

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05477

研究課題名(和文) 卵巣癌のゲノム多様性に基づく播種・転移・薬剤耐性・免疫逃避機序の解明と臨床応用

研究課題名(英文) Clinical utilization and investigation of ovarian cancer genome diversity associated with metastasis, resistance to treatment and immune escape

研究代表者

万代 昌紀 (Mandai, Masaki)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：80283597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は臨床腫瘍検体を用いた腫瘍微小環境における腫瘍ゲノム解析方法を確立し、さらに腫瘍ゲノムの遺伝子多様性をスコア化する方法を用いて、腫瘍免疫における免疫応答を評価し、実臨床で有用な手法を確立することである。本研究で実臨床応用にむけての階層的遺伝子変異解析パイプラインの整備を行った。遺伝子多様性スコアを癌ゲノムの遺伝子変異とコピー数変異から算出したスコアは予後を予測した。臨床応用のための癌ゲノムの層別化とトランスクリプトーム解析による腫瘍の免疫活性の相関を調べる方法を確立した。治療と反応性のある多様性スコアは経時的な採血と、T細胞、B細胞レパトアによっても観測できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんゲノム診断が実用化されつつある。本研究では実臨床において腫瘍組織から得られたDNAを用いたゲノムデータから遺伝子変異の多用性を算出する方法を用いてがんゲノムの多様性と腫瘍免疫の応答性との関連を検討した。腫瘍組織から得られたRNAを用いた免疫プロファイルを用いて癌遺伝子の多様性スコアとの相関が観測できた。これらは卵巣癌に対する予後や薬物治療の効果と関連することが示唆される。高額な薬剤が一定の効果を示しているが、本研究の手法を用いて個別化することで治療の感受性予測マーカーや反応性を表すマーカーにつながる可能性があり、非常に有用な研究であったと考える。今後さらなる検証と研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to establish the tumor genome analysis pipeline using clinical tumor tissue for actual clinical setting. Moreover, we aimed to identify tumor genome biomarkers for stimulating immune activity to conquer cancer. The fruit of this research is to establish the platform of genome and transcriptome analyses by means of tumor tissue including tumor microenvironment and, moreover to investigate biomarkers of immune reaction associated with somatic genome alteration. For the clinical utility, we established the multi platform pipeline in the tumor omics analyses.

The diversity scores in cancer genome alteration including mutation and copy number alteration predicted prognoses. Stratification of genome alterations was integrated with transcriptome analyses reflecting the activity of tumor immunity. Diversity scores related with response to treatment was utilized from blood samples over the course of treatment by T cells and B cells repertoires analyses.

研究分野：卵巣癌

キーワード：卵巣癌 腫瘍免疫 ゲノム診断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

婦人科がんを含む領域の研究において、遺伝情報のバイオインフォマティクス解析は不可欠の研究手法になりつつある。我々はこれまでにマイクロアレイ解析等を用いて婦人科がんの生物学的解析・免疫学的解析を進めてきた。乳癌や肺癌等の領域ではバイオインフォマティクスの手法が取り入れられたことによって、これまでの発生や進展に関する常識を覆す知見が数多く見出されるとともに、薬剤・治療選択にも生かされるようになってきている。

なかでも現在注目されているのが同一がん症例におけるゲノム多様性である。これまで同一のクローンと考えられてきた癌が、実は異なる性格を有する複数のクローンの集団であり、微小環境や治療によってダイナミックに遺伝的な変化を遂げる、というモデルが最近、提唱されつつある。このような概念は臨床における治療のコンセプトの変更にもつながるものである。すなわち肺癌等においては、癌のゲノム多様性が抗がん剤や分子標的薬の耐性と関連しており、さらに、治療によって癌細胞のクローンが変化することが耐性獲得に結び付くというモデルも提唱され始めており、これに基づく新しい治療選択が模索され始めている。

一方で、近年、卵巣癌を含む固形癌における免疫療法が着目されている。我々はこれまで、卵巣癌における腫瘍免疫、特に PD-L1/PD-1 シグナルの重要性を報告してきた。さらに卵巣癌患者における抗 PD-1 抗体の第 2 相臨床試験を実施し、優れた治療効果を見出している。しかし、これら免疫療法の効果を予測するバイオマーカーに関してはこれまで見出されていなかった。ところが、2015 年 6 月に大腸癌において癌の microsatellite instability が抗 PD-1 療法の強い予測マーカーであることが報告された。すなわち、ゲノムの不安定性がもたらすゲノム多様性が高い免疫原性に結びつき、免疫療法の治療効果につながる可能性が示唆された。

