

一致性聚类鉴定两种不同的胰腺导管腺癌免疫亚型

洪叶枫^{1*}, 王凤娇¹, 王帅帅¹, 张文忠^{2#}

¹青岛大学医学部, 山东 青岛

²青岛大学附属医院心血管内科, 山东 青岛

收稿日期: 2023年6月6日; 录用日期: 2023年7月1日; 发布日期: 2023年7月7日

摘要

胰腺导管腺癌早期诊断困难, 容易发生肝转移, 致死率极高。肿瘤微环境内免疫细胞, 纤维细胞与肿瘤细胞之间相互的作用形成了胰腺癌复杂的肿瘤微环境并在其进展过程中发挥了重要作用。免疫治疗在黑色素瘤, 结直肠癌, 胃癌等晚期肿瘤取得重大突破, 显著延长了病人生存周期。然而在胰腺癌中, 免疫检查点抑制剂应答率仅为5%, 疗效有限。大量研究表明, 免疫细胞丰度与病人预后, 免疫治疗疗效相关。了解不同胰腺癌免疫亚型之间潜在的调节机制, 有助于开发免疫治疗新靶点, 指导临床精准用药并预测免疫治疗疗效。本研究通过对145例胰腺癌患者免疫评分, 基质评分及肿瘤纯度一致性聚类, 鉴定出两种不同的胰腺癌免疫亚型。差异分析, 富集分析及蛋白互作网络发现了30个调控肿瘤微环境的hub基因。随后单细胞测序数据分析发现这些hub基因在肿瘤细胞中密度最高, 这些基因可能是调控肿瘤细胞与免疫细胞, 纤维细胞的关键基因。在形成胰腺癌免疫抑制的肿瘤微环境时发挥了重要作用, 可能是胰腺癌免疫治疗的新靶点。

关键词

胰腺导管腺癌, 免疫亚型, 一致性聚类, 单细胞测序

Identification of Two Distinct Immune Subtype of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by Consensus Clustering

Yefeng Hong^{1*}, Fengjiao Wang¹, Shuaishuai Wang¹, Wenzhong Zhang^{2#}

¹Medical College, Qingdao University, Qingdao Shandong

²Department of Cardiovascular Medicine, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

*第一作者。

#通讯作者 Email: xmczwz@qdu.edu.cn

文章引用: 洪叶枫, 王凤娇, 王帅帅, 张文忠. 一致性聚类鉴定两种不同的胰腺导管腺癌免疫亚型[J]. 临床医学进展, 2023, 13(7): 10787-10795. DOI: 10.12677/acm.2023.1371507

Abstract

Pancreatic ductal adenocarcinoma is an extremely aggressive tumor which susceptible to liver metastasis and is difficult to diagnose in the early stages. The interaction between immune cells, fibroblasts and tumour cells within the tumour microenvironment forms the complex tumour microenvironment of pancreatic cancer and plays an important role in its progression. Immunotherapy has made significant breakthroughs in advanced tumours such as melanoma, colorectal cancer and gastric cancer, significantly prolonging patient survival days. However, in pancreatic cancer, the response rate to immune checkpoint inhibitors is only 5%, with limited efficacy. Numerous studies have shown that the abundance of immune cells correlates with patient prognosis and the efficacy of immunotherapy. Understanding the potential regulatory mechanisms between different immune subtypes of pancreatic cancer can help develop new targets for immunotherapy, guide the precise use of clinical drugs and predict the efficacy of immunotherapy. In this study, two distinct immune subtypes of pancreatic cancer were identified by consensus clustering of immune scores, stromal scores and tumour purity in 145 pancreatic cancer patients. Differential analysis, enrichment analysis and protein interaction networks identified 30 hub genes that regulate the tumour microenvironment. Subsequent analysis of single-cell sequencing data revealed that these hub genes were found in the highest densities in tumour cells and that these genes may be key genes regulating tumour cells with immune cells and fibroblasts. They play an important role in shaping the immunosuppressive tumour microenvironment in pancreatic cancer and may be new targets for immunotherapy of pancreatic cancer.

