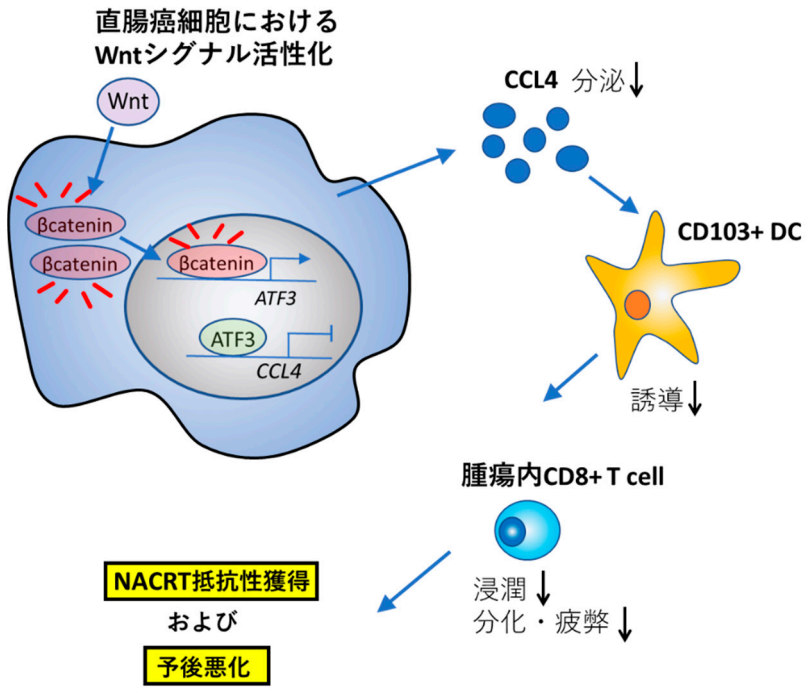
69　Wntシグナル制御による新規直腸癌化学放射線療法開発	松田　武

【目的】直腸癌術前化学放射線療法（NACRT）の喫緊の課題は病理学的完全奏効（pCR）率の向上であるが、そのためには、NACRT 抵抗性獲得機序の解明が必須である。本研究は、直腸癌 NACRT 抵抗性獲得における Wnt/β-カテニンシグナル（Wnt シグナル）の役割を、腫瘍免疫微小環境（Tumor immune microenvironment：TIME）の変化に着目して解析し、Wnt シグナル制御によって pCR 率を向上する新規 NACRT 治療戦略の開発を試みる。

【方法】①NACRT 直腸癌生検組織を用いて Wnt シグナル関連分子（β-カテニン）発現を免疫組織学的に調べ、β-カテニン発現強度（無・弱・中・高）と NACRT 組織学的奏効度および腫瘍学的予後との関連性を解析した。②NACRT 直腸癌手術組織を用いて、CD8 浸潤の程度を調べ、NACRT 組織学的奏効度および腫瘍学的予後との関連性を解析した。③BALB/c マウスに CT26 マウス大腸癌細胞株を用いて、放射線腫瘍マウスモデルを作製し、放射線照射量に関する治療効果、$CD8^+$T 細胞の浸潤、および Exhaustion を含む分化状態の評価を行った。

【結果】①NACRT 直腸癌生検組織において、β-カテニン発現強度と NACRT 奏効度は有意に相関しており、β-カテニン強発現群において、NACRT 奏効度は低かった（P＝0.0001）。全生存率はβ-カテニン強発現群（中・高）と弱発現群（無・弱）で有意差は無かったが（P＝0.234）、β-カテニン高発現群（高）はその他（無・弱・中）よりも有意に予後不良であった（P＝0.0143）。一方、無再発生存率は、各群間で有意差はなかったが、β-カテニン発現最弱群（無）は、他の 3 群よりも良好な傾向があった。②NACRT 後直腸癌において、$CD8^+$浸潤の程度と組織学的奏効度は高い相関性を示した（Cut off 1,320/mm^2、AUC=0.7986）。また、$CD8^+$の高浸潤群は、低浸潤群と比較して、有意に無再発生存率が良好であった（P＝0.020）。一方、レジデントメモリー$CD8^+$T 細胞（CD103、CD8 double positive）の細胞密度は、無再発生存率に寄与しなかった。③大腸癌培養細胞株移植マウスモデルにおいて、放射線照射量依存的な抗腫瘍効果を示した。また、放射線照射量依存的に $CD8^+$T 細胞が誘導された。さらに、抗原刺激に対して反応し、疲弊・分化したと思われる PD-1^+Tim-$3^+$$CD8^+$T 細胞が増加を示した。

