

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19531

研究課題名（和文）治療後膵癌オルガノイドを用いた微小免疫環境の解析と再現およびその免疫再改変

研究課題名（英文）Analysis and remodeling of immune microenvironment using pancreatic cancer organoids after treatment

研究代表者

中村 雅史（NAKAMURA, Masafumi）

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：30372741

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：消化器癌における術前治療に伴う腫瘍免疫微小環境の変化を評価するために、すでに取得していた消化器癌scRNAseqデータの中で術前療法を施行した食道癌データを用いてpreliminaryな評価を行い、術前治療群での形質細胞の増加、抗体産生能の上昇、CD8陽性Tリンパ球の疲弊化の低下を認めた。現在術前化学療法を実施した膵癌のpublic公開データを入手しており、食道癌データで得られた知見に注目しながら解析を進めている。一方で、ヒト膵癌細胞株・樹状細胞・癌線維芽細胞などを用いた3次元ALIオルガノイドモデルを樹立し、膵癌微小環境を再現、治療による免疫学的変動を検討している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は早期発見が困難であり、様々な治療に対し抵抗性を示す最も予後不良な癌腫である。これまでの膵癌の研究の多くは治療耐性株などの癌細胞のみを対象にしたものが多かったが、本研究はヒト切除サンプルを用いて癌細胞のみならず、免疫細胞などを対象にシングルセル解析を行うことで、単一細胞レベルでの術前治療に伴う様々な免疫細胞の機能的不均一性の変動解析を行うことができた。さらにALIオルガノイドモデルという腫瘍免疫微小環境を3次元的に再現した新たなモデルの樹立に成功した。今後このモデルを用いた治療実験などを行うことにより、化学療法の感受性や耐性獲得などの治療抵抗性に関する詳細な理解が期待される。

研究成果の概要（英文）：To evaluate changes in tumor immune microenvironment with pre-operative treatment in gastrointestinal cancers, we analyzed data of esophageal cancer with pre-operative chemotherapy obtained on our laboratory. We analyzed these data focusing on the chemotherapy. In the group with neo-adjuvant chemotherapy, plasma cells increased and enhanced antibody-secreting. On the other hand, CD8+ T cells with neo-adjuvant chemotherapy downregulated the expression of dysfunction. We obtained public data of pancreatic cancer with neo-adjuvant chemotherapy and start to analyze these data focusing on these new insights of esophageal cancers.

On the other hand, we succeeded to establish 3D ALI-organoid models using human pancreatic cancer cell lines, dendritic cells and cancer-associated fibroblasts.

研究分野：医歯薬学

キーワード：治療抵抗性 腫瘍免疫微小環境 膵癌 scRNAseq オルガノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は早期発見が困難であり、様々な治療に対し抵抗性を示す最も予後不良な癌腫であるが、このような抵抗性の獲得には免疫細胞を含む腫瘍周囲微小環境を構成する細胞群と癌細胞との相互作用が大きく関与している。抗癌剤などによる治療の早期には腫瘍の壊死や腫瘍抗原が放出され抗腫瘍免疫が賦活化されるが、治療継続により慢性的な抗原曝露に伴い免疫細胞の exhaustion が再度引き起こされ治療抵抗性を獲得している可能性があると考えられている。これまでの膵癌の研究の多くは治療耐性株などの癌細胞のみを対象にしたものが多く、腫瘍免疫と治療抵抗性との関連を検討した報告はこれまでにない。

2. 研究の目的

抗がん剤治療や放射線治療、癌免疫治療を施行した自然発癌マウス由来膵癌組織から免疫系を構築した ALI オルガノイドモデルを樹立し、腫瘍免疫を含めた治療応答機序および抵抗性獲得に関わる機能的な細胞集団や微小環境変化を新たに同定し、さらにその細胞集団の機能的特徴を解明することで新規標的治療を開発するために本研究は開始された。

3. 研究の方法

(1) 既に採取済であるヒト切除検体の scRNAseq 解析データを用いて術前治療奏功性 / 抵抗性に関わる癌免疫微小環境因子の検索

既に作成している消化器癌のシングルセル発現解析 (scRNAseq) データライブラリー (70 サンプル以上) を用いて、術前治療奏功群と抵抗群における癌免疫微小環境の差を解析し、治療抵抗性に関わる機能的細胞集団や相互作用を抽出した。

(2) 抗癌治療後の膵癌自然発癌マウスを使用した ALI オルガノイドモデルの樹立

膵癌自然発癌モデル (LSL-KrasG12D/+; LSL-Trp53R172H/+; PdxCre: KPC) マウスの使用が困難となったため、マウス由来の膵癌細胞の移植モデルで、抗がん剤治療や免疫チェックポイント阻害薬を用いた癌免疫治療を施行し、治療早期から、その後抵抗性を獲得し再増殖する治療後期まで多段階的に膵癌組織を採取し、各種細胞を培養した。また、腫瘍局所免疫系を構築した気相-液相界面 (air-liquid interface: ALI) オルガノイドを樹立した。