Keywords

Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Immune Subtype, Consensus Cluster, Single Cell Sequencing

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 背景

胰腺导管腺癌是胰腺最常见的恶性肿瘤,发病率与死亡率几乎相等[1][2]。据全球癌症统计报道,2022年胰腺癌新发病例在所有肿瘤中排第七位,而死亡病例在所有肿瘤中位列第三[1]。预计至2030年左右,胰腺癌将超过胃癌,结肠直肠癌成为肿瘤导致死亡的第二大主要原因。由于早期症状不明显且缺乏有效的早期诊断指标,大约80%的病人在确诊时已发生了远处转移[3]。吉西他滨对延长进展期胰腺癌病人生存期作用有限[4]。因此寻找新的治疗方法对改善胰腺癌预后十分重要。

近几年来,以免疫检查点抑制剂为代表的免疫治疗在结肠直肠癌,胃癌及黑色素瘤治疗取得重大突破[5]。然而,由于胰腺癌免疫细胞丰度较低和免疫抑制的肿瘤微环境,免疫治疗在胰腺癌的疗效十分有限[6]。由于肿瘤组织内部的抑制性,不同病人对免疫治疗的应答也不相同[7]。因此,建立胰腺癌免疫亚型对改善胰腺癌病人预后,精准诊疗及提高免疫治疗疗效十分重要。

本研究通过一致性聚类方法,基于免疫微环境评分的结果,对145例胰腺癌患者重新分组。随后,通过对两组胰腺癌患者的差异分析,功能富集分析,蛋白互作网络分析来寻找调控胰腺肿瘤微环境的关

键基因。为区分不同胰腺癌免疫亚型提供了理论支持，同时也为开发胰腺癌免疫治疗新靶点提出了新思路。

2. 材料与方法

2.1. 数据来源

从 GEO 数据库 GSE 71729 芯片获取了 145 例胰腺癌患者(GSM 1844109-GSM 1844245)的转录组测序数据。转录组数据标准化采用每千个碱基的转录每百万映射读取的 fragments (FPKM)的方法。

2.2. 免疫亚型

使用“ESMIMATER”R 包计算 145 例胰腺导管腺癌患者的免疫评分，基质评分及肿瘤纯度。基于免疫评分，基质评分及肿瘤纯度，使用“consensusclusterplus”R 包对 145 例胰腺导管腺癌患者进行一致性聚类。使用 pearson 相关距离的 pam 聚类，对 80%的样本重新抽样 10 次。使用经验累积分布函数图来确定最佳的聚类数量。

2.3. 差异分析

利用 lmFit 函数进行多元线性回归，进一步使用 eBays 函数进行计算 t 统计量，通过对标准误差的经验贝叶斯节制来计算差异表达的对数，最终获得每个基因的差异显著性。

2.4. 富集分析

将从 KEGG rest API 下载了京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)通路富集分析基因注释作为背景，将筛选出差异基因映射至背景合集中，使用 clusetrprofiler R 包进行富集分析。最小基因设定为 5，最大基因集设定为 5000。 $p < 0.05$ 且 $FDR < 0.25$ 认为有统计学意义。

2.5. 蛋白互作网络

本研究运用 cytoscape 中的 cytohubba 插件进行分析，本研究跟根据连接度 Degree 进行排序，筛选 Degree 前 30 的基因作为本研究的 hub 基因。

2.6. 单细胞测序

我们使用“seurat”R 包进行对 16 例胰腺导管腺癌患者单细胞测序数据进行质控过滤，检测到基因数小于 400，超过 6000，线粒体比例超过 15%的细胞被移除。随后，我们采用 Findvirablefeatures 函数，选取 vst 方法，挑选前 1500 高变基因进行下游分析。运用主成分分析方法对 1500 个高变基因进行降维。采用 tsne 对主成分分析结果进一步降维。用“singleR”R 包进行注释。使用 seuratR 包注释细胞类型。

3. 结果

3.1. 免疫亚型鉴定

首先，我们使用“ESTIMATE”R 包计算 145 例胰腺癌患者的免疫评分，肿瘤评分及基质评分。随后，基于这些患者的肿瘤微环境评分，我们使用“consensusclusterplus”R 包对这些患者进行一致性聚类。CDF 曲线显示， $k = 2$ 时分型结果最好(图 1)。其中亚型 1 免疫评分，基质评分较高，命名为热肿瘤，亚型 2 免疫评分较低，命名为冷肿瘤。

