

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07974

研究課題名(和文) 胃癌に対する免疫チェックポイント分子阻害剤の適切かつ有効な応用

研究課題名(英文) Efficacy of immune checkpoint blockade for Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma

研究代表者

西川 潤 (Nishikawa, Jun)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00379950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：EBウイルス関連胃癌細胞株には免疫チェックポイント分子PD-L1が発現しており、IFN- γ 投与によりさらにその発現が増強した。このPD-L1が高発現した胃癌細胞株とPD-1が発現したT細胞株を共培養することによって、T細胞株は著明にgrowth arrestを起こした。以上の結果からEBウイルス関連胃癌において、PD-1とPD-L1の結合が抗腫瘍免疫を抑えていると報告した。本成果はすでにGastric cancer誌に論文が受理された。抗PD-1抗体、ニボルマブが投与された患者の19例中2例にEBウイルス関連胃癌を認めたがともにPDであり、長期生存は得られていなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EBウイルス関連胃癌はリンパ球浸潤癌の組織型を呈し、PD-L1の発現が高いことが報告されていたが、実際にEBウイルス関連胃癌において、PD-1とPD-L1の相互作用が機能しているかは不明であった。我々はIFN- γ 処理により、PD-L1を高発現させたEBウイルス胃癌細胞株とPD-1を発現するT細胞株を共培養することで、T細胞がGrowth arrestを起こすことを示した。抗PD-L1抗体の効果は限定的であったが、EBウイルス関連胃癌の維持に抑制系の免疫チェックポイント分子が機能を果たしていることを証明できた。

研究成果の概要(英文)：The overexpression of PD-L1 is one of the features of EBV-associated gastric cancer (EBVaGC); however, the function of PD-L1 has not been studied in EBVaGC. We used three EBVaGC cell lines, SNU719 cells, NCC24 cells, and YCCEL1 cells, to evaluate the PD-L1 expression and function in EBVaGC. Jurkat T-lymphocytes expressing PD-1 were co-cultured with NCC24 and YCCEL1 cells and the cell cycles were analyzed. All of the EBVaGC cell lines expressed PD-L1, and its expression was further enhanced by stimulation with IFN- γ . In Jurkat T-cells co-cultured with IFN- γ -stimulated NCC24 and YCCEL1 cells, the number of cells in the G0/G1 phase was significantly increased. This G0/G1 arrest was partially released by administration of anti-PD-L1 antibody. EBVaGC cells expressing high levels of PD-L1 suppress T-cell proliferation, and the IFN- γ signaling pathway is involved in the expression of PD-L1.

研究分野：消化器内科

キーワード：EBウイルス関連胃癌 免疫チェックポイント分子 ニボルマブ

1. 研究開始当初の背景

近年、The Cancer Genome Atlas (TCGA)のデータで Epstein-Barr virus (EB ウイルス)関連胃癌は DNA メチル化とともに programmed death 1-ligand 1(PD-L1) (以下、PD-L1) の発現上昇が特徴とされた。また化学療法後に増悪した治癒切除不能な進行・再発の胃癌に免疫チェックポイント分子阻害剤、ヒト型抗ヒト PD-1 モノクローナル抗体が承認された。EB ウイルス関連胃癌は特徴的なリンパ球浸潤癌の組織型を呈することからこの薬剤が有効に作用する可能性は高い。

EB ウイルス関連胃癌には PD-L1 が高頻度に発現しているとの報告が多いが、機能解析を行った報告はない。我々は EB ウイルス関連胃癌細胞株を用い、PD-L1 の機能解析を *in vitro* のリンパ球浸潤癌モデルで再現し証明する。また、EB ウイルスを検出する *in situ* hybridization を定期的に施行している経験を生かして、抗 PD-1 抗体を投与される胃癌患者の EB ウイルス感染のスクリーニングを行い陽性例の奏効率などを検討する。

2. 研究の目的

免疫チェックポイント分子阻害剤が胃癌に承認されたが、非常に高価な薬剤であり、今後も適正かつ有効に使用投与するためのデータの蓄積が必要とされている。胃癌の 10%を占める、EB ウイルス関連胃癌には、免疫チェックポイント分子の PD-L1 が高発現している。しかし、EB ウイルス関連胃癌に発現している PD-L1 がファンクショナルなのか、また、免疫チェックポイント分子阻害剤が EB ウイルス関連胃癌に奏功するかは未だ不明である。

