

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09639

研究課題名(和文) 治療抵抗性絨毛癌に対する全ゲノム解析に基づいた複合的がん免疫治療の確立

研究課題名(英文) Establishment of a comprehensive cancer immunotherapy based on whole-genome analysis for treatment-resistant choriocarcinoma

研究代表者

新美 薫 (Niimi, Kaoru)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20571334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：次世代シーケンサーを用いた絨毛癌組織の全ゲノム解析による遺伝子変異の同定を試みた。妊娠性腫瘍での遺伝子変異数は30前後であり、非妊娠性での遺伝子変異数は中央値150であった。妊娠性の2例でTP53遺伝子変異を認め、絨毛癌のドライバー遺伝子の可能性が示唆された。絨毛性腫瘍の部位別の抗腫瘍免疫応答を解析したところ、絨毛癌ではNK細胞/CD8+T細胞比率は腫瘍内では末梢血よりも上昇しており、腫瘍局所において絨毛癌症例が子宮体癌症例より高かった。非妊娠性絨毛癌患者の腫瘍検体を用いて、in vivoモデル(Patient-derived xenograft: PDXモデル)の作成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

次世代シーケンサーを用いて、実際の絨毛癌臨床検体から遺伝子変異を同定した。稀な絨毛癌の複数の症例で、本人、パートナー、腫瘍を用いて腫瘍に特異的な遺伝子変異を同定することは他では行われておらず、学術的意義のあるものである。非妊娠性絨毛癌患者の腫瘍検体を用いて、in vivoモデル(Patient-derived xenograft: PDXモデル)の作成に成功した。次世代絨毛癌で世界ではじめてPDXモデルの作成に成功した。in vivoでの解析をさらに進めることで、臨床応用の可能性が期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：We attempted to identify gene mutations by whole-genome analysis of choriocarcinoma tissues using next-generation sequencer. The number of gene mutations in gestational tumors was around 30, while the median number of gene mutations in non-gestational tumors was 150. TP53 gene mutations were observed in two cases of gestational tumors, suggesting the possibility of driver genes for choriocarcinoma. We analyzed the anti-tumor immune response by site of trophoblastic tumors, and found that the NK cell/CD8+ T cell ratio was higher in the tumor than in the peripheral blood, and that the ratio was higher in choriocarcinoma cases than in endometrial cancer cases at the tumor site. We successfully established an in vivo model (Patient-derived xenograft: PDX model) using tumor fatigues from a patient with non-gestational choriocarcinoma.

研究分野：絨毛性疾患

キーワード：絨毛癌 絨毛性腫瘍 NK細胞 全エクソームシーケンス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

絨毛性腫瘍(絨毛癌や PSTT)はあらゆる妊娠後に発症しうる悪性腫瘍で、患者は比較的若い成人女性が多い。胞状奇胎患者のフォローや化学療法の進歩により、絨毛癌患者の発症率及び予後は飛躍的に改善したが、現在でも治療率は 85%程度でここ 20 年は改善がない。絨毛癌は化学療法が奏効しやすいが、抗癌剤耐性の場合には手術療法や放射線療法で集学的に治療しても治療困難なことが多く、治療抵抗性の絨毛癌の新規治療が求められる。

絨毛癌は日本で年間 40 - 50 人程度、PSTT は年間 5-10 名程度の発症数であり、稀な疾患である。絨毛癌は化学療法で寛解すれば子宮温存も可能なため手術検体は得にくい。このことから、臨床検体を用いた研究は少なく、新規治療の開発は進んでこなかった。

我々の施設は、絨毛性疾患の治療経験が豊富であり、絨毛癌患者が全国から集まっている。我々は、絨毛性腫瘍の原発巣や転移巣、治療前と治療後などの臨床検体が比較的豊富に得られる環境にあり、また日々の臨床から新規治療法の必要性を痛感している。

絨毛性腫瘍は半異物であり母体には免疫学的な許容と同時に異物を排除する機構が存在すると考えられる。このことから絨毛性腫瘍は他種のがんとは異なるがん微小環境が備わっていると考えられる。絨毛細胞は一般的に古典的 HLA class I 抗原が発現していないため、細胞傷害性 T 細胞の攻撃を回避している。しかし絨毛細胞は NK 細胞により非自己と認識され攻撃を受けることとなりうるが、絨毛細胞では NK 細胞の攻撃から回避するための機構も備わっていると考えられ、それが妊娠成立・維持だけでなく絨毛癌の悪性度にも関与していると考えられる。

