

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08802

研究課題名（和文）dMMR/MSI-H大腸癌における希少サブフラクションの同定と個別的免疫療法

研究課題名（英文）Subclassification of dMMR/MSI-H colorectal cancer

研究代表者

坂本 渉（Sakamoto, Wataru）

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：40622337

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）：ミスマッチ修復欠損・マイクロサテライト不安定性（dMMR/MSI-H）を示す大腸癌は低頻度だが臨床的には確立した群である。しかし、dMMR/MSI-H大腸癌には部分的な重複と相反する特徴が混在し広汎なスペクトラムを内包しており、これはBRAF、CIMP、RAS、CMS、TMB、PDL1、CD8+TILといった既存の知見で説明することはできない。本研究の目的は、個別化治療を可能にするためdMMR/MSI-H CRCの異なるサブグループを特定することである。複数の網羅的データ解析および免疫組織化学、in vitroの実験系を用いた。いくつかの興味深い知見を得たが、今後も検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害剤を中心とした免疫療法の登場から、dMMR/MSI-Hは臨床医に広く認知されるようになり、国内外で基礎研究・臨床研究が盛んに行われている。本研究の知見を今後さらに深め、発展させることで、dMMR/MSI-Hにおける新規のサブタイプを同定することができれば、大腸癌治療の個別化のための礎として寄与し得る可能性がある。

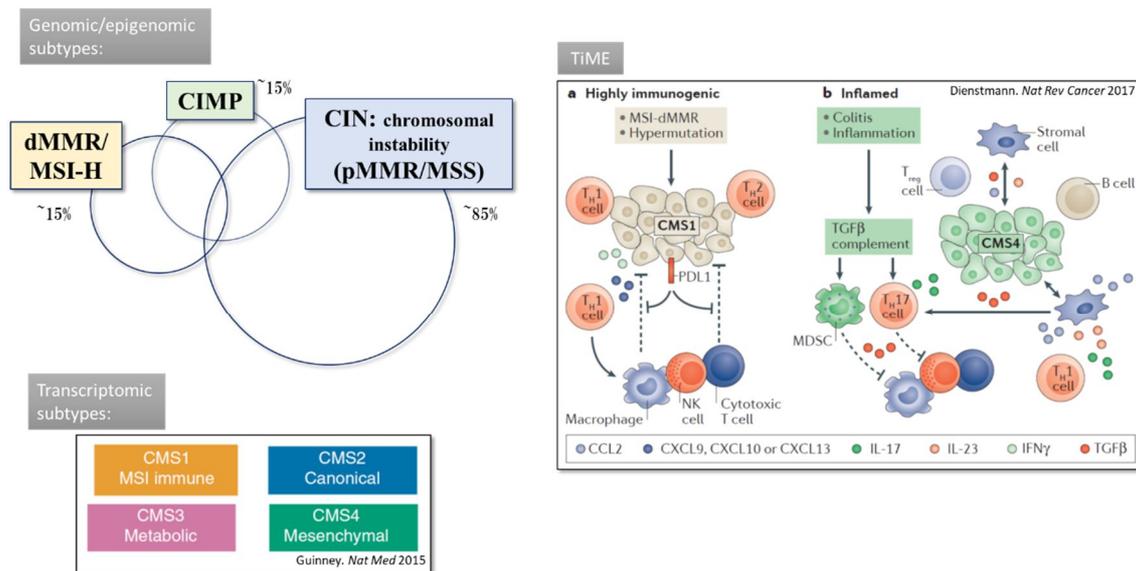
研究成果の概要（英文）：Colorectal cancer (CRC) exhibiting mismatch repair deficiency and/or microsatellite instability-High (dMMR/MSI-H) accounts for 15% of all CRCs and 4% of metastatic and recurrent cases. However, dMMR/MSI-H encompasses a broad spectrum with partially overlapping and contradictory characteristics, and this heterogeneity cannot be fully explained by known genomic, epigenomic, transcriptomic, or immunological factors, such as BRAF, CIMP, RAS, CMS, TMB, PDL1, CD8+TIL. The aim of this study was to identify distinct subgroups of dMMR/MSI-H CRC that enable individualized treatment. We have attempted to elucidate this issue using multiple RNA-seq, microarray and immunohistochemistry datasets with in vitro assays. Although we have obtained some intriguing findings, we are continuing our investigation.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 MSI dMMR

