

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：24405

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16428

研究課題名(和文) 抗原提示性癌関連線維芽細胞が腫瘍免疫に及ぼす影響の解析と大腸癌免疫治療への応用

研究課題名(英文) The role of antigen-presenting CAF for tumor progression in CRC

研究代表者

笠島 裕明 (Kasashima, Hiroaki)

大阪公立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：10899678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は「apCAFによる腫瘍免疫応答調節を介した癌免疫療法治療抵抗性メカニズムの解明」である。ヒト遺伝子発現情報データベースを用いた解析より、癌間質から分離培養された線維芽細胞においてapCAFマーカーは上昇していた。apCAFマーカー癌間質細胞陽性症例において陰性症例と比較し有意に無再発生存期間が不良であった。これらの結果は線維芽細胞における抗原提示能が腫瘍免疫及び腫瘍進展に関与していることを示唆している。マウス直腸同所移植腫瘍からCAFを抽出したところ、26%がapCAFであった。現在、apCAFの抽出に成功しており、ゲノムシーケンズ解析を用いた機能解析を施行中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌免疫療法は、従来の癌治療と異なり癌の微小環境を標的とした治療法であり、国内外で多数の報告がなされているが、大腸癌の約8割の症例には癌免疫療法の有効性は不良であり、その癌免疫療法治療抵抗性メカニズムは未だ十分に解明されていない。この研究結果より癌免疫療法治療抵抗性の原因として癌微小環境、特に線維芽細胞による腫瘍免疫抑制が推察され、今後難治性癌治療において重要な意味を持つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Background: Antigen-presenting cancer-associated fibroblast (apCAF) is recently reported to be the important CAF subpopulation which regulate tumor immunity. We aim to clarify the role and effect of apCAF for tumor progression in CRCs. Method: Bioinformatic analysis and IHC analysis were performed. Flow cytometry was also performed to isolate apCAF from orthotopic tumor in mouse rectum inoculated with mouse tumor organoid. Result: The apCAF markers were highly upregulated in CAF isolated form human CRCs and metastatic liver tumor compared to normal fibroblast in colon. The prognosis of the CRC patients who have positive expression of apCAF marker was poorer than those who have negative expression of apCAF. The percentage of apCAF in orthotopic rectal tumor in mouse was approximately 26%. Discussion: In CRC, apCAF may stimulate the tumor progression. We will seek to clarify the association between apCAF and tumor immunosuppression.

研究分野：癌微小環境

キーワード：線維芽細胞 大腸癌 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

癌の増殖や浸潤、遠隔転移は癌細胞と癌細胞周囲の微小環境との相互作用が重要であり、抗癌剤や分子標的治療薬による治療抵抗性獲得にも関与していることが明らかとなっている。近年注目されている癌免疫療法は、大腸癌においては十分な有効性が確認されておらず、治療抵抗性に関わるメカニズムの解明及び新規治療法の開発が不可欠である。

近年、大腸癌を遺伝子パターンに基づき、免疫型 (CMS1)、標準型 (CMS2)、代謝型 (CMS3)、間葉型 (CMS4) に分類する方法が用いられており、その中で最も予後が不良であり大部分が癌免疫療法抵抗性を示すと報告されている間葉型 (CMS4) は、間質、特に癌関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblast; CAF) の活性化が特徴とされる。申請者はこれまで CAF が腫瘍進展へ及ぼす影響を解析してきた (*Am J Pathol.*, 2016; *Br J Cancer*, 2015; *Gastric Cancer*, 2015; *Cancer Letter*, 2014)。また申請者らは Single-cell RNA sequence 法を用いて、大腸癌オルガノイド同所移植モデル腫瘍を解析し、癌の進展及び転移に関与する CAF の subpopulation を同定し、これらの CAF が癌微小環境において腫瘍免疫応答を調節し、腫瘍進展及び転移に関与することを明らかにしている (*Dev Cell*, 2021)。

最近、新たな CAF の subpopulation として抗原提示能を持つ CAF (Antigen-presenting CAF; apCAF) が膵癌及び乳癌で報告された (*Nat Cancer*, 2020; *Cancer Discov.*, 2019)。apCAF は抗原提示を介して T 細胞の自己寛容や制御性 T 細胞への分化を誘導することで抗腫瘍免疫細胞の働きを抑制するメカニズムが提唱されている。apCAF による腫瘍免疫調節メカニズムを明らかにすることは、免疫療法治療抵抗性大腸癌に対する新規治療法の開発につながる可能性があり臨床で極めて有用と考えられる。

