり、自己と非自己の識別による Anti-phagocytosis もしくは Pro-phagocytosis が起こる。自己の細胞には CD47 が発現しており、M<sub>1</sub> 上の免疫チェックポイント分子 Sirpa と結合することで自己と認識され、“Don't eat me” signal のスイッチが入るため貪食されない<sup>4</sup>。膵癌では癌幹細胞で CD47 が高発現しており、*in vitro* においては CD47 を阻害することで M<sub>1</sub> による貪食作用が促進されたが、異種移植モデルでは CD47 単独では腫瘍増殖に有意な差は得られなかったとの報告もあり、膵癌におけるマクロファージ免疫チェックポイントの作用機序はまだ不明な点が多い。マクロファージ免疫チェックポイント機構をターゲットとした抗腫瘍免疫の制御は、宿主が本来持つ癌免疫機能の回復が期待できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

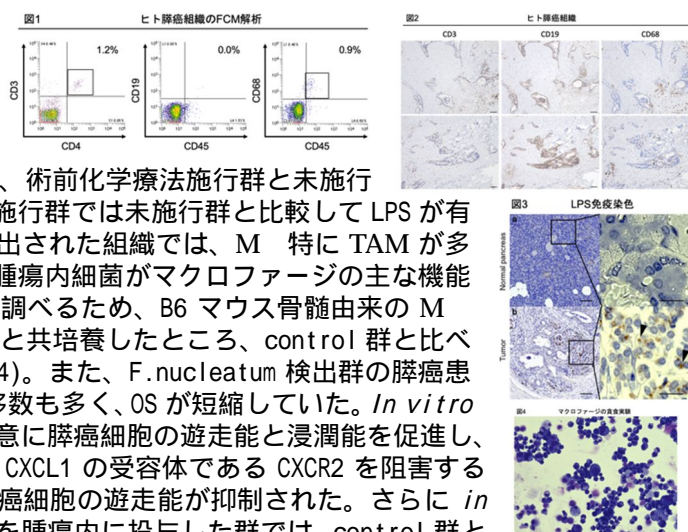
正常な免疫環境においては、M<sub>1</sub> の“Don't eat me” signal と“Eat me” signal のバランスが保たれており、不要になった細胞や病原体などの除去が適切に行われている。腫瘍細胞のみを除去するためには、自己/非自己認識のこのバランスを保ちながら制御することが不可欠である。そこで我々は、膵癌におけるマクロファージ免疫チェックポイントの機序を“Don't eat me” signal と“Eat me” signal の両面より解明しようと考えた。また、マクロファージ免疫チェックポイントの応答に腫瘍内細菌が及ぼす影響や、術前化学療法の治療効果や予後に与える影響についても明らかにする。腫瘍内細菌が膵癌免疫微小環境に与える影響をマクロファージ免疫チェックポイントの側面から明らかにしようと考えた。

### 3. 研究の方法

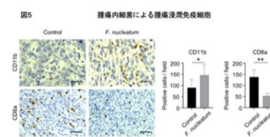
膵癌組織中に浸潤している免疫細胞の phenotype と発現量を FCM 解析や免疫組織染色にて評価・定量する。術前化学療法の有無で腫瘍内細菌や免疫細胞や予後などに違いがあるかを比較、検討する。また、腫瘍内細菌と腫瘍浸潤免疫細胞との間で相関があるかも検討する。さらに腫瘍内細菌の一つとして報告されている *F.nucleatum* を投与した *in vivo* モデルを用い、腫瘍内細菌による膵癌細胞への影響や腫瘍浸潤免疫細胞への影響を FCM 解析や免疫組織染色や抗体治療により評価する。腫瘍内細菌(*F.nucleatum*)の評価にはグラム陰性菌の細胞壁成分である LPS を用いる。