これまで我々は、絨毛癌細胞において糖転移酵素 C2GnT が NK 細胞からの免疫回避に関与し、絨毛癌の浸潤転移を促進していることを証明した(文献 1)。また、近年、抗 PD-1 抗体であるペムブロリズマブが絨毛性腫瘍で奏効した報告が相次いでいる。これらのことから、難治性絨毛性腫瘍に対する第 4 の治療として免疫療法の可能性を感じてきた。そこで、抗癌剤抵抗性となり免疫療法を必要とする患者を選定するバイオマーカーや、免疫治療が奏効する因子の探索が非常に重要だと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、全エクソーム解析を用いて、絨毛性腫瘍における治療抵抗性因子と抗腫瘍免疫応答因子を探索することを目的とした。全エクソーム解析で発見した新規の治療ターゲットを、PDX モデルを用いて検証し、臨床応用につなげる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 次世代シーケンサーを用いた絨毛癌組織の全ゲノム解析による遺伝子変異の同定

全エクソーム解析を軸として、インフォームドコンセントを得て患者から集積した絨毛性腫瘍の遺伝子変異を同定する。腫瘍検体パラフィン包埋ブロックからレーザーマイクロダイセクションを用いて DNA を抽出し、次世代シーケンサー(イルミナ社の HiSeq 2500)で行う。患者本人と夫の頬粘膜細胞から DNA を抽出し正常検体とする。これらを全エクソーム解析し、体細胞変異を検出する。また、同一患者の治療前後の比較や、原発巣と転移巣の比較も行う。コピー数についても同様に評価する。

#### (2) 絨毛性腫瘍の部位別の抗腫瘍免疫応答の解析

絨毛性腫瘍においてどの免疫担当細胞が重要なのかを検討しておかなくては、抗腫瘍免疫応答因子が同定できても臨床応用に結びつかない。絨毛性腫瘍組織を用いて、パラフィン包埋ブロックより組織切片を作成し、NK 細胞表面マーカーの CD57 や T 細胞マーカーの CD4, CD8 を用いた免疫染色で絨毛性腫瘍における免疫細胞の有無や個数を検討する。また、NK 細胞活性抑制系因子について検討する。腫瘍側に発現する分子の発現を、組織切片やすでに所有している 7 つの絨毛癌細胞株(Jar, Bewo, JEG3 等)を用いて免疫染色、フローサイトメトリー(FCM)等で確認する。新規に得られる絨毛性腫瘍手術検体の腫瘍先進部/傍腫瘍領域の各部位の組織から組織破砕法により組織浸潤免疫細胞を回収し、FCM を使用して浸潤免疫細胞のサブセット解析を行う。また、NK 細胞における活性抑制系のリガンド PD-1, KIR2DL, NKG2A, TIGIT の発現を確認する。これにより絨毛性腫瘍における免疫担当細胞とその機能が明らかになる。

#### (3) 患者から樹立したがん細胞株をターゲットとした抗腫瘍効果の検証

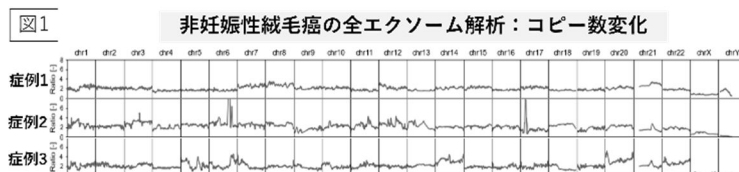
*in vivo* モデル(Patient-derived xenograft: PDX モデル)の作成と、PDX モデルおよび患者から樹立したがん細胞株をターゲットとした抗腫瘍効果の検証を行う。細かく切断し潰した腫

瘍細胞と基質を混ぜ、免疫不全マウス (NSG マウス) の皮下に注射し腫瘍細胞を培養する。そこから得られた腫瘍細胞の clonality を解析し、がん細胞株を樹立する。