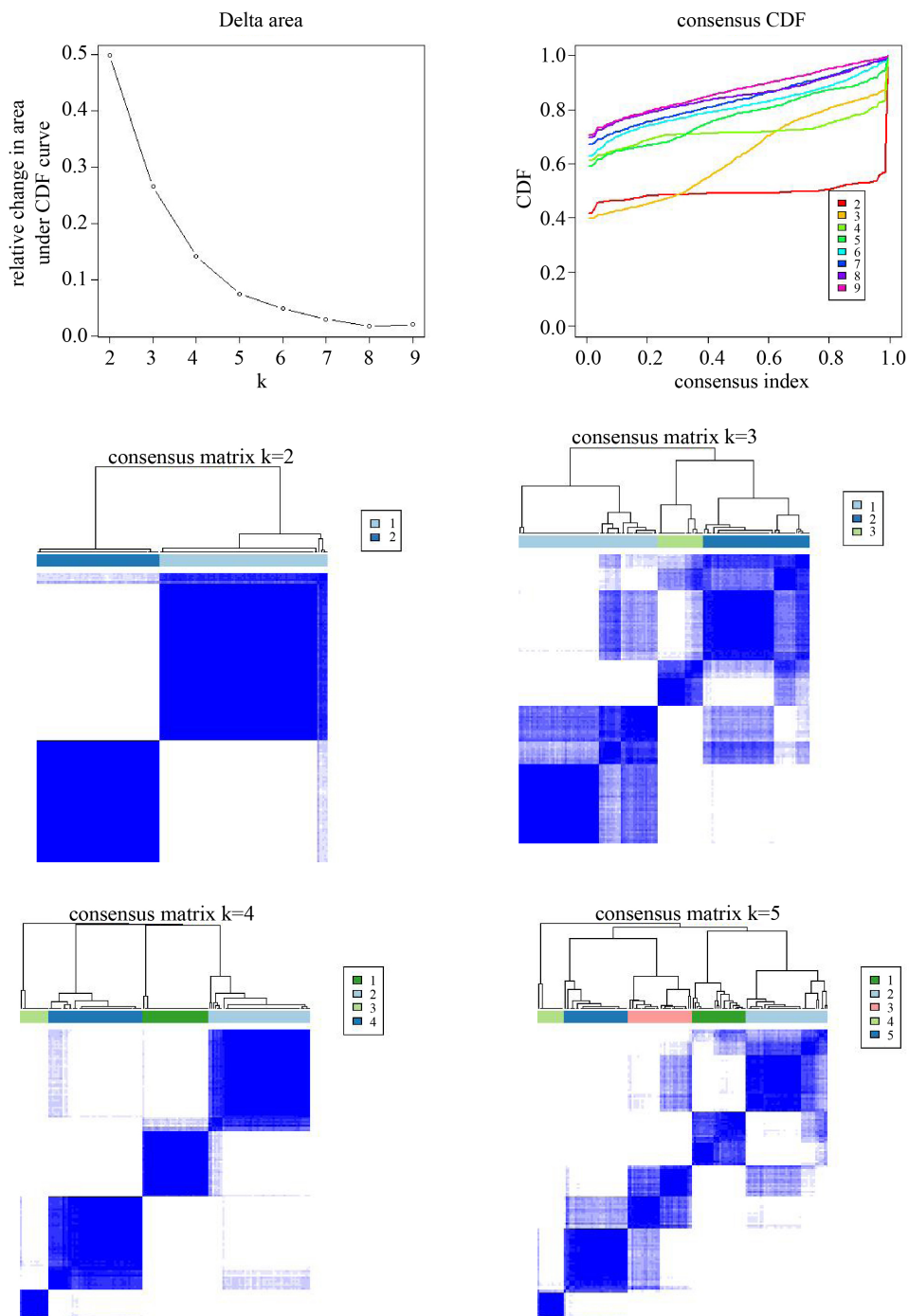


Figure 1. Identification of the PDAC immune subtype
图 1. 胰腺导管腺癌免疫亚型鉴定

3.2. 差异分析

随后，我们采取“limma”包对这两种不同的免疫亚型进行差异分析，来寻找两种免疫亚型之间的差异基因，adj p < 0.05 且 logFC > 1 设置为筛选差异基因的阈值。在这两种免疫亚型之间，我们会总共鉴定到 298 个差异基因(见图 2)。

