

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102  
 研究種目：挑戦的研究（萌芽）  
 研究期間：2018～2019  
 課題番号：18K19565  
 研究課題名（和文）微小環境プロファイリングに基づく末梢性T細胞リンパ腫の予後層別化と新規治療開発  
  
 研究課題名（英文）Development of novel prognostic model and therapeutic strategy based on microenvironment signature in peripheral T-cell lymphoma  
  
 研究代表者  
 赤司 浩一（Akashi, Koichi）  
  
 九州大学・医学研究院・教授  
  
 研究者番号：80380385  
 交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：末梢性T細胞リンパ腫（PTCL）は、悪性リンパ腫の中でも極めて予後不良な疾患であり、新たな治療戦略の確立が急務である。そのためには、まず層別化による疾患概念の整理が必要である。我々は新規RNA発現解析技術を用いた網羅的遺伝子発現解析を行うことで、従来考えられていた腫瘍細胞そのものの性格よりもむしろ、腫瘍周囲の微小環境細胞がその予後に強く関連することを明らかにし、新たな予後層別化モデルを開発した。さらに、予後不良症例で、微小環境細胞の免疫チェックポイント分子PD-L1が高発現していることを見出し、PTCLに対するPD-1阻害剤の奏効可能性が検証するために臨床研究を計画・実施している。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

PTCL、特にPTCL-NOSは分類不能型と定義される通り、所謂“waste-basket disease”と位置づけられており、その治療法はおろか、病態さえも明らかになっていない。本研究は、従来の腫瘍細胞の性格よりも微小環境細胞に注目することで、明確に層別化できることを示した初めての研究である。また、既存の治療では治癒を期待できない予後不良患者に対してPD-1阻害剤が奏効する可能性を明らかにするばかりでなく、免疫チェックポイント阻害剤におけるプレシジョンメディシンの実現に資する点において、社会的意義を有する研究であると考えている。

研究成果の概要（英文）：Peripheral T-cell lymphoma (PTCL), not otherwise specified (NOS) is among the most common disease subtypes of PTCL, one that exhibits heterogeneous clinicopathological features. Although multiple disease-stratification models, including the cell-of-origin, have been proposed, their clinical significance remains unclear. To establish a clinically meaningful stratification model, we analyzed gene-expression signatures of tumors and tumor-infiltrating immune cells using the nCounter system. We show that gene-expression signatures representing tumor-infiltrating immune cells, but not those of cancerous T cells, dictate patient clinical outcomes. Importantly, tumor-infiltrating macrophages expressed the immune-checkpoint molecules at high levels, suggesting that checkpoint inhibitors could serve as therapeutic options for patients in this subgroup. Our study identifies clinically distinct subgroups based on microenvironment signatures and suggests a novel therapeutic strategy in PTCL-NOS.

研究分野：急性白血病や悪性リンパ腫などの造血器腫瘍の病態解明および治療開発

キーワード：PTCL-NOS 免疫微小環境 T細胞リンパ腫 治療層別化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

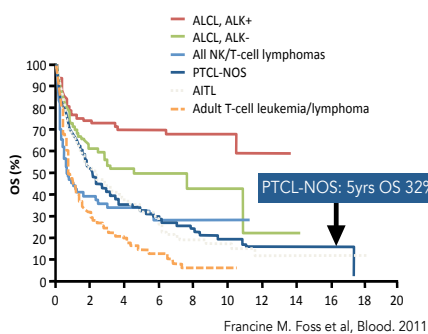


図1. PTCL の生存曲線. PTCL-NOS は中でも予後が大不良である.

悪性リンパ腫の患者数は、高齢化を背景に最近 10 年で約 2 倍に増加している。中でも末梢性 T 細胞性リンパ腫・非特定型 (PTCL-NOS) は、T/NK 細胞リンパ腫のうち 1/3 以上を占める最も頻度の高い病型にもかかわらず、標準治療の不在・病態に関する知見の乏しさから、5 年生存率は 30% 前後と極めて予後不良な疾患であり (J Clin Oncol. 2008)、標準治療の確立が急務である (図 1)。WHO 分類では T/NK 細胞腫瘍を細胞起源によって分類されるが、PTCL-NOS はそのいずれにも相当しない

分類不能型と定義され、所謂“waste-basket disease”と位置づけられている。この事実は、PTCL-NOS が様々な疾患単位を内包する heterogeneous な疾患概念であることを強く示唆している。病理組織像や発症様式、治療反応性において、非常に雑多な疾患単位から構成されていることが知られながらも、その層別化や病態解明、治療標的についての研究は大きく立ち後れている。歴史的には、腫瘍細胞の細胞起源を切り口として、Th1/Th2・制御性 T 細胞など、T 細胞亜分画による層別化が試みられてきたが、結論は得られておらず、ブレイクスルーが必要な状態である。

