

化学放射線療法後の膵癌局所免疫における IRF-5 の 抗腫瘍効果の解明

横浜市立大学医学部 消化器・腫瘍外科学

三宅 謙太郎

I 要 旨

膵癌の唯一の根治療法は手術療法であり、根治切除を目指し、現在までに国内外で多くの膵癌に対する術前療法の研究がされてきた。その中でも術前療法（化学療法または化学放射線療法）はその治癒切除率を向上させ、予後を改善するとされている。申請者らはこれまで術前化学放射線治療後の膵癌腫瘍微小環境の変化を解析してきた。その結果、腫瘍関連マクロファージと転写制御因子である Interferon regulatory factor-5 (IRF-5) との逆相関の関連が示唆され、IRF-5 の何かしらの抗腫瘍効果があることに着目した。そこで本研究ではヒトと同様な腫瘍微小環境を構築する膵癌同系同種移植モデルマウスを用いて、術前化学放射線治療が腫瘍微小環境にもたらす変化のメカニズムを明らかにし、それと IRF-5 のかかわりを明らかにすることを目的とした。しかし、結果として同モデルへの放射線療法の施行は困難であり、当初の研究計画通りの遂行ができなかった。今後は IRF-5 ノックアウトマウスを用いて、IRF-5 が治療標的とすることの妥当性の検証する方針とした。

II 目 的

膵癌における腫瘍微小環境は腫瘍細胞、間質細胞や細胞外成分で構成される。その中で免疫抑制細胞として制御性 T 細胞、腫瘍関連マクロファージ、myeloid-derived suppressor cells

が存在し、腫瘍浸潤リンパ球の浸潤を抑制し、腫瘍増殖に関与する。近年、化学療法や放射線療法による膵癌における腫瘍微小環境の変化が報告されている。

申請者らは 2008 年より進行膵癌症例を対象に術前化学放射線療法を導入してきた。切除例の予後解析の結果、放射線化学療法がもたらす免疫増感作用が膵癌術後の長期予後を向上させることが示唆された。これまで我々は術前化学放射線療法施行症例における腫瘍微小環境における制御性 T 細胞や腫瘍関連マクロファージの減少と腫瘍浸潤リンパ球の増加が予後因子となることを報告してきた¹⁾。また、症例を蓄積すると女性で予後が良好であり、腫瘍微小環境では女性は男性と比較し、腫瘍増殖作用のある M2 like macrophage の CD204 陽性腫瘍関連マクロファージの集積が抑制されていた。興味深いことに CD204 陽性腫瘍関連マクロファージは女性に多く存在する転写制御因子である Interferon regulatory factor-5 (IRF-5) との逆相関の関係を認めた。IRF-5 は主に細胞質にあって、TLR 刺激（特に TLR7,8,9 などの核酸刺激、LPS に応答する TLR4 もある程度）を受けるとアダプター分子 MyD88 依存性に、ユビキチン化・その後リン酸化による翻訳後修飾を受け、二量体化して核に移行し、I 型 IFN や炎症性サイトカイン遺伝子を誘導します。IRF-5 は腫瘍関連マクロファージのうち抗炎症作用のある M1 like macrophage への分化を促進し、M1 と M2 の極性化に関係していることが推測され、放射線化学療法後の腫瘍微小環境では

IRF-5 により腫瘍関連マクロファージの極性化が変化し、抗腫瘍作用が増強される可能性示唆された²⁾。

本研究では膀胱癌に対する化学放射線療法 (Chemoradiotherapy、以下 CRT) が膀胱癌微小環境における免疫細胞にもたらす変化と IRF-5 の関係を「がん患者モデル」を用いて明らかにすることを目的とした。

III 方法

1. 実臨床の治療と同様の術前治療モデルを構築するために、マウス膀胱癌オルガノイド株をマウス膀胱癌オルガノイド株から樹立した腫瘍片の同種同所移植マウスモデルを作成し、腫瘍片移植後、2、3 週間目に膀胱尾部切除を施行し、再発の有無、形式を検証した。(図 1)
腫瘍部切除は十分に margin を確保し、切除後に腹腔内洗浄を行った。
2. 膀胱癌切除検体におけるリンパ球の浸潤の確認をするために CD3 リンパ球の免疫染色を行った (CD3 ϵ (D4V8L) cell signaling)。その後 FACS 解析によるサブグループの解析を行った。

3. 膀胱癌同所移植モデルへの局所への放射線照射を施行した。

IV 結果

1. 同所移植後 2 週間後と 3 週間後に膀胱尾部切除を施行した後の再発期間、再発形式を検討した。2 週目では無再発となる症例を認めたが、3 週目の症例ではすべて局所再発または腹膜播種再発を認めた。(図 2、3)
2. 同所移植モデルにおける腫瘍浸潤リンパ球の存在を免疫染色で確認確認した。CD3+リンパ球の浸潤を確認した (図 4)。また FACS 解析によるサブセット解析では腫瘍浸潤リンパ球の中でも CD103+ である Tissue resident T cell の発現も確認した (図 5)。現在、腫瘍関連マクロファージの解析を行っている。
3. 同所移植マウスへの放射線治療を試みたが、当施設での同所への定位的な照射が困難であった。また照射範囲に伴いによる骨髓毒性を来すため、免疫細胞の評価が困難であると判断した。

