

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19934

研究課題名(和文) DNAミスマッチ修復異常大腸癌における免疫寛容誘導メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of the immune tolerance in the DNA mismatch deficient colorectal cancer

研究代表者

中西 良太 (NAKANISHI, Ryota)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90771254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：免疫療法のターゲット因子であるPD-L1、細胞障害性T細胞のマーカーであるCD8、マクロファージマーカーであるCD68のそれぞれの発現と局在を、大腸癌499例について検討した。高度のマイクロサテライト不安定性を示す症例(MSI-H)では、腫瘍細胞と腫瘍の間質においてPD-L1が高発現していた。MSI-H症例では、腫瘍より腫瘍先進部の正常組織の間質にそれぞれの因子が高発現していた。蛍光免疫染色にて、MSI-H大腸癌で腫瘍先進部の正常組織の間質のマクロファージが免疫寛容に関わっていることが示唆された。腫瘍内部の免疫チェックポイント分子の発現も免疫寛容や腫瘍の進展に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The expression and the localization of PD-L1 (the factor of the immune tolerance), CD8 (the marker of the cytotoxic T cell) and CD68 (the marker of the macrophage) were examined in 499 colorectal cancer. PD-L1 was significantly hyperexpressed in the cancer and stromal tissue of microsatellite instable (MSI-H) colorectal cancers (CRCs) than in the tissue of microsatellite stable ones. Of microsatellite instable cancers, PD-L1 was significantly hyperexpressed in the stromal tissue between the normal tissue at the invasive front than in the cancer tissue itself. Immunohistochemical analysis showed that PD-L1 was expressed on both tumor cells and CD68/CD163-positive (M2) macrophages at the invasive front of MSI-H CRCs. PD-L1 positive tumor cells and M2-type tumor-associated macrophages would contribute to tumor invasion and immune tolerance at the invasive front. Furthermore, the expression of the immune checkpoint factors might also affect the immune tolerance and the tumor aggressiveness.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 免疫寛容 PD-L1 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は先進国にて徐々に増加傾向を認め、本邦でも癌関連死の女性1位、男性3位である。大腸癌の発生にDNA修復因子の一つであるミスマッチ修復因子の欠損が関わりとされている。ミスマッチ修復機構はDNA複製時に塩基の不对合(ミスマッチ)がある場合、修復するDNA修復機構であり、この修復機構の機能低下により、さまざまな遺伝子の異常が積み重なり、細胞ががん化すると考えられている。具体的には、全大腸癌の2-5%を占めるとされる遺伝性非ポリポーシス大腸癌はミスマッチ修復因子の欠損により発癌すると考えられている(Ladabaum U et al. Gastroenterology 2015)。

また、ミスマッチ修復因子の欠損を伴う症例が全大腸癌の10-15%程度に認められることも報告されている(Boland CR et al. Gastroenterology 2010)。大腸癌に対して免疫チェックポイント阻害薬である抗PD-1抗体が臨床応用された(Le DT et al. N Engl J Med 2015)。大腸癌においては、ミスマッチ修復因子の欠損を伴う大腸癌症例に対してのみ強い抗腫瘍効果を認めることが報告された(Le DT et al. N Engl J Med 2015)。

今後さらなる研究・臨床への応用が期待される大腸癌治療における大きなトピックスである。しかし、その治療効果の機序については十分に解明されていない。免疫機構のネットワークを網羅的に解析することでミスマッチ修復欠損大腸癌における抗PD-1抗体の感受性決定の機序を解明できる可能性がある。

2. 研究の目的

あらかじめミスマッチ修復機構の状態が判明している大腸癌症例の検体を用いて、免疫組織化学染色を施行することで免疫チェックポイントタンパク質や各種免疫細胞の発現・局在・誘導を観察する。

ミスマッチ修復欠損大腸癌における免疫応答を詳細に解析し、免疫発現や免疫寛容の誘導メカニズムを明らかにすることで、新規治療標的因子の発見や抗PD-1抗体薬の治療最適化を目指す。

3. 研究の方法

免疫組織化学染色を用いた臨床検体におけるミスマッチ修復因子の評価。マイクロサテライト不安定性との比較検討、また免疫組織化学染色を用いて各種免疫チェックポイントタンパク質の発現・誘導・局在を評価、ミスマッチ修復因子の状態を含む臨床病理学的因子との比較検討を行うこと、であった。についてはミスマッチ修復因子の発現を大腸癌約499症例に検討した。具体的にはMLH1、MSH2の発現を免疫組織化学染色にて検討した。実際に大腸がんにおける免疫チェックポイント因子PD-L1の発現の検討はマイクロサテライト不安定性の有無にて検

討した。ミスマッチ修復因子を欠損している症例は高度のマイクロサテライト不安定性を示す症例が優位に多かった。については、上記研究実績の概要の通り、免疫療法のターゲット因子であるPD-L1、細胞障害性T細胞のマーカーであるCD8、マクロファージマーカーであるCD68のそれぞれの発現と局在を、マイクロサテライト不安定性の有無に分けて、大腸癌499例について検討した。

抗PD-L1、抗CD8、抗CD68抗体による免疫組織化学染色法を用いて腫瘍浸潤部と正常組織の境界部(invasive front)と腫瘍内部および間質(tumor)でPD-L1、CD8、CD68陽性細胞を評価した。PD-L1は腫瘍細胞と免疫系細胞に分けて評価した。腫瘍細胞に1%以上の発現を認める場合をPD-L1陽性、免疫系細胞においても1%以上のPD-L1発現を認める場合をPD-L1陽性と評価した。CD8、CD68陽性細胞は3視野を選択し、各視野での陽性細胞数の平均値を算出した。腫瘍細胞、CD68陽性細胞におけるPD-L1発現を明光免疫染色で評価した。

