

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18080

研究課題名(和文)肉腫における腫瘍内免疫応答の解析に基づく最適な複合的免疫療法の検討

研究課題名(英文)Study of optimally combined immunotherapy based on analysis of Intratumor Immune response in sarcoma

研究代表者

佐藤 靖祥 (SATO, Yasuyoshi)

公益財団法人がん研究会・有明病院 総合腫瘍科・副医長

研究者番号：00869836

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)：研究期間中に肉腫患者180例の手術・末梢血検体を採取した。十分な量の腫瘍組織が採取できた症例では、腫瘍組織を細断し酵素処理などを行ってFresh tumor digest(FTD)を作成した。残りは培地上に播種し、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)および腫瘍細胞を培養した。得られたTILとFTDを共培養し、上清を回収してELISAでインターフェロン(IFN $\gamma$ )産生を解析し、先行研究と同様に腫瘍細胞内に腫瘍反応性のTILが存在する症例群があることを確認した。さらに、次世代シーケンスを外注で行い、また一部の症例でフローサイトメトリー、液性因子解析を行って、腫瘍内免疫応答の多層的な解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肉腫においても腫瘍細胞内に腫瘍反応性のTILが存在する症例があることが確認された。研究期間終了時点では、次世代シーケンス、フローサイトメトリー、液性因子解析を行って、腫瘍内免疫応答の多層的な解析を進めており、最終的には、腫瘍内免疫応答の評価に基づく個別化免疫治療や新規の複合的免疫治療の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Surgical and peripheral blood samples were collected from 180 sarcoma patients during the study period. In cases where a sufficient amount of tumor tissue could be obtained, the tumor tissue was shredded and enzymatically treated to produce fresh tumor digest (FTD). The remainder was seeded on a culture medium to culture tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and tumor cells. The resulting TILs and FTD were co-cultured, and the supernatant was collected and analyzed for interferon gamma (IFN $\gamma$ ) production by ELISA, confirming the presence of a case group of tumor-reactive TILs in the tumor cells as in previous studies. In addition, next-generation sequencing has been outsourced, and flow cytometry and liquid factor analysis have been performed in some cases to analyze the multilayered immune response within the tumor.

研究分野：腫瘍内科

キーワード：肉腫 腫瘍免疫 免疫療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍患者では抗腫瘍免疫応答は様々な機序で抑制されている。近年その抑制因子の一つである免疫チェックポイント分子を抗体で阻害することにより、メラノーマ、肺癌、腎細胞癌、ホジキンリンパ腫、頭頸部癌、胃癌、悪性胸膜中皮腫、尿路上皮癌、乳癌、MSI-High 固形癌などで生存期間の延長が証明され、免疫療法はがん治療における重要な選択肢の一つとなってきた。一方で、免疫チェックポイント阻害薬は非常に高価であり、重篤な免疫学的有害事象の報告もあり、奏効が期待できる患者を選別できるバイオマーカーの確立が急務となっている。いくつかのがん種では、腫瘍細胞の PD-L1 の発現や、腫瘍遺伝子変異量などが治療効果と関連することが示唆されているが、絶対的なバイオマーカーとはみなされていない。加えて、免疫チェックポイント阻害薬をさらに早期の段階で使用したり、複数の免疫チェックポイント阻害薬や他の抗がん剤・分子標的薬と併用するなど、より効果的な治療法の探索が始まっており、個々の患者における腫瘍内免疫応答を理解することが求められている。

また、肉腫においては、現時点で免疫チェックポイント阻害薬を含め生存期間の延長が証明された免疫療法は存在しない。肉腫に有用な免疫療法の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

これまでのがん薬物療法は、腫瘍細胞の増殖を直接阻害する作用を持つ薬物が主体であったが、免疫チェックポイント阻害薬を含む免疫療法は、免疫細胞を介して間接的に腫瘍の増殖制御を目指す治療である。そのため、免疫療法のバイオマーカー探索においては、腫瘍細胞の特性解析に加えて、腫瘍が形成する免疫環境の解析が重要となる。申請者らの共同研究グループでは、現在までに次のような予備的な研究結果を得ている。

1) 肺癌 20 例において、RNA シークエンス解析を行い、患者個々の腫瘍内免疫応答の特性をスコア化した「イムノグラム」を作成し、腫瘍への T 細胞浸潤の程度により肺癌を 3 群に分類した ( Karasaki et al. J Thorac Oncol. 2017 )

2) 胃癌 31 例において、次世代シークエンス、フローサイトメトリー、液性因子解析を行い、腫瘍内免疫応答を多層的に解析した。RNA シークエンスデータに基づいて患者個々の「イムノグラム」を作成し、胃癌を 4 群に分類した。この分類は、従来の臨床分類とは相関を認めなかったが、がん抗原数や上皮間葉転換、遺伝子変異、腫瘍微小環境、腫瘍浸潤 T リンパ球 ( TIL ) の機能不全や浸潤排除の有無などの腫瘍内免疫応答が特徴づけられ、腫瘍内免疫応答の評価に有用と考えられた。( 佐藤. 東京大学大学院医学系研究科博士論文. )