#### 4. 研究成果

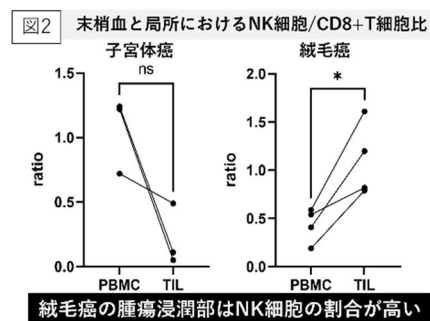
##### (1) 次世代シーケンサーを用いた絨毛癌組織の全ゲノム解析による遺伝子変異の同定

絨毛癌細胞株のJar細胞、Bewo細胞、JEG3細胞、CC1、CC3、CC4、CC6細胞の全エクソーム解析を行った。また、臨床検体として、非妊娠性絨毛癌3症例6検体と、腫瘍、本人、パートナーすべてのDNAを採取できた妊娠性絨毛癌8検体の全エクソームシーケンスも施行した。妊娠性腫瘍での遺伝子変異数は30前後であり、非妊娠性での遺伝子変異数は中央値150であった。妊娠性、非妊娠性で共通してMUC4遺伝子変異が認められた。また、妊娠性の2例でTP53遺伝子変異を認め、絨毛癌のドライバー遺伝子の可能性が示唆された。非妊娠性3症例のコピー数変化を確認したが、現時点で共通のコピー数変化の部位は特定できなかった (図1)。



##### (2) 絨毛性腫瘍の部位別の抗腫瘍免疫応答の解析

インフォームドコンセントを得た絨毛癌または子宮内膜癌患者において、手術直前の末梢血単球細胞 (PBMC) と手術直後の腫瘍検体からリンパ球を抽出し、フローサイトメトリーを用いて免疫細胞を分析した。次に、免疫組織学的染色で絨毛癌における腫瘍内浸潤リンパ球とNK細胞抑制型受容体の発現を検討した。絨毛癌ではNK細胞/CD8 + T細胞比率は腫瘍内では末梢血よりも上昇しており ( $p=0.0232$ )、腫瘍局所において絨毛癌症例が子宮体癌症例より高かった ( $p=0.0176$ ) (図2)。CD57抗体を用いた免疫染色では、絨毛癌でNK細胞の絨毛癌への腫瘍浸潤を認めた。また、NK細胞抑制型受容体 (HLA-C、HLA-E、HLA-G、PD-L1、CD112) の抗体を用いた免疫染色で、絨毛癌における発現を確認した。さらに、WB、RT-PCRで絨毛癌細胞株でのNK細胞抑制型受容体発現を確認した。さらに、絨毛癌細胞株JARとNK細胞を共培養後、分離したJARのRNAseqを行い、NK細胞の共培養によるmRNA発現の変化を確認した。RNAseqでは、NK細胞と共培養したJARでHLA-Eの発現が約2倍に上昇していた。



##### (3) 患者から樹立したがん細胞株をターゲットとした抗腫瘍効果の検証

非妊娠性絨毛癌患者の腫瘍断片を高度免疫不全マウスの皮下に移植し、増殖した腫瘍を継代した。3代継代できたことを確認して、PDX モデルの樹立と判断した。樹立した PDX 腫瘍を組織学、免疫組織化学、遺伝学および薬剤有効性試験を施行し、原発腫瘍と比較した。樹立した PDX モデルは組織学的および免疫組織化学的に原発腫瘍と類似しており、血清 hCG 値も原発腫瘍、PDX モデルともに上昇が見られた。PDX モデルでは原発腫瘍の組織学的な構造や性質が保たれており、hCG の分泌機能も維持されていた。PCR 解析から、PDX モデルにはヒト成分が含まれており、PDX モデルがヒト組織由来であることが示された。RNAseq では PDX モデルが原発腫瘍に非常に近い遺伝的性質を持っており、既存の絨毛癌や胚細胞腫瘍の細胞株と比較してもより原発腫瘍の遺伝状態に近いことがわかった。PDX モデルの薬剤に対する反応では、使用した 2 剤 (CDDP、MTX) で腫瘍縮小効果が見られ、原発腫瘍の臨床経過に矛盾しない結果であった。