本研究では、EB ウイルス関連胃癌細胞株を用いて、免疫チェックポイント分子の機能について解析する。また、EB ウイルス関連胃癌の切除検体を用い、免疫チェックポイント分子やその機能の制御する分子の発現を検討する。多施設共同研究で抗 PD-1 抗体を投与される患者を対象に EB ウイルス関連胃癌のスクリーニングを行い、これらの患者における免疫チェックポイント分子阻害剤の効果について検討する。基礎・臨床研究の両面から、EB ウイルス関連胃癌に対する免疫チェックポイント分子阻害剤の有効性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) EB ウイルス関連胃癌細胞株を用いた PD-L1 の機能解析

本研究では、*in vitro* での EB ウイルス関連胃癌細胞株 NCC24, SNU719, YCCEL1 を用い、PD-L1 の機能解析を行った。この PD-L1 がファンクショナルであるか否かを証明する目的で、Jurkat T 細胞株と EB ウイルス関連胃癌細胞株を共培養した。EB ウイルス関連胃癌はリンパ球浸潤癌の組織像を呈する。*in vivo* の EB ウイルス関連胃癌の状態を *in vitro* で再現し、T リンパ球の活性化や増殖が変化するかを検討した(図1)。T リンパ球の増殖能を細胞周期の解析で行った。また、EB ウイルス関連胃癌細胞株に発現した PD-L1 と T リンパ球表面の PD-1 の結合が T 細胞の活性化抑制、増殖抑制を起こすのかを検討した。また、抗 PD-L1 抗体を用いて、T 細胞の活性化抑制、増殖抑制が解除されるかを検討した。

(2) PD-L1 の発現に関する SNP についての解析

PD-L1 の発現に関する SNP が報告されており、EB ウイルス関連胃癌患者にこの SNP が高頻度であるか、検討した。患者の末梢血単核球などは得られなかったため、胃癌組織の DNA を用い、検討を行った。

(3) EB ウイルス関連胃癌患者におけるニボルマブの有効性について

化学療法中の胃癌患者の切除標本または生検組織に対して、EBER1 *in situ* hybridization を施行し、EB ウイルス関連胃癌患者におけるニボルマブの効果について検討を行った。

(4) EB ウイルス関連胃癌の liquid biopsy について

EB ウイルス関連胃癌患者の保存血清を用いて、血清から抽出した DNA に対して EB ウイルスの BamH1-W 断片に対する PCR を施行した。

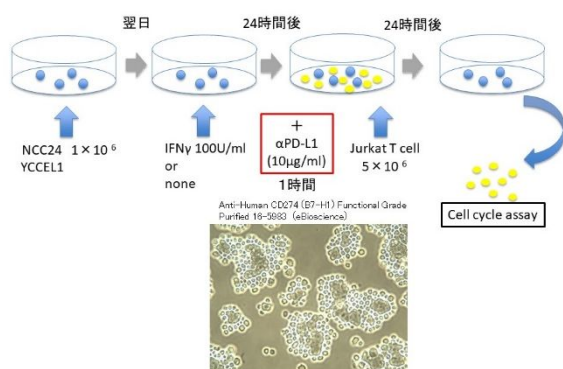


図1 EB ウイルス関連胃癌における PD-L1 の機能解析

EB ウイルス関連胃癌に IFN- γ を加え、PD-L1 の発現を増強させる。この EB ウイルス関連胃癌に T 細胞を加え、共培養を行った後にこの T 細胞の細胞周期の解析を行った。また、T 細胞を加える前の細胞を抗 PD-L1 抗体で処理することで、T 細胞の細胞周期の解析に変化を与えるか検討した。*in vitro* で *in vivo* の EB ウイルス関連胃癌の組織像に近い状態を再現した。

4. 研究成果

(1) EB ウイルス関連胃癌細胞株を用いた PD-L1 の機能解析

EB ウイルス関連胃癌に発現する PD-L1 が PD-1 を発現する T リンパ球の増殖を抑えることが示され、EB ウイルス関連胃癌に発現する PD-L1 がファンクショナルであることを証明した。