3) 肉腫 110 例の腫瘍組織において、腫瘍細胞内に腫瘍反応性の TIL が存在する症例があることを確認し、これらの症例では免疫療法が奏効する可能性があることを示唆した ( 佐藤ほか. 第 2 回日本サルコーマ治療研究会学術集会 )

本研究では、1)~2) の解析手法を肉腫患者に応用し、肉腫患者個々の腫瘍内免疫応答の特性を評価した「イムノグラム」を作成することで、肉腫における腫瘍内免疫応答の特徴を解明し、3) で示唆された免疫療法が奏効する患者群を選別し、さらに患者個々への最適な複合的免疫治療の提供を目指す。

### 3. 研究の方法

#### 3-1. 腫瘍特異的遺伝子変異の同定

##### a. 検体の採取・調整

手術時に採取された腫瘍組織を、肉眼的な癌部、非癌部に分けて保存する。遺伝子解析用と免疫染色用に手術組織を凍結・ホルマリン保存する。検体量に応じて、一部を細片に切断して培養し、細胞株の樹立を試み、患者のリンパ球と反応させて、腫瘍特異的免疫応答の検証に用いる。また、手術前、手術後の計 2 回、1 回 30ml ずつ採血する。採血後に末梢血単核球 ( PBMC ) と血清を分離して凍結保存する。

b. 腫瘍遺伝子特異的遺伝子変異の同定 腫瘍組織の肉眼的な癌部と非癌部、PBMC からそれぞれ DNA、RNA を抽出し、次世代シークエンサーにより全エクソン、RNA シークエンス解析を行う。非癌部、PBMC のデータをコントロールとして、腫瘍特異的な遺伝子変異や遺伝子発現を網羅的に同定する。

#### 3-2. 腫瘍内免疫応答の多層的解析

##### a. 腫瘍内微小環境の遺伝子解析

RNA シークエンスから得られた遺伝子発現プロファイリングから、特に免疫関連遺伝子群の発現

傾向や、シグナル伝達、細胞周期等に関する発現傾向を解析する。さらに腫瘍内における TIL のプロファイルを明らかにして、抗腫瘍エフェクター細胞と免疫抑制性細胞との関係を検討する。遺伝子異常に伴うシグナル伝達亢進、免疫抑制分子産生や細胞傷害性因子の発現について解析する。

b. 腫瘍組織の免疫組織化学染色

腫瘍組織切片の免疫組織化学染色を行い、がん抗原タンパク発現、T 細胞を含む免疫細胞の性状や分布の解析を行う。

c. フローサイトメトリーによる腫瘍内微小環境の解析

腫瘍局所における T 細胞・免疫抑制性細胞の存在、免疫関連分子の発現をフローサイトメトリーで検討する。

d. 液性因子の解析

末梢血から分離した血漿中のサイトカイン・ケモカインやがん抗原などに対する抗体などの液性因子を解析する。

3. 「イムノグラム」に基づく複合的免疫治療の検討

a. 「イムノグラム」の作成

上記解析で得られた腫瘍内微小環境などの情報に基づき、患者毎の抗腫瘍免疫応答に関連する因子について、左図のような「イムノグラム」(図は肺癌での例)を作成する。

b. 最適な複合的免疫治療の検討

「イムノグラム」に基づいて、抗腫瘍免疫応答を抑制している原因に応じて、手術、放射線照射、抗がん剤や分子標的薬抗体治療薬、免疫チェックポイント阻害薬、がんワクチン、免疫細胞治療などの組み合わせによる複合的免疫治療の提案の可能性を検討する。