1. 研究開始当初の背景

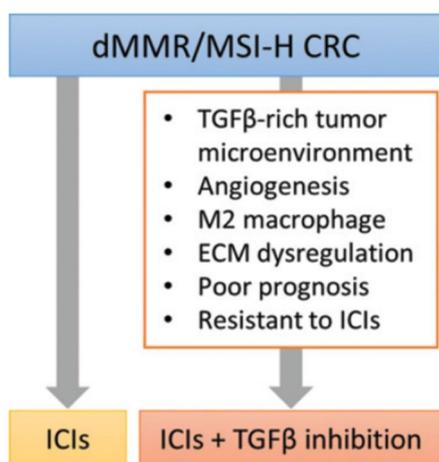
大腸癌は、発癌の分子メカニズムおよびゲノム・エピゲノム異常に基づいて、古くから3つのサブタイプ CIN (chromosomal instability: 染色体不安定性) CIMP (CpG island methylator phenotype: CpG アイランドメチル化形質) MSI (microsatellite instability: マイクロサテライト不安定性) に分類されてきた(下図)。一方、近年提唱された CMS サブタイプ (Consensus Molecular Subtype) はトランスクリプトミクスに基づいており、癌細胞だけでなく腫瘍微小環境における免疫・間質細胞由来の遺伝子発現プロファイルを含んでいる (Guinney et al. *Nat Med* 2015)。85%の大腸癌は CIN を示し、典型的には Vogelstein の多段階発癌モデルに沿った遺伝子変異の蓄積を伴い、CMS2-4 のいずれかに分類される。一方、約 15%の大腸癌はミスマッチ修復欠損 (dMMR) により高レベルの MSI、すなわち MSI-H を示し (dMMR/MSI-H) 免疫細胞浸潤と同時に免疫チェックポイント分子発現による免疫逃避を特徴とし、免疫チェックポイント阻害薬の有効が知られる。



dMMR/MSI-H を示す大腸癌は、全症例のうち 15%、転移再発例のうち 4%と低頻度であるが、ゲノム、病理、免疫、予後、治療応答のいずれの観点からも際立った特徴を有する最も確立したサブタイプである。しかし同時に、数多くの異なる(ときに矛盾する)特徴を内包している。

dMMR/MSI-H の大半は CMS1 に分類され、半数程度は CIMP、やはり半数程度が BRAF 変異を持ち、多くは孤発例だが遺伝性 (Lynch 症候群) が混在する。種々の型の鋸歯状病変 (HP、TSA、SSL) が遺伝子異常に関連した前癌病変となり得る。HP や SSL の多くは BRAF 変異を示し鋸歯状発癌経路の driver と言われる。

臨床においては、早期癌では dMMR/MSI-H は術後の再発リスクが低く予後が極めて良好だが、5-FU ベースの術後補助化学療法には抵抗性、CIMP は再発高リスクだが補助化学療法が有効とされる。BRAF 変異陽性例の予後は一般に不良である。一方で再発後の予後は dMMR/MSI-H、CIMP、BRAF、CMS1 のいずれサブタイプでも不良とされる。ICI は dMMR/MSI-H 大腸癌に対し免疫療法を軸としたパラダイムシフトの端緒となったが、その効果は均一でなく、奏効率は 30-60%とされる。以上のように、分子遺伝学的・病理学的・臨床的に、部分的に重複し、かつ部分的に相反する特徴を示すサブグループが dMMR/MSI-H のなかに多数存在している可能性がある。しかし日常臨床において MSI 検査に基づく個別化 (ICI の適応) が始まったのが 2018 年であり、上述の幅広い表現型を同一視せざるを得ないのが現状である。