EB ウイルス関連胃癌細胞株には免疫チェックポイント分子 PD-L1 が発現しており、IFN- γ 投与によりさらにその発現が増強した。この PD-L1 が高発現した胃癌細胞株と PD-1 が発現した T リンパ球を共培養することによって、T 細胞株は著明に growth arrest を起こした。この T リンパ球の growth arrest は抗 PD-L1 抗体で前処理をすることによって、部分的に解除された。以上の結果から EB ウイルス関連胃癌において、PD-1 と PD-L1 の結合が抗腫瘍免疫を抑えていると報告した。

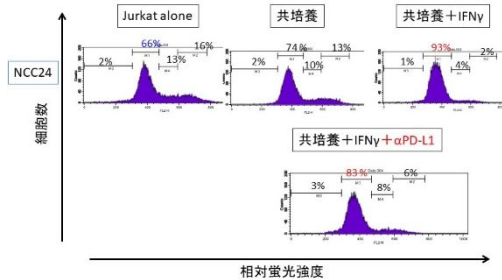


図2 T リンパ球の細胞周期解析

PD-L1 を強発現する EB ウイルス関連胃癌細胞 NCC24 と T リンパ球を共培養すると T リンパ球の S 期細胞割合は 4% に著明に低下した。抗 PD-L1 抗体で処理をすると 8% まで S 期細胞割合は増加した。

(2) EB ウイルス関連胃癌細胞株における PD-L1 の発現調節

EB ウイルス関連胃癌細胞株には、PD-L1 3'UTR の SNP が認められ、miRNA を介した PD-L1 の発現抑制が欠如している可能性が示唆された。しかしながら、EB ウイルス関連胃癌の臨床検体を用いた検討では、この SNP の頻度は陰性胃癌と差を認めなかった。

(3) EB ウイルス関連胃癌に対するニボルマブの効果

ニボルマブによる化学療法が施行されていた胃癌患者の切除標本または生検組織を用いて、EB ウイルス感染の検索を行ったところ、2 例の EB ウイルス関連胃癌患者を認めた。この 2 例に対するニボルマブの効果は十分でなく、PD と判定され、短期に投与が終了していた。自験例にはニボルマブが奏効した EB ウイルス関連胃癌を認めていない。

(4) liquid biopsy による EB ウイルス関連胃癌の診断

EBER1 ISH 法で診断された EB ウイルス関連胃癌 25 例と年齢、性別、組織型、深達度、ステージをほぼ合わせた EB ウイルス陰性胃癌 24 例の血清検体を対象に、ddPCR 法を行い、EB ウイルス量を測定した。EB ウイルス関連進行胃癌では EB ウイルス DNA の検出が可能であった。

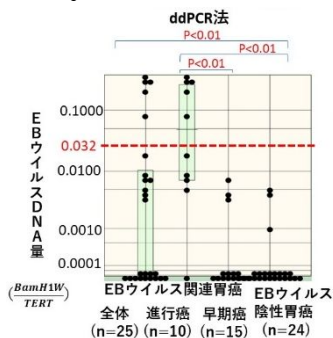


図3 血清中 EB ウイルス DNA の検出

EB ウイルス関連進行胃癌の EB ウイルス DNA 量の中央値は 0.032 であった。EB ウイルス関連早期胃癌と EB ウイルス陰性胃癌の EB ウイルス DNA の検出は困難で、EB ウイルス DNA 量の中央値はともに 0 であった。

< 引用文献 >

Sasaki S, Nishikawa J, Sakai K, Iizasa H, Yoshiyama H, Yanagihara M, Shuto T, Shimokuri K, Kanda T, Suehiro Y, Yamasaki T, Sakaida I. EBV-associated gastric cancer evades T-cell immunity by PD-1/PD-L1 interactions. *Gastric Cancer*. 2019 22(3):486-496. doi: 10.1007/s10120-018-0880-4.

