

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08776

研究課題名（和文）免疫モニタリングによる上部消化管がん腫瘍免疫応答機序の解明と個別化治療の確立

研究課題名（英文）Elucidation of the tumor immune response mechanism of upper gastrointestinal cancer through immune monitoring and establishment of individualized treatment

研究代表者

牧野 知紀 (Tomoki, Makino)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80528620

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：局所の免疫モニタリングとして、腫瘍浸潤Tリンパ球(TIL)を定量化するイムノスコアが食道癌の予後・術前化学療法治療効果予測に(Noma T, Makino T, et al. Ann Surg 2021)、腫瘍辺縁三次リンパ様構造が食道癌の予後・PD-1抗体治療効果予測にそれぞれ有用であった(Hayashi Y, Makino T, et al. Br J Cancer 2023)。

一方、全身モニタリングでは食道癌Nivolumab投与前後でNivolumab(IgG4)結合末梢血T細胞において投与4週後にCD8上のCD103発現が奏効例で高く、CD103高発現群は予後良好であった(投稿中)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上部消化管癌において局所および全身の免疫モニタリングすることで、腫瘍免疫応答機序の（少なくとも）部分的な解明につながり、また患者予後や(化学療法、免疫療法を含む)治療効果予測に臨床非常に有用であることが明らかとなった。いまだ研究途中の課題もあるが、今回得られた知見により上部消化管癌における個別化治療の確立、予後向上の一助となる可能性があり、その学術的・社会的意義は大きいものとする。

研究成果の概要（英文）：As local immune monitoring, Immunoscore, which quantifies tumor-infiltrating T lymphocytes (TILs), was found useful in predicting the prognosis and response to preoperative chemotherapy in patients with esophageal squamous cell carcinoma (Noma T, Makino T, et al. Ann Surg 2021). Similarly, peritumoral tertiary lymphoid structures was identified to be useful in predicting prognosis and response to PD-1 antibody treatment for esophageal cancer (Hayashi Y, Makino T, et al. Br J Cancer 2023).

On the other hand, in the analysis of Nivolumab (IgG4)-bound peripheral blood T cells before and after administration of Nivolumab for esophageal cancer as systemic immune monitoring, the expression of CD103 on CD8(+) T cells was higher in Nivolumab responders compared with non-responders at 4 weeks after Nivolumab administration, and the CD103-high group showed better prognosis (in submission).

研究分野：癌免疫微小環境

キーワード：食道癌 3次リンパ様構造 腫瘍浸潤リンパ球 PD-1抗体 胃癌

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

上部消化管がん(食道癌・胃癌)に対して ICI が最近保険収載され治療体系を大きく変えたが、ICI 単剤の奏効率は 10-20%といまだ低い。また、高額な医療コストや重篤な有害事象(irAE)リスクを考えると、ICI の治療効果や有害事象を予測する有用なバイオマーカーの確立が急務である。腫瘍組織における PD-L1 発現量、遺伝子変異数、ネオアンチゲン数、MSI-H、dMMR などの腫瘍因子が治療効果と相関するとの報告が散見されるが、総じて不変的マーカーの確立とまでは至っていない。その一因として ICI の治療効果はあくまで腫瘍に対する宿主側の免疫応答があって初めて成り立ち、個体・腫瘍によって異なる免疫細胞、免疫応答の関与が重要な役割を果たす。実際、腫瘍浸潤 T 細胞(TIL)数が ICI 治療効果の予測因子になることが様々ながんで報告され、腫瘍免疫応答においてはこれまで多くの T 細胞研究がなされてきた。一方で、液性免疫の中心的役割を担う B 細胞は、腫瘍免疫応答においては自己産生する抗体が腫瘍促進的に働く一方で、ADCC 活性や貪食作用、抗原提示細胞として T 細胞を介した抗腫瘍作用を備えるという 2 面性を持つ。また、腫瘍局所においては B 細胞が主成分を占める TLS を形成し、抗腫瘍免疫・良好な予後と強く関連するとされる一方で、IL-10・TGF $\beta$  を産生する”制御性 B 細胞”が腫瘍進展に関わるとされる。しかしマウス実験など数少ない報告のみであり、腫瘍免疫における B 細胞の詳細な役割・機序は大部分が未知である。

