

令和元年6月24日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07130

研究課題名(和文)食道癌におけるTCRレパトア解析

研究課題名(英文)TCR repertoire analysis in esophageal cancer

研究代表者

主藤 朝也(Sudo, Tomoya)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：50309803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：免疫チェックポイント阻害剤の加療効果は病変部のT細胞の種類(T細胞サブセット)とそれがもつT細胞レセプター(TCR)のレパートリーに依存している。本研究では食道癌腫瘍局所のT細胞サブセットとそのT細胞に共通のTCRレパートリーが存在するか次世代シーケンサーを用いて解析した。CD3/CD8/CD45RO/Foxp3といったT細胞サブセットを調べるマーカーを用いて、食道癌部の病変部に存在しているT細胞のパターンを解析したところ、食道癌局所には3つのパターンをもつT細胞サブセットが存在していることが明らかになった。またTCR解析では共通の遺伝子組み換えパターンをもつT細胞の存在の可能性が伺われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌の局所には異なるT細胞サブセットが存在し、免疫チェックポイント阻害剤(ICI)を使用する際にはこのT細胞のパターンを考慮して導入する必要があることが明らかになった。また、T細胞には共通のTCRレパートリーが存在する可能性があることも明らかとなった。本研究では、TCRのレパートリー内でアミノ酸配列についてのマッチングも検討を行ったが、一致するものは認められなかった。事前に予想されていたことであったが、TCR解析をより詳細に行うことで、個人個人に合わせた至適な免疫治療の開発につながる可能性があり、本研究が明らかにした結果は免疫治療の至適化という点で少なからず意義はあったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to unveil the subset pattern of T-lymphocytes and the common TCR repertoire in esophageal cancer.

Fifty-three cases were enrolled and immunohistochemical staining was performed using CD3/CD8/CD45RO/Foxp3/PD-L1/HLA and AE1/AE3 antibodies. Digital scan and quantification was performed. The clinicopathological significance of CD3-Hi group and further stratification was tested using other T cell subset markers. Adaptor ligation PCR with next generation sequencing was performed to explore the common TCR repertoire in CD3-Hi group. Patients were stratified into CD3 high expression (CD3-Hi) group and CD3 low expression (CD3-Low) group. Overall survival and disease free survival were significantly better in CD3-Hi group. CD3-Hi group was divided into three clustering groups. In the TCR repertoire analysis there was a total of 29 combinations of TCR TRAV|TRAJ and 52 combinations of TCR TRBV|TRBJ recombination repertoires significantly amplified in CD3-Hi group.

研究分野：消化器癌

キーワード：食道癌 T細胞サブセット 包括的TCR解析

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

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 食道癌は以前から予後不良の疾患として知られており、手術を中心とした集学的治療が行われているが、多くの患者は集学的治療が完遂できず患者の状態を考慮した個別化治療の開発が期待されていた。癌の個別化治療を目指すためには癌細胞自身のもつ性質とともに、腫瘍周囲の微小環境を解析する必要がある。腫瘍周囲の微小環境で構成する要素の中で、炎症細胞は腫瘍全体の性質に大きく影響を与える。炎症細胞とくに腫瘍免疫に関わる T 細胞にはサブセットが存在し、抗腫瘍性にも腫瘍促進性にも働く。そのため、腫瘍周囲の微小環境を把握するためには腫瘍周囲に浸潤している T 細胞のサブセットがどのような状況であるかを解析する必要がある。

(2) さらに T 細胞の細胞表面上には T cell receptor (TCR) が存在し、TCR が腫瘍細胞が提示している抗原を TCR を通じて認識している。この TCR を解析し、食道癌に共通の TCR レポートリーが認められれば、より個別化された治療の開発につながる。この TCR の包括的な解析は非常に困難であったが、近年 adaptor ligation PCR と次世代シーケンサーを組み合わせることで可能となってきた。

#### 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的の 1 つは、T 細胞サブセットマーカーを用い食道癌局所に集簇している T 細胞サブセットのパターンを明らかにすることである。このサブセットパターンが明らかになることで、どのような T 細胞のバランスが腫瘍全体の性質を宿主にとって有利であるのかが明確となる。

(2) 本研究のもう一つの目的は、TCR の包括的解析を行い、食道癌局所において食道癌に共通の TCR が存在しうるのかを明らかにする。共通の TCR の存在が明らかになれば、食道癌細胞には共通に認識される抗原が存在することとなり、免疫治療を中心新たな治療戦略に道を開くことになる。また、共通の TCR が認められない場合も個々の症例に応じた究極のテーラーメイド治療に繋がる可能性がある。

