

令和元年6月24日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10994

研究課題名(和文)膀胱癌における免疫環境と遺伝子変異の包括的解析によるBCG抵抗性機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of BCG resistance mechanism by comprehensive analysis of immune environment and gene mutation in bladder cancer

研究代表者

常楽 晃 (Joraku, Akira)

筑波大学・医学医療系・客員研究員

研究者番号：60436277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱癌における遺伝子変異と免疫環境との関連を明らかにするために103名の膀胱癌組織をもちいて解析を行った。FGFR3変異陽性例ではCD8陽性浸潤細胞が少なく、TP53変異陽性ではCD8陽性細胞が多かった。BCG抵抗性にかかわる免疫環境を明らかにするためにBCG抵抗性の53症例を用いてPD-L1発現を評価した。腫瘍部のPD-L1発現に関してはBCG前後で差は認めなかったが、BCG前の症例でもPD-L1発現が亢進しておりBCG抵抗性の機序に腫瘍のPD-L1発現が寄与している可能性が示唆された。間質においてはBCG後にPD-L1発現が亢進しておりBCGによって惹起される炎症との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非筋層浸潤性膀胱癌に対するBCG膀胱内注入療法は再発や進展の抑制に有効であるが、BCG抵抗性に対しては膀胱全摘等の侵襲的治療が余儀なくされている。BCG抵抗性を事前に予測することはできず、抵抗性の機序も明らかになっていない。本研究ではBCG抵抗性症例のPD-L1発現を検証し、BCG抵抗性の機序の一つとして膀胱癌のPD-L1発現の関与が示唆された。また膀胱癌における体細胞変異と腫瘍免疫環境との関連着目し、膀胱癌においてFGFR3遺伝子に変異を有する症例は腫瘍細胞への免疫細胞浸潤が少なくTP53遺伝子に変異を有する患者症例では腫瘍細胞への免疫細胞浸潤が多いことがわかった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the relationship between somatic mutations and tumor immune environment in bladder cancer, we analyzed bladder cancer tissues of 103 bladder cancer patients. We compared the relationship tumor characteristics with tumor immune environment. There were less CD8 positive infiltrating cells in FGFR3 mutation than in FGFR3 wild cases. There were more CD8 positive cells in TP53 mutation than TP53 wild cases. To clarify the immune environment involved in BCG resistance, PD-L1 expression was evaluated using 53 cases of BCG resistance. There was no difference between before and after BCG treatment with regard to PD-L1 expression in tumor cells. On the other hand, in cases before BCG treatment, PD-L1 expression in tumor cells is enhanced, suggesting that PD-L1 expression in tumor cells may contribute to the mechanism of BCG resistance. PD-L1 expression in tumor tissues was elevated after BCG treatment, suggesting a relationship with BCG-induced inflammation.

研究分野：泌尿器悪性腫瘍

キーワード：BCG PD-L1

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

1. 研究開始当初の背景

非筋層浸潤性膀胱癌(NMIBC)に対する BCG 膀胱内注入療法は免疫機構を介して再発や進展の抑制に有効であるが、BCG 抵抗性腫瘍に対しては有効な保存的治療が存在しないため膀胱全摘等の侵襲的治療が余儀なくされている。BCG 抵抗性を事前に予測することはできず、さらに抵抗性の機序も明らかになっていない。そこで本研究では膀胱癌のドライバー遺伝子変異と免疫環境との関連を検討し、また BCG 抵抗性腫瘍における免疫抑制機構の包括的解析を行うことにより、BCG 抵抗性膀胱癌と免疫抑制機構の関連を明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

(1)膀胱癌における遺伝子変異の有無および遺伝子発現に基づく分子分類別の腫瘍内免疫環境との関連を明らかとする

(2) BCG 抵抗性腫瘍の免疫環境を明らかとする。

3. 研究の方法

(1) ヒト膀胱癌組織を用いて cancer pannel (Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2)を用いてターゲットシーケンスを行い体細胞変異を評価し、体細胞変異の有無と腫瘍内免疫環境との関連を評価する

(2) ヒト膀胱癌組織を用いて RNA-seq(Illumina NextSeq 500)による網羅的発現解析を行い、免疫関連物質の発現状況を評価する。

(3) BCG 抵抗性腫瘍の組織内における免疫環境を免疫誘導系、免疫抑制系分子の免疫学的染色により評価する。

4. 研究成果

(1) 膀胱癌組織において体細胞変異と腫瘍内免疫環境の関連

自施設が中心となって行った「尿路上皮癌における癌関連遺伝子変異に関する多施設共同前向き研究」として収集された 103 名の膀胱癌患者を対象に cancer pannel (Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2)を用いて解析を行った結果と患者背景を図 1 に示す。103 名の患者背景のうち NMIBC では *FGFR3* および *RAS* の変異頻度が高く、筋層浸潤性膀胱癌(MIBC)では *TP53* の変異頻度が高かった。

	n	total 103	NMIBC 59	MIBC 44
年齢(歳)	中央値	71(39-87)	70(39-87)	72(42-87)
性別	男性	85	54	31
	女性	18	5	13
grade	Low grade	33	33	0
	High grade	70	26	44
体細胞変異	FGFR3変異	34(33%)	26(44%)	8(18%)
n(%)	RAS*変異	25(25%)	20(34%)	5(11%)
	PIK3CA変異	25(25%)	14(24%)	12(27%)
	TP53変異	30(29%)	8(14%)	22(50%)