以上のように、癌のゲノム多様性は、癌の発生や進展の自然史を明らかにするのみならず、治療においてもこれまでにない画期的なバイオマーカーとして機能する可能性があり、特に遺伝子の多様性が大きいと考えられる卵巣癌における解析が待たれている。

2. 研究の目的

卵巣癌の同一症例、同一腫瘍内のゲノム多様性に焦点を当て、単一クローンと考えられてきた癌が実際にはどのような遺伝的多様性を有しているかを研究することで、これまで明らかではなかった卵巣癌の発生・進展の自然史を明らかにする。また治療面においても、ゲノム多様性は薬剤耐性の獲得や免疫療法における奏功因子としての役割が注目され始めており、卵巣癌におけるゲノム多様性が薬剤感受性や免疫原性とどのように関連しているかを臨床的・基礎的に検討する。最終目的として、ゲノム多様性を定量的にスコア化することによって、実臨床に使用することを目的に、転移・予後を予測するバイオマーカーあるいは薬剤・治療選択におけるコンパニオンマーカーとして利用できるように開発・臨床応用する。

3. 研究の方法

はじめに過去の卵巣癌検体を用いて、同一症例において原発巣・転移巣・再発巣にどのようなゲノム多様性が存在しているかを明らかにする。全ゲノム対象としたコピー解析と特定の癌関連遺伝子の変異を含めたターゲット解析の両方をおこなう。さらにこの結果と、播種・転移・再発・薬剤耐性獲得・腫瘍免疫反応といった臨床イベントとの関連を明らかにする。ゲノム多様性の意義が証明されたらさらに詳細な遺伝子解析を進める。多様性を有する遺伝子の特徴、その生物学的な意義を明らかにし、癌クローンの変異の自然史を明らかにするとともにそれがどのように播種や薬剤耐性と結びついているかを動物実験も用いつつ明らかにする。最終的に卵巣癌の特異的で臨床応用なゲノム多様性診断パネルを作成し、その有用性を検討する。

4. 研究成果

卵巣癌におけるゲノム多様性の評価方法として、腫瘍組織におけるクローン性に着目し、クローン数の解析を行うことから着手した。倫理委員会の承認を得た上で、過去に採取した卵巣癌検体 24 例のパラフィン包埋切片より DNA を抽出し、全ゲノム領域における SNPbased array を行った。また、癌と関連する主要な 50 遺伝子変異解析を次世代シーケンサーを用いて行った。これらのデータを専用ソフトにより全ゲノム領域のコピー数異常を網羅的に解析するとともに、専用プログラムによりクローン数解析を行った。結果として、がん遺伝子の変異を有する卵巣癌ではクローン数が少なく、がん遺伝子の変異を持たない卵巣癌ではクローン数が多いことが示唆された。すなわち、がん遺伝子などのドライバー変異を持たない腫瘍クローンはパッセンジャー変異が多く、腫瘍の体細胞遺伝子変異が多い可能性が見いだされた。海外の報告で、抗 PD-1 抗体の効果はその腫瘍における遺伝子変異の数が多い程効果があるとされ、免疫療法におけるバイオマーカーとして注目されている。今回の結果は、クローン数が多い腫瘍はパッセンジャー変異が多く、すなわち腫瘍の体細胞遺伝子変異が多く免疫療法が奏功する可能性があることを示唆するものであった。

卵巣癌における標準的な化学療法であるパクリタキセル・カルボプラチン療法の奏功に関して、マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルを用いたバイオマーカー探索を試み、スコア化することで効果を予測することが可能であることが示唆された。これらの結果を組み合わせることで、ゲノムバイオマーカーによる卵巣癌の個別化治療が可能となると推察された。

