

令和 5 年 4 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07594

研究課題名（和文）胃癌腹膜播種における腫瘍不均一性および腫瘍微小環境を標的とした革新的治療法の開発

研究課題名（英文）Development of innovative therapies targeting tumor heterogeneity and tumor microenvironment in peritoneal dissemination of gastric cancer

研究代表者

岩槻 政晃（Iwatsuki, Masaaki）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教

研究者番号：50452777

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）：予後不良である胃癌腹膜播種に対する新たな治療戦略の開発を目的に、既存の免疫チェックポイント阻害剤（ICI）ならびに新規のICIに注目し、そのバイオマーカー探索を、時間的heterogeneityに着目して、解析した。抗PD-L1抗体のバイオマーカーであるPD-L1は抗がん剤やCAFの影響で制御されていることを明らかにした。

また、その制御機構を分子生物学的に明らかにし、ICIの使用タイミングなどの工夫でその治療効果の増強がHLA-Eの発現機構を明らかにし、バイオマーカー探索を行い、soluble HLA-Eの発現制御機構を明らかに、予後を左右するバイオマーカーになり得ることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ICIが多くの癌腫、様々なセッティングで使用される中、さらに治療効果を高めることで予後向上が期待できる。本研究ではバイオマーカーの発現に時間的なheterogeneityが存在することを明らかにした。また、発現機構を詳細に検討することにより、ICIの使用するタイミングやその他の薬剤との併用療法の有効性の理論的背景を明らかにした。また、新たなICIのバイオマーカーを同定し、liquid biopsyとして血清中でその測定に成功、予後に関わる可能性を示すことができた。今後、予後マーカーさらには治療効果予測マーカーとしての実臨床での応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：For the purpose of developing new therapeutic strategies for peritoneal dissemination of gastric cancer with poor prognosis, we focus on existing immune checkpoint inhibitors (ICI) and novel ICIs, and search for their biomarkers by focusing on temporal heterogeneity. Analyzed. We clarified that PD-L1, a biomarker of anti-PD-L1 antibody, is regulated by the influence of anticancer drugs and CAF. In addition, we clarified the regulatory mechanism from molecular biology, and clarified the expression mechanism of HLA-E by devising the timing of use of ICI to enhance its therapeutic effect. We clarified the regulatory mechanism and clarified that it can be a biomarker that influences the prognosis.

研究分野：腫瘍学

キーワード：liquid biopsy heterogeneity 免疫チェックポイント阻害剤

### 1. 研究開始当初の背景

本邦の胃癌死亡率は第三位であり、胃癌による死亡の約半数は腹膜播種によるものである。腹膜播種を含む stage IV の 5 年生存率はわずか 7.8% で、新規抗癌剤や分子標的薬が導入され、その治療成績は向上しているが、生存期間中央値は 12 か月を超える程度である。従来の薬剤の効果や投与経路の工夫だけでは腹膜播種を克服することができず、ブレイクスルーには、腹膜播種の分子生物学的メカニズムの解明とそれを応用した新規治療の開発が必要不可欠である。腹膜播種をきたしやすい diffuse type 胃癌は分子生物学的手法により、genomically stable 群に分類されており、遺伝子変異やコピーナンバー異常の率が低い。この結果から、diffuse-type 胃癌が癌細胞以外の腫瘍間質細胞を多く含むと同時に、癌細胞自体のゲノム異常の蓄積により規定されるのではなく周囲環境からの影響を強く受けていると考えられる。腫瘍間質は癌の進展を補助するだけではなく、治療抵抗性にも深く関与しており、癌の根絶には腫瘍間質をも標的とした治療の開発が必要となる。これまでの癌研究は治療前、原発巣の解析が行われ、治療抵抗性の原因となる空間的かつ時間的な heterogeneity を考慮した遺伝子プロファイリングは明らかではない。

### 2. 研究の目的

胃癌腹膜播種に対する新たな治療戦略を開発するために、胃癌にも使用されるようになった免疫チェックポイント阻害剤に着目し、heterogeneity を基軸として以下の 2 つのアプローチを行った。

