

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19894

研究課題名(和文) Cetuximab加療後大腸癌のNGSを用いた腫瘍浸潤リンパ球のTCR解析

研究課題名(英文) Characterization of the T cell repertoire by deep T cell receptor sequencing in tissues and blood from patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab.

研究代表者

井上 由佳 (INOUE, Yuka)

山口大学・医学部附属病院・診療助教(4日/週)

研究者番号：50749835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究を実施するためプロトコールを作成しIRB承認後、症例集積を開始した。現在までに3例を登録した。症例集積と並行し本研究を行うきっかけとなった我々の研究の論文発表を行った。また、ペプチドワクチンとL-OHPベースの化学療法を施行した切除不能進行大腸癌の9症例を本研究と同様にmRNAを抽出しTCR- およびTCR- のcDNAを合成しシーケンスを行った。更にTCR多様性とPFSとの関連につき検討し、これを学会ならびに論文発表した。

研究成果の概要(英文)：We started this study, after approval of IRB (Institutional Review Board). Three cases were enrolled this study by now. During this study period, we published a paper of the study which was the opportunity to start this study. Furthermore, we published a paper and reported about analyzing the T cell repertoire in blood samples and cancer tissues in advanced colorectal cancer patients that had received cancer peptide vaccine and oxaliplatin-based chemotherapy, and investigating the relationship between the TCR diversity and the PFS (progression free survival).

研究分野：癌免疫学

キーワード：癌免疫学 進行大腸癌 セツキシマブ TCRレパートリー TCR- TCR- 多様性

1. 研究開始当初の背景

近年、多くの抗上皮増殖因子受容体(EGFR)抗体薬が開発され、その抗腫瘍効果はEGFR依存性のシグナル伝達経路の阻害に加え、抗体依存性細胞傷害活性(ADCC)の誘導が寄与していることが知られている。我々は大腸癌肝転移症例に対するCmabの作用機序につき病理組織学的検討を行いADCCが誘導されている可能性があることを証明した。更にcetuximab使用症例で癌局所にCD3・CD8陽性細胞の著明な浸潤を認め、ADCC活性に引き続き抗原提示細胞を介したtumor antigen spreadingが誘発され、腫瘍関連抗原に対するCTLが誘導されている可能性が示唆された(図1)。

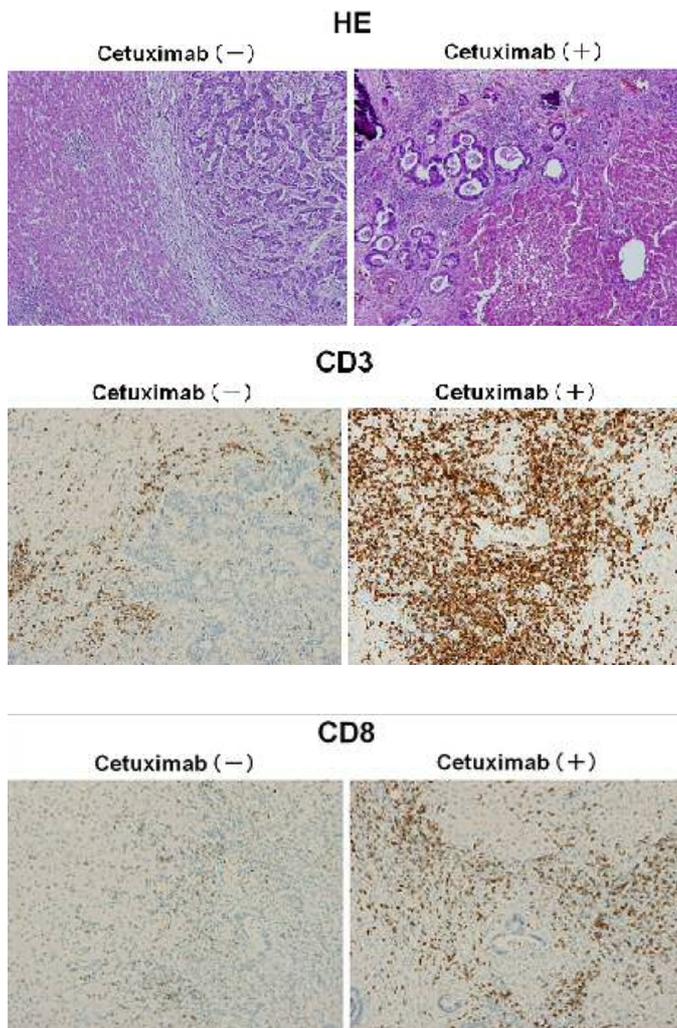


図1:大腸癌肝転移切除症例の病理組織

このことは、FIRE-3試験(切除不能進行・再発大腸癌に対する1st-lineとしての

FOLFIRI+Cetuximab vs

FOLFIRI+Bevacizumab)でCmab群がPFSでは有意差を認めずOSで有意差を認めた結果を裏付けられると考えられる。また、これまでに、腫瘍浸潤性T細胞(TILs)が乳癌、大腸癌、悪性リンパ腫、胃癌等において、化学療法の反応性や予後に関与しているとの報告がなされている。しかしながら、これらの検討のほとんどが、Tリンパ球全体を捉えた検討であり、どのような機能を持ったT細胞が癌細胞で活性化しているのかについては詳細な検討がなされていない。また、術前化学療法に分子標的薬を用いた症例における、同様の検討についてもこれまでに報告がない。

