

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09778

研究課題名（和文）子宮Ecosystemの観点から捉える子宮体がんに対する抗腫瘍免疫応答

研究課題名（英文）Antitumor immune response in patients with endometrial cancer from the perspective of uterine Ecosystem

研究代表者

鈴木 史朗（Suzuki, Shiro）

愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍免疫応答研究分野・研究員

研究者番号：20612758

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：子宮腫瘍の局在別の抗腫瘍免疫応答に着目して、臨床検体を用いた研究を行った。子宮体がんの病理画像解析にて、Type I子宮体がんの子宮筋層の腫瘍浸潤先進部では、帯状に集簇するリンパ球（PLB）を多数例で認めた。子宮体がんにおけるCD8陽性T細胞の浸潤は、Inflamed type、Desert type、Excluded typeの3パターンに大別された。また、FACS解析の結果から、Excluded typeでCD8陽性T細胞が腫瘍中心部に浸潤できない要因には、Inflamed typeに比べてCTLA-4発現が高い免疫抑制能の強い制御性T細胞の存在が関係している可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Type IとType II子宮体がんでは腫瘍浸潤境界における応答（PLBが形成されない原因等）は異なると考えられるが、今後、子宮におけるPLB誘導のメカニズムを解明することで、宿主側への適切な介入を行い腫瘍局所へ効率的にエフェクター細胞を浸潤・集積させうる免疫療法の開発に結び付く可能性がある。また、子宮腫瘍に対する腫瘍局所の免疫応答を子宮Ecosystemという観点から捉える基礎研究を引き続き実施することによって、子宮がんの病態解明にも寄与することとえられる。

研究成果の概要（英文）：The study focused on the anti-tumor immune response of uterine tumors by localization. Clinical specimens were used in the study.

We found a cluster of peritumoral lymphocytes with band-like structures (PLB) in the forefront of endometrial cancer and analyzed their association with the clinical outcome. In comparison with type I endometrial cancer, PLB was found in many cases of type II endometrial cancer. PLB in type II endometrial cancer show a strong association with fatal outcome. The infiltration of CD8-positive T cells in endometrial cancer was classified into three patterns: Inflamed, Desert and Excluded type. Furthermore, the results of FACS analysis suggest that a factor in the inability of CD8-positive T cells to infiltrate the tumor centre in Excluded types may be related to the presence of immunosuppressive regulatory T cells with higher CTLA-4 expression compared to Inflamed types.

研究分野：婦人科がん

キーワード：腫瘍免疫 子宮体がん

1. 研究開始当初の背景

がん発生・進展機構の解明および治療効果予測のためには、がん種毎で異なる様々な内的・外的因子が関与するがんの不均一性の理解が重要である。子宮の恒常性維持や要事の応答性のために備わっている機構は、子宮腫瘍の発生・進展過程における宿主応答でも流用されている可能性がある。近年、乳がんや大腸がん等の悪性腫瘍で、傍腫瘍領域にリンパ球を中心とした免疫細胞集塊からなる三次リンパ組織様構造 (Tertiary Lymphoid Structures: TLS) が存在しており、予後指標になると注目されている。子宮体がんは、本邦の欧米化とともに増加傾向が続いている。また、子宮がん領域においても免疫チェックポイント阻害薬を主とした免疫療法の臨床応用が進んでいる。子宮は脈管系や免疫細胞群等が内在した粘膜・筋層・漿膜といった層構造を有しているため、子宮腫瘍内局在によって宿主応答に影響を及ぼす外的・内的因子が異なっていると推察されるが、子宮体がんにおける腫瘍局所の免疫応答の詳細を解析した研究は限定的である。

2. 研究の目的

子宮体がんを主に子宮腫瘍に対する腫瘍局所の免疫応答を、子宮 Ecosystem という観点から捉える基礎研究の実施によって、子宮がんの微小環境解析や病態解明、さらには新規の抗腫瘍治療法開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