4. 研究成果

大腸癌における免疫寛容の機序の解明を目指し、PD-L1発現の意義と局在の検討について検討した。具体的には、免疫療法のターゲット因子であるPD-L1、細胞障害性T細胞のマーカーであるCD8、マクロファージマーカーであるCD68のそれぞれの発現と局在を、マイクロサテライト不安定性の有無に分けて、大腸癌499例について検討した。

マイクロサテライト不安定性を示す症例(MSI-H)では、マイクロサテライト不安定性を認めない症例(MSS)と比較して、腫瘍細胞と腫瘍の間質においてPD-L1が高発現していた。具体的には腫瘍内のPD-L1陽性症例および間質のPD-L1陽性症例の割合はMSI-HおよびMSSで、それぞれ36% vs 5%(腫瘍)、78% vs 27%(間質)に認められた。さらにMSI-H症例のうち、腫瘍細胞にPD-L1が高発現している症例は低分化型腺癌、脈管侵襲を示す症例が多かった。間質にPD-L1が高発現している症例はStage I/IIが多く、Stage III/IV症例が少なかった。MSI-H症例では、概して腫瘍より腫瘍先進部の正常組織の間質(免疫系細胞)にPD-L1が発現していた。CD8、CD68陽性細胞もInvasive frontに多数浸潤していた。蛍光免疫染色にて、MSI-H症例の腫瘍先進部の正常組織の間質においてPD-L1陽性細胞は、MSI-H症例のinvasive frontに発現しており、またその多くがCD68陽性細胞であった。

以上の検討により、MSI-H大腸癌では、腫瘍先進部の正常組織の間質に存在するマクロファージが免疫寛容に関わっていることが示唆された。さらに腫瘍先進部の正常組織の間質のみでなく、腫瘍内部の免疫チェックポイント分子の発現も免疫寛容や腫瘍の進展に関わっている可能性が示唆された。以上の結果を第27回日本消化器癌発生学会総会で発表した。

また、抗 PD-1 抗体薬の高い有用性が報告された食道扁平上皮癌においても腫瘍免疫回避機構の機序を明らかにする目的で PD-L1 の発現と癌の進展様式の一つである上皮間葉移行との関係を解析した。腫瘍先進部での PD-L1 発現と上皮間葉移行誘導因子 ZEB-1 が共同して悪性度に関与する可能性が示唆され、第 71 回消化器外科学会などで報告した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

Korehisa S, Oki E, Iimori M, Nakaji Y, Shimokawa M, Saeki H, Okano S, Oda Y, Maehara Y. Clinical significance of programmed cell death-ligand 1 expression and the immune microenvironment at the invasive front of colorectal cancers with high microsatellite instability. *Int J Cancer*. 査読有、2018 Feb 15;142(4):822-832.

Korehisa S, Ikeda T, Okano S, Saeki H, Oki E, Oda Y, Hashizume M, Maehara Y. A novel histological examination with dynamic three-dimensional reconstruction from multiple immunohistochemically stained sections of a PD-L1-positive colon cancer. *Histopathology*. 査読有、2018 Mar;72(4):697-703. doi: 10.1111/his.13400. Epub 2017 Dec 13.

Tsutsumi S, Saeki H, Nakashima Y, Ito S, Oki E, Morita M, Oda Y, Okano S, Maehara Y. Programmed death-ligand 1 expression at tumor invasive front is associated with epithelial-mesenchymal transition and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 査読有、2017 Jun;108(6):1119-1127.

Ito S, Okano S, Morita M, Saeki H, Tsutsumi S, Tsukihara H, Nakashima Y, Ando K, Imamura Y, Ohgaki K, Oki E, Kitao H, Mimori K, Maehara Y. Expression of PD-L1 and HLA Class I in Esophageal Squamous Cell Carcinoma: Prognostic Factors for Patient Outcome. *Ann Surg Oncol*. 査読有、2016 Aug;23(Suppl 4):508-51

[学会発表](計 3 件)

是久翔太郎、沖英次、飯森真、中西良太、中司悠、佐々木駿、城後友望子、廣瀬皓介、枝廣圭太郎、谷口大介、西村章、堤

亮介、工藤健介、田尻裕、藏重淳二、中島雄一郎、杉山雅彦、佐伯浩司、小田義直、前原喜彦。マイクロサテライト不安定性を示す(MSI-H)大腸癌におけるPD-L1発現と局在の検討、第117回日本外科学会定期学術集会、2017年4月27-29、横浜

是久翔太郎、沖英次、飯森真、中西良太、中司悠、佐々木駿、城後友望子、廣瀬皓介、枝廣圭太郎、谷口大介、西村章、堤亮介、工藤健介、田尻裕、藏重淳二、中島雄一郎、杉山雅彦、佐伯浩司、小田義直、前原喜彦。マイクロサテライト不安定性を示す(MSI-H)大腸癌におけるPD-L1発現の意義と局在の検討、第27回日本消化器癌発生学会総会、2016年9月15-16日、鹿児島

中西良太、沖英次、是久翔太郎、杉山雅彦、中島雄一郎、大垣吉平、園田英人、佐伯浩司、前原喜彦。マイクロサテライト不安定性を示す(MSI-H)大腸癌におけるPD-L1発現症例の生物学的特徴、第71回日本消化器外科学会総会、2016年7月14-16日、徳島

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西良太 (NAKANISHI, Ryota)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：90771254

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

是久翔太郎 (KOREHISA, Shotaro)
九州大学・医学研究院・大学院生

堤 智崇 (TSUTSUMI, Satoshi)
九州大学・医学研究院・大学院生