一方、がん特異的免疫細胞は腫瘍細胞との接触や免疫療法の介入によりそれらの数・機能において経時的变化を呈する。この変化を数値化することを“免疫モニタリング”と称すが、実際に非消化器癌での ICI 投与後短期での免疫モニタリングによる末梢血 PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞数上昇が治療効果に相関するという知見や、ICI 投与後の末梢血 B 細胞数低下が irAE 発症を予測するとの報告もある。本研究では末梢血と腫瘍組織にて T 細胞に加え B 細胞に着目した免疫モニタリングにより食道癌・胃癌における有用な ICI 治療マーカー確立や治療標的の同定を目的とし、最終的に上部消化管がん免疫療法の個別化確立を目指す。

### 2. 研究の目的

近年の薬物療法の進歩により上部消化管がん領域でも治療奏効例の予後改善はあるもののいまだ全体として飛躍的な予後改善には至っていない。最近 CTLA-4/PD-1 抗体など ICI が大きな注目を集め、食道癌・胃癌でも驚くべき臨床効果を得ているが、ICI 単剤での奏効率は改善の余地が大きく、それらの有用な効果予測マーカーは未確立である。そこで、本申請研究においては上部消化管がんに対する ICI のバイオマーカー確立および新たな治療標的の同定が目的である。

### 3. 研究の方法

食道癌・胃癌患者における T 細胞・B 細胞を中心とした各免疫関連因子の経時的評価を液性・細胞性免疫の双方を加味した下記のアプローチで行い、ICI 治療におけるバイオマーカーの確立および治療標的分子(細胞)の同定を経てそれらの臨床応用を目指す。

#### (1) 全身免疫モニタリング

末梢血を用いて T 細胞および B 細胞(形質細胞)を中心とした下記の因子の経時的(Day0、7、14、28)免疫モニタリングを行い、治療効果・有害事象・予後との関連を検証する

Nivolumab(IgG4)が結合した T・B 細胞の各表面マーカー発現解析(T・B 細胞数および各細胞サブセットの測定)。活性化分子(ICOS、OX40、4-1BB、CD103 etc)および抑制性分子(PD-1、Tim-3、CCR4、CTLA-4、LAG-3 etc)についてそれぞれフローサイトメトリー(FACS)にて測定・評価。B 細胞については総数および各細胞サブセット分画

を各測定し、これらとT-regやエフェクターT細胞(とくにPD-1+CD8陽性T細胞)との関連性を検証(FACS、免疫染色)

リンパ球レセプター(TCR・BCR)のレパトア解析によるclonalityおよびdiversity評価(Antigen spreading評価としての)がん抗原に対する自己抗体の網羅的測定(Bio-Plexシステム)と末梢血B細胞分画との相関

FACSによる制御性T(CD25+FOXP3+細胞)および制御性B細胞(CD19+IL-10+細胞またはIgA+PD-1+IL-10+細胞)分画測定とサイトカイン(LPS/PMA刺激によるIL-10・TGF )産生能評価、制御性B細胞の制御性T細胞への分化誘導能評価(ナイーブT細胞との共培養)

## (2)がん局所免疫モニタリング

内視鏡生検/切除標本の腫瘍組織におけるT・B細胞を中心とした経時的(ICI投与前後)なモニタリング評価と治療効果・有害事象・予後との関連を検証する

腫瘍浸潤T・B細胞の各発現評価(CD3/4/8、CD19/20 etc:FACS、免疫)と腫瘍側因子(PD-L1/2、MLH-1/MSH-2、MSI etc)およびその他の免疫細胞(NK細胞・M1/2マクロファージ・樹状細胞・キラーT細胞・制御性T細胞・MDSC・好酸球 etc)の発現との相関

腫瘍内/腫瘍周囲 TLS の多重蛍光免疫染色評価(CD4/8/19/20/21/138)と機能解析(Visium®を用いた空間的遺伝子発現解析)

制御性B細胞(CD19+IL-10+細胞またはIgA+PD-1+IL-10+細胞)の発現・局在評価と制御性T細胞/エフェクター(PD-1+CD8陽性)T細胞発現との関連性

腫瘍浸潤B細胞由来免疫グロブリンのレパトア解析

アプローチAとB、すなわち末梢血とがん局所における免疫細胞の動向の相関性その後、独立したサンプルを用いた validation を経て最終的に前向き臨床試験へとつなげる。

