

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 5 年 5 月 3 0 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16195

研究課題名（和文）皮膚扁平上皮癌における腫瘍免疫療法および分子標的薬の適応についての研究

研究課題名（英文）The study of tumor immunotherapy and molecularly targeted therapy for cutaneous squamous cell carcinoma

研究代表者

西田 陽登（Nishida, Haruto）

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：30641120

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,300,000 円

研究成果の概要（和文）：27例の皮膚扁平上皮癌(cSCC、転移巣あり13例と転移巣なし14例)に対して、次世代シーケンサー(NGS)を用いた遺伝子検索と免疫組織化学検査(IHC)を用いた発現タンパクの解析を行い、腫瘍免疫療法および分子標的薬の適応について研究を行った。その結果、転移症例は非露光部に多く、NGSにて遺伝子の総変異数が多く、IHCではCD8陽性T細胞が少ないことが明らかとなった。また、cSCCの発生にはERBB4とNPM1、転移にはGNAQ、GNAS、JAK2、NRAS、IDH2、CTNNB1が関わっている可能性がある。今回の研究から、特に、露光部に発生したcSCCに対して腫瘍免疫療法の効果が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究において、皮膚扁平上皮癌(cSCC)の腫瘍発生や転移に関連する遺伝子が明らかとなった。これらの結果から、露光部と非露光部の腫瘍発生の違いが明らかとなり、cSCCに対しても腫瘍免疫療法の効果があると考えられ、特に、露光部に発生したcSCCに対しての効果が期待できる。また今後は、cSCCに対する新たな治療戦略の可能性が広がり、現在、他の腫瘍について使用されている分子標的薬などを用いるドラッグリポジショニングや新たな分子標的薬の開発も期待できる。

研究成果の概要（英文）：We studied 27 cases of cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC, 13 cases with metastases and 14 cases without metastases) for the indication of tumor immunotherapy and molecular targeted drugs by gene search using next-generation sequencing (NGS) and analysis of expressed proteins using immunohistochemical tests (IHC). The results revealed that metastatic cases were more common in non sun-exposed areas, with high number of total gene mutations by NGS and fewer CD8-positive T cells by IHC. In addition, ERBB4 and NPM1 may be involved in cSCC development, and GNAQ, GNAS, JAK2, NRAS, IDH2, and CTNNB1 in cSCC metastasis. Based on this study, tumor immunotherapy is expected to be effective, particularly for cSCC arising in the sun-exposed areas.

研究分野：病理診断

キーワード：皮膚扁平上皮癌 次世代シーケンサー 免疫組織化学検査 腫瘍免疫療法

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、人口の高齢化に伴い、日光露光部における腫瘍発生頻度が増加傾向であり、皮膚においては悪性黒色腫、扁平上皮癌 (SCC) が特に目立つ。悪性黒色腫は、近年研究が進んできている腫瘍免疫学の発達により予後が著明に改善しつつあるが、SCC に関しては予後が比較的良好であることもあり研究・検討が進んでいない。ところで、SCC は肺や頭頸部にも発生するが、これらの分野では腫瘍免疫療法を基にした分子標的薬が保険適用となり、予後の改善がなされてきている。そこで、皮膚扁平上皮癌 (cSCC) に対しても腫瘍免疫療法の効果を認めるのではないかと着想し、研究を開始した。

2. 研究の目的

肺や頭頸部領域などの他臓器の扁平上皮癌において、生検や手術にて採取された検体を用いて免疫染色を行い、薬剤の適否や治療効果の予測がなされている。そこで、皮膚扁平上皮癌において腫瘍免疫療法が可能かどうか、という問いをたてるとともに、近年普及しつつある遺伝子学的検査の手法である次世代シーケンサーを用いて、皮膚扁平上皮癌の遺伝子検索を網羅的に行って、腫瘍発生を明らかにする。また、形態的・臨床病理組織学的な検討も合わせて行い、皮膚扁平上皮癌の新しい治療法となるような分子標的薬のターゲットとなりうる遺伝子を明らかにする。