2. 研究の目的

癌オルガノイドを用いた浸潤・肝転移大腸癌モデルでの検討から、apCAF による腫瘍免疫応答調節を介した癌免疫療法治療抵抗性メカニズムの解明及び大腸癌新規治療法の開発に寄与すること

3. 研究の方法

ヒト遺伝子データベースを用いた大腸癌組織由来線維芽細胞における apCAF マーカー発現の検討

大腸癌組織より樹立した線維芽細胞、正常組織由来大腸線維芽細胞、肝転移巣より樹立した線維芽細胞を用いて mRNA を抽出し抗原提示能に関連する遺伝子発現を比較検討する。

ヒト大腸癌間質組織における apCAF 発現の臨床病理学的意義に関する検討

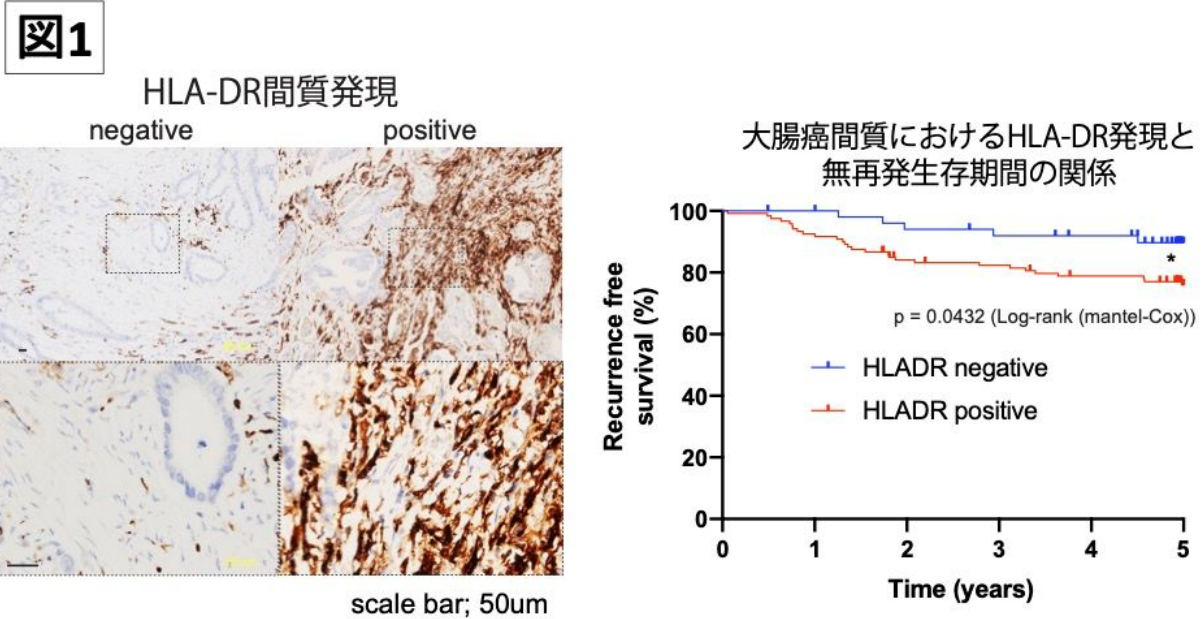
大腸癌切除標本パラフィン包埋切片を用い、癌間質細胞における apCAF マーカーの発現を免疫組織学的染色を用いて大腸癌患者の予後に関して解析する。さらに線維芽細胞マーカーと共に免疫蛍光多重染色法で検討する。