Wnt シグナル活性化に伴う $CD8^+$T 細胞浸潤抑制による NACRT 抵抗性獲得



69. Wnt シグナル制御による新規直腸癌化学放射線療法開発

松田　武

神戸大学 大学院医学研究科 外科学講座 低侵襲外科学分野

Key words：直腸癌，NACRT，Wnt シグナル，β-カテニン，$CD8^+$T 細胞

緒　言

直腸癌は、他の大腸癌と比べ再発率が高いだけでなく、人工肛門や排便障害という重大な問題に患者は直面する。再発率の減少、また肛門温存率の上昇を目的として、術前化学放射線療法（Neoadjuvant-Chemoradiotherapy：以下 NACRT）が重要な役割を果たしてきたが、直腸癌の約半数は NACRT 抵抗性を示すことが知られている。一方で、病理学的完全奏効（pathological complete response：pCR）は予後良好な点に端を発し［1］、Watch and wait policy として NACRT 後 clinical CR 例に手術なしで観察する治療が注目されたが［2］、現在はオプション治療に止まる。その原因は pCR 率が 20%未満と低いことにある。従って、今後の直腸癌 NACRT の目指すべき方向は pCR 率の向上にあるといえる。

Wnt/β-カテニンシグナル（以下、Wnt シグナル）は、生体にとって細胞増殖、分化、形態形成などを制御する極めて重要な役割を担っているシグナル伝達経路である。これまでに、大腸癌幹細胞の維持・増殖に Wnt シグナル活性化が必須であることが示されている。また近年、がん細胞における Wnt シグナル活性化は、ATF3 を誘導し、それによって *CCL4* 遺伝子の転写が抑制されることで、樹状細胞などの抗原提示細胞のがん局所への浸潤が阻害され、$CD8^+$T 細胞などのエフェクターT 細胞のがん局所へ浸潤が抑制されることが示された［3］。さらに Wnt シグナル活性化は、腫瘍抗原放出、腫瘍抗原提示、T 細胞プライミングと活性化、T 細胞の局所浸潤など、T 細胞を中心とする抗腫瘍免疫応答のあらゆる段階で、抗腫瘍免疫応答を抑制することが示され、Wnt シグナル阻害と免疫チェックポイント阻害剤の複合的免疫療法にも期待が集まる［4］。

我々は、直腸癌 NACRT がもたらす腫瘍免疫微小環境（Tumor immune microenvironment：TIME）の変化を Wnt シグナルに着目して捉え、Wnt シグナル制御によって良好な TIME を誘導して pCR 率を向上する新規 NACRT 治療戦略を開発することを目的に本研究を行った。本研究では、Wnt シグナル活性化が、NACRT 治療奏効度や $CD8^+$T 細胞誘導と強く相関しており、無再発生存率とも強く相関していることが示された。また、マウス移植モデルにおいて、放射線照射量依存的に $CD8^+$T 細胞が誘導され、抗腫瘍効果があること、さらに、放射線刺激に対して反応し、疲弊・分化したと思われる $PD\text{-}1^+Tim\text{-}3^+CD8^+$T 細胞が増加することが示された。

方　法

1. NACRT 前直腸癌生検組織におけるβーカテニンの免疫組織学的解析

直腸癌患者 62 例の NACRT 前生検組織におけるβ-カテニン発現強度を、核内β-カテニン染色陽性細胞数によってスコア 0（β-カテニン陽性細胞 0～1%）、1（同 1～5%）、2（同 5～30%）、3（同＞30%）の 4 群に分類し、組織学的奏効度や腫瘍学的成績との関連性を解析した。

2. NACRT 後直腸癌手術標本における $CD8^+$T 細胞動態と予後の関連性解析

NACRT 施行直腸癌患者のうち、pCR 症例を除く 49 例において、$CD8^+$T 細胞浸潤を免疫組織学的に解析した。また ROC 曲線解析にて、$CD8^+$T 細胞浸潤数/mm^2のカットオフ値を求め、組織学的奏効度や腫瘍学的成績との関連性を解析した。また、レジデントメモリー$CD8^+$T 細胞の動態を解析し、腫瘍学的成績との関連性を解析した。