- A) 現在、胃癌に対して使用される抗 PD-1 抗体において、治療効果のバイオマーカーとなり得る PD-L1 の発現に関し、治療による時間的 heterogeneity の可能性について検討
- B) 胃癌において、新規免疫チェックポイント NKG2A/HLA-E 経路に着目し、胃癌臨床検体での発現の検討や発現調整機序

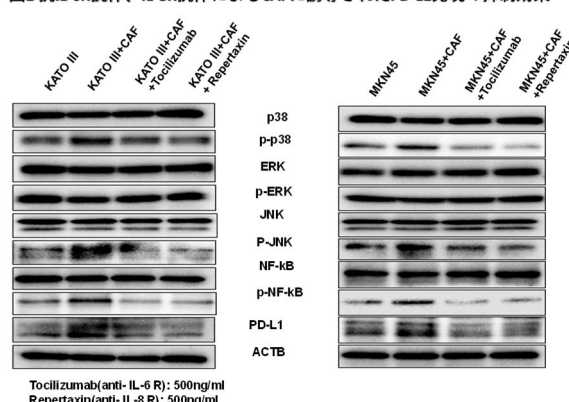
### 3. 研究の方法

- A)
  - (1) 化学療法による PD-L1 の発現が変化するかどうかについて胃癌細胞株を用いて検討
  - (2) PD-L1 の発現は腫瘍間質の存在によって影響を受ける可能性を cancer associated fibroblast (CAF) と共培養することで検討
- B)
  - (1) 臨床検体での評価：根治切除を施行した前治療歴のない進行胃癌 232 例を対象とし、切除検体の FFPE 切片を用いて抗 HLA-E 抗体による免疫染色を行い、腫瘍組織全体での HLA-E の発現を評価した。NK 細胞は抗 CD56 抗体と抗 CD3 抗体を用いた 2 重免疫染色を行い、HLA-E/NK 発現と臨床病理学的因子・予後との相関を検証した。
  - (2) 胃癌細胞株とヒト全血から分離した NK 細胞との共培養を行い、腫瘍膜表面の HLA-E と上清中の soluble HLA-E の経時的変化と、同時に上清中の IFN- $\gamma$  の濃度変化を確認した。また、健常者ならびに胃癌患者血清中における soluble HLA-E を測定した。

### 4. 研究成果

- A)
  - (1) 胃癌の key drug である 5-FU を PD-L1 陰性細胞株に持続曝露を行ったところ、PD-L1 の発現は時間依存性、濃度依存性に増加した。また 5-FU の曝露中止を行っても PD-L1 の発現は維持された。PD-L1 の発現には JAK-STAT 経路の活性が増加していた。
  - (2) PD-L1 陰性細胞株 (MKN45, KATOIII) を CAF と共培養したところ、PD-L1 の発現は増加した。次いで、共培養上清を cytokine array を行ったところ、IL-6, IL-8 が有意に増加していた。胃癌細胞株に IL-6, IL-8 を添加すると NF- $\kappa$ B 経路を活性化し、PD-L1 の発現は増加した。以上より、CAF から産生される IL-6, IL-8 が PD-L1 の発現を調整していることが明らかとなった。そこで、anti-IL-6 R である Tocilizumab と anti-IL-8 R である Repertaxin を投与すると、PD-L1 の発現は抑制された。さらに CAF との共培養でも同様の結果が得られた (図 1)。

図1 抗IL-6R抗体、IL-8R抗体によるCAFに誘導されたPD-L1発現の抑制効果



Tocilizumab(anti-IL-6 R): 500ng/ml  
Repertaxin(anti-IL-8 R): 500ng/ml

B)

(1) HLA-E 陽性群は 104 例 (44.8%) に認め、分化型、上部胃癌に有意に多く認められた ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ )。HLA-E 陽性群は、全生存率、無再発生存率のいずれも予後不良であり ( $p = 0.006$ ,  $p = 0.004$ )。多変量解析では共に HLA-E 陽性が独立した予後予測因子であった ( $p = 0.024$ ,  $p = 0.007$ )。HLA-E/NK 発現別の解析では、全生存・無再発生存ともに HLA-E 陽性、NK low 群が最も予後不良であった ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ) (図 2)。