4. 研究成果

研究期間中に肉腫患者 180 例の手術・末梢血検体を採取した(先行研究とあわせて計 372 例)。十分な量の腫瘍組織が採取できた症例では、腫瘍組織を細断し酵素処理などを行って Fresh tumor digest(FTD)を作成した。残りは培地上に播種し、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)および腫瘍細胞を培養した。得られた TIL と FTD を共培養し、上清を回収して ELISA でインターフェロン (IFN )産生を解析し、先行研究と同様に腫瘍細胞内に腫瘍反応性の TIL が存在する症例群があることを確認した。さらに、次世代シーケンスを外注で行い、また一部の症例でフローサイトメトリー、液性因子解析を行って、腫瘍内免疫応答の多層的な解析を行っており、その成果について複数の論文を投稿準備中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 SATO YASUYOSHI, NAKANO KENJI, KAWAGUCHI KUNIKI, FUKUDA NAOKI, WANG XIAOFEI, URASAKI TETSUYA, OHMOTO AKIHIRO, HAYASHI NAOMI, YUNOKAWA MAYU, ONO MAKIKO, TOMOMATSU JUNICHI, HAYAKAWA KEIKO, FUNAUCHI YUKI, TANIZAWA TAISUKE, AE KEISUKE, MATSUMOTO SEIICHI, TAKAHASHI SHUNJI	4. 巻 1
2. 論文標題 Changes in Neutrophil-to-lymphocyte Ratio Predict Efficacy of Trabectedin for Soft-tissue Sarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Diagnosis & Prognosis	6. 最初と最後の頁 303 ~ 308
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/cdp.10040	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 Sato Yasuyoshi, Nakano Kenji, Wang Xiaofei, Fukuda Naoki, Urasaki Tetsuya, Ohmoto Akihiro, Hayashi Naomi, Yunokawa Mayu, Ono Makiko, Tomomatsu Junichi, Saito Masanori, Minami Yusuke, Hayakawa Keiko, Funauchi Yuki, Tanizawa Taisuke, Ae Keisuke, Matsumoto Seiichi, Takahashi Shunji	4. 巻 13
2. 論文標題 Pre-Treatment Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio (NLR) as a Predictive Marker of Pazopanib Treatment for Soft-Tissue Sarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 6266 ~ 6266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13246266	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 Sato Y, Wada I, Odaira K, Hosoi A, Kobayashi Y, Nagaoka K, Karasaki T, Matsushita H, Yagi K, Yamashita H, Fujita M, Watanabe S, Kamatani T, Miya F, Mineno J, Nakagawa H, Tsunoda T, Takahashi S, Seto Y, Kakimi K	4. 巻 9
2. 論文標題 Integrative immunogenomic analysis of gastric cancer dictates novel immunological classification and the functional status of tumor infiltrating cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical & Translational Immunology	6. 最初と最後の頁 e1194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cti2.1194	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 SATO YASUYOSHI, NAKANO KENJI, FUKUDA NAOKI, WANG XIAOFEI, URASAKI TETSUYA, OHMOTO AKIHIRO, YUNOKAWA MAYU, ONO MAKIKO, TOMOMATSU JUNICHI, HAYAKAWA KEIKO, FUNAUCHI YUKI, TANIZAWA TAISUKE, AE KEISUKE, MATSUMOTO SEIICHI, TAKAHASHI SHUNJI	4. 巻 41
2. 論文標題 Pre-treatment Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predicts Efficacy of Eribulin for Soft-tissue Sarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 527 ~ 532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.14804	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 船内 雄生、佐藤 靖祥、垣見 和宏、高橋 俊二、阿江 啓介、大川 淳	4. 巻 32
2. 論文標題 腫瘍浸潤Tリンパ球の解析による肉腫における免疫療法の可能性探索	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 東日本整形災害外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 79 ~ 82
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24645/jejot.32.1_79	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8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 佐藤靖祥, 山下裕玄, 小林由香利, 長岡孝治, 高橋俊二, 瀬戸泰之, 垣見和宏
2. 発表標題 Analysis of intra-tumoral immune response before and after nivolumab treatment in gastric cancer : 胃癌におけるニボルマブ治療前後の腫瘍内免疫応答の解析.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤靖祥, 瀬戸陽, 小林由香利, 長岡孝治, 仲野兼司, 佐藤由紀子, 神山亮介, 新橋渉, 佐々木徹, 福島啓文, 米川博之, 高橋俊二, 三谷浩樹, 垣見和宏
2. 発表標題 統合的免疫ゲノム解析に基づく頭頸部癌の新規免疫学的分類.
3. 学会等名 第19回日本臨床腫瘍学会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuyoshi Sato, Yukari Kobayashi, Koji Nagaoka, Yasuhiro Okumura, Koichi Yagi, Hiroharu Yamashita, Kazuhiro Kakimi, Yasuyuki Seto
2. 発表標題 Biomarkers by integrative immunogenomic analysis before and after nivolumab in gastric cancer
3. 学会等名 第94回日本胃癌学会総会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sato Y, Wada I, Odaira K, Hosoi A, Kobayashi Y, Nagaoka K, Karasaki T, Matsushita H, Yagi K, Yamashita H, Takahashi S, Seto Y, Kakimi K
2. 発表標題 Novel immunological classification of gastric cancer by integrative analysis
3. 学会等名 AACR2020 VIRTUAL ANNUAL MEETING II（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林由香利、佐藤靖祥、和田郁雄、細井亮宏、長岡孝治、八木浩一、山下裕玄、高橋俊二、瀬戸泰之、垣見和宏
2. 発表標題 統合的な解析による新たな胃がんの免疫学的分類
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林由香利、佐藤靖祥、船内雄生、細井亮宏、唐崎隆弘、高橋俊二、阿江啓介、垣見和宏
2. 発表標題 肉腫における腫瘍内免疫微小環境の解析
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 細井亮宏、佐藤靖祥、長岡孝治、小林由香利、高橋俊二、瀬戸泰之、垣見和宏
2. 発表標題 胃がんの腫瘍内免疫応答の統合的解析
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤靖祥、和田郁雄、小林由香利、奥村康弘、若松高太郎、八木浩一、愛甲丞、山下裕玄、野村幸世、垣見和宏、瀬戸泰之
2. 発表標題 免疫ゲノム解析による胃癌の新規免疫学的分類
3. 学会等名 第93回日本胃癌学会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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