### 2. 研究の目的

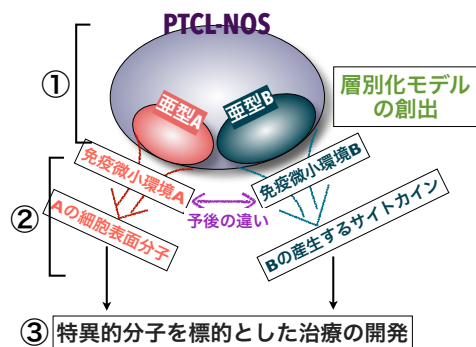


図 2. 本研究の概観

上記の事実から、新たな治療法の開発のためには、まず層別化による疾患概念の整理が必要であると考えた。病態に基づいた層別化を行うことにより、発症メカニズムや治療予後の観点で均一な集団を切り取り、そのメカニズムを明らかにすることで、新規治療法の開発を目指すこととした。そこで、本研究では、①PTCL-NOS に対する免疫微小環境を基軸とした予後層別化モデルを確立すること、②それぞれの亜分類において免疫細胞が予後に寄与するメカニズムを明らかにする中で、治療標的を同定すること、さらに③同定された治療標的に対する治療法の開発を行うことを本研究の目標とした (図 2)。

### 3. 研究の方法

我々は先行研究において、nCounter system を用いて RNA が断片化しているホルマリン固定 (FFPE) 標本からさえも RNA 絶対定量が可能な RNA 解析技術を新規に確立した。本技術は、バーコード配列を有した遺伝子特異的 RNA プローブに標的 RNA を捕捉させ、そのバーコードを顕微鏡で数え上げる (count) ことで、RNA 発現レベルを定量する技術である (図 3)。通常、FFPE 由来の RNA は高度に断片化しているために、逆転写反応や PCR 反応等の新たに核酸配列を生成するステップで、元の RNA との“ズレ”が生じる (図 4 左)。nCounter では、“ズレ”の原因となる酵素反応を取り除き、極限までに行程を単純化させることによって、断片化 RNA でも未固定検体に含まれる完全長 RNA と全く同様に RNA 定量が可能になった (図 4 右)。本技術を用いて、初発 PTCL-NOS FFPE 検体を対象に、免疫関連遺伝子 (T/B/NK 細胞等) を含む 840 遺伝子の網羅的発現解析を実施した。免疫関連遺伝子の発現パターンから、各症例の層別化の可能性を検討した。

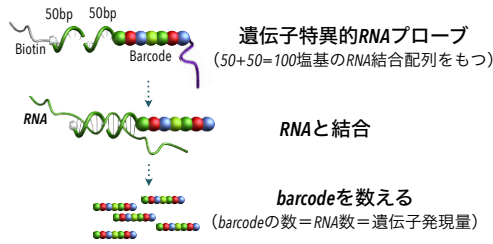


図 3. nCounter system の RNA 測定原理

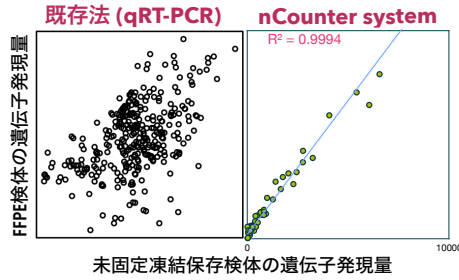


図 4. RNA 測定法による発現量の違い

#### 4. 研究成果

68 症例の初発 PTCL-NOS 患者より取得した FFPE 検体を対象に、nCounter による免疫関連遺伝子の網羅的発現解析を行った。その結果、PTCL-NOS においては、従来考えられていた腫瘍細胞である T 細胞関連の遺伝子群の相関は認めず、腫瘍周囲に存在する B 細胞 (B)・樹状細胞 (DC)・マクロファージ (M $\phi$ ) などの微小環境免疫細胞に関連した遺伝子が互いに相関し、クラスターを形成していることが明らかになった。このことにより、微小環境関連遺伝子の発現によって PTCL-NOS 症例が層別化される可能性が示唆された (図 5)。