(2) NK 細胞との共培養において腫瘍膜表面の HLA-E 発現は peak out が見られる一方、上清中の soluble HLA-E は上昇した。共培養上清中の IFN- $\gamma$  は経時的な上昇を認めた。胃癌細胞への IFN- $\gamma$  添加時も膜表面 HLA-E の peak out と上清中の soluble HLA-E の上昇が見られた (図 3)。また、胃癌患者の血清中 soluble HLA-E は健常者と比較し有意に高値であった。進行胃癌の soluble HLA-E が早期症例よりも有意に高値であった。また、正常上限を cut off とした時、soluble HLA-E 高値群は低値群と比較し、予後不良の傾向があった (図 4)。

図2. HLA-E発現・NK細胞と長期予後

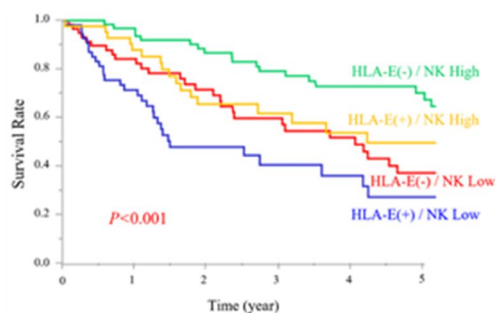


図3: IFN- $\gamma$ によるHLA-E発現の変化

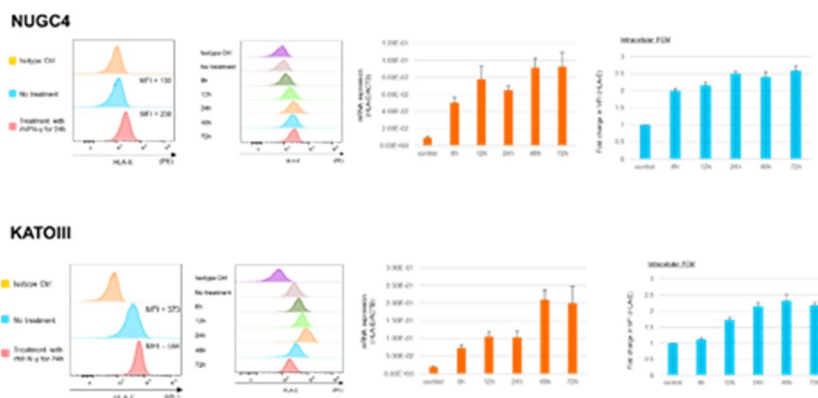
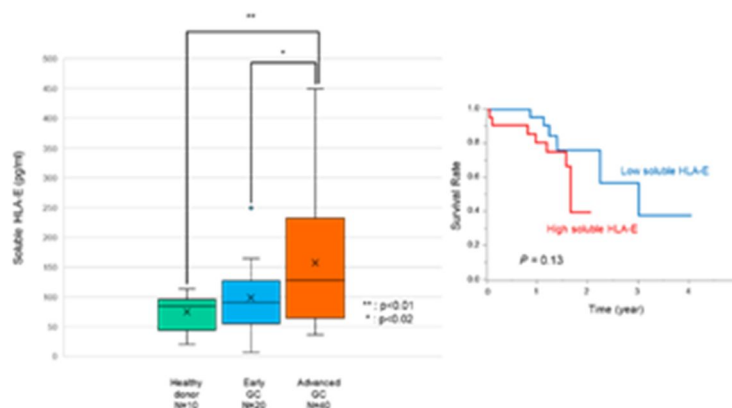