実臨床応用にむけての階層的遺伝子変異解析パイプラインの整備を行った。2018 年末、高頻

度サテライト不安定性 (MSI-High) を有する再発固形癌に対する免疫チェックポイント阻害剤 PD-1 抗体の投薬が保険適応となった。また Tumor mutation burden 体細胞遺伝子変異数も免疫チェックポイント阻害剤の感受性マーカーとして報告されている。本研究では The Cancer Genome Atlas のデータベースから子宮内膜癌、子宮頸癌、卵巣癌の Whole exome sequence を用いて MSI および TMB を算出し、RNA sequencing gene expression profile を用いて免疫関連遺伝子発現スコア (免疫反応スコア) を算出して、各種婦人科癌の MSI と TMB と免疫反応スコアとの関連を算出するプラットフォームを構築した。

血液を用いた継時的な腫瘍ゲノム診断と免疫原性のある腫瘍抗原の同定を試みた。臨床治療経過の中で、特に近年卵巣癌で臨床導入されている分子標的治療薬である血管新生阻害剤アバスチンや PARP 阻害剤オラパリブを再発治療中に投与する過程で、患者末梢血から経時的に PBMC を採取してきた。これらを用いて T 細胞、B 細胞レパトア解析により抗腫瘍効果を示す免疫反応性を反映するバイオマーカーを探索する方法を見出した。

マウス卵巣癌細胞株、動物モデルを用いた解析として CRISPR/CAS9 システムで免疫チェックポイント遺伝子の PD-L1 と同じく B7 ファミリーである B7H3 をノックアウトした細胞株を自然免疫マウスモデルに移植することで、フェノタイプ (免疫応答性、浸潤能) の変化を評価した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. The mesenchymal transition subtype more responsive to dose dense taxane chemotherapy combined with carboplatin than to conventional taxane and carboplatin chemotherapy in high grade serous ovarian carcinoma: A survey of Japanese Gynecologic Oncology Group study (JGOG3016A1).

Murakami R, Matsumura N, Michimae H, Tanabe H, Yunokawa M, Iwase H, Sasagawa M, Nakamura T, Tokuyama O, Takano M, Sugiyama T, Sawasaki T, Isonishi S, Takehara K, Nakai H, Okamoto A, Mandai M, Konishi I.

Gynecol Oncol. 2019 May;153(2):312-319. doi: 10.1016/j.ygyno.2019.02.010. Epub 2019 Mar 8.

PMID: 30853361

2. VISTA expressed in tumour cells regulates T cell function.

Mulati K, Hamanishi J, Matsumura N, Chamoto K, Mise N, Abiko K, Baba T, Yamaguchi K, Horikawa N, Murakami R, Taki M, Budiman K, Zeng X, Hosoe Y, Azuma M, Konishi I, Mandai M.

Br J Cancer. 2019 Jan;120(1):115-127. doi: 10.1038/s41416-018-0313-5. Epub 2018 Nov 9.

PMID: 30382166

3. Antitumor Effect of Nivolumab on Subsequent Chemotherapy for Platinum-Resistant Ovarian Cancer.

Inayama Y, Hamanishi J, Matsumura N, Murakami R, Abiko K, Yamaguchi K, Baba T, Horie K, Konishi I, Mandai M.

Oncologist. 2018 Nov;23(11):1382-1384. doi: 10.1634/theoncologist.2018-0167. Epub 2018 Aug 29.

PMID: 30158286

4. Snail promotes ovarian cancer progression by recruiting myeloid-derived suppressor cells via CXCR2 ligand upregulation.

Taki M, Abiko K, Baba T, Hamanishi J, Yamaguchi K, Murakami R, Yamanoi K, Horikawa N, Hosoe Y, Nakamura E, Sugiyama A, Mandai M, Konishi I, Matsumura N.

Nat Commun. 2018 Apr 27;9(1):1685. doi: 10.1038/s41467-018-03966-7.

PMID: 29703902

5. Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression.

Lin H, Wei S, Hurt EM, Green MD, Zhao L, Vatan L, Szeliga W, Herbst R, Harms PW, Fecher LA, Vats P, Chinnaiyan AM, Lao CD, Lawrence TS, Wicha M, Hamanishi J, Mandai M, Kryczek I, Zou W.

J Clin Invest. 2018 Feb 1;128(2):805-815. doi: 10.1172/JCI96113. Epub 2018 Jan 16. Erratum in: J Clin Invest. 2018 Apr 2;128(4):1708.

PMID: 29337305

6. Exome Sequencing Landscape Analysis in Ovarian Clear Cell Carcinoma Shed Light on Key Chromosomal Regions and Mutation Gene Networks.