子宮体がんの腫瘍局在別の抗腫瘍免疫応答に着目して、臨床検体・臨床情報を用いた研究を行った。

(1)2002年1月から2016年12月末までに手術治療を受けた子宮体がん症例のうち、1/2以上の子宮筋層浸潤がある子宮体がん手術検体を抽出し、子宮筋層浸潤先進部～傍腫瘍領域を有するホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを使用して病理組織学的・免疫組織化学的 (IHC) 解析を施行した。免疫染色された標本画像は、x200のデジタルデータで保存し、RGBに分解後、Image J (National Institutes of Health) を用いて染色陽性率の定量的評価を行った。子宮筋層の腫瘍深部辺縁を帯状に集簇するリンパ球 (帯状リンパ組織様構造、PLB: Peritumoral Lymphoid Bandlike Structures) をx200拡大視野中のリンパ球数によって各々4段階 (0-5:very low、6-100:low、101-200:intermediate、201+:high) に分類し評価を行った。Progression-free survival (PFS) および Overall survival (OS) に対する各種リスク因子は、ロジック検定を用いて評価した。

(2)本研究に際して新たに文書による患者同意取得を行った子宮体がん手術症例から、腫瘍浸潤リンパ球 (Tumor-infiltrating lymphocytes : TIL) および末梢血単核細胞 (PBMC) の回収、腫瘍組織から病理組織標本の作製とDNAおよびRNAの回収、便・腔分泌物・子宮内分泌物由来のDNA抽出を、症例毎に可能な項目について検体採取した。手術検体 (子宮) の各部位 (腫瘍中心部、筋層浸潤先進部～傍腫瘍領域辺縁部) から組織を採取した。腫瘍局在別のCD8+細胞 (細胞傷害性T細胞) およびFOXP3+細胞 (Treg細胞) の腫瘍浸潤パターンを評価するために、IHCを施行した。また、腫瘍局在別に組織破砕法により浸潤免疫細胞を回収し、フローサイトメトリー (FCM) を使用してTILのサブセット解析 (live or dead, CD3, CD4, CD8, CCR7, CD45RA, FOXP3, PD-1, CTLA4, TIM3, LAG3, TIGIT) を行った。CD8+T細胞 (CD3+CD8+分画) 効果 Treg細胞 (CD3+CD4+CD45RA-FOXP3++分画) に焦点をあて、各種免疫関連分子の発現を評価し、PBMCとTILの比較、CD8+T細胞の浸潤パターンの違いによる比較を行った。

4. 研究成果

(1)主評価対象としたType子宮体がん (類内膜がん Grade3、漿液性がん、明細胞がん、混合がん) 85例の背景は、病期分類 (FIGO2008) Stage I, II, III, IV は各々37例 (43.5%)、7例 (8.2%)、29例 (34.1%)、12例 (14.1%) であった。組織型は類内膜がん Grade3、漿液性がん、明細胞がん、混合がんが各々58例 (68.2%)、13例 (15.3%)、9例 (10.6%)、5例 (5.9%) であった。原発巣の腫瘍浸潤の最深部をHE染色標本で評価したが、他がん種で報告されるようなTLSが確認できた症例は極一部 (10例) に留まった。腫瘍最深部の子宮筋層には腫瘍辺縁に帯状に広がるリンパ球の集簇 (PLB) を認める症例が多く (59例) に確認された (図1、表1)。

| 表1. 子宮体がん | TLS | PLB |
|----------------|-------|-------|
| Type I (n=40) | 1/40 | 3/40 |
| Type II (n=85) | 10/85 | 59/85 |

単変量解析において病期 (I, II vs. III, IV) (HR=7.700; 95%CI=2.939-20.170; p<0.001) CA125値 (>35 IU/ml)