図4: 血清中soluble HLA-E発現と予後



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3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 Morinaga Takeshi, Iwatsuki Masaaki, Yamashita Kohei, Matsumoto Chihiro, Harada Kazuto, Kurashige Junji, Iwagami Shiro, Baba Yoshifumi, Yoshida Naoya, Komohara Yoshihiro, Baba Hideo	4. 巻 29
2. 論文標題 Evaluation of HLA-E Expression Combined with Natural Killer Cell Status as a Prognostic Factor for Advanced Gastric Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 4951 ~ 4960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-022-11665-3	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 Yamashita K, Iwatsuki M, Yasuda-Yoshihara N, Morinaga T, Nakao Y, Harada K, Eto K, Kurashige J, Hiyoshi Y, Ishimoto T, Nagai Y, Iwagami S, Baba Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Ajani JA, Baba H	4. 巻 Feb;124(3)
2. 論文標題 Trastuzumab upregulates programmed death ligand-1 expression through interaction with NK cells in gastric cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Br J Cancer	6. 最初と最後の頁 595-603
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 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

1. 著者名 Morinaga Takeshi, Iwatsuki Masaaki, Yamashita Kohei, Yasuda-Yoshihara Noriko, Yamane Taishi, Matsumoto Chihiro, Harada Kazuto, Eto Kojiro, Kurashige Junji, Ishimoto Takatsugu, Baba Yoshifumi, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Baba Hideo	4. 巻 30
2. 論文標題 Dynamic Alteration in HLA-E Expression and Soluble HLA-E via Interaction with Natural Killer Cells in Gastric Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1240 ~ 1252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-022-12505-0	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 Morinaga Takeshi, Iwatsuki Masaaki, Yamashita Kohei, Yasuda-Yoshihara Noriko, Yamane Taishi, Matsumoto Chihiro, Harada Kazuto, Eto Kojiro, Kurashige Junji, Ishimoto Takatsugu, Baba Yoshifumi, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Baba Hideo	4. 巻 30
2. 論文標題 ASO Visual Abstract: Dynamic Alteration in HLA-E Expression and Soluble HLA-E via Interaction with Natural Killer Cells in Gastric Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1253 ~ 1254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-022-12555-4	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Kazuto Harada, Masaaki Iwatsuki, Shiro Iwagami, Yoshifumi Baba, Yuji Miyamoto, Naoya Yoshida1, Jaffer A. Ajani, Hideo Baba
2. 発表標題 Future perspective of precision medicine based on ascites cells for gastric adenocarcinoma with peritoneal carcinomatosis
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeshi Morinaga, Masaaki Iwatsuki, Kohei Yamashita, Kojiro Eto, Kazuto Harada, Junji Kurashige, Shiro Iwagami, Yoshifumi Baba, Naoya Yoshida, Yoshihiro Komohara, Hideo Baba
2. 発表標題 Evaluation of HLA-E expression combined with natural killer cell status as a prognostic factor for advanced gastric cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森永 剛司、岩槻 政晃、山下 晃平、山根 大侍、松本 千尋、江藤 弘二郎、原田 和人、岩上 志朗、石本 崇胤、馬場 祥史、宮本 裕士、吉田 直矢、馬場 秀夫
2. 発表標題 胃癌におけるHLA-E発現制御機構の解明
3. 学会等名 第32回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩槻政晃、山下晃平、森永剛司、山根大侍、原田和人、江藤弘二郎、長井洋平、 岩上志朗、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 胃癌におけるPD-L1発現の空間的・時間的不均一性の検討
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩槻政晃、山下晃平、森永剛司、松本千尋、Lou mei yue、中村健一、岩上志朗、 馬場祥史、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 胃癌細胞におけるTrastuzumabが与えるPD-L1発現への影響
3. 学会等名 第31回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Meiyue Lou, Masaaki Iwatsuki, Chihiro Matsumoto, Xiyu Wu, Takatsugu Ishimoto, Yoshifumi Baba, Yuji Miyamoto, Naoya Yoshida, Hideo Baba
2. 発表標題 The immunomodulating effect of CAF for tumor microenvironment in gastric cancer
3. 学会等名 the 81st Annual Scientific Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2022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 分担 者	吉田 直矢  (Yoshida Naoya)  (60467983)	熊本大学・病院・特任教授   (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	原田 和人  (Harada Kazuto)  (70608869)	熊本大学・病院・特任助教    (17401)	
研究分担者	山下 晃平  (Yamashita Kohei)  (00867202)	熊本大学・病院・非常勤診療医師    (17401)	

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