(3) ALI オルガノイドモデルを用いた治療耐性獲得に関わる因子の in vitro での検証

1. で明らかにした治療耐性に関わっていると考えられる要素を標的とした治療比較実験を行うために、上記で確立した ALI オルガノイドモデルを用いて、特に樹状細胞とがん細胞、癌関連線維芽細胞に着目してその細胞間相互作用を検討した。今後、さらに癌免疫微小環境の改変による tumor-killing response の差を評価する。

(4) 3. で確認した治療耐性に関わる癌免疫微小環境因子を阻害する薬剤を併用した in vivo 治療実験および効果判定

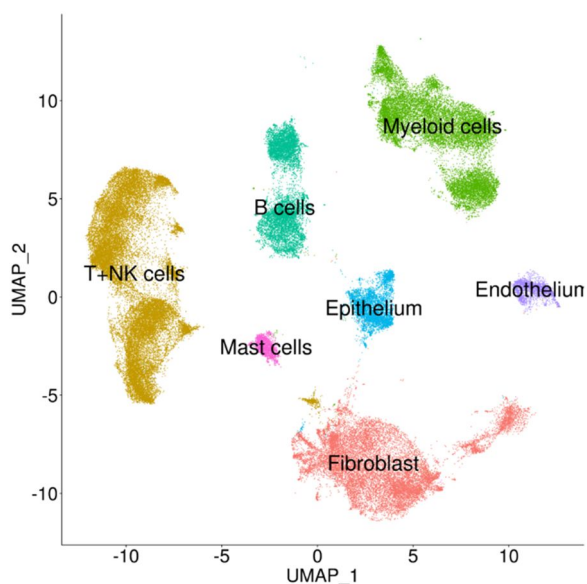
KPC マウスを用いて in vitro で治療耐性克服を確認した因子 (オートファジーなど) を制御し得る薬剤を併用し、癌免疫微小環境改変による治療抵抗性改善へ寄与するかどうかを検討した。さらに、シングルセル発現解析によって control 群との比較解析を行い、腫瘍免疫の変動を評価した。

4. 研究成果

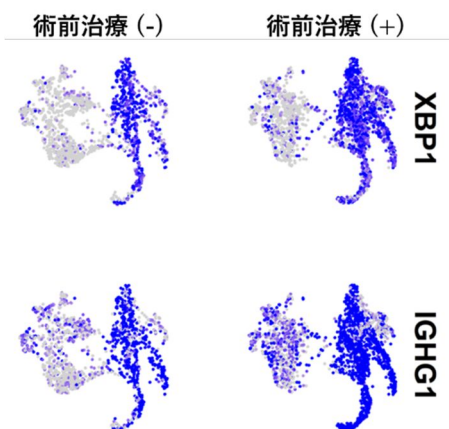
術前治療サンプルを用いたシングルセル解析と膵癌の public 公開データの解析

消化器癌における術前治療に伴う腫瘍免疫微小環境因子の変動を評価するために、すでに作成していたヒト切除検体のシングルセル解析データを用いて評価を開始した。当研究室では、食道癌・胃癌・大腸癌などの多様な消化器癌に対するシングルセル解析を行っているが、本邦で術前化学療法を施行することが多い食道扁平上皮癌に特に注目して解析を行った。正常部 7 例・癌部 10 例 (術前化学療法施行群 5 例、未施行群 5 例) を含めた 17 検体を対象に解析した。検出された細胞を merge し、各細胞種における代表的なマーカー遺伝子の発現レベルに着目してクラスターリングを行うと、T リンパ球・B リンパ球・骨髄球系細胞などの主要な免疫細胞が同定され、特に T リンパ球が最も多く認められた。また、正常部と比較し、腫瘍部で T リンパ球が多い傾向を認めた。さらに、術前治療の有無に着目して解析を行ったところ、術前治療施行群では形質細胞が増加し、抗体産生能も有意に上昇していた。一方、CD8 陽性 T リンパ球では術前治療施行群

で疲弊化関連遺伝子が低下していた。これらの解析から、術前治療に伴う腫瘍免疫微小環境の変化を単一細胞レベルでとらえることができた。現在、術前化学療法を実施した膵癌の public データを入手しており、食道癌データで得られた知見に注目しながら解析を開始している。



(図1) 腫瘍免疫微小環境内の主要な細胞種



(図2) 形質細胞は術前治療に伴い増加

ALI オルガノイドモデルの樹立

まず、ALI オルガノイドモデルの樹立のため、すでに当研究室で使用しているヒト膵癌細胞株を用いたモデルの樹立を開始した。抗腫瘍免疫において重要な役割をもつ樹状細胞と、腫瘍免疫微小環境の間質成分として重要な癌線維芽細胞を用いて 3 次元で再構成された ALI オルガノイドモデルを樹立することができた。今後は他の免疫細胞も含めた ALI オルガノイドモデルの作成や、得られた解析結果をふまえ、薬剤投与実験などをこのオルガノイドモデルで行うことでより詳細な解析を進めていく方針である。

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 1件）

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
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 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 & 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 -

〔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 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

〔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	甲斐 昌也 (KAI Masaya) (10755242)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	小園 真吾 (KOZONO Shingo) (40706850)	九州大学・医学研究院・共同研究員 (17102)	
研究分担者	久保 真 (KUBO Makoto) (60403961)	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