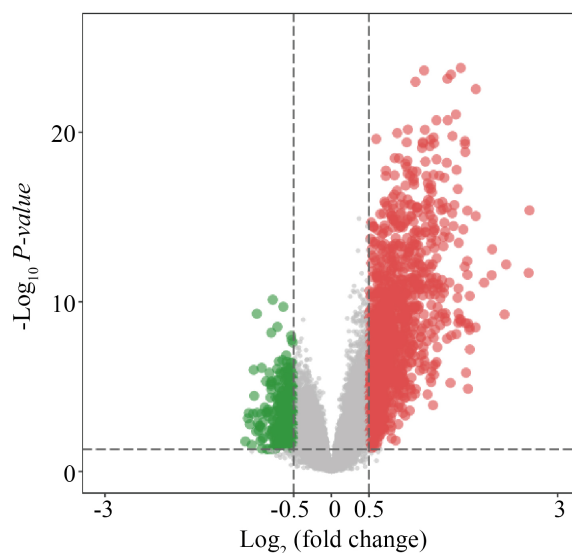


Figure 2. Volcano map for differential expressed analysis of different immune subtypes

图 2. 不同免疫亚型差异分析火山图

3.3. 功能富集分析

我们对这 298 个差异基因进行了 KEGG 富集分析。富集分析结果表明这些差异基因主要富集在 Cell adhesion molecules, Intestinal immune network for IgA production, Hematopoietic cell lineage, Complement and coagulation cascades, Chemokine signaling pathway, Antigen processing and presentation, Cytokine-cytokine receptor interaction, Th1 and Th2 cell differentiation, Leukocyte transendothelial migration, Th17 cell differentiation, ECM-receptor interaction, NF-kappa B signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, Natural killer cell mediated cytotoxicity, Human T-cell leukemia virus 1 infection 等免疫及纤维化相关通路, 说明这些基因可能在调控肿瘤微环境发挥了重要作用, 可能成为预测胰腺癌免疫治疗疗效, 提高胰腺癌患者对免疫治疗应答率的重要靶点(图 3)。

3.4. 蛋白 - 蛋白互作网络分析

运用 cytoscape 中的插件 cytoHubba 进行基因 - 基因相互作用网络分析, 根据节点在网络中的接连接进行排名, 确定了前 30 个基因: C1QA, CSF1R, C1QB, THBS1, LUM, ITK, COL5A1, COL3A1, COL1A1, CD28, CD3G, CD8A, TYROBP, FBN1, COL1A2, DCN, CD247, PIPRC, FN1, LCP2, CFP, BTK, CCR5, MMP9, CXCR4, C1QC, ITGB2, VCAN, CXCL12, CD2。这 30 个基因的相互作用见图 4。

3.5. 单细胞测序检测 hub 基因表达

为了评估这些基因是如何调控肿瘤免疫微环境, 我们从 GSE 155698 下载了 16 例胰腺导管腺癌患者的单细胞测序数据。选取前 1500 个高变基因进行下游分析(图 5(a))。在胰腺癌中, 总共鉴定出 9 种细胞: T 细胞, B 细胞, 内皮细胞, 肿瘤细胞, 纤维细胞, 单核细胞, 中性粒细胞, NK 细胞和组织干细胞(图 5(b))。使用“seurat”包中 AddModuleScore 函数对这 30 个 hub 基因在各细胞类型进行打分, 结果表明这些细胞在肿瘤细胞中密度最高(图 5(c))。