3. 大腸癌細胞株移植マウスモデルにおける放射線抗腫瘍効果と $CD8^+T$ 細胞浸潤及び分化度の解析

BALB/c マウスに CT26 マウス大腸癌細胞株を、放射線腫瘍マウスモデルを作製した。放射線照射量に関する抗腫瘍効果と $CD8^+T$ 細胞浸潤の関連性を解析した。CT26 細胞 1×10^6 個を BALB/c マウス 20 匹の皮下にそれぞれ移植し、移植後 14 日目に放射線照射（0 Gy、2 Gy、10 Gy、15 Gy）を行った。放射線照射後腫瘍計測を経時的に腫瘍計測を行い、照射 17 日目に $CD8^+T$ 細胞浸潤及び Exhaustion を含む分化状態を Flow Cytometry で解析した。

結　果

1.　核内β-カテニン発現は組織学的奏効度と有意に相関し、最強発現群は有意に予後不良であった。

まず、核内β-カテニン発現強度によって、症例を 4 群（スコア 0：13 例、スコア 1：13 例、スコア 2：21 例、スコア 3：14 例）に分類し、スコア 0、1 を弱発現群、スコア 2、3 を強発現群とした。核内β-カテニン強発現群は、組織学的奏効度は有意に低かった（P=0.0001）（表 1）。

表 1. 核内β-カテニン発現強度と組織学的奏効度の関連性

組織学的奏効度	弱発現（スコア０，１）	強発現（スコア２，３）	P（Fisher 検定）
Grade 1a	2	13	0.0001
Grade 1b	4	13	
Grade 2	15	11	
Grade 3	6	0	

組織学的奏効度 Grade1a、1b は Poor responder、Grade2、3 は Good responder に相当する。β-カテニン発現強度が強い場合は有意に組織学的奏効度が低かった。

また、全生存率をβ-カテニン発現強度ごとに見てみると、β-カテニン発現強度スコア 3（最強発現群）の患者群は、他の 3 群と比較して、有意に全生存率が良好であった（スコア 3 vs. スコア 0、1、2；P=0.0143（Log-rank test））（図 1）。

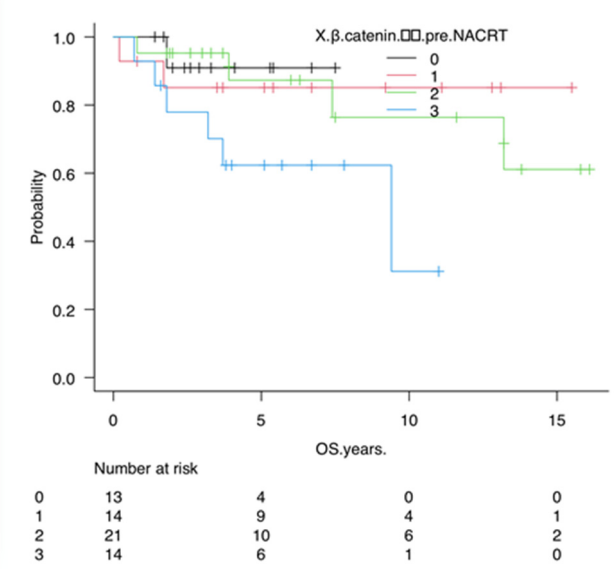


図 1.　β-カテニン発現強度ごとの全生存率

β-カテニン発現強度スコア 3 の患者群は、他の 3 群と比較して有意に全生存率が良好であった。

2. NACRT 誘導 CD8$^+$T 細胞の高度浸潤は組織学的奏効度および無再発生存の良好な予後因子であった。

組織学的完全奏効（Grade 3）を除く NACRT 施行直腸癌 49 例の手術検体を免疫組織学的に解析した。CD8$^+$T 細胞数は組織学的奏効度と有意に相関しており、浸潤 CD8$^+$T 細胞が多いほど、組織学的奏効度は高かった（data not shown）。ROC 曲線で腫瘍組織内 CD8$^+$T 細胞腫瘍密度の Cut off 値を求め、無再発生存率と全生存率を解析したところ、全生存率に有意差は無かったが（Log-rank test P=0.233）、無再発生存率は CD8$^+$T 細胞密度が高い群（CD8^{high} 27 例 vs CD8^{low} 22 例）が、有意に予後良好であった（Log-rank test P=0.020、図 2）。