## 4. 研究成果

### (1)食道癌における腫瘍浸潤リンパ球評価とその臨床病理学的意義

術前無治療症例切除標本を用いたイムノスコア評価

2000-2017年に根治切除を施行した術前無治療食道扁平上皮癌患者300例の切除標本ホルマリオン固定パラフィン包埋(FFPE)スライドにおいて、IS評価方法として抗CD3抗体(総Tリンパ球、monoclonal, Clone F 7.2.38, Dako)を、CD8抗体(キラーTリンパ球、monoclonal, Clone C8.144B, Dako)についての組織免疫化学染色を行い、腫瘍周囲の浸潤辺縁(間質と腫瘍の境界線から内外側に500 $\mu$ mの範囲)と腫瘍の中心部(辺縁部より内側の範囲)のTIL数について1視野:500 $\mu$ m<sup>2</sup>を複数視野分、自動計測(BZ-X710/BZ-H3C, Keyence)した。中心部と辺縁部それぞれにおいてTIL数の上位5視野を選択し、5視野の合計TIL数の平均値をカットオフとし症例ごとにISスコアリング(0-4点)を行った。CD3・CD8の免疫染色評価では、腫瘍の中心部と辺縁部のCD3陽性細胞数(平均値)は中心部722/mm<sup>2</sup>、辺縁部1474/mm<sup>2</sup>(P=0.0001)、CD8陽性細胞数(平均値)は中心部500/mm<sup>2</sup>、辺縁部870/mm<sup>2</sup>(P=0.0001)であり、CD3・CD8ともに中心部よりも辺縁部の方が有意に多かった。この平均値を用いてISを評価すると、ISの分布は0/1/2/3/4=92例(32%)/76(25%)/52(17%)/32(10%)/48(16%)であった。ISを2群[IS-high(3-4点)群 vs IS-low(1-2点)群]に分けると、2群間でstageを含めた患者背景因子には差を認めなかった。予後に関して、全症例においてIS-high群はIS-low群よりも予後良好な傾向があり[5年全生存率(OS) IS-high群 vs low群:77.6 vs 65.8%, p=0.0722]、pStage II-IV症例(n=180)においてより顕著であった[IS-high群 vs low群 5年OS:70.2 vs 54.5%, p=0.0208]、さらにOSの多変量

解析では IS が独立予後因子となった [ ハザード比(HR)=2.07,95% confidence interval (CI)=1.26-3.41, P=0.0043 ]

治療前(NAC 前)内視鏡生検検体を用いた TIL 評価

2000-2017 年に術前化学療法(NAC)として DCF(Docetaxel/Cisplatin/5-FU)または FAP(5-FU/Adriamycin/Cisplatin)療法後に根治切除を施行した食道扁平上皮癌 146 例の NAC 前内視鏡生検 FFPE スライドを用いた CD3・CD8 免疫染色評価を行った。TIL 評価法に関しては、複数の生検腫瘍検体中の全ての TIL 細胞数を自動計測し、腫瘍面積あたりの TIL 密度( $1\mu\text{m}^2$ )を算出、その中央値をカットオフとして high 群、low 群に 2 群化した。CD3 陽性および CD8 陽性細胞数(密度の中央値)は各  $3.1\times 10^4/\mu\text{m}^2$  と  $1.7\times 10^4/\mu\text{m}^2$  であり( $P=0.0001$ )、それらと臨床病理学的因子との間に有意差は認めなかった。NAC 奏効例( $n=71$ ;組織学的 Grade2-3)は、非奏効例( $n=75$ ;組織学的 Grade0-1b)と比較して CD3 陽性 ( $3.8\times 10^4$  vs  $2.5\times 10^4/\mu\text{m}^2$ ,  $P=0.0106$ ) および CD8 陽性細胞数 ( $2.1\times 10^4$  vs  $1.4\times 10^4/\mu\text{m}^2$ ,  $P=0.0729$ ) が多く、とくに CD3 陽性細胞数に関しては OS の多変量解析において独立予後因子となった( $HR=1.75$ ,  $95\%CI=1.12-2.78$ ,  $P=0.0169$ )。

以上より、食道癌切除標本および内視鏡生検検体の FFPE サンプルを用いた新たな TIL 評価法が、予後および治療効果予測において有用である可能性が示唆された。

(Noma T, Makino T, et al. Immunoscore Signatures in Surgical Specimens and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Pretreatment Biopsy Predict Treatment Efficacy and Survival in Esophageal Cancer. Ann Surg. 277:e528-e537, 2023)