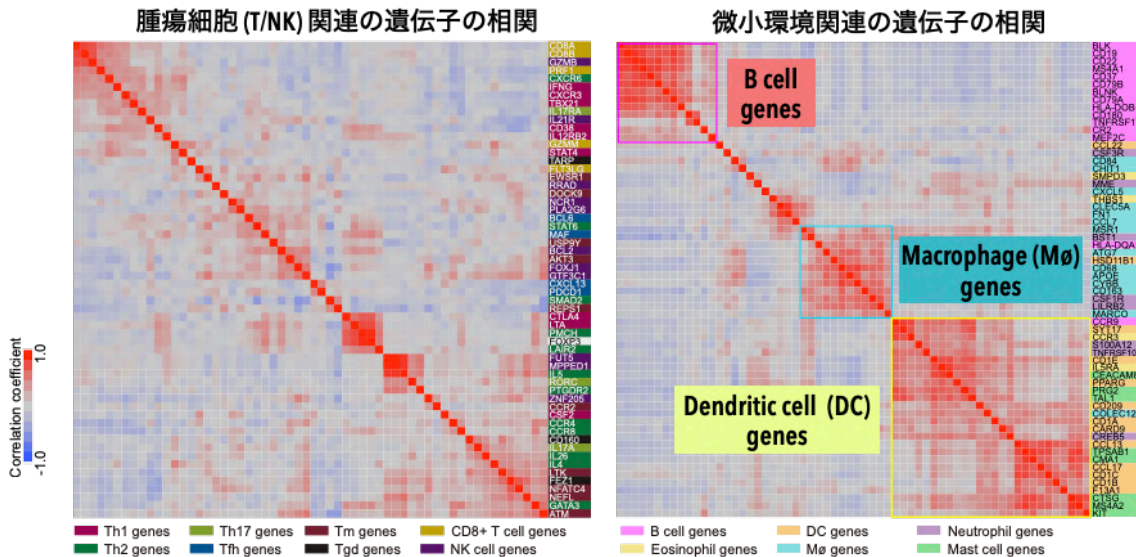


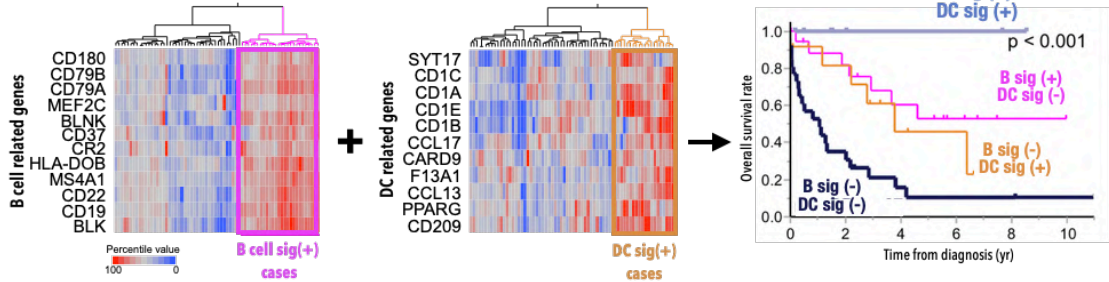
図 5. 68 症例における、腫瘍細胞(T/NK)関連遺伝子(左)、および微小環境関連遺伝子(右)の相関

実際、図 6 に示す通り、B・DC・M $\phi$  関連の遺伝子発現によって PTCL-NOS 症例が明確に層別化されることが明らかになった。さらに、B・DC が豊富な症例の予後は良好であり、逆にこれらが少ない症例は予後不良であった (図 6 上)。このように微小環境プロファイルに基づく各グループの予後は大きく異なっており、これらの知見を微小環境関連遺伝子発現パターンによる予後層別化モデルとして論文発表した (図 6 上)。以上より、“waste-basket disease”である PTCL-NOS は、腫瘍細胞自体の性格ではなく、周囲の免疫担当細胞の構成パターンによって、予後の異なる病型に層別化可能であることが示された。

このことは同時に、腫瘍をとりまく免疫環境が臨床動態に強く影響を関連している可能性を示唆しており、このメカニズムを明らかにすることで新たな治療標的を同定することが可能となると考えた。例えば、予後不良である M $\phi$  群には、腫瘍免疫逃避機構の責任分子として注目されている PD-L1 の高発現が特徴的に認められたことから、同分子が治療標的となる可能性が示唆された (図 6 下)。PD-1/PD-L1 は種々のがん腫において腫瘍免疫逃避機構の責任分子として注目されており、PD-1 阻害剤である Nivolumab (ニボルマブ) は複数のがん腫において有効であることが期待されてい

る。我々が得た知見から、PTCL でも PD-L1 が高発現しているような症例にはニボルマブが奏効する可能性が考えられ、図 7 に示す通り、PTCL に対する適応拡大を目指した臨床研究を実施中である。

