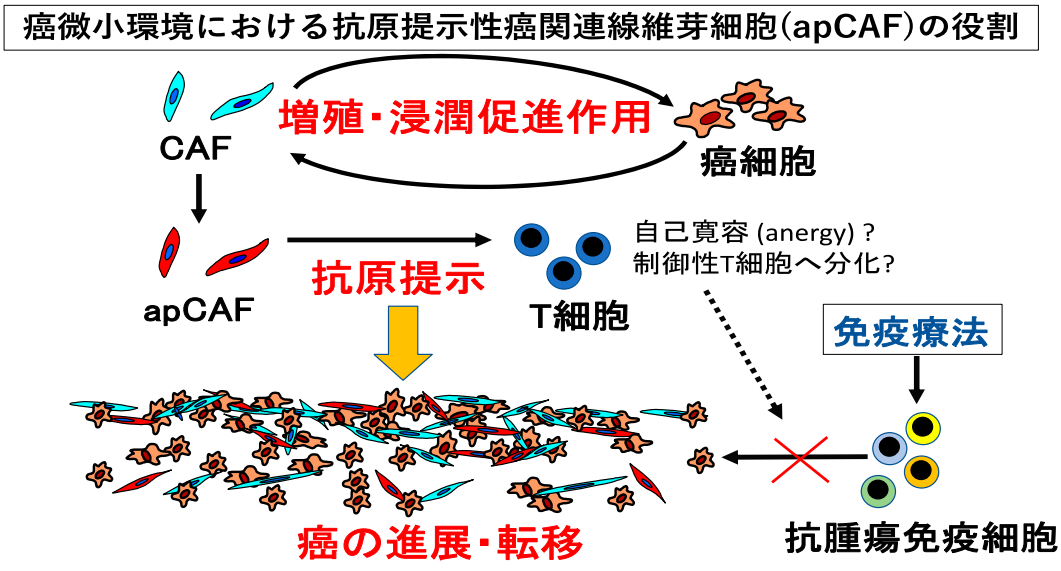
191　抗原提示性癌関連線維芽細胞が癌免疫に及ぼす影響	笠島　裕明

【目的】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。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。新たな CAF の subpopulation として抗原提示能を持つ CAF（Antigen-presenting CAF；apCAF）が報告され、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上極めて有用と考えられる。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及び大腸癌新規治療法の開発に寄与することである。

【方法】癌関連線維芽細胞が及ぼす癌細胞との相互作用及び腫瘍免疫との関連を解析するため、ヒト大腸癌組織標本を用いた 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、ヒト遺伝子発現情報データベースを用いた大腸癌間質における apCAF マーカー発現の解析、apCAF の由来と報告されている中皮細胞における apCAF マーカー発現量の解析及びマウス大腸癌同所移植モデルにおける apCAF 分画割合に関する経時的変化の検討を行った。

【結果】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。さらに直腸同所移植腫瘍モデル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 class Ⅱ陽性細胞）であり、肝転移巣では原発巣に比較し高率に apCAF が抽出された。さらにヒト大腸癌患者から樹立された中皮細胞では、線維芽細胞に比較し抗原提示マーカーの発現が上昇しており癌細胞の相互作用によりその発現はさらに上昇した。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と考えられた。

癌関連線維芽細胞が及ぼす腫瘍免疫への影響



191. 抗原提示性癌関連線維芽細胞が癌免疫に及ぼす影響

笠島　裕明

大阪公立大学 大学院医学研究科 消化器外科

Key words：大腸癌，免疫療法，癌関連線維芽細胞，抗原提示

緒　言

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［1］。大腸癌では遺伝子パターンに基づき、免疫系が強く活性化されている免疫型（CMS1）、上皮性でWntおよびMycシグナル経路が活性化している標準型（CMS2）、上皮性で代謝調節異常が認められる代謝型（CMS3）、TGFbシグナル経路の活性化と間質浸潤や血管新生が認められる間葉型（CMS4）に分類する方法が用いられている［2］。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。これまで CAF の subpopulation として炎症性 CAF と平滑筋アクチン発現 CAF が報告されているが、第 3 の subpopulation として抗原提示能を持つ CAF（Antigen-presenting CAF：apCAF）が報告された［3，4］。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おり、さらに中皮細胞がその起源として報告されている［5］。以上より、我々は細胞－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を考え、さらに 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ることから、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及び大腸癌新規治療法の開発に寄与すること」である。

