

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15576

研究課題名（和文）がん免疫療法治療前後の多領域シーケンス解析による治療効果関連因子の特定

研究課題名（英文）Identification of Treatment-Related Factors Using Multi-Region Analysis Before and After Cancer Immunotherapy

研究代表者

鎌谷 高志（Kamatani, Takashi）

東京医科歯科大学・M&Dデータ科学センター・講師

研究者番号：90645764

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、がん免疫療法の前後における多領域シーケンス解析を通じて、治療効果に関連する因子を特定しました。具体的には、治療前後での腫瘍組織の進化、同一患者内での異なる臓器における治療効果の違いとその病理・遺伝学的差異、免疫チェックポイント阻害剤（ICI）の耐性獲得の形成と腫瘍の特徴を解明しました。治療効果に関連するサブクローンを特定し、進行に關与する「悪性サブクローン」の特徴を生物学的・免疫学的に明らかにしました。また、公共データベースで悪性度を示すことに成功し、変異の病原性や成長過程の推測から選択圧の影響を解明しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、がん免疫療法における腫瘍進化の理解を深め、治療効果に影響を与える因子や耐性機構の解明に貢献しました。学術的には、がん進行と治療効果に関連する新たな生物学的・遺伝学的知見を発見し、今後の個別化医療の発展に寄与すると考えます。社会的には、治療効果を向上させるための新たな戦略や、治療抵抗性がんの対策に向けた基礎データとして利用でき、がん治療の効果改善に寄与すると考えます。

研究成果の概要（英文）：This study identified factors related to the effectiveness of cancer immunotherapy through multi-region sequencing analysis conducted before and after treatment. Specifically, we examined: (1) the evolution of tumor tissue pre- and post-treatment, (2) differences in treatment effects across different organs within the same patient and their pathological and genetic disparities, and (3) the development of resistance to immune checkpoint inhibitors (ICIs) and related tumor characteristics. We identified subclones associated with treatment effectiveness and elucidated the biological and immunological features of “malignant subclones” involved in cancer progression. Additionally, we validated the malignancy of these subclones using public databases and assessed the impact of selective pressures by analyzing mutation pathogenicity and subclone growth processes.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：マルチオミックス がん免疫 免疫チェックポイント阻害薬

1. 研究開始当初の背景

近年、免疫チェックポイント阻害薬(以下ICI)などの新規がん免疫療法が利用されている。しかし、がん免疫療法が有効な患者ははっきりしておらず、世界中の研究者がICIの有効性の予測因子を探索している。また治療当初はICIが有効であっても、治療を継続していくにつれ、効果が低下する獲得耐性が問題となっている。一方で、多くのがん種は従来ヘテロ性が高いと言われており、近年多領域シーケンスを用いることで、腫瘍内には様々なサブクローンが存在することで強いヘテロ性をもつことや、そのヘテロ性が殺細胞性抗がん剤との関連性を示す報告があり(Angelova M, Cell, 2018, Suzuki H, Nat. Genet., 2015, Turajilic S, Science, 2016)。多領域シーケンスと薬物療法の奏効性の関連解析が注目されつつある。しかし、過去にがん免疫療法の治療効果の予測を目的とし、治療前後の多領域シーケンスを行った報告はない。

2. 研究の目的

近年、本邦で固形癌ではマイクロサテライト不安定性(MSI)が高い腫瘍において、ペンプロリズマブが適応になるなど、がん免疫療法の適応患者数が急速に増大している。しかし、MSIが高い腫瘍でも奏効率は高くなく、世界中の研究者ががん免疫療法の有効性の予測因子を探索している。また治療当初は有効であっても、治療を継続していくにつれ、効果が低下する獲得耐性が問題となっている。

本研究の目的は、尿路上皮がんのがん免疫療法に対する奏効性・獲得耐性予測因子の発見のため、治療前後のがんの多領域解析を用い、がんの進化様式を推定する(図1)。また、奏効性・獲得耐性と関連がある重要なサブクローン集団を同定し、そのサブクローンと関連するがん微小環境の変化を解明する。また、別の患者のサンプルや公共データベースを用い、同じ特徴を持ったサブクローンと治療効果の関連性を検証する。