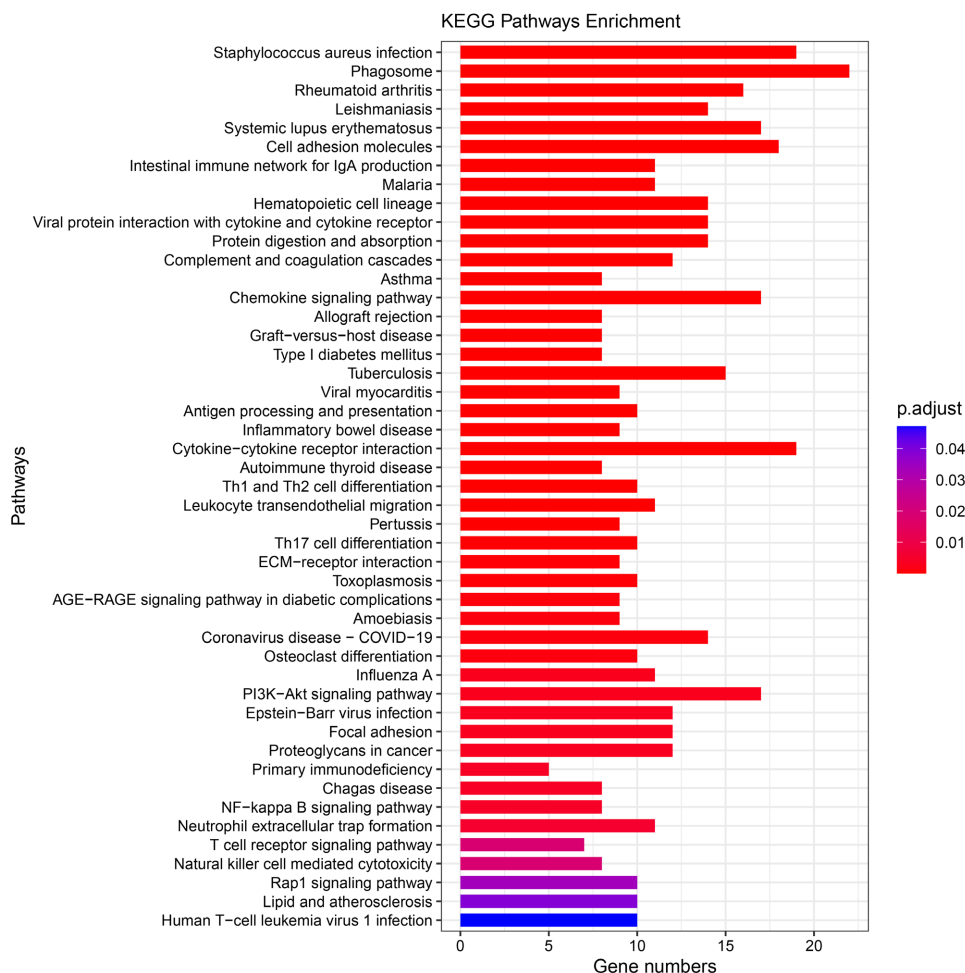


Figure 3. KEGG enrichment analysis
图 3. KEGG 富集分析

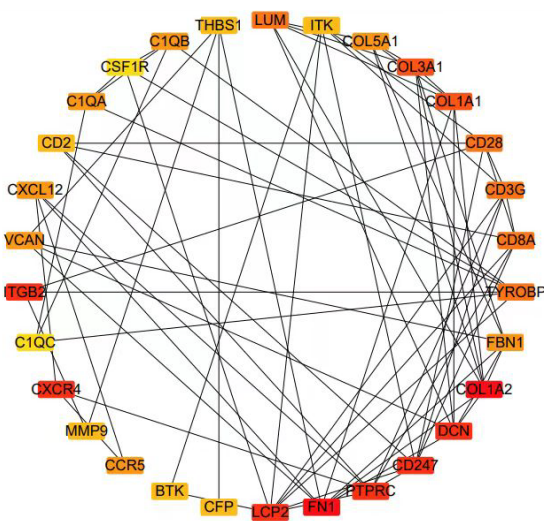


Figure 4. Protein-protein interaction network
图 4. 蛋白 - 蛋白互作网络

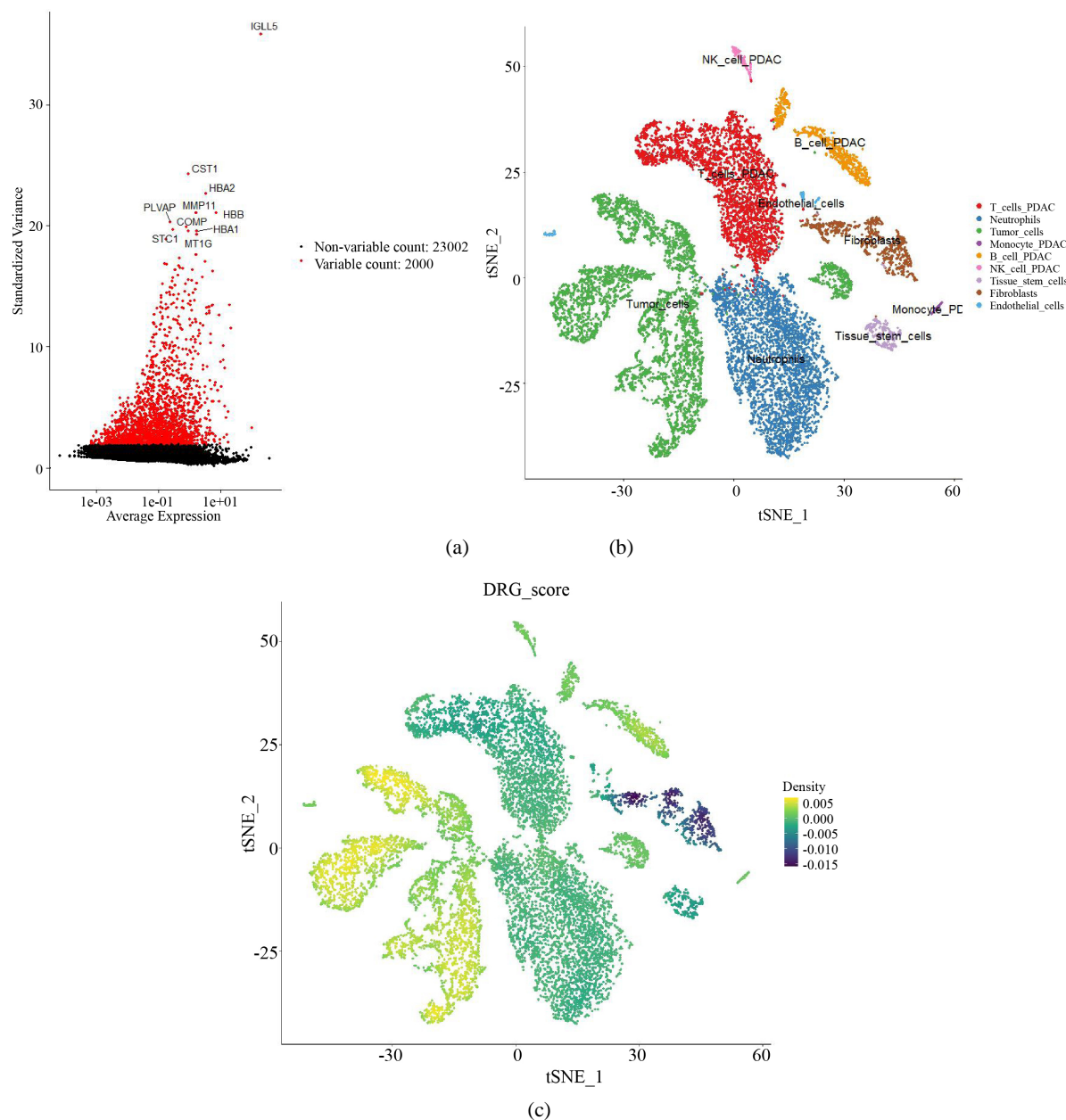


Figure 5. Single-cell sequencing for detection of hub gene expression. (a): Top 1500 highly variable genes. (b): Classify cell populations using the tSEN algorithm. (c): Hub Gene density map

图 5. 单细胞测序检测 hub 基因表达。(a) 前 1500 高变基因; (b) 通过 tSEN 算法对细胞群分类; (c) hub 基因密度图

4. 讨论

免疫治疗，特别是免疫检查点抑制剂的出现，开创了肿瘤治疗的新时代。大量研究表明，免疫细胞丰度，特别是 CD8T 细胞浸润水平与病人预后及免疫治疗疗效密切相关[8] [9]。由于肿瘤组织内部的异质性，不同病人对治疗的敏感性不同。本研究的目的是建立一种新的胰腺导管腺癌免疫亚型，为胰腺肿瘤的免疫治疗提供指导。