方　法

1. 癌関連線維芽細胞が及ぼす癌細胞との相互作用及び腫瘍免疫との関連に関する総説

single-cell RNA sequence を用いた癌関連線維芽細胞の機能解析に関するこれまでの報告を、特に CAF subpopulation の観点から総説した。

2. ヒト大腸癌組織標本を用いた apCAF マーカー発現と臨床病理学的因子との関連性

我々の所属研究室が保有する臨床病理学的情報が紐付いた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臨床病理学的予後との関連性を解析した。

3. 大腸癌由来線維芽細胞における apCAF マーカー発現の解析

正常大腸組織、大腸癌、肝転移巣それぞれより線維芽細胞を樹立し、apCAF マーカーの発現を qRT-PCR を用いて検討した。

4. 大腸癌腹膜播種症例より樹立した中皮細胞における apCAF マーカー発現量の解析

我々の所属研究室で樹立した正常中皮細胞及び大腸癌腹膜播種中皮細胞を用いて apCAF マーカーの発現を qRT-PCR を用いて検討した。

5. マウス大腸癌同所移植モデルにおける apCAF 分画割合に関する経時的変化の検討

マウス大腸癌オルガノイドによる大腸癌同所移植モデルを用いて、大腸腫瘍に含まれる apCAF 分画の割合を Flow cytometry analysis を用いて経時的に測定した。

結　果

1. 癌関連線維芽細胞が及ぼす癌細胞との相互作用及び腫瘍免疫との関連に関する総説

我々は、近年盛んに行われている single-cell RNA sequence を用いた癌関連線維芽細胞の機能解析に関するこれまでの報告を、特に CAF subpopulation の観点から腫瘍免疫に及ぼす影響を中心に総説として発表した（図 1）[1]。