2. 研究の目的

T細胞受容体(TCR)はalpha鎖(TCRA)およびbeta鎖からなるヘテロ二量体として機能する。これらの遺伝子はV(D)J領域間でrearrangementを起こすことにより、多様なT細胞の抗原認識を可能にしている。このため、癌患者において免疫応答および癌の治療反応性に関与するT細胞の役割を解明するには、TCRのシーケンスレベルでの解析が有用と考えられる。次世代シーケンサー(NGS)は、免疫レパートリーのV領域(またはV(D)J配列)をパラレルに1000~1500万種類の塩基配列を安価に知ることが可能となった。Cmab使用前後のPBMCや癌組織からTCRシーケンスを同定することにより、Cmabのバイオマーカーとしての有効性の評価、さらにはCmabに免疫を惹起するメカニズムがあることが証明されれば、免疫療法との併用により更なる治療効果増強が期待でき、患者に恩恵をもたらすことになる。

3. 研究の方法

術前化学療法を行う大腸癌患者で、本研究について十分な説明を受け、インフォームド・コンセントを取得した患者を対象とする。

治療前後の末梢血単核球 (PBMC) および切除標本の腫瘍部分より検体を採取する。それぞれから、RNA を抽出し SMART 法を用いて TCRA および TCRB の完全長 cDNA を合成し、Ion Torrent PGM シーケンサーでシーケンスを行う。得られたシーケンスデータをヒトゲノムにマッピングし、TCR レポートリーおよびその発現量を決定し、cetuximab を用いた術前化学療法前後の比較、および cetuximab を用いない術前化学療法を行った症例との比較を行う。更には予後との関連を検討する。

4. 研究成果

本研究を実施するためプロトコールを作成し、IRB にて承認された。IRB 承認後、症例集積を開始した。当院において術前化学療法を行う大腸癌患者で、本研究について十分な説明を受け、インフォームド・コンセントを取得した患者を集積している間、本研究を行うきっかけとなった我々の研究、即ち、肝転移を有する進行大腸癌症例に対し肝切除を施行した症例を術前の加療毎に病理組織学的に検討を行い、cetuximab 使用症例で癌局所に CD3・CD8 陽性細胞の著明な浸潤を認め、ADCC 活性に引き続き抗原提示細胞を介した tumor antigen spreading が誘発され、腫瘍関連抗原に対する CTL が誘導されている可能性が示唆されたが、この研究に関する論文発表を行った (下記論文発表 2)。

さらに、ペプチドワクチンと L-OHP ベースの化学療法を施行した切除不能進行大腸癌の 9 症例で、本研究と同様に mRNA を抽出し TCR- α および TCR- β の cDNA を合成しシーケンスを行った。更に TCR 多様性と PFS: progression-free survival との関連につき検討を行った。その結果、治療前後の末梢血中の TCR- α ・TCR- β のクロノタイプは相関を認めたが (図 2)、一方で治療後の癌組織中の TCR- α ・TCR- β のクロノタイプでは相関は認めなかった (図 3)。

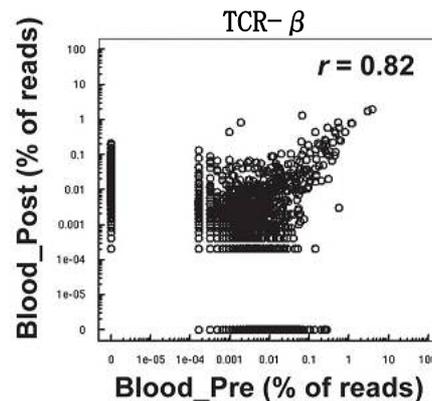
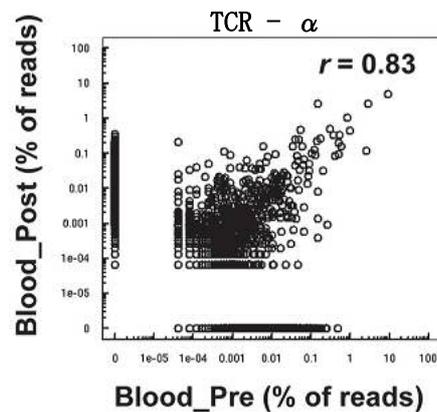


