

癌幹細胞を標的とした新規大腸癌免疫療法の開発

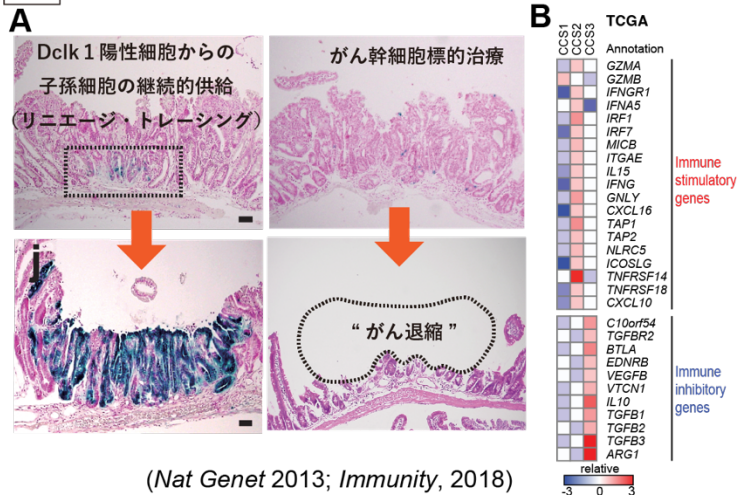
京都大学大学院医学研究科地域医療システム学講座

中西 祐貴

大腸がんの罹病率・死亡率は共に増加傾向であり、遠隔転移を伴う大腸がんの予後は不良である。特に「がん幹細胞、間質反応、がん関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast: CAF)」を特徴とするサブタイプ (colorectal cancer subtype (CCS)分類における CCS3 (Nat Med, 2013)、consensus molecular subtype (CMS)分類における CMS4 (Nat Med, 2015))は、最も予後が悪いグループである。大腸がんに対するがん免疫療法は、少数のマイクロサテライト不安定性 (MSI) がんを除き、ほとんどの大腸がん (マイクロサテライト安定性: MSS) で奏功しない。そのため、大腸がん免疫療法の治療成績向上は急務である。

我々は以前、DCLK1が大腸がん幹細胞マーカーであり、DCLK1陽性細胞の選択的排除によりがん退縮が得られることを示している (図 1A; Nat Genet, 2013)。さらに、がん幹細胞と関連し、かつ予後不良サブタイプである CMS4/CCS3 大腸がんが免疫抑制性であることを報告し (図 1B; Immunity, 2018)、同時に DCLK1 を高発現することを確認した。一方で、がん幹細胞の免疫原性、および CCS3/CMS4 大腸がんの重要な構成因子である間質浸潤

図1



(Nat Genet 2013; Immunity, 2018)

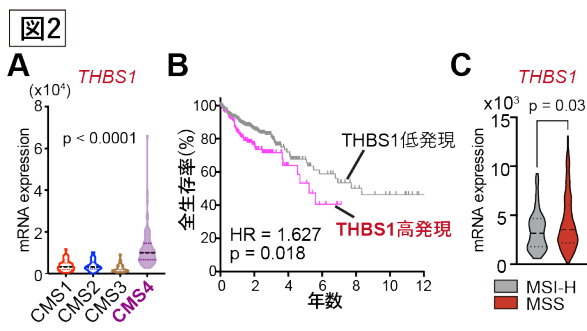
細胞とがん幹細胞のクロストークについてはこれまで検討されておらず、これは大腸がんの免疫治療抵抗性メカニズムの解明とそれを標的とした新規治療戦略の確立につながる重要な課題である。今回の研究に先立ち、我々はがん免疫抑制に働く CD47 の発現が大腸がん幹細胞において上昇していることを見出し、大腸がん幹細胞が免疫抑制性であることががん組織全体の免疫治療抵抗性に寄与している可能性を考えた。本研究では、大腸がん幹細胞特異的に CD47 を阻害することにより、がん組織の免疫原性が上昇し、抗腫瘍効果が得られるかについて評価し、大腸がんに対する免疫療法抵抗性が改善するかを検討することとした。