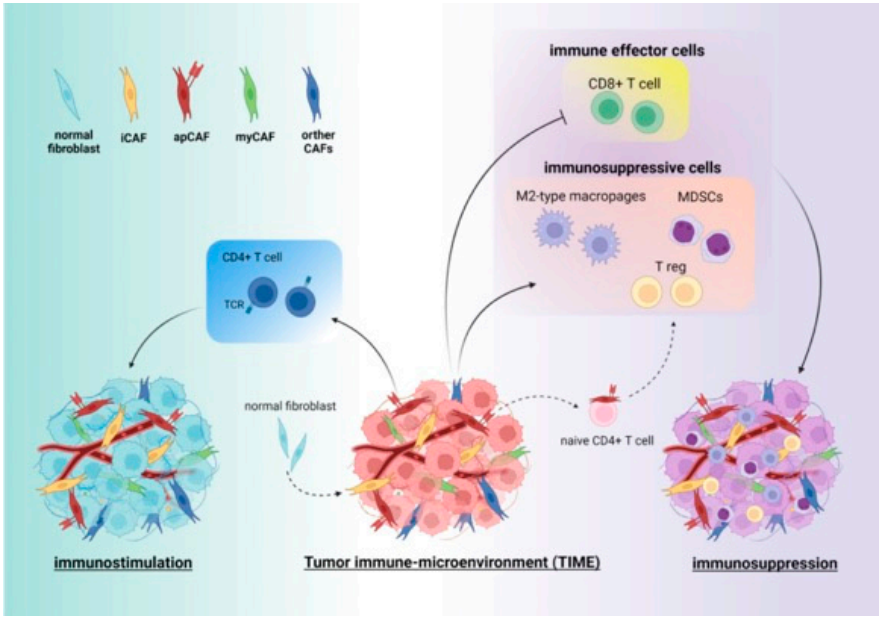


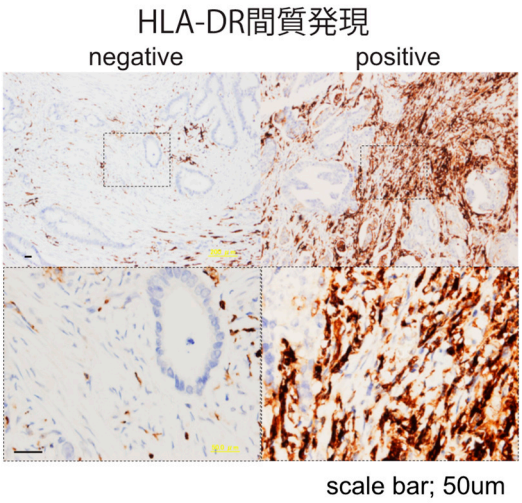
図 1. 腫瘍免疫微小環境における CAF の役割
iCAF：inflammatory CAF、apCAF：antigen-presenting CAF、
myCAF：myofibroblastic CAF、MDSC：myeloid-derived suppressor cell、
T reg：regulatory T cell。

2. ヒト大腸癌組織標本を用いた apCAF マーカー発現と臨床病理学的因子との関連性

我々の所属研究室が保有する臨床病理学的情報が紐付いたヒト大腸癌サンプル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たところ、癌間質細胞陽性症例（下線）において陰性症例（上線）と比較し有意に無再発生存期間が不良であった（図 2）。

3. 大腸癌由来線維芽細胞における apCAF マーカー発現の解析

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、StageⅡに比較し StageⅢでより高率に陽性症例が認められた（図 3）。



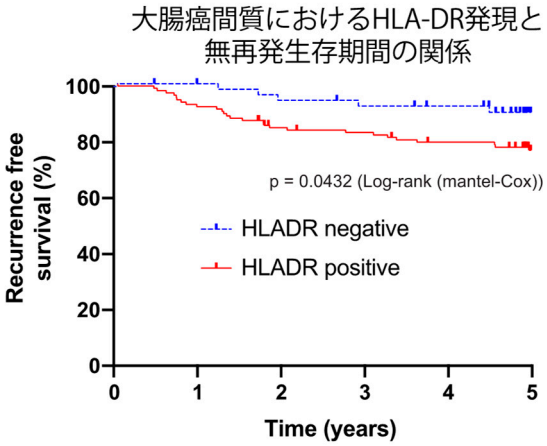
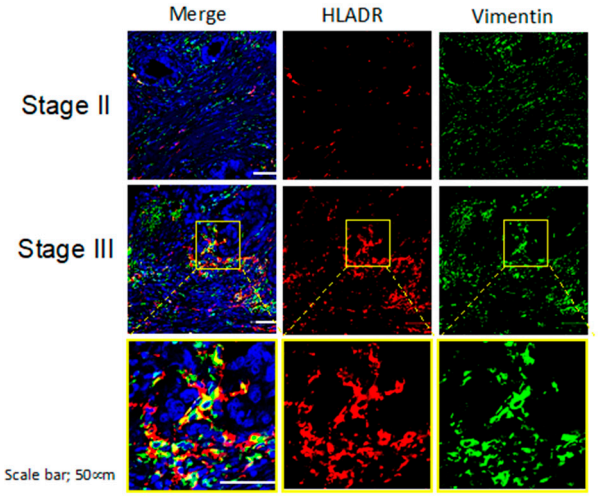


図 2. 大腸癌間質における HLA-DR 抗体を用いた免疫組織染色代表症例（左）及び Kaplan-Meier 生存解析（右）

大腸癌間質細胞 HLA-DR 発現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。



	Stage II	Stage III
apCAF negative	50	31
apCAF positive	35	44

p = 0.039
(Fisher's exact test)