3. 研究の方法

本研究は、WES, WGS, RNA, 病理画像のデータを用いて、尿路上皮がんのがん免疫療法に対するがん進化様式の解明に加えて、奏効性・獲得耐性と関連するサブクローンの同定および検証を行った。具体的には下記の4つの項目に対する解析を行った。

1. がん免疫療法に対する治療前後のがんの進化様式の推定
2. 進化様式に伴うサブクローンの同定および治療効果と関連するサブクローンの発見、サブクローンのマーカー遺伝子の同定
3. ISHを用いた病理画像からのサブクローンの検証、およびIHCを用いたサブクローンによる環境変化様式の解明
4. 公共データベースなどでのサブクローン解析および治療効果との関連の検証

1. がん免疫療法に対する治療前後のがんの進化様式の推定

取得した1患者60サンプル(治療前原発2カ所、治療後8臓器58カ所)のWESを用いて解析を行う。具体的にはGATK Mutect2などのcallerソフトを用いて変異情報をコールしたのちに、変異情報データを用いて系統樹解析を行った。また、がんの進化様式を推測するための系統樹解析に使用するソフトとしては頻用されるVCF2PopTree (Subramanian S et al., PeerJ, 2019)やMEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)などのソフトに加えて、phangorn (Schliep K, Bioinformatics, 2011)やMesKit (Liu M et al., Gigascience, 2021)などがんの系統樹解析で報告があるソフトを使用し、比較検討した。

2. がん進化様式に伴うサブクローンの同定および治療効果と関連するサブクローンの発見、サブクローンのマーカー遺伝子の同定

がんのサブクローン集団を解析する方法としては、PyClone (Roth A et al., Nat. methods, 2014)を施行した。検出されたサブクローンと推測した進化様式を掛け合わせ、全サブクローンの移動・出現・消失の軌跡を推定し、さらには臓器のRECIST分類に基づいた治療効果判定(PDやSDなど)とサブクローンの関連解析を行い、奏効性・獲得耐性と関連があるサブクローンを同定した。次に、治療効果と関連するサブクローン集団を病理組織などからも同定するために、マーカーとなりうる遺伝子を発見する手法を開発した。マーカー遺伝子の同定方法としては、遺伝子発現量データとサブクローンの割合のデータを使用し、elastic netなどのペナルティを入れる手法とtspex (Camargo P et al., 2020, Research Square)を改変したものをを用いて同定した。

3. ISHを用いた病理画像からのサブクローンの検証、およびIHCを用いたサブクローンによる環境構築の解明

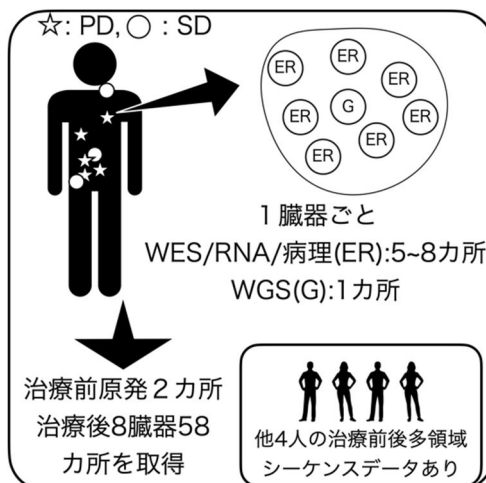


図1: 本研究の多領域解析の全容

同定したサブクロンのマーカーに対して、in situ hybridization 法 (ISH) や免疫組織科学染色 (IHC) を用いて一般的な免疫細胞の染色を行い、同定したサブクロン集団のマーカー検証を行なった。また空間的トランスクリプトームデータを用いて、同定した悪性サブクロンに相当するクラスターをマーカー遺伝子群から同定し、悪性サブクロン特有の生物学的特徴や免疫細胞の分布などを定量化し、悪性サブクロンの特徴を掴んだ。

4. 公共データベースでなどのサブクロン解析および治療効果との関連の検証

今までの研究で、特定のサブクロンががん免疫療法の奏効性・獲得耐性と関連し、組織の免疫環境が変化することが示されたと思う。その結果が、1 サンプルのみでおこる固有の事象なのか、尿路上皮がんや他のがん種まで発展できる内容なのかを検証する。取得済みである免疫療法治療前後の尿路上皮がんの 4 患者のデータに同定したサブクロンが存在するか、する場合は治療効果が正しく予測できているかを検討すると同時に、がん免疫療法を施行された尿路上皮がんや肺がんの公共データベース(Gao J et al., Nat. Med., 2020, van Dijk N et al., Nat. Med., 2020, Banchereau R et al., Nat. Commun., 2021) の WES データを用いて検証を行った。