図1 患者背景と体細胞変異

*RAS: KRAS/HRAS/NRAS

以上の結果から体細胞変異の有無と腫瘍細胞内の免疫環境を比較した。網羅的発現解析による腫瘍内免疫関連物質として CD8A と CD274(PDL-1)の発現値を、腫瘍内免疫細胞浸潤の評価として CD8 による免疫染色を行い CD8 陽性 T 細胞の腫瘍内浸潤細胞数を計測し比較検討した。

結果は図 2 に示す通りで、CD8A の発現は *FGFR3* 変異例では少ない傾向がみられたが有意差は

なく、RAS, PIK3CA, TP53 変異陽性例で有意差をもって高かった。しかし、免疫組織学的(IHC: immunohistochemical analysis)に腫瘍細胞内の CD8 陽性 T 細胞の評価を行うと FGFR3 変異陽性例は FGFR3 変異陰性例と比較して少なく、TP53 変異陽性例は TP53 変異陰性例と比較して多いことがわかった。一方、RAS 変異および PIK3CA 変異の有無では腫瘍細胞内の CD8 陽性 T 細胞との間に有意差を認めなかった。CD274 の発現値に着目すると FGFR3 変異陽性例では陰性例と比較し低い傾向があり、FGFR3 変異以外の体細胞変異の有無では関連を認めなかった。

以上の結果からヒト膀胱癌における腫瘍内免疫環境は体細胞変異および分子分類により異なる特徴を示すことを見出した。

		FGFR3 mutation or fusion			RAS (KRAS,HRAS,NRAS)		
		positive	negative	p* value	positive	negative	p* value
mRNA expression	CD8A	0.51 +/- 2.52	0.74 +/- 5.52	N.S	0.43 +/- 1.99	0.76 +/- 5.24	0.02
	CD274	0.69 +/- 1.91	0.95 +/- 4.65	0.08	0.76 +/- 1.37	0.94 +/- 4.40	N.S
IHC analysis	CD8	6.0 +/- 13.9	12.0 +/- 36.0	0.03	9.0 +/- 36.2	8.0 +/- 29.4	N.S

		PIK3CA			TP53		
		positive	negative	p* value	positive	negative	p* value
mRNA expression	CD8A	1.36 +/- 7.41	0.59 +/- 3.24	0.03	1.41 +/- 7.07	0.53 +/- 3.17	0.02
	CD274	1.12 +/- 2.18	0.80 +/- 4.35	N.S	1.23 +/- 4.82	0.87 +/- 3.49	N.S
IHC analysis	CD8	11.0 +/- 32.44	7.0 +/- 30.64	N.S	21.0 +/- 37.6	6.5 +/- 26.4	<0.01

図2 体細胞変異と腫瘍免疫環境

* Mann-Whitney's U test

(2) FGFR1, 3 の活性化機序による腫瘍内免疫環境の関連

FGFR3 変異ならびに膀胱癌でよく検討されている FGFR1 および FGFR3 に着目し、FGFR1, FGFR3 高発現例(高発現の上位 10%)と免疫関連物質および腫瘍内 CD8 陽性 T 細胞浸潤細胞との比較を行った(図 3)。FGFR3 高発現例では FGFR3 変異陽性例と同様に腫瘍内 CD8 陽性 T 細胞浸潤細胞が少ない傾向がみられた。一方 FGFR1 高発現例では腫瘍内 CD8 陽性 T 細胞浸潤細胞が多い傾向があり、CD274(PD-L1)の発現も高かった。FGFR サブタイプの活性化機序によりそれぞれ腫瘍内免疫環境に差があることは免疫チェックポイント阻害剤の治療による反応性が異なる可能性が示唆された。

		FGFR3 mutation or fusion			FGFR3 expression			FGFR1 expression		
		positive	negative	p* value	overexpression	normal	p* value	overexpression	normal	p* value
mRNA expression	CD8A	0.51 +/- 2.52	0.74 +/- 5.52	N.S	0.73 +/- 1.73	0.65 +/- 4.91	N.S	3.89 +/- 10.98	0.58 +/- 2.99	<0.01
	CD274	0.69 +/- 1.91	0.95 +/- 4.65	0.08	0.65 +/- 2.53	0.92 +/- 4.03	N.S	2.87 +/- 7.95	0.87 +/- 3.13	0.02
IHC analysis	CD8	6.0 +/- 13.9	12.0 +/- 36.0	0.03	4.0 +/- 6.7	10.0 +/- 32.2	0.05	27.0 +/- 49.8	7.0 +/- 27.2	0.06