我们通过“ESTIMATE”R 包对 145 例胰腺癌患者肿瘤微环境中免疫浸润及纤维化程度进行评估。随后使用“consensusclusterplus”R 包对这 145 例胰腺癌患者进行重新分组，建立胰腺癌免疫亚型。对这

两种免疫亚型进行差异分析,共鉴定出 298 个差异基因。KEGG 富集分析结果表明这些差异基因主要与 Cell adhesion molecules, Intestinal immune network for IgA production, Hematopoietic cell lineage, Complement and coagulation cascades, Chemokine signaling pathway, Antigen processing and presentation, Cytokine-cytokine receptor interaction, Th1 and Th2 cell differentiation, Leukocyte transendothelial migration, Th17 cell differentiation, ECM-receptor interaction, NF-kappa B signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, Natural killer cell mediated cytotoxicity, Human T-cell leukemia virus 1 infection 等免疫,纤维粘连的通路相关。随后通过蛋白-蛋白互作网络,筛选出排名前 30 的 hub 基因,这些基因可能是调控肿瘤微环境的关键基因。

CSF1 与外周血单核细胞向肿瘤微环境的迁移有关。与 CSF1R 结合后,CSF1 促进单核细胞向巨噬细胞分化,并向促瘤的 M2 巨噬细胞表型发展[10]。有研究表明,在胰腺癌小鼠模型中,靶向 CSF1/CSF1R 轴可以重塑肿瘤微环境,提高胰腺癌小鼠对免疫检查点抑制剂的敏感性[11]。然而,一项 II 期临床研究表明,CSF1R 阻断并不能改善晚期 PDAC 患者对吉西他滨的敏感性(NCT 03336216)。CSF1R 阻断主要是抑制巨噬细胞的极化,促进细胞毒性 T 细胞的浸润,增加免疫检查点如 PD-L1 和 CTLA4 的表达[11]。因此,CSF1 抑制剂提高胰腺癌病人对免疫治疗敏感程度仍需进一步评估。同时,有报道称 CSF1 表达水平可以预测非小细胞肺癌的免疫治疗的疗效[12]。CSF1 预测胰腺癌免疫治疗疗效的能力仍需评估。

在单细胞测序层面,我们对这 30 个 hub 基因表达水平进行了评估。基因集评分结果表明,这些基因在肿瘤细胞表达水平最高。肿瘤微环境在胰腺癌进展中发挥了重要作用,免疫抑制的肿瘤微环境可能是胰腺癌对免疫治疗应答率低的主要原因[13]。胰腺癌微环境由基质细胞和免疫细胞组成。有助于胰腺癌进展的基质细胞主要是胰星状细胞(PSCs)、调节性 T 细胞(Tregs)、骨髓源性抑制细胞(MDSCs)和肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)。这些细胞和癌细胞可以分泌细胞外成分,如细胞外基质(ECM)、基质金属蛋白酶(MMP)、生长因子和转化生长因子- β (TGF β),以维持微环境。胰腺癌微环境有两个主要特点:严重纤维化和广泛的免疫抑制[14]。胰腺癌肿瘤微环境是指胰腺癌细胞的生存环境,主要由胰腺星状细胞,肿瘤相关成纤维细胞,免疫细胞与细胞外基质组成。本质上来讲,胰腺导管腺癌处于一个纤维结缔组织广泛沉积的肿瘤微环境内。广泛纤维细胞募集免疫抑制细胞,造成了胰腺肿瘤细胞免疫逃逸。广泛纤维化,缺血乏氧,免疫抑制的肿瘤微环境为肿瘤细胞的生长提供了条件。同时,纤维黏连的基质纤维压迫血管,限制了化疗药物向肿瘤细胞投递,使其对化疗药物产生耐受。这两个特点可以促进胰腺癌细胞增殖,通过直接抑制抗肿瘤免疫力来逃避免疫监视,或诱导免疫抑制性细胞增殖和转移。据此,我们推测这些 hub 基因主要定位于肿瘤细胞,可能与它们调控胰腺癌免疫抑制与纤维化的肿瘤微环境有关。它们可能是增强胰腺癌免疫治疗疗效的潜在靶点。