3. 研究の方法

cSCC を 27 例蒐集し、13 例は診断時に転移巣が確認されており、14 例は転移巣が認められていなかった。それぞれの症例の臨床病理学的情報も蒐集し、各原発巣に対して next-generation sequencing (NGS) を用いた遺伝子検索、HE 染色を用いた tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) の検討、CD8、PD-L1 を用いた免疫組織化学検査 (IHC) を行った。なお、NGS に関しては Illumina 社の iSeq100 を使用し、50 遺伝子 (*ABL1*, *EGFR*, *GNAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *AKT1*, *ERBB2*, *GNAQ*, *MET*, *RBI*, *ALK*, *ERBB4*, *HNF1A*, *MLH1*, *RET*, *APC*, *EZH2*, *HRAS*, *MPL*, *SMAD4*, *ATM*, *FBXW7*, *IDH1*, *NOTCH1*, *SMARCB1*, *BRAF*, *FGFR1*, *JAK2*, *NPM1*, *SMO*, *CDH1*, *FGFR2*, *JAK3*, *NRAS*, *SRC*, *CDKN2A*, *FGFR3*, *IDH2*, *PDGFRA*, *STK11*, *CSF1R*, *FLT3*, *KDR*, *PIK3CA*, *TP53*, *CTNNB1*, *GNAI1*, *KIT*, *PTEN*, *VHL*.) をターゲットとした Illumina Cancer Hotspot Panel V2 を用いた。

4. 研究成果

皮膚扁平上皮癌における臨床病理学的因子と腫瘍免疫

診断時に転移のあった症例 (cSCC+) と転移のなかった (cSCC-) を比較すると、cSCC- では高齢者が多く、腫瘍サイズが小さかった。また cSCC+ では腫瘍の深達度が深く、腫瘍径が有意に大きかった。27 例中 20 例は露光部に発生し、特に 12 例は顔面に認められた。cSCC- は露光部に発生した症例が多かった (14 例中 13 例)。腫瘍免疫として、CD8 陽性の TILs は cSCC- の症例で有意に認められ、PD-L1 の発現は cSCC+ の症例で低い傾向がみられた。cSCC- においては PD-L1 発現の低い症例で TILs が多く認められた。

これらのことから、cSCC+ は非露光部で多く、TILs の効果は乏しいと考えられた。腫瘍免疫療法の治療効果予測因子として明確に定義されたものはないが、PD-L1 の発現、TILs、高マイクロサテライト不安定性 (MSI-high)、ミスマッチ修復遺伝子の変異、tumor mutation burden (TMB) などが関連しているとされている。cSCC- における有意な TILs は、腫瘍進展・転移を抑制している可能性がある。

皮膚扁平上皮癌における変異遺伝子

NGS を用いた遺伝子解析では、cSCC- では平均の遺伝子変異数が 330 であったのに対し、cSCC+ では 1330 と著明な差がみられた。cSCC- 症例における露光部の症例においては、遺伝子変異数が著しく少なかった。cSCC+ 症例では 50 遺伝子全てにおいて変異が検出され、*GNAQ*、*GNAS*、*JAK2*、*NRAS*、*IDH2*、*CTNNB1* は cSCC+ 症例においてのみ検出された。cSCC+ と cSCC- のいずれにおいても *ERBB4* と *NPM1* の変異が検出されたが、*APC*、*ATM*、*CDKN2A*、*EGFR*、*ERBB2*、*FGFR2*、*FGFR3*、*MET*、*MPL*、*NOTCH1*、*PDGFRA*、*RBI*、*RET*、*SMAD4*、*SMARCB1*、*SMO*、*TP53* は cSCC+ で有意に変異が認められた。