図 3. 大腸癌間質における apCAF マーカー発現の解析（左）と大腸癌進展度との相関関係の解析（右）

青 : DAPI、赤 : HLA-DR（線維芽細胞マーカー）、緑 : Vimentin（apCAF マーカー）。StageⅡに比較し StageⅢでより高率に apCAF 陽性症例が認められた。

4. 大腸癌腹膜播種症例より樹立した中皮細胞における apCAF マーカー発現量の解析

我々の所属研究室で樹立した正常中皮細胞及び大腸癌腹膜播種中皮細胞を用いて apCAF マーカーの発現を解析したところ、正常中皮細胞及び大腸癌関連線維芽細胞と比較して大腸癌腹膜播種中皮細胞では apCAF マーカー（HLA-DRA、 HLA-DQA1、CD74）が上昇していた（図 4）。

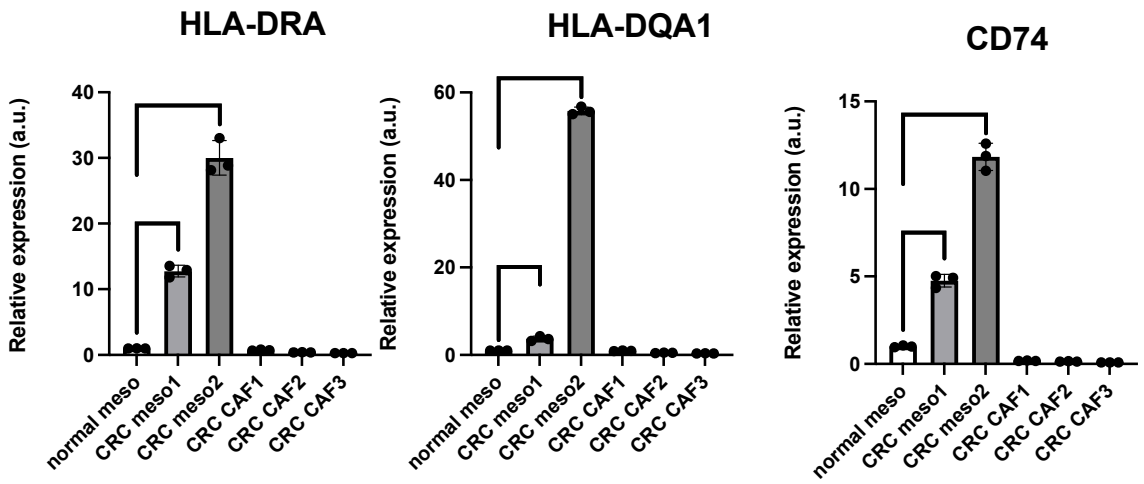


図 4. 正常中皮細胞（normal meso）、大腸癌腹膜播種中皮細胞（CRC meso）及び大腸癌組織より樹立した線維芽細胞（CRC CAF）における apCAF マーカーと中皮細胞マーカー発現の解析
CRC meso において normal meso や CRC CAF に比較し apCAF マーカーの発現が上昇していた
P＜001、*P＜0.0001（Student's t-test）。

5. マウス大腸癌同所移植モデルにおける apCAF 分画割合に関する経時的変化の検討

マウス大腸癌同所移植モデルを用いて腫瘍内に含まれる apCAF 分画の割合を Flow cytometry analysis を用いて経時的に測定したところ、同所移植後 6 週間、腫瘍サイズ 10 mm 程度の時期に apCAF は最も多く、その後は myCAF の割合が増加していた（図 5）。