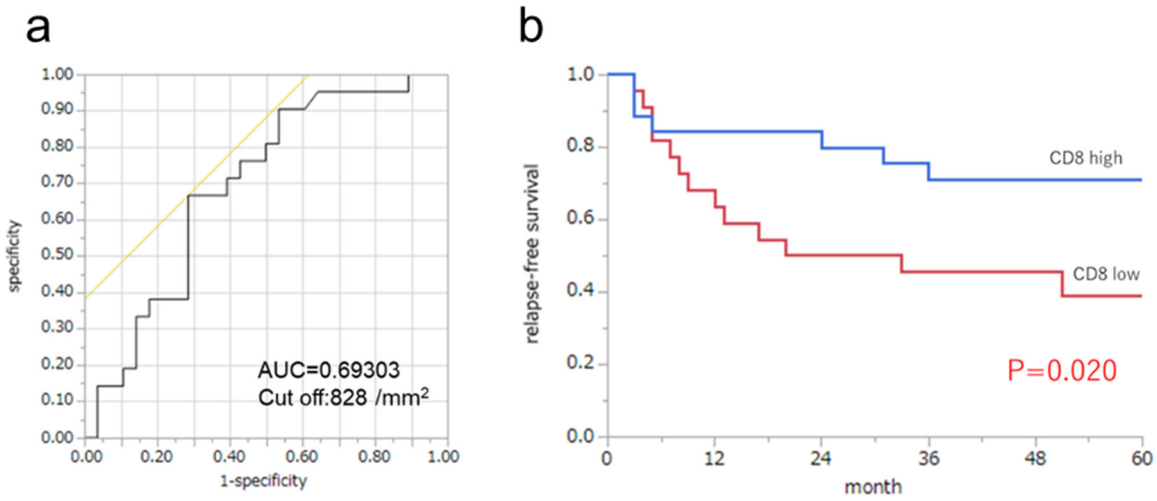


図 2. CD8$^+$T 細胞密度による無再発生存率

a） AUC 曲線による CD8$^+$T 細胞密度のカットオフ値。

b） CD8$^+$T 細胞密度による無再発生存曲線。

しかし、腫瘍内レジデントメモリーCD8$^+$T 細胞（CD103、CD8 double positive：T_{RM}）の細胞密度は、無再発生存に寄与しなかった（$T_{RM}{}^{high}$ 20 例 vs $T_{RM}{}^{low}$ 29 例）。

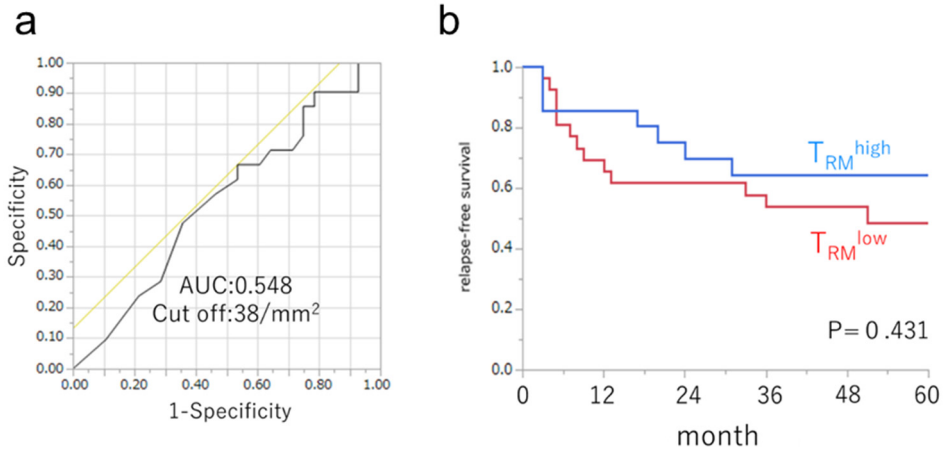


図 3. レジデントメモリーCD8$^+$T 細胞密度による無再発生存率

a） AUC 曲線によるレジデントメモリーCD8$^+$T 細胞密度のカットオフ値。

b） レジデントメモリーCD8$^+$T 細胞密度による無再発生存曲線。

3. 大腸癌マウスモデルにおいて、放射線照射量依存的に CD8⁺T 細胞、PD-1⁺Tim-3⁺CD8⁺T 細胞が誘導された

CT26 大腸癌細胞株を BALB/c マウス皮下に移植し、放射線照射量に関する抗腫瘍効果と CD8⁺T 細胞浸潤の関連性を解析した（図 4）。また、放射線照射（高原刺激）に対して反応し、疲弊・分化したと思われる PD-1⁺Tim-3⁺CD8⁺T 細胞が増加を示した（図 5）。