本研究が対象とする dMMR/MSI-H 大腸癌の不均一性は、単一の因子により説明することはできず、網羅的・多層的視点が必須である。

当研究者らは近年、dMMR/MSI-H 大腸癌におけるサ

ブグループとして、TGF 依存的な癌間質の活性化を特徴とし、予後不良で免疫チェックポイント阻害剤(ICI)に不応である CMS4-like な集団を同定している(左図、Endo E, Okayama H, Sakamoto W et al. *Mol Cancer Res* 2020)。このサブグループは CD8+T 細胞浸潤、TMB、BRAF 変異とも独立している。これらの患者は TGF 阻害剤と ICI の併用が有用な可能性が示唆されている。

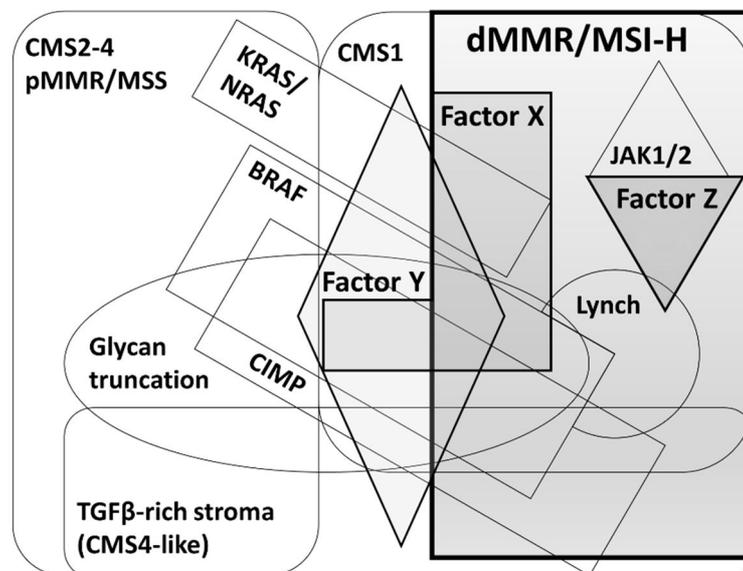
また当研究者らは、dMMR/MSI-H 大腸癌において、細胞表面糖鎖構造 Tn 抗原の短縮と CD8 陽性 T 細胞浸潤の抑制、PD-L1 発現低下を示す群を抽出し報告した(Matsumoto T, Okayama H, Sakamoto W et al. *Int J Mol Sci* 2020)。すなわち、免疫の活性化を特徴とする dMMR/MSI-H 大腸癌の一部に immune cold とも言えるようなサブグループが存在するものである。また Tn 抗原は CAR-T 療法、癌ワクチンの標的として臨床試験が行われており、ICI との併用を期待している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、dMMR/MSI-H 大腸癌に内包される不均一なスペクトラムを複数の希少サブフラクションとして認識する試みである。

下に示す概念図のように、dMMR/MSI-H において、既知のゲノム・エピゲノム異常や CMS 分類、未知の因子 (Factor X-Z) に裏打ちされる複数サブセットが重複していると想定した。これら個々のサブフラクションの背景にある分子機構を解明することが第一の目的である。