#### 3. 研究の方法

(1) 2013 年から 2017 年に久留米大学において切除術をうけた食道癌症例 124 例と対象とした。この中で、承諾を受けた 53 例の切除標本を使用した。切除標本において CD3/CD8/CD45R0/Foxp3/PD-L1/HLA-class 1/AE1AE3 の一次抗体を使用し免疫染色を自動免疫染色器を用いて行った。染色プレパラートはスキャナー (Nanozoomer) を用いてデジタル化した。デジタル化したイメージを使用し、CD3/CD8/CD45R0/Foxp3 については腫瘍の中心部と先進部において 5 箇所ずつ 40 倍の拡大画像を抽出した。PD-L1/HLA-class 1/AE1AE3 については 1.25 倍画像においてイメージを抽出した。抽出したイメージは imageJ で色調分化を行った後、定量化した。各症例ごとに定量化した各マーカーの値をもとに、腫瘍における各マーカーの発現強度の解析、各マーカーの相関関係、各症例におけるマーカーの発現強度からクラスタリング解析、クラスタ同士での臨床病理学的背景因子の比較、各クラスタ間の予後解析を統計解析ソフト (JMP13.0) を用いて行った。

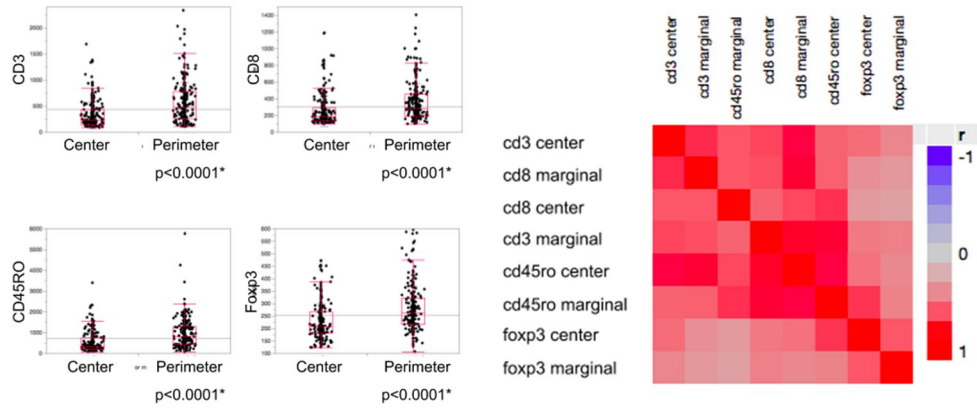
(2) CD3 発現の多い症例と低い症例それぞれ 5 例ずつの間で adaptor ligation PCR を行った後、次世代シーケンサーによる解析を行い、CD3 発現の多い症例において、共通に認められる V 領域と J 領域の組み合わせ (VJ 組み合わせ) 抽出を行った。抽出に際しては R (ver. 3.4.2) に含まれる edgeR パッケージを使用した。さらに、VJ 組み合わせがアミノ酸配列まで合致しているかについても解析を行った。

#### 4. 研究成果

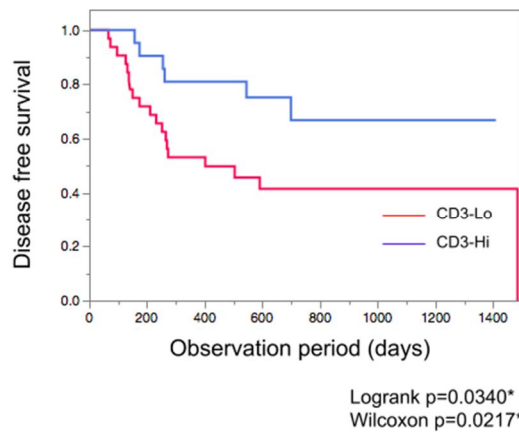
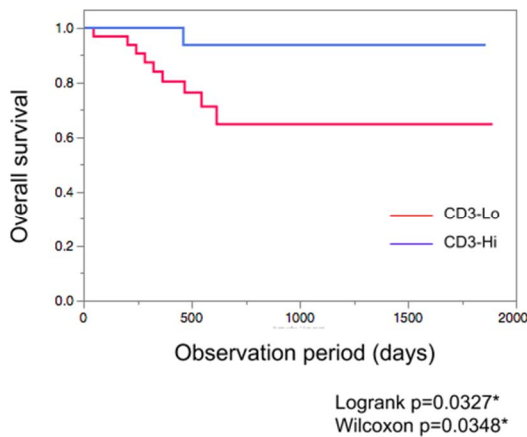
(1) CD3, CD8, FOXP3, CD45R0 の発現は腫瘍の中心部よりも辺縁で強く認められた。