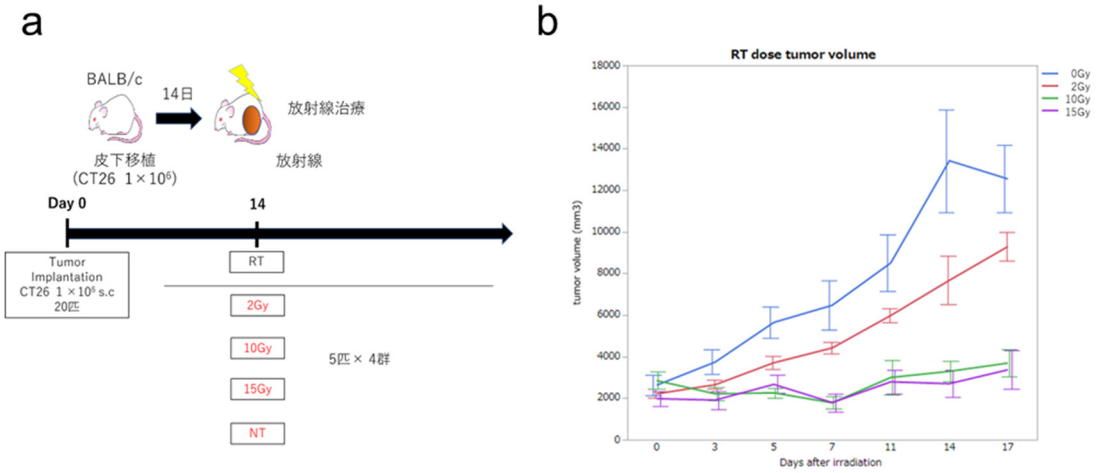


図 4. 大腸癌マウス移植モデルにおける放射線照射量依存的な抗腫瘍効果

a) CT26 大腸癌細胞株移植によるマウス放射線腫瘍モデル作製

b) 放射線照射量依存的な抗腫瘍効果

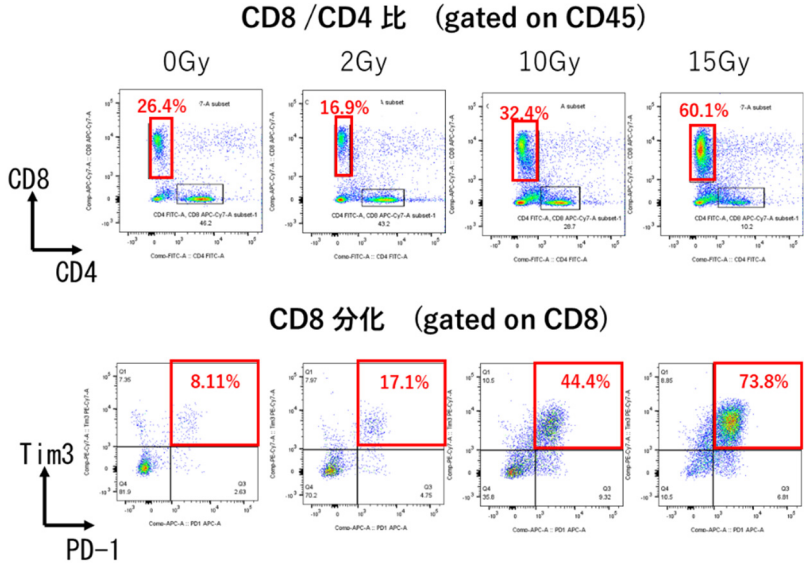


図 5. 放射線照射後（14 日目）における腫瘍内 CD8⁺T 細胞浸潤と分化度

放射線照射量依存的に CD8⁺T 細胞浸潤と CD8⁺T 細胞疲弊・分化度は亢進した。

考　察

腫瘍組織の解析では、NACRT による組織学的奏効度は、核内β-カテニンの発現強度が負の相関を示し、腫瘍内への CD8⁺T 細胞の浸潤の程度が正の相関を示した。核内β-カテニンの発現強度と腫瘍内 CD8⁺T 細胞の浸潤の関連性は現在解析中であるが、明らかな負の相関が想定される。これは古典的 Wnt/β-カテニン経路の ON-OFF が腫瘍内への CD8⁺T 細胞の浸潤を規定することを強く示唆し、興味深い結果となった。