本研究不足之处在于所有数据均来自公共数据库,完整的临床数据难以获得,无法评估肿瘤微环境与生存,预后,肿瘤分型及各项生化指标的关系。

总之,我们通过建立胰腺导管腺癌的免疫亚型以及之后的转录组学,单细胞转录组学分析,初步探索了不同胰腺癌免疫亚型的分子调节机制。基于蛋白互作网络和单细胞测序分析,我们鉴定了 30 个调控肿瘤细胞与免疫,纤维细胞互作的 hub 基因,可能成为治疗胰腺癌的潜在靶点。

参考文献

- [1] Siegel, R.L., Miller, K.D., Wagle, N.S., et al. (2023) Cancer Statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **73**, 17-48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- [2] Li, Y.J., Wu, J.Y., Wang, J.M., et al. (2020) Emerging Nanomedicine-Based Strategies for Preventing Metastasis of Pancreatic Cancer. *Journal of Controlled Release*, **320**, 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.041>
- [3] Wolfgang, C.L., Herman, J.M., Laheru, D.A., et al. (2013) Recent Progress in Pancreatic Cancer. *CA: A Cancer Jour-*

-
- nal for Clinicians*, **63**, 318-348. <https://doi.org/10.3322/caac.21190>
- [4] Maeda, S., Unno, M. and Yu, J. (2019) Adjuvant and Neoadjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *Journal of Pancreatology*, **2**, 100-106. <https://doi.org/10.1097/JP9.0000000000000028>
- [5] Brahmer, J.R., Tykodi, S.S., Chow, L.Q., *et al.* (2012) Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *The New England Journal of Medicine*, **366**, 2455-2465. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1200694>
- [6] Iorio, V., Rosati, A., D'Auria, R., *et al.* (2018) Combined Effect of Anti-BAG3 and Anti-PD-1 Treatment on Macrophage Infiltrate, CD8(+) T Cell Number and Tumour Growth in Pancreatic Cancer. *Gut*, **67**, 780-782. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314225>
- [7] Principe, D.R., Korc, M., Kamath, S.D., *et al.* (2021) Trials and Tribulations of Pancreatic Cancer Immunotherapy. *Cancer Letters*, **504**, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2021.01.031>
- [8] Gao, Y., Chen, S., Vafaei, S., *et al.* (2020) Tumor-Infiltrating Immune Cell Signature Predicts the Prognosis and Chemosensitivity of Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Frontiers in Oncology*, **10**, Article ID: 557638. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.557638>
- [9] Li, R., He, Y., Zhang, H., *et al.* (2021) Identification and Validation of Immune Molecular Subtypes in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Implications for Prognosis and Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, **12**, Article ID: 690056. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.690056>
- [10] Hamilton, J.A. (2008) Colony-Stimulating Factors in Inflammation and Autoimmunity. *Nature Reviews Immunology*, **8**, 533-544. <https://doi.org/10.1038/nri2356>
- [11] Fujiwara, T., Yakoub, M.A., Chandler, A., *et al.* (2021) CSF1/CSF1R Signaling Inhibitor Pexidartinib (PLX3397) Reprograms Tumor-Associated Macrophages and Stimulates T-Cell Infiltration in the Sarcoma Microenvironment. *Molecular Cancer Therapeutics*, **20**, 1388-1399. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-20-0591>
- [12] Qi, X., Qi, C., Wu, T., *et al.* (2020) CSF1R and HCST: Novel Candidate Biomarkers Predicting the Response to Immunotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, **19**. <https://doi.org/10.1177/1533033820970663>
- [13] Chronopoulos, A., Robinson, B., Sarper, M., Cortes, E., Auernheimer, V., Lachowski, D., Attwood, S., García, R., Ghassemi, S., Fabry, B. and Del Río Hernández, A. (2016) ATRA Mechanically Reprograms Pancreatic Stellate Cells to Suppress Matrix Remodelling and Inhibit Cancer Cell Invasion. *Nature Communications*, **7**, Article No. 12630. <https://doi.org/10.1038/ncomms12630>
- [14] Neeße, A., Algül, H., Tuveson, D.A. and Gress, T.M. (2015) Stromal Biology and Therapy in Pancreatic Cancer: A Changing Paradigm. *Gut*, **64**, 1476-1484. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309304>