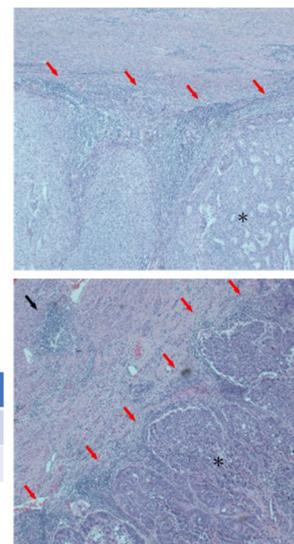


図1 * Tumor → TLS → PLB

(HR=2.579; 95%CI=1.255-5.299; $p<0.001$) 術中腹水細胞診 (陰性 vs. 陽性)
 (HR=3.779; 95%CI=1.763-8.099; $p<0.001$) PLB (very low, low vs. intermediate, high)
 (HR=0.198; 95%CI=2.58-11.46; $p<0.001$) は各々PFSの増悪と有意な相関を認めた。多変量解析においては病期 (, vs. ,) (HR=7.131; 95%CI=1.958-25.960; $p=0.003$)
 CA125値 (>35 U/ml) (HR=3.823; 95%CI=1.471-9.938; $p=0.006$) 組織型 (類内膜がん Grade 3 vs. その他) (HR=2.986; 95%CI=1.313-6.787; $p=0.009$) PLB (very low, low vs. intermediate, high) (HR=0.220; 95%CI=0.093-0.519; $p<0.001$) が PFS の独立した増悪因子であった。死亡のリスク因子は再発の因子と類似した結果であった。OSの増悪因子として、単変量解析において、病期 (, vs. ,)

(HR=10.160, 95%CI=2.330-44.310; $p=0.002$) 術中腹水細胞診 (陰性 vs. 陽性) (HR=4.190; 95%CI=1.491-11.780; $p=0.007$) 脈管侵襲 (陰性 vs. 陽性) (HR=3.146; 95%CI=1.173-8.437; $p=0.023$) PLB (very low, low vs. intermediate, high) (HR=0.207; 95%CI=0.0805-0.537; $p=0.001$) が強い相関を示した。多変量解析においては、年齢 (<60 vs. ≥ 60 歳) (HR=3.484; 95%CI=1.094-11.090; $p=0.037$) 病期 (I, II vs. III, IV) (HR=6.250; 95%CI=1.061-37.00; $p=0.043$) PLB (very low, low vs. intermediate, high) (HR=0.259; 95%CI=0.0913-0.734; $p=0.011$) が OS と強い相関を示した。PLBの存在とその程度はPFS、OSともに良好な予後と強い相関が示された。免疫染色においてPLBの構造は、外周はCD4が多く、次いでCD8、CD38、CD68が存在し、中心部にはCD20が多いことが確認された。PLBの構造はTLSのそれと類似していることが確認された (図2)。

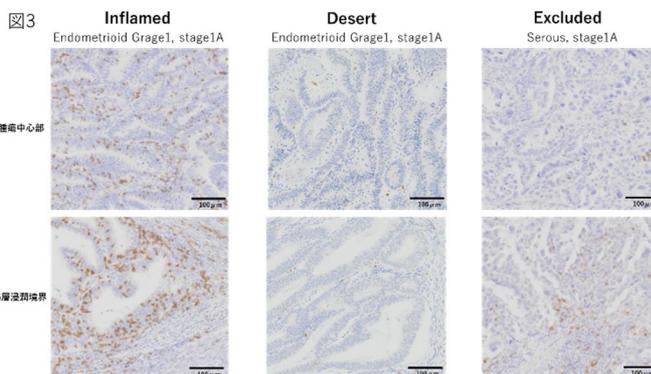
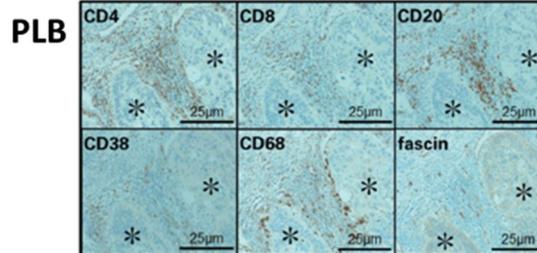
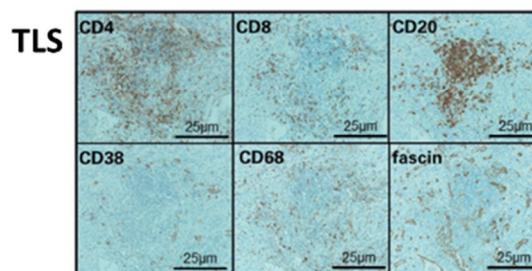
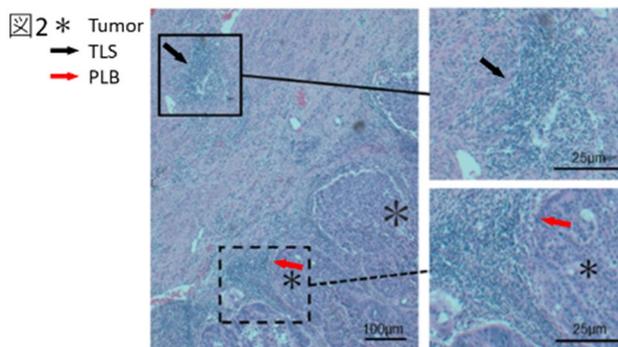
一方、比較的予後良好とされる Type 子宮体がん (類内膜がん Grade1・2) において、PLBは多くの症例で認められなかった。Type と Type 子宮体がんではPLBが形成されない原因は異なると推測されるが、今後、子宮におけるPLB誘導のメカニズムを解明することで、宿主側への適切な介入を行い腫瘍局所へ効率的にエフェクター細胞を浸潤・集積させる免疫療法の開発に結び付く可能性がある。