4. 研究成果

・ヘテロ性の解析

全ゲノム解析 (WGS) とエクソーム解析 (WES) で、腫瘍内での遺伝的変異を解析した。特定の遺伝子群の変異が共通して見られた一方で、個々のサンプルで異なる変異も確認され、同一の患者内のサンプルにも関わらず、臓器間・臓器内での大きいヘテロ性が存在することが示された。また、遺伝子発現の解析では、同様にヘテロ性を認めたが、特筆すべき点として右肺と左肺などの同一の免疫環境と思われる臓器においても免疫に関連する生物学的特徴の活性化の程度が異なり、同様の臓器内においても異なる生物学的パスウェイが動いている可能性が示唆された。

・がんのクローン進化の評価

次に、上記のヘテロ性を構成する要素としてサブクロンに注目するために、サブクロン構造の解析を行なった。その結果、腫瘍進化に伴う多様なクローンの存在を確認した。全ての臓器および全ての癌細胞に存在することが推定される主要なクローンや、特定の臓器にしか存在しないサブクロンなど様々なタイプのクローンが存在した。治療前の検体の解析と比較すると、治療前には存在しないクローンや、治療前と比較して増量していると思われるサブクロンも存在し、ICI という免疫環境に大きく関わるとと思われる治療に伴う選択圧が生じ、一部のクローンは治療の選択圧下で生き残ったり消失したりすることが明らかになった。また、同様にヘテロ性の構成・腫瘍の進化を推定できる手法として、系統樹解析を行なったところ、左肺が最初に分岐し、右肺や他の臓器が続く進化的経路が示された。

・免疫療法に対する抵抗性関連クローンの特定

次に、多数あるサブクロンの中で、ICI の治療と関連するサブクロン、特に ICI の治療に対して抵抗性を持つ臓器において多量に存在するサブクロンの同定を行った。その結果、複数のサブクロンが治療後の腫瘍サンプルで顕著に多く見られることが確認された。それらのサブクロンの変異の中には、腫瘍遺伝子・腫瘍抑制遺伝子として重要なものも存在し、悪性となりうると考えられた。これらのクローンは、高い非同義/同義変異比を持ち、治療中の選択圧の影響により残った selective subclone の可能性が示唆された。

・外部コホートでの検証

内部コホートと外部コホートの比較で、ペムプロリズマブ治療後のサンプルが先の検証で示された悪性クローンを持つ傾向が強いことが確認され、同定した作成サブクロンが免疫療法への感受性に影響することが示唆された。

・空間トランスクリプトーム解析

WES および RNA-seq のデータと、悪性サブクロンのデータを用いて、悪性サブクロンを同定するためのマーカーとなりうる遺伝子群を解析した。同定した悪性サブクロンに対するマーカー遺伝子群を用いて、空間的トランスクリプトームデータにおける悪性サブクロンの位置を推定する手法を開発した。この推定手法を用いて空間的トランスクリプトームの悪性サブクロンに相当するクラスターを同定した。同定したクラスターに相当する部分を、マーカー遺伝子群のタンパク質の一部で免疫染色を行ったところ、そのクラスターにおいてはそのタンパク質が強く染色され、開発した悪性サブクロン同定手法を検証できた。

・悪性サブクロンの特徴

悪性サブクロンに相当する空間的トランスクリプトームのクラスターの遺伝子発現量データを調べたところ、悪性サブクロンの持つユニークなフェノタイプとその空間的特徴が明らかになった。悪性サブクロンは、そのサブクロンごとに生物学的特徴や免疫細胞の分布が異なり、ICI に耐性化する要因が異なっている可能性が示唆された。

これにより、ICI の耐性獲得の形成と腫瘍の特徴を解明した。また、治療効果に関連するサブクロンを特定し、進行に関与する「悪性サブクロン」の特徴を生物学的・免疫学的に明らかにした。これらの研究成果は、がん免疫療法に対する反応性と抵抗性に関する新たな知見が得られ、治療戦略の向上に貢献する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0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
---------	---------