図3 FGFRと腫瘍免疫環境

* Mann-Whitney's U test

(3) BCG 療法再発例と無再発例の腫瘍内免疫環境の検討

上記研究対象者で BCG 療法の適応となりうる NMIBC の 59 名のうち後治療として 25 名が BCG 療法を実施され、観察期間 3 年の間に 5 名が再発した。再発例と無再発例の primary tumor の腫瘍内免疫環境が BCG 後の再発と関連するか検討した。網羅的発現解析による腫瘍内免疫関連物質として CD8A、CD274、CD4、FOXP3、HAVCR3、IDO1、LAG3 の発現値と IHC

		再発あり	再発なし	p* value
mRNA expression	CD8A	0.65 +/- 2.20	0.61 +/- 3.17	>0.99
	CD274	1.12 +/- 0.63	0.94 +/- 3.75	0.54
	CD4	11.09 +/- 3.93	6.64 +/- 11.52	0.5
	FOXP3	1.31 +/- 1.32	1.33 +/- 2.37	0.66
	HAVCR2	1.65 +/- 1.85	1.26 +/- 1.73	0.43
	IDO1	0.36 +/- 1.97	0.53 +/- 6.15	0.76
	LAG3	1.57 +/- 1.34	0.77 +/- 2.57	0.34
IHC analysis	CD8	12.0 +/- 18.2	9.5 +/- 22.9	0.61

図4 BCG施行群と腫瘍免疫環境

* Mann-Whitney's U test

の CD8 陽性 T 細胞の評価を行った。結果は図 4 で示すとおりで BCG 療法後の再発例、無再発例の primary tumor の腫瘍内免疫関連物質の発現との間に相関を認めるものはなかった。

(3) BCG 抵抗性にかかわる免疫環境の検討

筑波大学附属病院にて 2010 年から 2016 年までに筋層非浸潤性膀胱癌に対して BCG 療法を施行し再発もしくは進展をきたした症例を用いて BCG 施行前後の組織の PD-L1 の染色を行った。BCG 未施行の症例が 19 例、BCG1 回施行後の症例が 23 例、BCG2 回以上施行後の症例が 11 例であった。PD-L1 の発現の程度については intensity score (IS) と proportion score (PS) の合計で評価した (Oncotarget. 2018;75:34066)。PD-L1 の発現部位については腫瘍部ならびに間質をそれぞれ評価した。

腫瘍部の PD-L1 発現に関しては BCG 施行前後で差を認めず過去の諸家の報告とは異なる結果であった (図 5)。さらに BCG 施行前の検体において PD-L1 を高発現となっている症例も多くあり BCG 抵抗性の機序として腫瘍自体の PD-L1 発現が関与していることが示唆された。今後検体数を増やし、さ

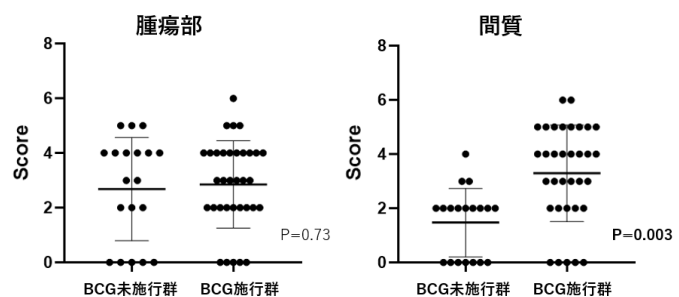


図5 BCG施行前後のPD-L1発現

さらに BCG 奏功例の腫瘍との比較検討を行っていく。間質部の PD-L1 発現に関しては諸家の報告と同様に BCG 施行群において有意に発現が亢進されており、BCG によって惹起された炎症が関与していることが示唆されるが、BCG 抵抗性の機序との関与は検証が必要である。

次いで BCG 施行群のうち最終 BCG 投与後の再発期間が 12 か月以内の検体、それ以降の検体の 2 群にわけて同様の検討を行った (図 6)。腫瘍部、間質に関しては有意差は認めなかったが再発期間が 12 か月以内の群において PD-L1 の発現が高い傾向を認めた。早期に再発する症例では腫瘍部 PD-L1 発現が影響するが、12 か月以降の場合には、PD-L1 の関与が少ない可能性が示唆された。一方間質の PD-L1 発現に関しては BCG によって惹起される炎症の影響で上昇している可能性が示唆された。

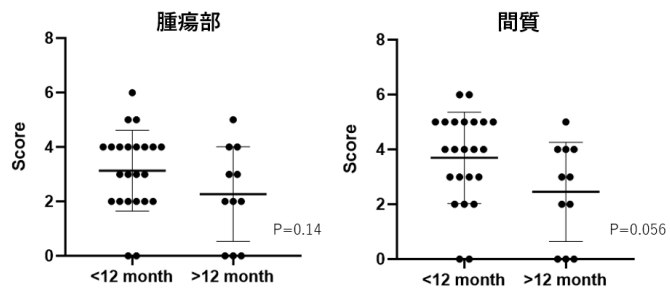


図6 BCG施行後の再発期間とPD-L1発現

5. 主な発表論文等

[学会発表](計0件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名： 小島 崇宏

ローマ字氏名： Takahiro Kojima

所属研究機関名： 筑波大学

部局名：医学医療系

職名： 准教授

研究者番号(8桁): 40626892

(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。