大腸癌同所移植モデルを用いた癌微小環境における抗原提示性癌関連線維芽細胞 (apCAF) の同定及び機能解析

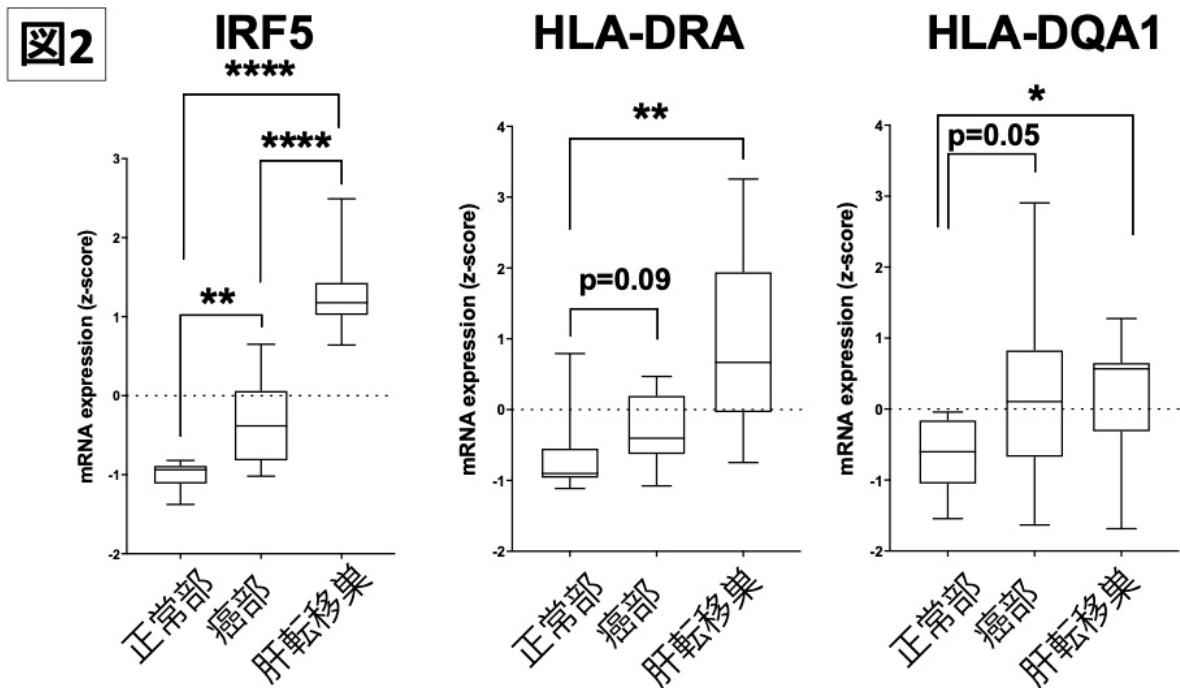
マウス癌オルガノイド (MTO) を用いた直腸同所移植により得られた直腸局所腫瘍からフローサイトメトリーを用いて CAF を抽出し、apCAF 関連マーカーの発現をフローサイトメトリーおよび qRT-PCR にて評価する。

4. 研究成果

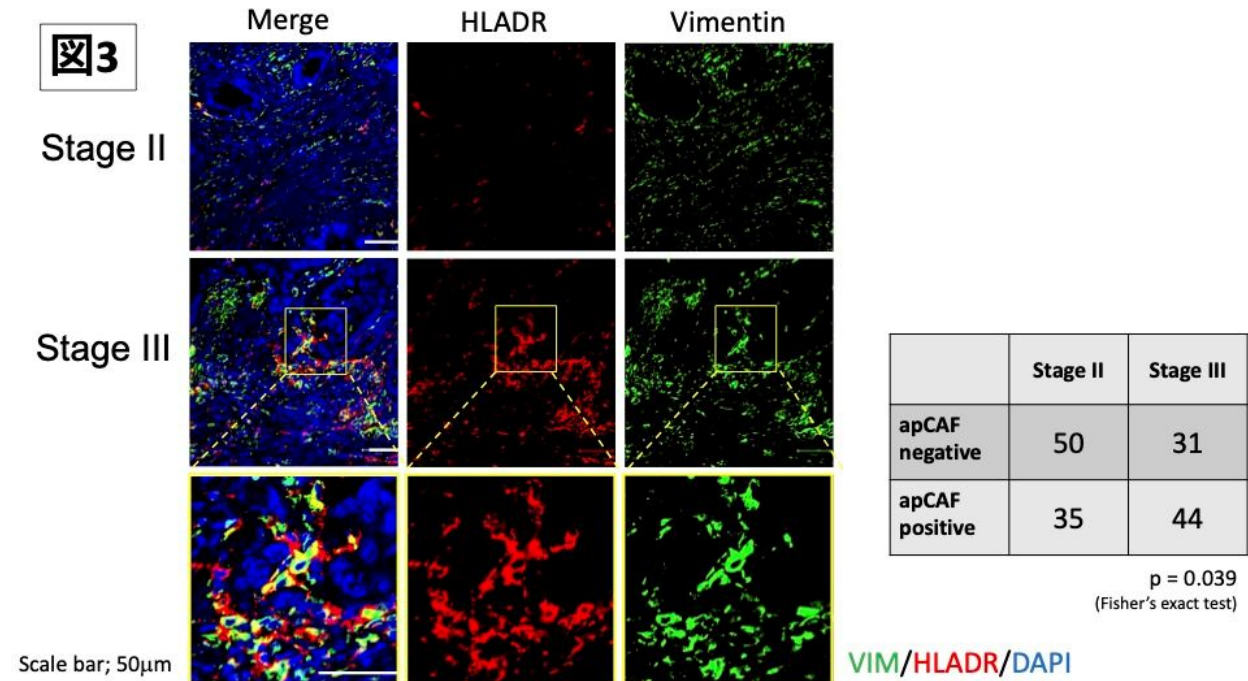
ヒト大腸癌組織標本を用いて、apCAF マーカーとして報告されている HLA-DR 抗体による免疫組織学的染色を行い、癌間質細胞における HLA-DR 発現と大腸癌患者の予後との関連を解析し、癌間質細胞陽性症例において陰性症例と比較し有意に無再発生存期間が不良であった(図 1)。