## (2) 食道扁平上皮癌の予後・ICI 治療効果予測における腫瘍辺縁三次リンパ様構造評価の意義

(目的)三次リンパ様構造(TLS: Tertiary Lymphoid Structure)は慢性炎症下に発生する異所性リンパ器官で、リンパ節や脾臓などの二次リンパ器官と類似構造を有し獲得免疫の開始・維持を司る。固形癌など悪性腫瘍の微小環境においても存在することが知られ、それらの発現・成熟性が腫瘍局所での抗腫瘍免疫応答に寄与するとされる。一方で TLS の発生、成熟性に関わるがん免疫微小環境の変化やその機序、患者予後への影響は未だ一定の見解を得ず、とくに食道扁平上皮癌における知見は乏しい。本研究は食道癌における腫瘍辺縁 TLS の発現、成熟度を評価し予後および治療効果予測を含めた臨床病理学的意義を明らかにすることを目的とした。

(対象・方法と結果)自施設を含む 2 施設において術前無治療にて根治切除を施行した食道扁平上皮癌 316 例が対象。腫瘍最深部切除標本を用いた HE 染色にて腫瘍辺縁(腫瘍先進部より  $1000\mu\text{m}$  と定義)における TLS 密度を計測し、連続切片の免疫組織化学染色による CD21 および CD23 発現に基づき TLS の成熟性(未成熟から成熟の順に E-TLS: Early TLS, PFL-TLS: Primary Follicle like TLS, SFL-TLS: Secondary Follicle like TLS)を評価した。全体の 91%の症例に TLS 発現を認め、成熟度別の TLS 発現率は E-TLS/PFL-TLS/SFL-TLS:=75/54/65%であり、TLS 発現の増加に伴い成熟 TLS 割合は増加した。正常食道上皮、dysplasia 部、癌部(T1 腫瘍)での TLS 発現(密度)はそれぞれ  $0.06[0-0.12]$ 、 $0.10[0-0.41]$ 、 $0.36[0.09-1.70]/\text{mm}^2$  であり、癌では Stage の進行に伴い TLS 発現は減少した(StageI/II/III/IV =  $0.49[0-3.09]/0.33[0-2.09]/0.20[0-1.11]/0.13[0-1.90]/\text{mm}^2$ )。TLS 高発現 vs 低発現群の 2 群比較(cutoff : TLS 密度中央値)では、高発現群で Stage が浅く( $p$ StageIII/IV 割合  $49.4$  vs  $75.3\%$ ,  $P<0.0001$ )、脈管侵襲が少なく(リンパ管侵襲陽性割合  $50.6$  vs  $66.5\%$ ,  $P=0.0060$ , 静脈侵襲陽性割合  $34.2$  vs  $63.3\%$ ,  $P<0.0001$ )、また手術時の血清栄養指標が良好[血清アルブミン値  $4.0$  vs  $3.9$  (g/d),  $P=0.0059$  / 好中球リンパ球比  $1.89$  vs  $2.58$ ,  $P<0.0001$  / Prognostic nutritional index  $48.3$  vs  $45.8$ ,  $P<0.0013$ ]であった。予後については、TLS 高発現群は低発現群と比較して Progression-free survival(PFS)が有意に良好であった(2 年 PFS

81.1 vs 48.9%,  $P < 0.0001$ )。この傾向は Stage 別のサブグループにおいても同様であり、とくに成熟度の高い TLS 発現の有無でより顕著であった(2 年 PFS : E-TLS 65.2 vs 65.0%,  $P = 0.24$  / PFL-TLS 79.9 vs. 50.0%,  $P < 0.0001$  / SFL-TLS 81.1 vs. 48.8%,  $P < 0.0001$ )。PFS の多変量解析にて TLS 密度は独立予後因子であった(ハザード比=2.31、95%信頼区間=1.55-3.46、 $p < 0.0001$ )。続いて同切除標本の多重蛍光免疫染色(CD1c, CD4, CD8, CD19, CD21, CD138)にて免疫細胞フェノタイピングによる TLS 成熟度毎の構成細胞分析( $n=70, 345$  TLSs)を行うと、TLS の成熟度が増すに伴って各免疫細胞の分布・局在が変化し TLS 内部及び周囲の免疫細胞数が上昇した(免疫細胞総数中央値: E-TLS/PFL-TLS/SFL-TLS=681.5/1546.5/2427)。とくに PFL-TLS と比較して SFL-TLS では周囲の CD138 陽性形質細胞割合が有意に高かった(7.5 vs 13.4%,  $P < 0.0001$ )。さらに別コホートとして術後再発に対して抗 PD-1 抗体治療を施行した再発食道癌 34 例を対象とし初回手術時の切除標本を用いて腫瘍辺縁 TLS 評価を行ったところ、TLS 高発現群( $n=17$ )は低発現群( $n=17$ )と比較して抗 PD-1 抗体の治療効果が有意に高く(responder 割合 47.1 vs 5.9%,  $P = 0.0017$ )、良好予後であった(median PFS 160 vs 52 days,  $P = 0.0040$ )。