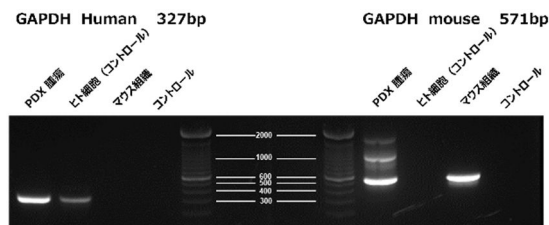


図3 PDX腫瘍のPCR解析  
PDX腫瘍は、継代を経てもヒト成分が保存されていた

文献 1. Nakamura K, Niimi K, Core 2 1,6-N-acetylglucosaminyltransferases accelerate the escape of choriocarcinoma from natural killer cell immunity. *Biochem Biophys Res* 2021; 26.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Niimi Kaoru, Yamamoto Eiko, Morita Sachi, Morikawa Maki, Hattori Hikaru, Hatakeyama Miki, Morita Mami, Nishino Kimihiro, Oda Yukari, Watanabe Eri, Yamamoto Toshimichi, Kajiyama Hiroaki, Kikkawa Fumitaka	4. 巻 15
2. 論文標題 Next generation genome sequencing of a matched normal tumor pair from a patient with intractable gestational choriocarcinoma: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 143-143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2021.2305	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 Nakamura Kenichi, Niimi Kaoru, Yamamoto Eiko, Ikeda Yoshiki, Nishino Kimihiro, Suzuki Shiro, Kajiyama Hiroaki, Kikkawa Fumitaka	4. 巻 26
2. 論文標題 Core 2 1,6-N-acetylglucosaminyltransferases accelerate the escape of choriocarcinoma from natural killer cell immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 100951 ~ 100951
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.100951	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 新美 薫, 山本 英子, 柴田 真由, 小田 結加里, 渡邊 絵里, 西野 公博, 梶山 広明
2. 発表標題 絨毛性腫瘍に対する遺伝子パネル検査の注意点
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新美 薫
2. 発表標題 「ワークショップ2 絨毛性腫瘍に対する免疫チェックポイント阻害薬の使用経験と将来展望」絨毛性腫瘍におけるゲノム医療の注意点と免疫チェックポイント阻害剤の使用について
3. 学会等名 第39回日本絨毛性疾患研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小田 結加里, 新美 薫, 玉内 学志, 柴田 真由, 渡邊 絵里, 西野 公博, 山本 英子, 梶山 広明
2. 発表標題 非妊娠性絨毛癌のPatient-derived xenograft (PDX)モデルの確立
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小田 結加里, 新美 薫, 玉内 学志, 吉田 康将, 柴田 真由, 渡邊 絵里, 西野 公博, 山本 英子, 梶山 広明
2. 発表標題 Patient-derived xenograft (PDX)モデルの樹立に成功した悪性卵巢胚細胞腫瘍患者の1例
3. 学会等名 第63回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 絵里, 新美 薫, 牛田 貴文, 小田 結加里, 西野 公博, 小谷 友美, 山本 英子, 梶山 広明
2. 発表標題 妊娠24週で高度貧血によりterminationとなるも生児を得た胎児共存奇胎の一例
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新美 薫, 山本英子, 小田結加里, 渡邊絵里, 西野公博, 吉川史隆
2. 発表標題 遺伝子パネル検査を施行した難治性絨毛癌の一例
3. 学会等名 第62回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小田 結加里, 新美 薫, 柴田 真由, 渡邊 絵里, 西野 公博, 山本 英子
2. 発表標題 ~ 当院における絨毛癌脳転移症例の検討 ~
3. 学会等名 第62回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 新美 薫、山本 英子	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 7
3. 書名 臨床婦人科産科76巻2号 Page272-278(2022.3)	

1. 著者名 新美 薫、山本 英子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 メディカルレビュー社	5. 総ページ数 7
3. 書名 HORMONE FRONTIER INGYNECOLOGY 28巻3号Page235-241 (2021.9)	

〔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	奥野 友介  (Okuno Yusuke)  (00725533)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授    (23903)	

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