また当初の第 2 番目の目的としては、個々の分子機構に基づくサブフラクションに対する個別的な標的治療、免疫療法の応用の可能性を想定していた。



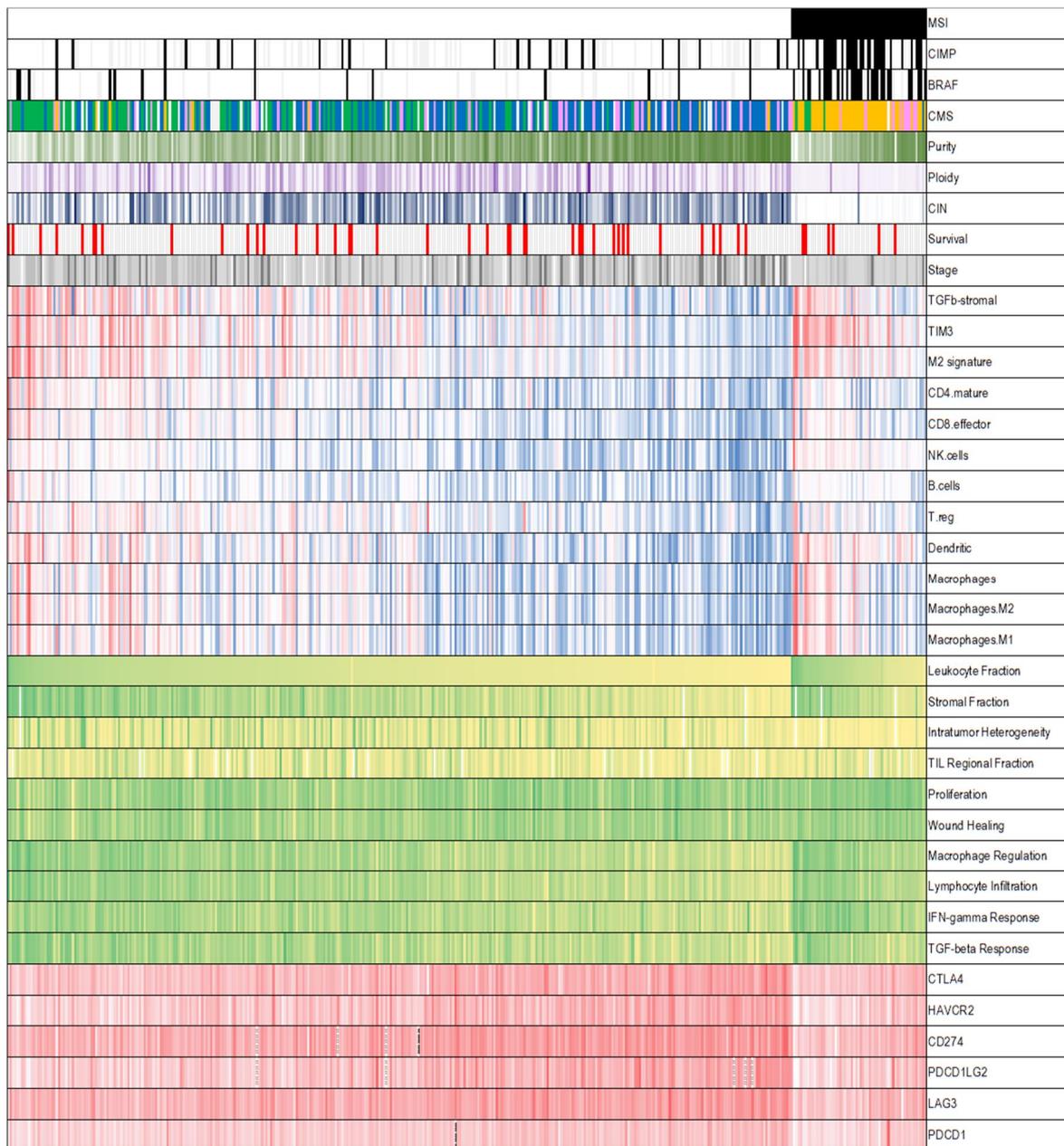
## 3. 研究の方法

本研究では下記のような方法を用いる(詳細は研究成果の欄に述べる)。

- 網羅的データ解析(マルチオミクスデータとして、マイクロアレイ、RNA シークエンス、DNA コピー数解析、遺伝子変異解析)
- 各種統計解析
- ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片を用いた免疫組織学的検討
- 臨床病理学的情報、予後、CIN、MSS、MSI、CIMP 等の検討
- 各種機能的検討 (in vitro、大腸癌細胞株)

#### 4 . 研究成果

本研究は、複数データセットを用いたマルチオミクス解析を出発点としている。RNA シークエンス、遺伝子変異解析、コピー数解析、臨床情報など各種データを収集した。下記は MSI データのある 399 症例の大腸癌原発巣の解析である。なおこのような解析を複数の大腸癌コホートに適用することで、比較的少数である MSI 症例の解析においても再現性を重視するものである。