(結語)腫瘍辺縁 TLS の密度と成熟性は食道癌における予後や免疫チェックポイント阻害剤の治療効果の有用な予測バイオマーカーとなる可能性が示唆された。

(Hayashi Y, Makino T, et al. Density and maturity of peritumoral tertiary lymphoid structures in oesophageal squamous cell carcinoma predicts patient survival and response to immune checkpoint inhibitors. Br J Cancer. 128:2175-2185, 2023)

### **(3) 食道癌 ICI 療法における経時的全身(血液)免疫モニタリングとその意義**

(背景) 食道癌に対する免疫チェックポイント阻害剤は単剤では奏効率が低く治療効果を予測するバイオマーカーの確立が必至であるが、とくに全身免疫を反映する血液を用いた有用なバイオマーカーは未だ存在しない。今回、食道癌に対して Nivolumab(抗 PD-1 抗体)を投与した前後で、抗 PD-1 抗体の結合したリンパ球の表面マーカーの特徴を経時的に解析し、それらと Nivolumab の治療効果や予後など臨床病理学的因子との相関を検討した。

(方法と結果) 切除不能進行・再発食道扁平上皮癌に対して抗 PD-1 抗体の投与前後で経時的 (Day0,7,14,28)に末梢血検体を採取した食道扁平上皮癌症例( $n=57$ )を対象とした。フローサイトメトリーを用いて PD-1 抗体の結合した T 細胞上に発現する分子と治療効果との相関について検討を行ったところ、Nivolumab 投与 4 週後、Nivolumab 結合 CD8 上の CD103 は奏効例で有意に発現率が高かった( $p=0.0041$ )。また、投与 4 週目の CD103 高発現群は有意に全生存期間が良好であった( $p=0.042$ )。 (in submission)

なおその他の (腫瘍浸潤、制御性) B 細胞の解析やがん抗原に対する自己抗体の網羅的測定などについては現在進行中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Noma T, Makino T, Ohshima K, Sugimura K, Miyata H, Honma K, Yamashita K, Saito T, Tanaka K, Yamamoto K, Takahashi T, Kurokawa Y, Yamasaki M, Nakajima K, Morii E, Eguchi H, Doki Y	4. 巻 277(3)
2. 論文標題 Immunoscore signatures in surgical specimens and tumor-infiltrating lymphocytes in pretreatment biopsy predict treatment efficacy and survival in esophageal cancer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 e528-e537
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SLA.0000000000005104.	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 Hayashi Y, Makino T, Sato E, Ohshima K, Nogi Y, Kanemura T, Honma K, Yamashita K, Saito T, Tanaka K, Yamamoto K, Takahashi T, Kurokawa Y, Miyata H, Nakajima K, Wada H, Morii E, Eguchi H, Doki Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Density and maturity of peritumoral tertiary lymphoid structures in oesophageal squamous cell carcinoma predicts patient survival and response to immune checkpoint inhibitors.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Br J Cancer.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-023-02235-9.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林芳矩、牧野知紀、山下公太郎、西塔拓郎、田中晃司、山本和義、高橋剛、黒川幸典、中島清一、江口英利、土岐祐一郎
2. 発表標題 食道癌における腫瘍浸潤TおよびBリンパ球の臨床病理学的意義
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林芳矩、牧野知紀、山下公太郎、田中晃司、西塔拓郎、山本和義、高橋剛、黒川幸典、中島清一、江口英利、土岐祐一郎
2. 発表標題 食道癌における腫瘍周囲三次リンパ様構造は長期予後および免疫治療効果を予測する
3. 学会等名 第123回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野間俊樹、牧野知紀、山崎誠、山下公太郎、田中晃司、西塔拓郎、山本和義、黒川幸典、中島清一、江口英利、土岐祐一郎
2. 発表標題 食道癌における腫瘍浸潤リンパ球の新規評価法(Immunoscore)と予後の検討
3. 学会等名 第75回日本食道学会学術集会
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
研究 分担 者	土岐 祐一郎  (Doki Yuichiro)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授	
	(20291445)	(14401)	

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