CD47 はマクロファージや樹状細胞といった抗原提示細胞に対する "don't eat me" シグナルとして、免疫原性細胞死 (immunogenic cell death) を負に制御し、抗がん免疫を抑制する。予備データから、がん幹細胞が CD47 を高発現することで抗原提示細胞からの貪食を回避し、がん免疫抑制をもたらしている可能性が示唆されたため、DCLK1-CreERT2;CD47f/f マウスを作成し、代表的な大腸癌モデル ApcMin マウスと交配することで、がん幹細胞特異

的 CD47 阻害による腫瘍フェノタイプに与える影響を評価した。しかし、本検討では、有意ながん縮小効果が確認できず、その理由として、がん幹細胞の可塑性が考えられた。すなわち、一度がん幹細胞が排除されても、ニッチシグナルを放出する間質の作用により、新たながん幹細胞が形成され、それが癌の再増大をもたらすと考えられたため、がんの効率的退縮には、間質の標的化が重要と考えられた。そこで、本研究における新たな標的分子としてがん間質に高発現している CD47 のリガンド THBS1 に着目し、同分子の腫瘍促進、およびがん免疫治療抵抗性における役割について検討した。

(1) ヒト大腸がんにおける THBS1 の発現解析

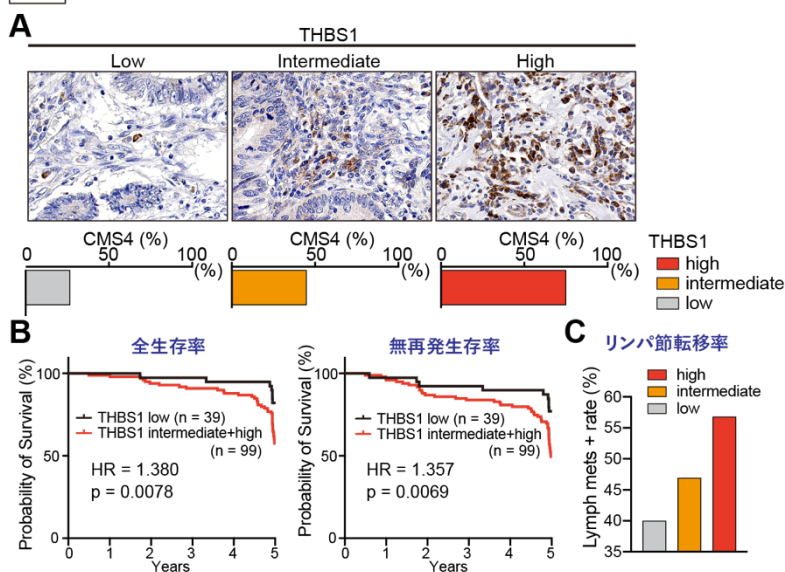
ヒト大腸がん組織の免疫染色において、THBS1 はがん間質に発現していることが明らかとなり、この結果はヒト大腸がんの遺伝子発現データセットにおいても確認できた。さらに、TCGA データセットを用いた解析により、THBS1 の mRNA が CMS4 大腸がんを高発現していること



(図 2A)、そして THBS1 高発現群の大腸がん患者は低発現群と比べて生存予後が有意に悪いことが示された (図 2B)。また、THBS1 の発現は MSS サブタイプにエンリッチしており、がん免疫治療抵抗性に関与している可能性が示唆された (図 2C)。

さらに、155 症例のヒト大腸がん外科手術検体の tissue microarray を用いた解析においても、THBS1 が CMS4 タイプの大腸がんを高発現しており (図 3A)、同様に予後マーカーとなることが確認された (図 3B)。加えて、THBS1 高発現大腸がんは低発現大腸がんと比べて、リンパ節転移や遠隔転移を有意に多くともなっていることから、THBS1 が高悪性度大腸がんのバイオマーカーであることが確認できた (図 3C)。