さらに CD3, CD8, FOXP3, CD45RO の発現はお互いに高い相関が認められた。(右図)

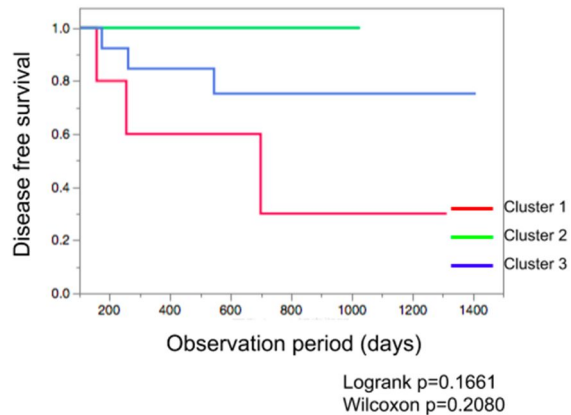
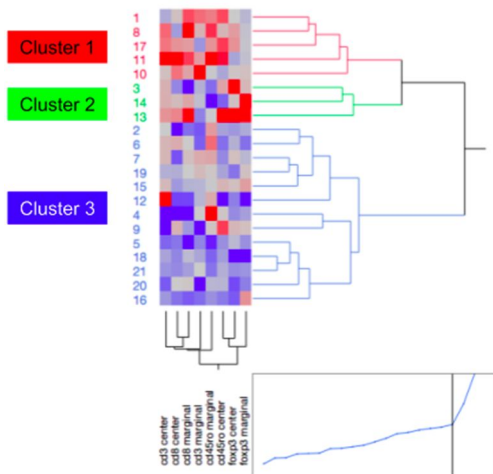
(2) 症例を CD3 が高発現症例 (CD3-Hi) と低発現症例 (CD3-Lo) に分けて全生存期間 (OS) と無再発生存期間 (DFS) を比較したところ、CD3-Hi 群においていずれも有意に良好であった。



無再発生存期間 (DFS) を比較したところ、



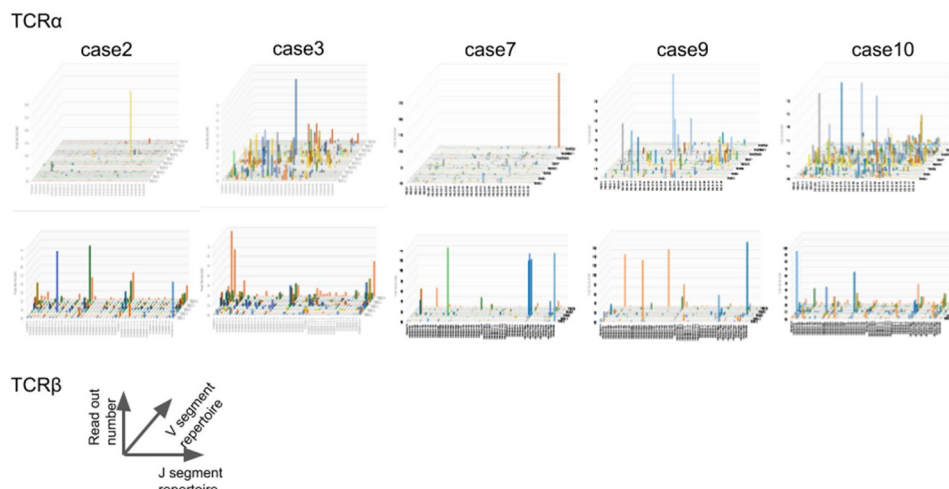
(3) CD3-Hi 群において CD8, CD45RO, Foxp3 の発現をもとにクラスタリング解析を行ったところ、3つのクラスターに分けることができ、3クラスターで予後解析をさらに行ったところ、クラスター2が良好で、クラスター1が不良な傾向にあった。また、各クラスターの特徴としてクラスター1では細胞傷害性 T 細胞、メモリー T 細胞のマーカーの発現が高く、クラスター2では制御性 T 細胞の発現が高値、クラスター3では各マーカーは差がないパターンを示した。