### 4. 研究成果

膵癌切除組織を用い膵癌組織内に発現する免疫細胞を FCM 解析にて検討したところ、CD4<sup>+</sup> T 細胞や CD68<sup>+</sup> M<sub>1</sub> が認められた(図 1)。免疫染色においても同様の傾向がみられた(図 2)。腫瘍内細菌の成分である LPS は正常組織と比較して、膵癌組織内で有意に多く検出された(図 3)。また、術前化学療法施行群と未施行群で比較したところ、術前化学療法施行群では未施行群と比較して LPS が有意に多く検出された。LPS が多く検出された組織では、M<sub>1</sub> 特に TAM が多く存在することがわかった。そこで腫瘍内細菌がマクロファージの主な機能の一つである貪食能に与える影響を調べるため、B6 マウス骨髄由来の M<sub>1</sub> を *F.nucleatum* で刺激し、膵癌細胞と共培養したところ、control 群と比べ貪食能が低下する傾向にあった(図 4)。また、*F.nucleatum* 検出群の膵癌患者は、腫瘍径が大きく、リンパ節転移数も多く、OS が短縮していた。*In vitro* の実験において、*F.nucleatum* は有意に膵癌細胞の遊走能と浸潤能を促進し、膵癌細胞の CXCL1 産生を促進した。CXCL1 の受容体である CXCR2 を阻害すると、*F.nucleatum* により促進した膵癌細胞の遊走能が抑制された。さらに *in vivo* モデルにおいて、*F.nucleatum* を腫瘍内に投与した群では、control 群と



比較して、腫瘍の増大を認め、CD11b+ マクロファージや MDSC の増加、CD8+ T 細胞の減少が見られた(図 5)。抗 CXCL1 抗体、CXCR2 阻害剤による治療実験では、腫瘍増大が抑制された。膵癌において、術前化学療法により腫瘍内細菌が増加する可能性があり、腫瘍内細菌の一つである *F.nucleatum* は、膵癌細胞の CXCL1 産生を促進し、癌細胞自身や腫瘍内の免疫微小環境を改変することで、癌の進展を促していることが示唆された。またこれには、免疫細胞の中でも特にマクロファージの phenotype や貪食機能の変化が深く関わっていることが示唆された。



#### 引用文献

- 1 R.L. Siegel, K.D. Miller, and A. Jemal. Cancer statistics, 2018, CA. Cancer J. Clin. 2018, 68(1):7-30.
- 2 Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, and Smyth MJ. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. Cancer Res. 2015, 75(11)2139-2145.
- 3 Blando J, Sharma A, Higa MG, and Sharma P. Comparison of immune infiltrates in melanoma and pancreatic cancer highlights VISTA as a potential target in pancreatic cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019, 116(5)1692-1697.
- 4 Tsai RK and Discher DE. Inhibition of “self” engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. J Cell Biol. 2008, 180(5)989-1003.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Guan Weiyu, Nakata Kohei, Sagara Akiko, Iwamoto Chika, Endo Sho, Matsuda Ryota, Matsumoto Sokichi, Ikenaga Naoki, Shindo Koji, Moriyama Taiki, Onishi Hideya, Ohuchida Kenoki, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 22
2. 論文標題 Erratum to “ERAP2 is a novel target involved in autophagy and activation of pancreatic stellate cells via UPR signaling pathway” [Pancreatology 22 (1) (2022 Jan) 9-19]	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 1059 ~ 1059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2022.08.013	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, Nakamura Masafumi	4. 巻 14
2. 論文標題 Heterogeneity of Cancer-Associated Fibroblasts and the Tumor Immune Microenvironment in Pancreatic Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3994 ~ 3994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14163994	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 and Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 89
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 -
1. 著者名 Feng Haimin, Moriyama Taiki, Ohuchida Kenoki, Sheng Nan, Iwamoto Chika, Shindo Koji, Shirahane Kengo, Ikenaga Naoki, Nagai Shuntaro, Nakata Kohei, Mizumoto Kazuhiro, Nakamura Masafumi	4. 巻 40
2. 論文標題 N-acetyl cysteine induces quiescent-like pancreatic stellate cells from an active state and attenuates cancer-stroma interactions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	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) 10.1186/s13046-021-01939-1	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 Sagara Akiko, Nakata Kohei, Yamashita Tomohiro, Guan Weiyu, Zhong Pingshan, Matsumoto Sokichi, Endo Sho, Iwamoto Chika, Shindo Koji, Ikenaga Naoki, Moriyama Taiki, Ohuchida Kenoki, Mizumoto Kazuhiro, Nakamura Masafumi	4. 巻 21
2. 論文標題 New high-throughput screening detects compounds that suppress pancreatic stellate cell activation and attenuate pancreatic cancer growth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 1071 ~ 1080
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2021.04.002	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 Iwamoto Chika, Ohuchida Kenoki, Shinkawa Tomohiko, Okuda Sho, Otsubo Yoshiki, Okumura Takashi, Sagara Akiko, Koikawa Kazuhiro, Ando Yohei, Shindo Koji, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Moriyama Taiki, Miyasaka Yoshihiro, Ohtsuka Takao, Eto Masatoshi, Akashi Koichi, Nakamura Masafumi	4. 巻 512
2. 論文標題 Bone marrow-derived macrophages converted into cancer-associated fibroblast-like cells promote pancreatic cancer progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 15 ~ 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2021.04.013	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 Sagara Akiko, Nakata Kohei, Matsumoto Sokichi, Guan Weiyu, Shinkawa Tomohiko, Iwamoto Chika, Ikenaga Naoki, Ohuchida Kenoki, Nakamura Masafumi	4. 巻 22
2. 論文標題 Repositioning of duloxetine to target pancreatic stellate cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	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) 10.3892/ol.2021.13005	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 Hayashi Masataka, Ikenaga Naoki, Nakata Kohei, Luo Haizhen, Zhong PingShan, Date Satomi, Oyama Koki, Higashijima Nobuhiro, Kubo Akihiro, Iwamoto Chika, Torata Nobuhiro, Abe Toshiya, Yamada Yutaka, Ohuchida Kenoki, Oda Yoshinao, Nakamura Masafumi	4. 巻 114
2. 論文標題 Intratumor <i>Fusobacterium nucleatum</i> promotes the progression of pancreatic cancer via the CXCL1-CXCR2 axis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3666 ~ 3678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15901	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 Fei Shuang、Ohuchida Kenoki、Kibe Shin、Yan Zilong、Iwamoto Chika、Shinkawa Tomohiko、Zhang Bo、Kawata Jun、Abe Toshiya、Ideno Noboru、Ikenaga Naoki、Nakata Kohei、Oda Yoshinao、Nakamura Masafumi	4. 巻 149
2. 論文標題 Involvement of angiogenesis in cancer-associated acinar-to-ductal metaplasia lesion of pancreatic cancer invasive front	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 5885 ~ 5899
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00432-022-04554-5	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 -