マウス放射線治療モデルにおいて、放射線照射量依存的に一定の抗腫瘍効果を示し、$CD8^+$T 細胞が濃度依存性に誘導されたことは、放射線照射による腫瘍細胞への効果が、腫瘍細胞 DNA 損傷による免疫応答性細胞死を引き起こすことを強く示唆する。誘導された$CD8^+$T 細胞の多くは、照射後早期より$Tim\text{-}3^+PD\text{-}1^+$であるが、単に疲弊の程度を示すだけでなく、腫瘍組織内で抗原刺激を受けた T 細胞が多く存在し、抗腫瘍効果に貢献していることを示す。実際、$Tim\text{-}3^+PD\text{-}1^+CD8^+$T 細胞は、$Tim\text{-}3^-PD\text{-}1^+CD8^+$T 細胞よりも、強力な細胞傷害性を示す。$Tim\text{-}3^+PD\text{-}1^+CD8^+$T 細胞を強力に誘導する我々の放射線治療モデルは、Wnt シグナル経路を標的とした薬剤開発において、有望なモデルと評価系と考える。

最近になって注目される、腫瘍内レジデントメモリーT 細胞（T_{RM}）であるが、肺がん、乳がん、大腸癌では、良好な予後規定因子であるとされる報告が多い。これまで、直腸癌の NACRT 症例においてのT_{RM}に関連した報告はなく、他癌腫では腫瘍への浸潤の程度がその予後を規定するが、本研究では、NACRT 後直腸癌ではその傾向は認められなかった。この解析は他に例を見ず、今回の研究で解析を行なった意義は非常に大きい。腫瘍内$CD8^+$細胞の浸潤が重要な予後規定因子となることは決定的である点から、興味深い結果といえる。組織学的な特徴では腫瘍実質内にT_{RM}が多く存在した点を考慮すれば、腫瘍実質内でのT_{RM}の密度が重要であるのか、あるいは、間質での非$T_{RM}CD8^+$T 細胞が重要であるのか、など検討すべき点が多い。また、一般的にT_{RM}は$PD\text{-}1^+Tim\text{-}3^+$である点も考慮すると、表現型や細胞動態について、さらなる解析が必要である。

Luke らの報告によれば、TCGA データを用いて解析された癌腫の 90%以上において、非 T 細胞炎症性サブセットにおける Wnt シグナル経路が活性化されていた［5］。直腸癌 NACRT 症例においても、Wnt シグナル経路の活性化は、非 T 細胞炎症性腫瘍において顕著である点において、興味深い結果を示した。一方で、放射線により誘導される直腸癌腫瘍内$CD8^+$T 細胞であるが、術前生検標本におけるβ-カテニン発現強度が重要であり、治療前の時点で Wnt シグナルが大きく影響する可能性がある。これは、腫瘍制御と免疫誘導の 2 点から Wnt シグナル阻害剤の重要性を示している。本研究では Wnt/β-カテニン経路が放射線の治療効果や免疫細胞の浸潤を規定する点において、腫瘍学的な重要性を示したが、さらなる解析が必要である。

文　献

1) Maas M, Nelemans PJ, Valentini V, et al. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. Lancet Oncol. 2010 Sep;11(9):835-44. PMID: 20692872 DOI: 10.1016/S1470-2045(10)70172-8

2) Glynne-Jones R, Wyrwicz L, Tiret E, Brown G, Rödel C, Cervantes A, Arnold D; ESMO Guidelines Committee. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2017 Jul 1;28(suppl_4):iv22-iv40. PMID: 28881920 DOI: 10.1093/annonc/mdx224.

3) Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic ß-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. Nature. 2015 Jul 9;523(7559):231-5. PMID: 25970248 DOI:10.1038/nature14404

4) Wang B, Tian T, Kalland KH, Ke X, Qu Y. Targeting Wnt/ß-Catenin Signaling for Cancer Immunotherapy. Trends Pharmacol Sci. 2018 Jul;39(7):648-658. PMID: 29678298 DOI: 10.1016/j.tips.2018.03.008

5) Luke JJ, Bao R, Sweis RF, Spranger S, Gajewski TF. WNT/ß-catenin Pathway Activation Correlates with Immune Exclusion across Human Cancers. Clin Cancer Res. 2019 May 15;25(10):3074-3083. PMID: 30635339 doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1942.