Murakami R, Matsumura N, Brown JB, Higasa K, Tsutsumi T, Kamada M, Abou-Taleb H, Hosoe

Y, Kitamura S, Yamaguchi K, Abiko K, Hamanishi J, Baba T, Koshiyama M, Okuno Y, Yamada R, Matsuda F, Konishi I, Mandai M.

Am J Pathol. 2017 Oct;187(10):2246-2258. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.06.012. Epub 2017 Sep 6.

PMID: 28888422

7. Clonal composition of human ovarian cancer based on copy number analysis reveals a reciprocal relation with oncogenic mutation status.

Sakai K, Ukita M, Schmidt J, Wu L, De Velasco MA, Roter A, Jevons L, Nishio K, Mandai M.

Cancer Lett. 2017 Oct 1;405:22-28. doi: 10.1016/j.canlet.2017.07.013. Epub 2017 Jul 19.

PMID: 28734796

8. Immune checkpoint (PD-1 and CTLA-4) signal inhibitors for gynecologic oncology; up to date.

Hamanishi J, Mandai M, Konishi I.

Nihon Rinsho. 2017 Feb;75(2):234-244. Review. Japanese.

PMID: 30562858

9. [Perspectives of Individualized Treatment by Genome-Wide Analyses in Ovarian Cancer].

Matsumura N, Yamaguchi K, Murakami R, Mandai M, Konishi I.

Gan To Kagaku Ryoho. 2016 Nov;43(11):1316-1320. Japanese.

PMID: 27899771

10. Immune checkpoint inhibition in ovarian cancer.

Hamanishi J, Mandai M, Konishi I.

Int Immunol. 2016 Jul;28(7):339-48. doi: 10.1093/intimm/dxw020. Epub 2016 Apr 7. Review.

PMID: 27055470

[学会発表](計3件)

PD-1 signal inhibitors for gynecologic cancers: Future perspectives

Hamanishi J.

The 5th Biennial Meeting of Asian Society of Gynecologic Oncology (ASGO 2017).

December 1 2017. Otemachi Sankei Plaza, Tokyo, Japan

Specific gene signatures and oligoclonal expansion of B cell repertoire with the responders of anti-PD-1 antibody (Nivolumab) for ovarian cancer; Novel predictive biomarkers.

Hamanishi J, Murakami R, Mandai M, Matsumura M, Abiko K, Baba T, Hosoe Y, Yamaguchi K, Konishi I.

International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe 2017. Hyogo, Japan.

Is the mesenchymal transition subtype more responsive to dose dense taxane chemotherapy combined with carboplatin (ddTC) than to conventional taxane and carboplatin chemotherapy (TC) in high grade serous ovarian carcinoma? A survey of Japanese Gynecology Oncology Group study (JGOG3016A1), J Clin Oncol 35, 2017 (suppl; abstr 5510)

Ryusuke Murakami, Noriomi Matsumura, Hiroshi Tanabe, Hirofumi Michimae, Mayu Yunokawa, Haruko Iwase, Motoi Sasagawa, Toshiaki Nakamura, Osamu Tokuyama, Masashi Takano, Toru Sugiyama, Takashi Sawasaki, Seiji Isonishi, Kazuhiro Takehara, Hidekatsu Nakai, Aikou Okamoto, Masaki Mandai, Ikuo Konishi

ASCO2017. June 5th, 2017. Chicago USA

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：西尾 和人
ローマ字氏名：Nishio Kazuto
所属研究機関名：近畿大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：10208134

研究分担者氏名：宮澤 正顯
ローマ字氏名：Miyazawa Masaaki
所属研究機関名：近畿大学
部局名：医学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：60167757

研究分担者氏名：馬場 長
ローマ字氏名：Baba Tsukasa
所属研究機関名：京都大学
部局名：医学研究科
職名：准教授
研究者番号（8桁）：60508240

研究分担者氏名：濱西 潤三
ローマ字氏名：Hamanishi Junzo
所属研究機関名：京都大学
部局名：医学研究科
職名：講師
研究者番号（8桁）：80378736

研究分担者氏名：村上 隆介
ローマ字氏名：Murakami Ryusuke

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：特定病院助教

研究者番号（8桁）：40782363

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。