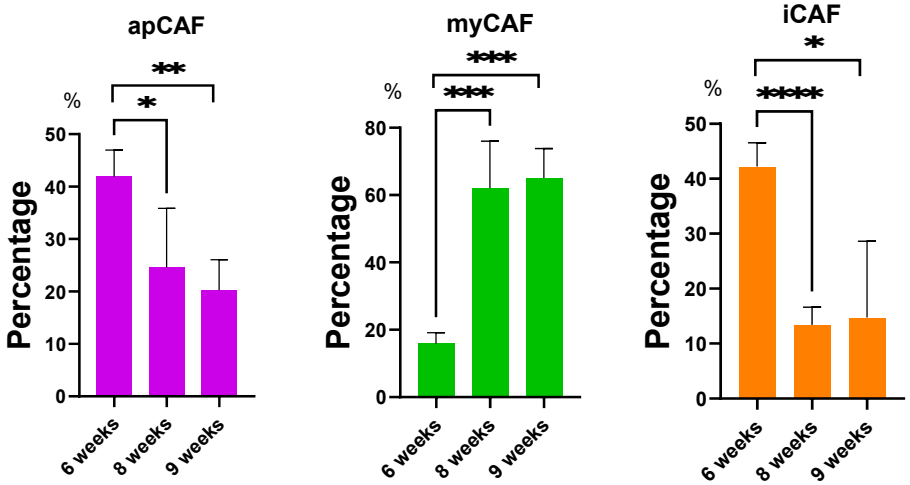


図 5. マウス大腸癌同所移植モデルにおける apCAF 分画割合に関する経時的変化
同所移植後 6 週間後に apCAF の割合は最大となり、以降は myCAF の割合が増加していた。*P＜0.05、**P＜0.01、***P＜0.001、****P＜0.0001（Student's t-test）。

考　察

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が考えられる。さらに中皮細胞が癌の進展に伴って apCAF へ分化している可能性が示唆された。以上より、抗原提示を有する線維芽細胞は大腸癌において腫瘍進展に関与していることが示唆された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、Weill Cornell Medicine, Pathology & Laboratory Medicine Prof. Jorge Moscat and Prof. Maria T. Diaz-Meco である。最後に、本研究に多大なご支援を賜りました、公益財団法人上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げます。

文　献

1) Yamamoto Y, Kasashima H, Fukui Y, Tsujio G, Yashiro M, Maeda K. The heterogeneity of cancer-associated fibroblast subpopulations: Their origins, biomarkers, and roles in the tumor microenvironment. Cancer Sci. 2023 Jan;114(1):16-24. doi: 10.1111/cas.15609. Epub 2022 Oct 19. PMID: 36197901

2) Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa E Melo F, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. Nat Med. 2015 Nov;21(11):1350-6. doi: 10.1038/nm.3967. Epub 2015 Oct 12. PMID: 26457759

3) Friedman G, Levi-Galibov O, David E, Bornstein C, Giladi A, Dadiani M, Mayo A, Halperin C, Pevsner-Fischer M, Lavon H, Mayer S, Nevo R, Stein Y, Balint-Lahat N, Barshack I, Ali HR, Caldas C, Nili-Gal-Yam E, Alon U, Amit I, Scherz-Shouval R. Cancer-associated fibroblast compositions change with breast cancer progression linking the ratio of S100A4+ and PDPN+ CAFs to clinical outcome. Nat Cancer 2020 Jul;1(7):692-708. doi: 10.1038/s43018-020-0082-y. Epub 2020 Jun 29. PMID: 35122040

4) Elyada E, Bolisetty M, Laise P, Flynn WF, Courtois ET, Burkhart RA, Teinor JA, Belleau P, Biffi G, Lucito MS, Sivajothi S, Armstrong TD, Engle DD, Yu KH, Hao Y, Wolfgang CL, Park Y, Preall J, Jaffee EM, Califano A, Robson P, Tuveson DA. Cross-Species Single-Cell Analysis of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Reveals Antigen-Presenting Cancer-Associated Fibroblasts. Cancer Discov. 2019 Aug;9(8):1102-1123. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-0094. Epub 2019 Jun 13. PMID: 31197017

5) Huang H, Wang Z, Zhang Y, Pradhan RN, Ganguly D, Chandra R, Murimwa G, Wright S, Gu X, Maddipati R, Müller S, Turley SJ, Brekken RA. Mesothelial cell-derived antigen-presenting cancer-associated fibroblasts induce expansion of regulatory T cells in pancreatic cancer. Cancer Cell. 2022 Jun 13;40(6):656-673.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2022.04.011. Epub 2022 May 5. PMID: 35523176