(2)子宮体がん計29例 (類内膜がん25例、漿液性がん3例、明細胞がん1例)の腫瘍から検体を回収した。

病理組織標本での免疫組織化学的検討にて、CD8+T細胞の浸潤は、Inflamed type、Desert type、腫瘍辺縁に浸潤が多く腫瘍中心部の浸潤は少ない Excluded type の3パターンに大別された (図3)。FOXP3+細胞の浸潤は、腫瘍辺縁と腫瘍中心部で有意な差は確認されなかった。

FACS解析では、CD8+T細胞におけるPD-1、CTLA-4の発現は、PBMCで0.27%、0.66%、TILでは類内膜がん

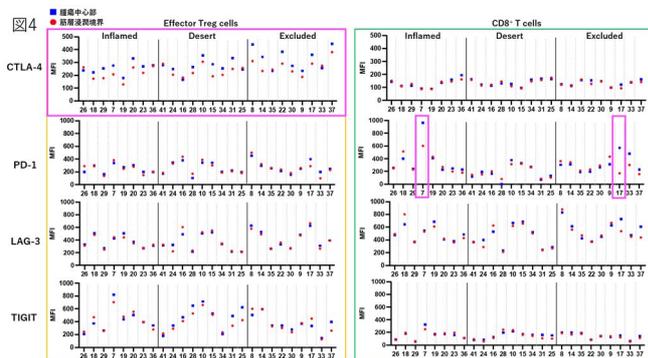
- 期で15%、0.55%、- 期で25%、0.42%、漿液性がん36%、1.3%であり、CD8+T細胞におけるPD-1発現はTILで有意に上昇していた ($p<0.0001$)。eTreg細胞におけるPD-1、CTLA-4の発現は、PBMCで0.15%、0.25%、TILでは類内膜がん - 期で17%、18%、- 期で17%、16%、漿液性がん32%であり、eTreg細胞におけるPD-1、CTLA-4発現はTILで有意に上昇していた ($p<0.0001$)。また、CD8+T細胞のPD-1陽性率は、Desert typeよりもInflamed typeで有意に高く (27% vs. 6.8%、 $p=0.036$) Desert typeよりもExcluded typeで高かった (36% vs. 6.8%、 $p=0.04$)。また、eTreg細胞におけるCTLA-4陽性率は、Inflamed typeよりも



Excluded type で有意に高かった (26% vs. 15%, $p=0.036$) (図4)。 Excluded type で CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞が腫瘍中心部に浸潤できないことには、Inflamed type に比べて CTLA-4 発現が高い免疫抑制能の強い制御性 T 細胞の存在が関係している可能性がある。

