

京都大学	博士（医学）	氏名	尾松 万悠紀
論文題目	THBS1-producing tumor-infiltrating monocyte-like cells contribute to immunosuppression and metastasis in colorectal cancer (大腸がんにおいてTHBS1を分泌する腫瘍浸潤性単球様細胞は免疫抑制と転移形成に重要である)		
(論文内容の要旨) 遺伝子発現プロファイルに基づく Consensus Molecular Subtype (CMS)分類 (Guinney J et al, <i>Nat Med</i> , 2015)によると、間質反応の強い大腸がん (CMS4)は免疫抑制性の腫瘍微小環境を形成し、予後が悪い。CMS4 大腸がんでは炎症関連パスウェイが亢進していることから、今回、炎症関連因子である、Thrombospondin-1 (THBS1)に注目し、大腸がんにおける役割を検討することとした。 まず、ヒト大腸がん組織における THBS1 の発現を免疫染色と in situ hybridization で確認したところ、THBS1 は腫瘍間質部において高発現していることが判明した。さらに、ヒト大腸がんの大規模遺伝子発現データを用いた bioinformatics 解析と、331 例の外科臨床検体を用いた組織学的解析から、THBS1 を高発現する大腸がんでは間質反応が亢進しており、転移率が高く、予後不良であることが明らかとなった。このことから、THBS1 は大腸がんの間質部に高発現し、悪性度の寄与する可能性が考えられた。 がん組織における THBS1 の機能を明らかにするため、CMS4 大腸がんの性質を持つマウス大腸がん由来オルガノイド (mouse tumor organoid: MTO (Tauriello D.V.F. et al, <i>Nature</i> , 2018))によるマウスの直腸同所移植モデルを使用し、解析した。同モデルでは、THBS1 ノックアウト(THBS1 KO)マウスに同所移植することで、腫瘍細胞以外の間質細胞特異的に THBS1 が欠損した状態でフェノタイプを解析することが可能である。結果、野生型マウスに対する MTO の同所移植では、直腸移植部からリンパ節、肝への転移がみられるのに対し、THBS1 KO マウスでは、肝転移、リンパ節転移が抑制され、生存予後が改善することが判明した。免疫染色、FACS、RNA sequencing (RNA-seq)、single cell RNA-seq (scRNA-seq)を用いた解析により、THBS1 KO マウスの腫瘍では、免疫・炎症関連のシグナルの亢進、活性化 CD8 陽性 T 細胞の増加が認められた。そこで、CD8 陽性 T 細胞を排除すると、THBS1 KO マウスにおいて転移が再出現するようになった。さらに、in vitro での T 細胞刺激実験において、THBS1 が直接 T 細胞の活性、細胞障害性を減弱させることが確認された。以上の結果から、THBS1 は CD8 陽性 T 細胞の活性を直接抑制することで抗がん免疫を抑制し、高悪性度大腸がんの転移形成を促進していることが示唆された。 次に、THBS1 のソース細胞の同定を試みた。免疫染色の結果、CD11b 陽性の骨髄系細胞が THBS1 の主要発現細胞である可能性が考えられた。さらに、scRNA-seq 解析から、骨髄系細胞の中でも単球様細胞が THBS1 のソースとして重要と示唆された。 THBS1 発現細胞が骨髄由来であることを確認するため、野生型マウスの骨髄を THBS1 KO マウスに移植したキメラマウスを作成した。同マウスにおける同所移植実験では、腫瘍中の THBS1 の発現や転移形成能が野生型マウスと同レベルまで回復したことから、THBS1 発現細胞は骨髄由来であることが確認できた。ヒト大腸がん大規模遺伝子発現データと MTO 腫瘍の bioinformatics 解析から、THBS1 を高発現する大腸がんでは CXCL12 が高発現していることが判明した。さらに、CXCL12 阻害剤の投与により、MTO 同所移植腫瘍における THBS1 の発現が低下し、転移が抑制された。以上の結果から、THBS1 を発現する単球様細胞は CXCL12 の作用により骨髄から腫瘍中に遊走することが明らかとなった。			

最後に、THBS1 阻害と既存の抗がん治療との併用効果を確認するために、THBS1 KO マウスの MTO 同所移植モデルにおいて、抗 PD-1 抗体、抗 VEGFR2 抗体、あるいは FOLFOX による治療実験を行なった。結果、いずれの治療併用群においても、野生型と比較し、転移はより強く抑制され、また直腸移植部の増大も抑制された。これらの結果から、THBS1 の阻害は転移抑制だけではなく、既存の治療薬の抗腫瘍効果を増強させることが明らかとなった。

以上より、高悪性度大腸がんでは、CXCL12 の作用により骨髄から腫瘍に遊走する単球様細胞が THBS1 を分泌し、抗がん免疫を抑制することで転移促進、治療抵抗性の増強をもたらすことが示唆された。

(論文審査の結果の要旨)
本研究では、高悪性度大腸癌における Thrombospondin-1 (THBS1)の役割を解明するために、ヒト大腸癌サンプルおよびマウス大腸癌オルガノイド (MTO) の immune competent mouse に対する同所移植モデルを用いて解析を行なった。ヒト大腸癌サンプルの解析から、THBS1 は腫瘍間質に限局的に発現しており、高悪性度大腸癌で高発現し、予後不良因子であることを明らかにした。その結果をもとに、THBS1 ノックアウトマウスに MTO の同所移植を行い、間質特異的に THBS1 を排除した腫瘍を解析することで、間質の THBS1 が抗腫瘍免疫を抑制することで転移形成を促進していることを見出した。さらに、下流因子に関しては in vivo と in vitro モデルを用いて CD47、CD36 の両レセプターが THBS1 排除による転移抑制に重要であることを示した。加えて、マウス大腸癌とヒト大腸癌のシングルセル RNA シーケンス解析を行うことで、THBS1 発現細胞が単球様細胞であることを同定した。また、キメラマウスを用いた実験から THBS1 発現細胞は骨髄由来であることを示し、阻害剤投与実験から、その誘導に CXCL12 が重要であることを明らかにした。さらに、臨床応用を念頭に、マウスの同所移植実験に既存の抗がん剤と THBS1 除去を併用することで、THBS1 の除去が既存の抗がん剤の効果を増強することを示した。

以上の研究は高悪性度大腸癌における転移促進機構の一端の解明に貢献し、高悪性度癌に対する有効な新規治療戦略の開発に繋がる可能性が高い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 6 年 1 月 22 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。