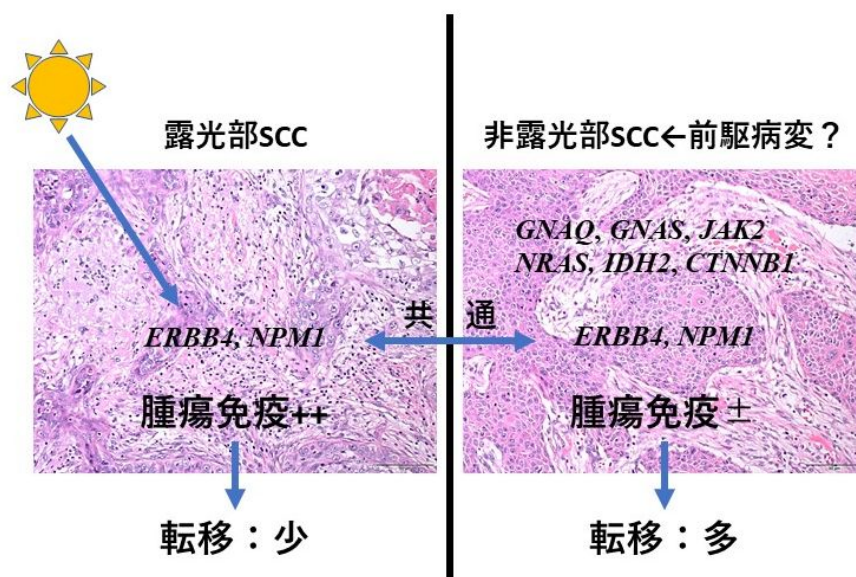
これらのことから、露光部における総遺伝子変異数は全体的に少なかったものの、露光部では日光が腫瘍発生に関連していると考えられる。既報告でも cSCC の腫瘍発生に日光が関連してい

るという報告があり、日光がドライバー遺伝子の変異に関わっている可能性がある。今回検出された遺伝子変異のうち、*CSF1R*、*FLT3* は線維芽細胞などの腫瘍微小環境、*NPM1* は増殖関連因子とされており、cSCC にて初めて検出された遺伝子である。

皮膚扁平上皮癌における腫瘍関連遺伝子と転移関連遺伝子

cSCC+とcSCC-の遺伝子変異を比較すると、*CTNNB1*、*GNAQ*、*GNAS*、*IDH2*、*JAK2*、*NRAS* はcSCC+のみに検出された。また、*GNAQ*、*GNAS*、*JAK2* は細胞増殖因子、*NRAS*、*IDH2*、*CTNNB1* は腫瘍関連因子とされており、これらが腫瘍の転移や悪性度に関連している可能性がある。そのため、cSCC においてこれらの遺伝子変異を検出した場合は、小さな病変や早期発見できていたとしても、注意深い経過観察が必要だと考えられる。また、*ERBB4*、*NPM1* はcSCC+、cSCC-のいずれにも検出され、これらの遺伝子はcSCCの発生に関連している可能性がある。また、*CSF1R*、*ERBB4*、*FLT3*、*KDR*、*NPM1* は腫瘍深達度の深いもの（より深くまで浸潤している症例）で変異を示す症例が多く、これらの腫瘍微小環境や腫瘍増殖関連因子に変異を持つ症例は、浸潤能や悪性度が高い可能性がある。

これらの結果を下の図に纏めた。



以上から、転移症例は非日光部に多く、NGS にて遺伝子の総変異数が多く、IHC では CD8 陽性 T 細胞が少ないことが明らかとなった。また、cSCC の発生には *ERBB4* と *NPM1*、転移には *GNAQ*、*GNAS*、*JAK2*、*NRAS*、*IDH2*、*CTNNB1* が関わっている可能性がある。これらの結果から、cSCC に対しても腫瘍免疫療法の効果があると考えられ、特に、日光部に発生したcSCC 対しての効果期待できる。また今後は、cSCC に対する新たな治療戦略の可能性が広がり、現在、他の腫瘍について使用されている分子標的薬などを用いるドラッグリポジショニングや新たな分子標的薬の開発も期待できる。

なお、これらの内容を論文として纏め、英文雑誌である PLoS One に掲載された (Nishida H, et al. CD8/PD-L1 immunohistochemical reactivity and gene alterations in cutaneous squamous cell carcinoma. PLoS One. 2023;18:e0281647) .

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1 . 著者名 Haruto Nishida, Yoshihiko Kondo, Takahiro Kusaba, Kazuhiro Kawamura, Yuzo Oyama, Tsutomu Daa	4 . 巻 18(2)
2 . 論文標題 CD8/PD-L1 immunohistochemical reactivity and gene alterations in cutaneous squamous cell carcinoma	5 . 発行年 2023年
3 . 雑誌名 PLoS One	6 . 最初と最後の頁 e0281647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0281647	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------