### 予後層別化



### 治療層別化

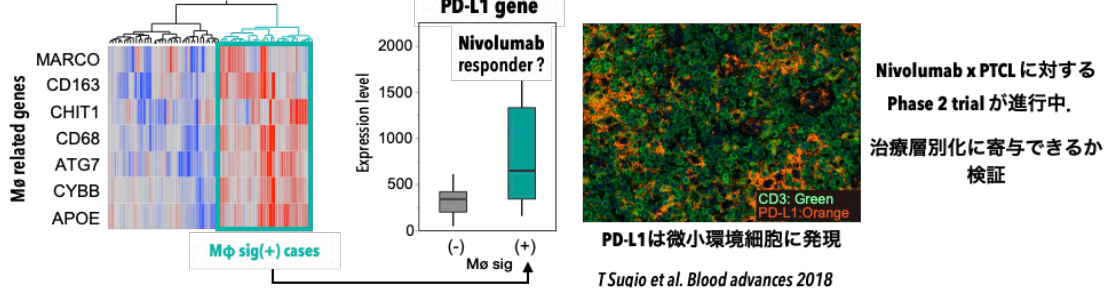


図 6. 微小環境関連細胞のうち、B 細胞や DC 細胞関連遺伝子の発現によって層別化され、B/DC 細胞が豊富な症例は予後が良好であることが明らかとなった(上)。予後不良なマクロファージ(Mφ)群には微小環境細胞に由来する PD-L1 の発現が高く、PD-1/PD-L1 阻害剤の治療の可能性が示唆された。

### <医師主導第2相臨床治験 (UMIN000034499)>

- ・再発難治PTCL 20例
- ・ニボルマブ(PD-1阻害薬) 240mg / 2週
- ・2019年4月より症例登録開始
- ・全国7施設の多施設協同試験



### <WJHS-NHL02, 治験シエマ>

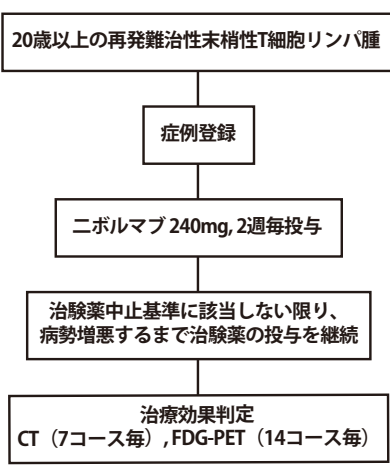
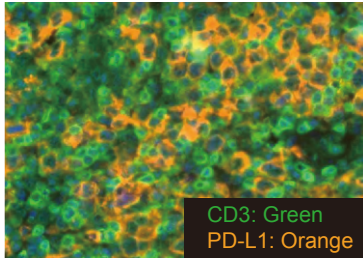


図 7. PTCL に対する PD-1 阻害剤ニボルマブの適応拡大を目指す臨床試験の概要(左)とシエマ(右)

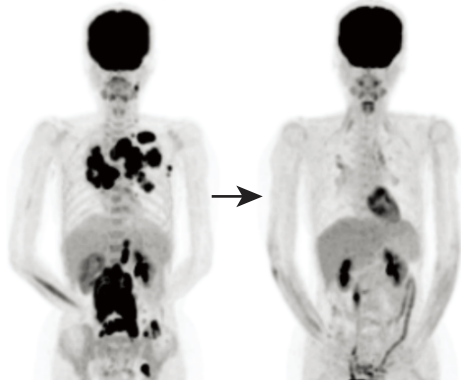
この治験については、現在症例の集積中であるが、既存の種々の治療に抵抗性を示した患者に劇的に奏効した症例も認めており (図 8)、本治験の研究結果が待たれるところである。実際、同患者の初診時の腫瘍組織では、腫瘍細胞 (CD3 陽性 T 細胞) の周囲の微小環境細胞に PD-L1 の高発現を認めていた。ニボルマブのような免疫チェックポイント阻害剤はその薬価が極めて高いことから大きな社会的な問題となっている。したがって、その奏効を予測するバイオマーカーの開発は医療経済上、重要なテーマであり、PTCL において、微小環境中の PD-L1 の発現の有無が、ニボルマブの奏効を予測しうるマーカーとなれば、重要な知見となる。このように、本研究は、既存の治療では治癒を期待できない予後不良患者に対して PD-1 阻害剤が奏効する可能性を明ら

初診時腫瘍組織



かにするばかりでなく、免疫チェックポイント阻害剤におけるプレシジョンメディスンの実現に資するものである。

治療経過, FDG-PET



治療前 (20XX/4)      14コース後 (20XX/12)

図 7. 8 レジメンに抵抗性の PTCL-NOS の治療経過

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugio T, Miyawaki K, Kato K, Sasaki K, Yamada K, Iqbal J, Miyamoto T, Ohshima K, Maeda T, Miyoshi H, Akashi K.	4. 巻 2
2. 論文標題 Microenvironmental immune cell signatures dictate clinical outcomes for PTCL-NOS.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 2242-2252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2018018754	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	宮脇 恒太  (MIYAWAKI KOHTA)  (50774709)	久留米大学・医学部・研究員    (37104)	
研究分担者	加藤 光次  (KATO KOJI)  (20571764)	九州大学・大学病院・講師    (17102)	