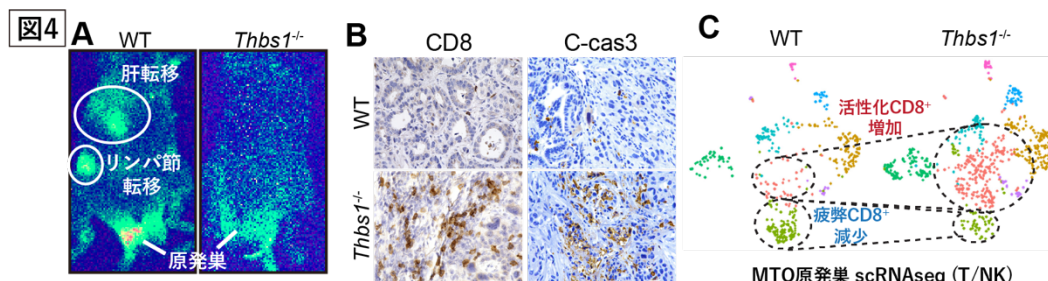
図3



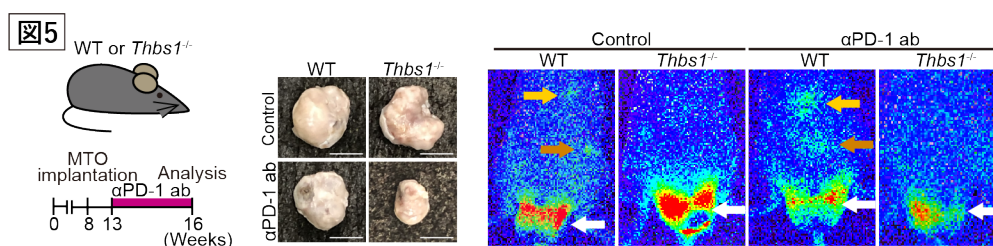
(2) THBS1 阻害による大腸がん免疫治療抵抗性の改善

がん幹細胞特異的に Apc, Kras, Trp53, Tgfbr2 の 4 種の遺伝子変異を導入して作成したマウス由来大腸がんオルガノイド mouse tumor organoid (MTO; Nature, 2018) による、直腸同所移植・転移実験系を行い、THBS1 の阻害効果を検討した。同システムは、免疫系を含む微小環境が保全されたマウスにおいて、間質由来分子の役割の検討が可能である。MTO を THBS1 KO (*Thbs1*^{-/-}) マウスへ同所移植することで間質特異的な THBS1 阻害の効果を検討した。興味深いことに、*Thbs1*^{-/-} マウスでは、原発巣は野生型マウス (WT) と同様に形成されるものの、リンパ節・肝転移が著明に抑制されていた (図 4A)。また *Thbs1*^{-/-} マウスの

原発巣では細胞傷害作用を持つ CD8⁺ T 細胞の浸潤や細胞死 (C-Cas3⁺) の増加を認め、抗がん免疫の活性化が確認された (図 4B)。scRNA-seq 解析においても、THBS1 KO 原発巣では活性化 CD8⁺ T 細胞の増加と疲弊 CD8⁺ T 細胞の減少が認められ (図 4C)、間質の THBS1 の阻害により腫瘍免疫が活性化し、がんの進展・転移が抑制されると考えられた。つまり、間質の THBS1 阻害は上皮細胞以上に腫瘍微小環境に作用することで抗腫瘍効果を示している可能性が示唆された。



そこで、新規のコンビネーション治療として THBS1 と免疫チェックポイント (PD1/PDL1) の同時阻害の治療効果を MTO 同所移植モデルにより検証した。まず、*Thbs1*^{-/-}マウスに対する MTO 同所移植モデルで抗 PD1 抗体を投与したところ、非常に興味深いことに、原発巣・転移巣共に劇的な腫瘍抑制効果が確認できた (図 5)。



このように、本研究では当初の予定と異なり、がん幹細胞に発現する CD47 という受容体でなく、間質で高発現する CD47 のリガンドである THBS1 を標的とすることにより、抗腫瘍効果とがん免疫治療抵抗性が改善することが確認できた。これらの成果は、特に高悪性度の大腸がんに対する極めて有効な治療戦略を提示することにもつながり、高い社会的ニーズに対応するものであると思われる。