図 2: 治療前後の末梢血中の TCR- α ・TCR- β のクロノタイプの相関

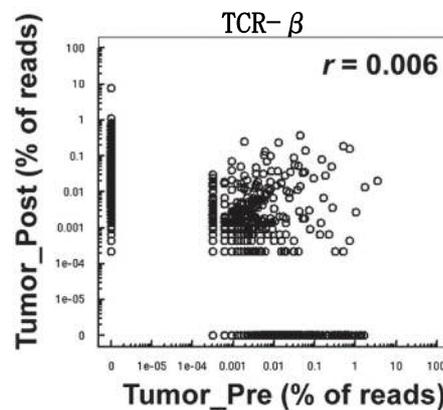
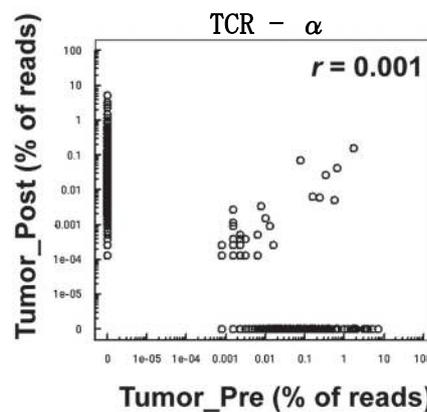


図 3: 治療前後の癌組織中の TCR- α ・TCR- β のクロノタイプの相関

Heat map では治療前の癌組織中に多く認められた TCR シークエンスを末梢血中には同定できなかったが、治療後の癌組織中に多く認められたシークエンスをわずかながら末梢血中にも同定できた (図 4)。

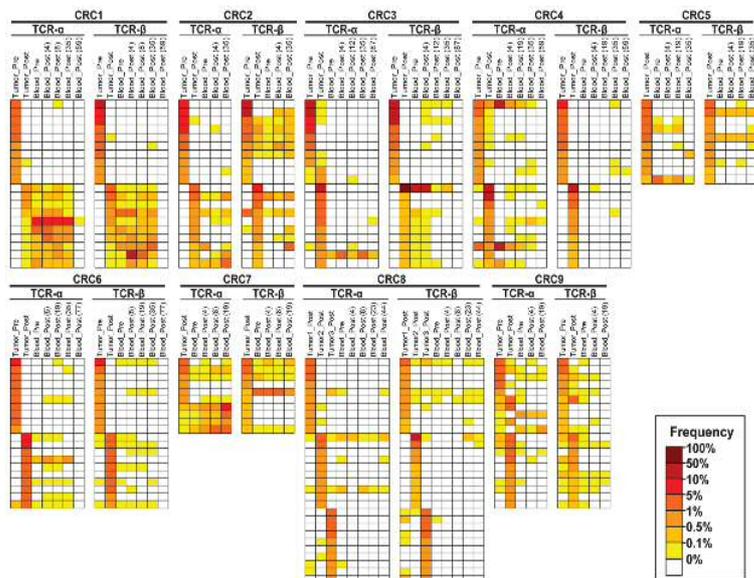


図 4：腫瘍組織・血液中 TCR のクロノタイプの heatmap

また、末梢血中の TCR の多様性が大幅に減少した患者において PFS が長い傾向があった。本結果については論文発表 (下記雑誌論文 1) ならびに学会発表 (下記学会発表) を行った。

本研究に関しては現在 3 症例を集積している。今後も更なる症例集積を行い、解析を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Inoue Y, Hazama S, Suzuki N, Tokumitsu Y, Kanekiyo S, Tomochika S, Tsunedomi R, Tokuhisa Y, Iida M, Sakamoto K, Takeda S, Ueno T, Yoshino S and Nagano H.

Cetuximab strongly enhances immune cell infiltration into liver metastatic sites in colorectal cancer

Cancer Sci. 査読有

2017; Mar;108(3):455-460

Doi:10.1111/cas.13162

2. Tamura K, Hazama S, Yamaguchi R, Imoto S, Takenouchi H, Inoue Y, Kanekiyo S, Shindo Y, Miyano S, Nakamura Y and Kiyotani K.

Characterization of the T cell repertoire by deep T cell receptor sequencing in tissues and blood from patients with advanced colorectal cancer

Oncology Letters. 査読有

2016;11(6):3643-3649.

Doi:10.3892/ol.2016.4465.

[学会発表] (計 1 件)

1. 井上由佳、切除不能進行大腸癌患者における組織および血液中の T 細胞レパトリーの解析、第 37 回 癌免疫外科研究会、2016 年 5 月 13 日、川越プリンスホテル(埼玉県・川越市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 由佳 (INOUE, Yuka)

山口大学・医学部附属病院・診療助教

研究者番号：50749835

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者