子宮がんにおける各種細菌叢解析に関しては、便・腔分泌物検体と比較して子宮内分泌物検体からの DNA

抽出量が不十分な症例が特に多く immature な結果となった。今後、子宮内分泌物・便・腔分泌物検体セットでの細菌叢解析を実施するためには、子宮内分泌物検体の質（最適な採取・抽出法での収集）がより重要となると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kazuto Nosaka, Shiro Suzuki, Toshiaki Yoshikawa, Manami Shimomura, Kazuhisa Kitami, Kosuke Yoshida, Masato Yoshihara, Fumitaka Kikkawa, Tetsuya Nakatsura, Hiroaki Kajiyama | 4. 巻 41(10) |
| 2. 論文標題 Heat Shock Protein 105 as an Immunotherapeutic Target for Patients With Cervical Cancer | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Anticancer Res | 6. 最初と最後の頁 4741-4751 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15289 | 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 Yusuke Shimizu, Shiro Suzuki, Mayu Ukai, Satomi Hattori, Nobuhisa Yoshikawa, Hiroaki Kajiyama | 4. 巻 41(1) |
| 2. 論文標題 The Prognostic Significance of Peritumoral Lymphocytes' Band-like Structure in Type II Endometrial Cancer | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Anticancer Res | 6. 最初と最後の頁 249-258 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14771 | 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 Nobuhisa Yoshikawa, Akira Shirakawa, Kosuke Yoshida, Satoshi Tamauchi, Shiro Suzuki, Fumitaka Kikkawa, Hiroaki Kajiyama | 4. 巻 35(6) |
| 2. 論文標題 Sarcopenia as a Predictor of Survival Among Patients With Organ Metastatic Cervical Cancer | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Nutr Clin Pract | 6. 最初と最後の頁 1041-1046 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ncp.10482 | 査読の有無 有 |
| 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 Satoshi Tamauchi, Hiroaki Kajiyama, Yoshinori Moriyama, Masato Yoshihara, Yoshiki Ikeda, Nobuhisa Yoshikawa, Kimihiro Nishino, Kaoru Niimi, Shiro Suzuki, Fumitaka Kikkawa | 4. 巻 45(10) |
| 2. 論文標題 Relationship between preexisting mental disorders and prognosis of gynecologic cancers: A case-control study | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Obstet Gynaecol Res | 6. 最初と最後の頁 2082-2087 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.14053 | 査読の有無 有 |
| 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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 吉川聡明, ウー チィウエン, 松下 博和, 細田 和貴, 鈴木 史朗, 籠谷 勇紀 |
| 2. 発表標題 Epigenetic modification of antitumor T cells to induce durable clinical response in adoptive immunotherapy |
| 3. 学会等名 第25回日本がん免疫学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 高磯 伸枝, 福江 美咲, 小森 康司, 鈴木 史朗, 清水 泰博, 井本 逸勢 |
| 2. 発表標題 リンチ症候群に対する大腸癌と子宮内膜癌の手術症例を対象にしたユニバーサルスクリーニングの取り組み |
| 3. 学会等名 第45回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 吉川聡明, ウー チィウエン, 松下 博和, 鈴木 史朗, 籠谷 勇紀 |
| 2. 発表標題 エピジェネティック因子修飾による抗腫瘍T細胞の機能改善 |
| 3. 学会等名 第18回日本免疫治療学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木史朗, 清水裕介, 服部諭美, 吉川史隆 |
| 2. 発表標題 Type2子宮体癌における帯状リンパ組織様構造の存在は良好な予後と関連する |
| 3. 学会等名 第17回日本免疫治療学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木史朗 |
| 2. 発表標題 婦人科がんに対する複合的がん免疫療法の開発を目指した基盤研究 |
| 3. 学会等名 第71回日本産科婦人科学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔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 |
|-------|-------------------------------|--------------------------------|----|
| 研究協力者 | 服部 諭美 (Hattori Satomi) | 名古屋大学・産婦人科・大学院生 (13901) | |

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 |
|---------|---------|