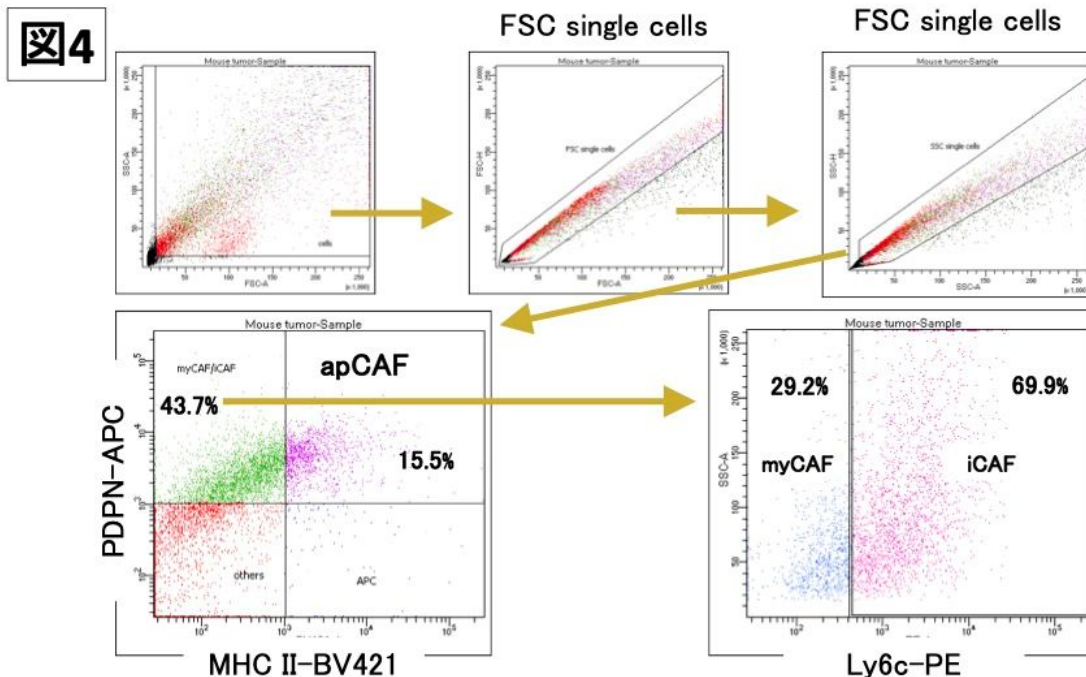
また、ヒト遺伝子発現情報データベースを用いた大腸癌の解析により、癌間質部分から分離培養された線維芽細胞において apCAF マーカー (IRF5、HLA-DRA、HLA-DQA1) は正常部に比較し上昇しており、肝転移巣ではさらに上昇していることが確認された(図 2)。



さらに線維芽細胞マーカーである Vimentin と apCAF マーカーである HLA-DR の蛍光二重染色により大腸癌間質に HLA-DR 陽性線維芽細胞が同定され、Stage II に比較し Stage III でより高率に陽性症例が認められた(図 3)。