〔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 新川智彦, 大内田研宙, 持田郁己, 井手野昇, 水内祐介, 進藤幸治, 池永直樹, 森山大樹, 仲田興平, 中村雅史
2. 発表標題 異なる薬物治療反応性を示す微小環境因子依存性に基づいた新たな膵癌サブタイプ分類
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

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 岩本千佳, 大内田研宙, 新川智彦, 小山虹輝, 奥田翔, 進藤幸治, 池永直樹, 仲田興平, 江藤正俊, 中村雅史
2. 発表標題 Development of PDX models with functional human blood and immune systems in pancreatic cancer
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 新川智彦, 大内田研宙, 持田郁己, 奥田翔, 大坪慶志輝, 岩本千佳, 進藤幸治, 池永直樹, 仲田興平, 中村雅史
2. 発表標題 膵癌における癌関連線維芽細胞由来の微小環境因子が腫瘍分化度に与える影響についての検討
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 岩本千佳, 大内田研宙, 新川智彦, 相良亜希子, 奥田翔, 小山虹輝, 進藤幸治, 池永直樹, 仲田興平, 森山大樹, 中村雅史
2. 発表標題 造血幹細胞由来CAF subsetが腫瘍内heterogeneityを高度化する
3. 学会等名 第52回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masataka Hayashi, Naoki Ikenaga, Kohei Nakata, Haizhen Luo, PingShan Zhong, Koki Oyama, Nobuhiro Higashijima, Akihiro Kubo, Satomi Date, Chika Iwamoto, Kenoki Ohuchida, Masafumi Nakamura
2. 発表標題 Biological effects of intratumor periodontal pathogens in pancreatic cancer
3. 学会等名 54th American Pancreatic Association Annual Meeting
4. 発表年 2023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	大内田 研宙  (Ohuchida Kenoki)  (20452708)	九州大学・医学研究院・准教授    (17102)	

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