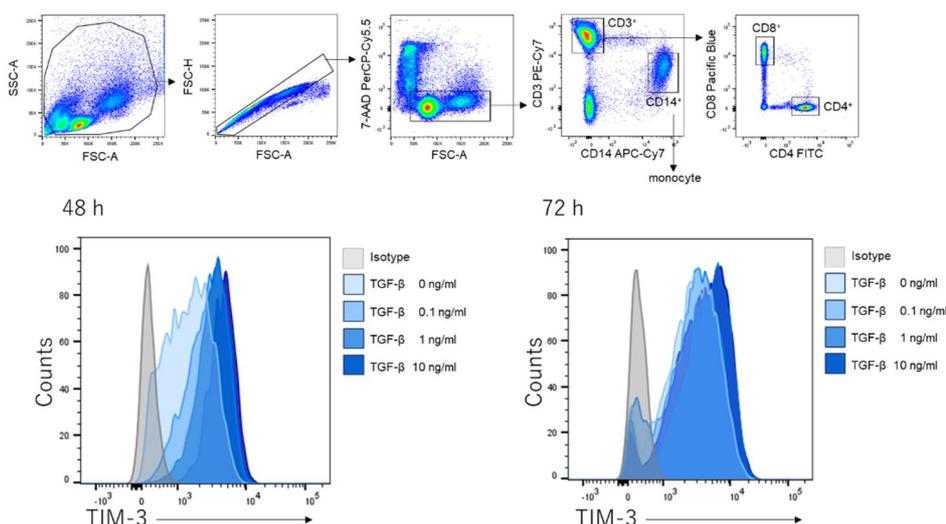
上記に示すように、MSI 症例は多くが CMS1 に分類され、CIMP および BRAF 変異と強い関連を認める。非 MSI 症例に比較して、CIN のレベルは低く、種々の免疫担当細胞シグネチャーにより示される免疫学的プロファイルが大きく異なることがわかる。同様に CTLA4、CD274 (PD-L1)、PDCD1 (PD-1) など、いわゆる免疫チェックポイント分子発現も MSI 症例では際立っている。

さて本研究の主眼は MSI 大腸癌におけるサブグループの同定を目指すものである。未発表または不完全であること、十分な結論に到達できなかったため本稿に全体を示すことはできないが、多数の可能性について検討を重ねた。

一つの例としては、特定の糖鎖酵素をコードする遺伝子群の発現が MSI 症例で特異的に上昇していることを見出し、複数のコホートで validation に至った。この MSI 大腸癌における酵素遺

伝子異常は癌特異的な細胞表面糖鎖構造の変化に寄与している可能性があり、またこの酵素遺伝子の発現は MSI 症例のなかでも極めて高発現のもの、低発現のものに 2 分できる可能性があるため興味深い解析結果であった。しかしながら、種々の細胞実験やデータ解析により明瞭な結論に至っておらず、現在も検討を続けている状況である。

もう一つの例として、当研究者らによる近年の解析結果から、MSI 症例の約半数は TGF- $\beta$  による間質の活性化が際立っており、かつ予後不良な群でもある (*Mol Cancer Res* 2020)。上記の図でも示すが、MSI 症例のうち、TGF- $\beta$  依存的な間質活性化を示す症例は、腫瘍促進的・免疫抑制的な M2 マクロファージ浸潤が高度であり、かつ免疫チェックポイント分子である TIM3 発現が高値である可能性が示唆された。下図に示すように、PBMC から単球を採取し、TGF- $\beta$  刺激を行うことで単球上に TIM3 発現が亢進することを見出した。また単球から分化させた M2 マクロファージは著明に TIM3 発現が上昇していた。これらは新規の知見であったが、必ずしも MSI 大腸癌に特異的というわけではなく、MSI 大腸癌におけるさらなるサブグループの意義を深めるには至らなかった。