Shuto T, Nishikawa J, Shimokuri K, Yanagi A, Takagi T, Takagi F, Miura O, Iida M, Nagano H, Takemoto Y, Harada E, Suehiro Y, Yamasaki T, Okamoto T, Sakaida I. Establishment of a Screening Method for Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma by Droplet Digital PCR. *Microorganisms*. 2019 7(12):628. doi: 10.3390/microorganisms7120628.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shuto T, Nishikawa J, Shimokuri K, Yanagi A, Takagi T, Takagi F, Miura O, Iida M, Nagano H, Takemoto Y, Harada E, Suehiro Y, Yamasaki T, Okamoto T, Sakaida I.	4. 巻 7(12)
2. 論文標題 Establishment of a Screening Method for Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma by Droplet Digital PCR.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 E628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms7120628.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yanagi A, Nishikawa J, Shimokuri K, Shuto T, Takagi T, Takagi F, Kobayashi Y, Yamamoto M, Miura O, Yanai H, Suehiro Y, Yamasaki T, Yoshiyama H, Sakaida I.	4. 巻 7(9)
2. 論文標題 Clinicopathologic Characteristics of Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Cancer Over the Past Decade in Japan.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 E305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/microorganisms7090305.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 柳井秀雄, 村上知之, 西川潤	4. 巻 31
2. 論文標題 ウイルス感染症 EBウイルス関連胃癌	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 消化器内視鏡	6. 最初と最後の頁 118-122
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sasaki S, Nishikawa J, Sakai K, Iizasa H, Yoshiyama H, Yanagihara M, Shuto T, Shimokuri K, Kanda T, Suehiro Y, Yamasaki T, Sakaida I.	4. 巻 22
2. 論文標題 EBV-associated gastric cancer evades T-cell immunity by PD-1/PD-L1 interactions.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gastric Cancer.	6. 最初と最後の頁 486-496
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10120-018-0880-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 西川潤, 柳井秀雄, 柳原正志, 下栗佳那美, 五嶋敦史, 橋本真一, 岡本健志, 坂井田功	4. 巻 30
2. 論文標題 変わりゆく早期胃癌のスペクトラム H.pylori未感染・現感染・除菌後は違う!EBウイルス関連胃癌	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 消化器内視鏡	6. 最初と最後の頁 103-109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 J. Nishikawa, S. Sasaki, I. Sakaida
2. 発表標題 EBV-associated gastric cancer evades T cell immunity by PD-1/PD-L1 interactions
3. 学会等名 13th International Gastric Cancer Congress (IGCC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木翔、西川潤、五嶋敦史、岡本健志、坂井田功
2. 発表標題 EBウイルス関連胃癌におけるPD-L1発現の検討と胃癌治療選択への展望
3. 学会等名 第111回日本消化器病学会中国支部例会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 首藤 拓也, 西川 潤, 野柳 彩華, 高木 立哉, 末広 寛, 山崎 隆弘, 坂井田 功
2. 発表標題 droplet digital PCRによるEBウイルス関連胃癌の検出(Screening for Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma by droplet digital PCR)
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野柳 彩華, 西川 潤, 首藤 拓也, 高木 立哉, 末広 寛, 山崎 隆弘, 柳井 秀雄, 坂井田 功
2. 発表標題 Epstein-Barr virus関連胃癌の臨床・病理学的特徴(Clinical and pathological features of Epstein-Barr virus associated gastric cancer)
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川 潤, 山崎 隆弘, 坂井田 功
2. 発表標題 内視鏡生検検体とリキッドバイオプシーによるEBウイルス関連胃癌の診断
3. 学会等名 第98回日本消化器内視鏡学会総会(JDDW/2019) (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐々木 翔, 西川 潤, 坂井田 功
2. 発表標題 EBウイルス関連胃癌におけるPD-L1発現機序と機能の検討
3. 学会等名 第104回日本消化器病学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 下栗佳那美, 西川潤, 高木立哉, 高木文也, 末広寛
2. 発表標題 EBウイルス関連胃癌の迅速診断法の開発と臨床応用
3. 学会等名 第58回日本臨床化学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川亮, 岡本健志, 西川潤
2. 発表標題 Helicobacter pylori除菌後発見胃癌の特徴について~EBウイルス関連胃癌との関連を含めて~
3. 学会等名 第24回日本ヘリコバクター学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川 潤、岡本健志
2. 発表標題 EBV-associated gastric cancer evades T-cell immunity by PD-1/PD-L1 interactions.
3. 学会等名 第90回日本胃癌学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

西川 潤研究室のホームページ http://ds0n.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~kensa2/nishikawa/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	末廣 寛 (Suehiro Yutaka) (40290978)	山口大学・大学院医学系研究科・准教授 (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------