続いて、CAF の集積を特徴とする CMS4 癌に酷似した高悪性度大腸癌をマウス直腸に形成する MTO (大腸癌の責任遺伝子 4 種(APC, KRAS, TP53, TGFBR2)の変異を導入し樹立されたオルガノイド) を用いて直腸同所移植腫瘍からフローサイトメトリーで CAF (podoplanin 陽性細胞) を抽出したところ、CAF 全体のうち 26% が apCAF (podoplanin/MHC classII 陽性細胞) であった(図 4)。



考察；

上記の結果より、線維芽細胞における抗原提示能が腫瘍免疫及び腫瘍進展に関与していることを示唆しており、癌細胞 間質線維芽細胞相互作用が apCAF を介して腫瘍免疫を制御している可能性へとつながり、臨床上極めて重要な事象である。今後抽出した apCAF を RNA シーケンス解析にて腫瘍免疫へ及ぼす影響のメカニズムを明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Martinez-Ordoez Anxo, Duran Angeles, Ruiz-Martinez Marc, Cid-Diaz Tania, Zhang Xiao, Han Qixiu, Kinoshita Hiroto, Muta Yu, Linares Juan F., Kasashima Hiroaki, Nakanishi Yuki, Yashiro Masakazu, Maeda Kiyoshi, Pannellini Tania, Pigazzi Alessio, Diaz-Meco Maria T., Moscat Jorge	4. 巻 41
2. 論文標題 Hyaluronan driven by epithelial aPKC deficiency remodels the microenvironment and creates a vulnerability in mesenchymal colorectal cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Cell	6. 最初と最後の頁 252 ~ 271.e9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ccell.2022.11.016	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
1. 著者名 SHIBUTANI MASATSUNE, KASHIWAGI SHINICHIRO, FUKUOKA TATSUNARI, ISEKI YASUHITO, KASASHIMA HIROAKI, MAEDA KIYOSHI	4. 巻 37
2. 論文標題 The Significance of the D-Dimer Level as a Prognostic Marker for Survival and Treatment Outcomes in Patients With Stage IV Colorectal Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 440 ~ 444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.13097	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 Sugimoto Atsushi, Fukuoka Tatsunari, Shibutani Masatsune, Kasashima Hiroaki, Kitayama Kishu, Ohira Masaichi, Maeda Kiyoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Prognostic significance of the Naples prognostic score in colorectal cancer patients undergoing curative resection: a propensity score matching analysis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	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/s12876-023-02722-6	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 Sugimoto Atsushi, Fukuoka Tatsunari, Nagahara Hisashi, Shibutani Masatsune, Iseki Yasuhito, Kasashima Hiroaki, Sasaki Maho, Ohira Masaichi, Maeda Kiyoshi	4. 巻 408
2. 論文標題 Predictive value of the Naples prognostic score on postoperative outcomes in patients with rectal cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Langenbeck's Archives of Surgery	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) 10.1007/s00423-023-02851-2	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 Yamamoto Yurie, Kasashima Hiroaki, Fukui Yasuhiro, Tsujio Gen, Yashiro Masakazu, Maeda Kiyoshi	4. 巻 114
2. 論文標題 The heterogeneity of cancer associated fibroblast subpopulations: Their origins, biomarkers, and roles in the tumor microenvironment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 16~24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15609	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 笠島裕明 福岡達成 渋谷雅常 田中浩明 八代正和 前田清
2. 発表標題 大腸癌同所移植モデルと single-cell RNA sequence を用いた癌関連線維芽細胞 が及ぼす腫瘍免疫への影響の解析
3. 学会等名 第43回癌免疫外科研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroaki Kasashima, Kisyu Kitayama, Yuichiro Miki, Mami Yoshii, Tatsunari Fukuoka, Tatsuro Tamura, Masatsune Shibutani, Takahiro Toyokawa, Hiroaki Tanaka, Shigeru Ree, Masakazu Yashiro, Kiyoshi Maeda
2. 発表標題 The role of antigen-presenting CAFs for tumor-related immune microenvironment in colon cancer
3. 学会等名 第81回日本癌学会
4. 発表年 2022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

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	Weill Cornell Medical College	Pathology and Laboratory Medicine	Moscato & Diaz-Meco Lab