上述のように、MSI 大腸癌の解析において、その希少性に由来する統計学的検出力という limitation が大きく、本研究の範囲において MSI 大腸癌における明瞭なサブグループを確立するには至らなかった部分がある。しかしながら、解析の過程において MSI と関連付けた複数の副次的な知見を得ることができ、さらなる検討を進めている段階である。

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 0件）

1. 著者名 Kaneta Akinao, Nakajima Shotaro, Okayama Hirokazu, Matsumoto Takuro, Saito Katsuharu, Kikuchi Tomohiro, Endo Eisei, Ito Misato, Mimura Kosaku, Kanke Yasuyuki, Saito Motonobu, Saze Zenichiro, Fujita Shotaro, Sakamoto Wataru, Onozawa Hisashi, Momma Tomoyuki, Ohki Shinji, Kono Koji	4. 巻
2. 論文標題 Role of the cGAS-STING pathway in regulating the tumor-immune microenvironment in dMMR/MSI colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	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） 10.1007/s00262-022-03200-w	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 NEUPANE PRAJWAL, MIMURA KOSAKU, NAKAJIMA SHOTARO, OKAYAMA HIROKAZU, ITO MISATO, THAR MIN AUNG KYI, SAITO KATSUHARU, ONOZAWA HISASHI, FUJITA SHOTARO, SAKAMOTO WATARU, SAITO MOTONOBU, SAZE ZENICHIRO, MOMMA TOMOYUKI, KONO KOJI	4. 巻 41
2. 論文標題 The Expression of Immune Checkpoint Receptors and Ligands in the Colorectal Cancer Tumor Microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4895 ~ 4905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15303	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 大竹廉正, 中嶋正太郎, 金田晃尚, 岡山洋和, 小野澤寿志, 藤田正太郎, 坂本涉, 齋藤元伸, 門馬智之, 三村耕作, 河野浩二.
2. 発表標題 dMMR/MSI大腸癌におけるSTING高発現はCD8陽性T細胞の高浸潤に寄与する
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 東倉賢治郎, 三村耕作, 中嶋正太郎, 伊藤美郷, 小野澤寿志, 岡山洋和, 藤田正太郎, 坂本涉, 齋藤元伸, 門馬智之, 河野浩二.
2. 発表標題 大腸癌における免疫チェックポイントリガンドの発現状況について
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊池智宏, 三村耕作, 松石彬, 鈴木博也, 丸山裕也, 佐久間芽衣, 圓谷秀哲, 深井智司, 金田晃尚, 氏家大輔, 千田峻, 楡井東, 多田武志, 花山寛之, 小野澤寿志, 岡山洋和, 坂本渉, 佐瀬善一郎, 門馬智之, 河野浩二.
2. 発表標題 大腸がんにおける腸内細菌叢と腫瘍浸潤免疫細胞の関連
3. 学会等名 第35回日本バイオセラピー学会学術集会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 草間大輔, 菊池智宏, 中嶋正太郎, 菅家康之, 花山寛之, 渡辺洋平, 小野澤寿志, 早瀬傑, 岡山洋和, 坂本渉, 藤田正太郎, 齋藤元伸, 佐瀬善一郎, 門馬智之, 三村耕作, 河野浩二.
2. 発表標題 pMMR/MSI-L/MSS大腸癌における抗PD-1抗体を用いた免疫治療の可能性
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡山洋和, 松本拓朗, 遠藤英成, 中嶋正太郎, 金田晃尚, 伊藤美郷, 菅家康之, 小野澤寿志, 藤田正太郎, 坂本渉, 齋藤元伸, 佐瀬善一郎, 門馬智之, 三村耕作, 河野浩二.
2. 発表標題 MSI/dMMR大腸癌のsubclassification
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金田晃尚, 中嶋正太郎, 伊藤美郷, 岡山洋和, 齋藤元伸, 三村耕作, 河野浩二.
2. 発表標題 dMMR/MSI-H 大腸癌における cGAS-STING 経路の発現
3. 学会等名 第34回日本バイオセラピー学会学術集会総会
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	岡山 洋和  (Okayama Hirokazu)  (20583397)	福島県立医科大学・医学部・講師    (21601)	

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