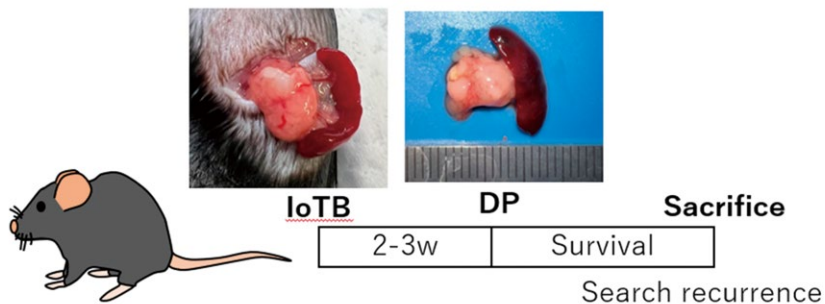


図 1 術前治療モデル

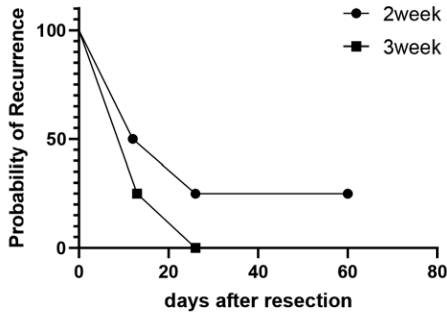


図 2 再発期間

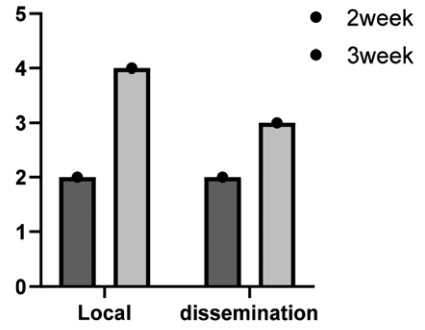


図 3 再発形式

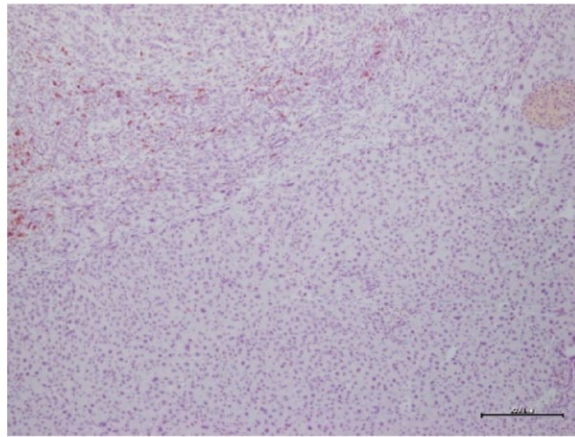


図 4 CD3腫瘍浸潤リンパ球 (×40)

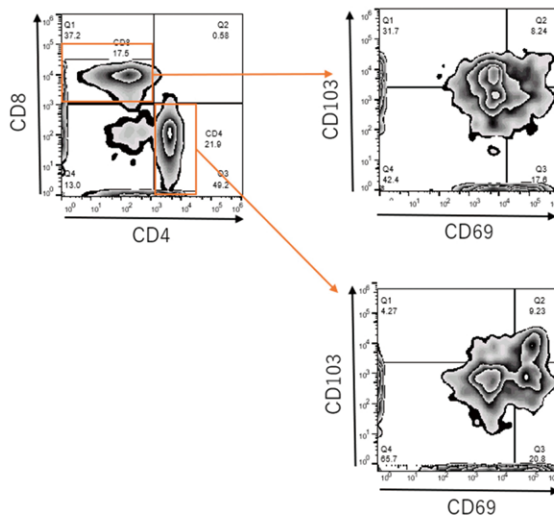


図 5 腫瘍浸潤リンパ球のサブセット解析

V 考 察

本研究で用いた膵癌同種同所移植モデルを用いて、切除後の再発の解析、腫瘍環境の検討は可能であった。同モデルを用いて、原発巣だけでなく、再発病変の腫瘍微小環境を解析することで、新たな術後治療が確立できる可能性が示唆された。しかし、同モデルでは腫瘍部局所への化学放射線療法が困難であり、研究計画に沿った研究を遂行することが難しかった。そこで当施設での免疫学教室にご協力いただき、今後、IRF-5 ノックアウトマウスを用いて、同所移植を行い、膵癌微小環境における免疫細胞の変化を野生型と比較する方針とした³⁾。欠損マウスを用いる事で IRF-5 が膵癌微小環境での腫瘍関連マクロファージに発現することで抗腫瘍免疫にかかわることを解明することを目的とする。その際、転写因子である IRF5 が腫瘍関連マクロファージでどのような遺伝子の発現を調節しているのかは、野生型と IRF-5 欠損膵癌腫瘍関連マクロファージで RNA-seq や ATAC-seq を行うことで解明する予定である。

VI 結 語

同モデルを用いて、実臨床に沿った術前化学放射線を施行することは困難であった。今後、IRF-5 ノックアウトマウスを用いて、膵癌微小環境における免疫細胞の変化を野生型と比較する方針とし、IRF5 が腫瘍関連マクロファージでどのような遺伝子の発現を調節しているのを解明していく予定である。

参考文献

- 1) Murakami T, Hiroshima Y, Matsuyama R, Homma Y, Hoffman RM, Endo I. Role of the tumor microenvironment in pancreatic cancer. *Ann Gastroenterol Surg.* 2019; 3(2): 130-7.
- 2) Matsuki H, Hiroshima Y, Miyake K, Murakami T, Homma Y, Matsuyama R, et al. Reduction

of gender-associated M2-like tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment of patients with pancreatic cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2021; 28(2): 174-82.

- 3) Ban T, Kikuchi M, Sato GR, Manabe A, Tagata N, Harita K, et al. Genetic and chemical inhibition of IRF5 suppresses pre-existing mouse lupus-like disease. *Nat Commun.* 2021; 12(1): 4379.