(4) CD3-Hi 群と CD3-Lo 群間で adaptor ligation PCR 及び次世代シーケンサーによる比較解

析を行い、CD3-Hi 群に共通して認められる VJ 組み合わせの抽出を行った。（右図）

これらの組み合わせの中で、共通に認められる組み合わせについて抽出を行ったところ、TCR 鎖には 29 種類の



recombination repertoire が TCR 鎖には 52 種類の recombination repertoire が認められた。さらにこれらの組み合わせについてアミノ酸配列まで共通であるかの解析を行ったが、アミノ酸配列まで完全に一致した TCR は認められなかった。（下図：VJ 組み合わせの例 赤は全例で一一致、オレンジは 1 例不一致、黄色は 2 例不一致、白は一致なし）

TRAV13-1 TRAJ39 α chain					TRBV27 TRBJ1-5 β chain				
cases	TRAV	TRA	VJ recombinant amino acid sequence	Read out number	cases	TRBV	TRBJ	VJ recombinant amino acid sequence	Read out number
SD33a	TRAV13-1	TRAJ39	C A A S D N A A N M L T F	38	SD35b	TRBV27	TRBJ1-5	C A S S F G P G H F	68
SD35a	TRAV13-1	TRAJ39	C A A S L G N N A G N M L T F	319	SD61b	TRBV27	TRBJ1-5	C A S S F G N N G P G H F	16
SD35a	TRAV13-1	TRAJ39	C A A S K N A G N M L T F	305	SD63b	TRBV27	TRBJ1-5	C A S S S H P L T G L N G P Q H F	79
SD35a	TRAV13-1	TRAJ39	C A A S K G L G N N A G N M L T F	73	SD64b	TRBV27	TRBJ1-5	C A S S L G Q A G P G H F	548
SD61a	TRAV13-1	TRAJ39	C A A S E G D N A G N M L T F	451	SD64b	TRBV27	TRBJ1-5	C A S S L S Q A G P G H F	18
SD61a	TRAV13-1	TRAJ39	S A A S E G D N A G N M L T F	14					
SD63a	TRAV13-1	TRAJ39	C A A N R W G A G N M L T F	175					
SD64a	TRAV13-1	TRAJ39	C A A G N A A N M L T F	322					

(6) 今回の研究を通じて、食道癌の病変局所における CD3 の発現によって食道癌症例は層別化することができ、CD3-Hi 群は CD3-Lo 群と比較して有意に予後良好であることが明らかとなった。また CD3-Hi 群症例は CD8,CD45RO,Foxp3 の発現によってさらに層別化できる可能性を示した。さらに、TCR 解析によって CD3-Hi 群で共通する TCR の VJ 組み合わせが明らかとなった。しかし、アミノ酸レベルで TCR の VJ 組み合わせの一致には至らなかった。

T細胞のサブセットによる解析では、当初細胞傷害性T細胞やメモリーT細胞が多く存在するパターンが最も予後が良好であり、制御性 T 細胞のサブセットが多い場合は最も予後が不良となる可能性が予想された。しかし、本研究を通じて逆の傾向を示しており制御性 T 細胞は腫瘍局所における行き過ぎた免疫反応を抑制することで、腫瘍に対する免疫効果を最適化する役割を示している可能性が考えられた。今後この点についてはさらなる検討が必要である。また、サブセットのバランスをコントロールする因子として IL-17 などのサイトカインが報告されているため、サイトカインのコントロールが今後の免疫治療を最適化する上で重要なキーファクターとなる可能性がある。

TCR 解析では共通する VJ 組み合わせは認められたものの、アミノ酸レベルでの一致は認めなかった。食道癌細胞には共通の抗原が表出しているものの、TCR の組み合わせは非常に膨大であるため症例間では共通のアミノ酸配列にならない可能性は考慮される。また、この TCR の解析から症例個々に合わせた TCR を T 細胞に導入、投与することで究極の免疫治療につながる可能性も示唆している。今後同様の解析はさらに重要であると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

Clinical Impact of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma; Sudo T1,2, Nishida R3, Kawahara A4, Saisho K3,5, Mimori K6, Yamada A4, Mizoguchi A7, Kadoya K3, Matono S3, Mori N3, Tanaka T3, Akagi Y3. Ann Surg Oncol. 2017 Nov;24(12):3763-3770. doi: 10.1245/s10434-017-5796-4. Epub 2017 Feb 3.

〔学会発表〕（計 3 件）

食道扁平上皮癌の病変部局所における T リンパ球サブセットと免疫チェックポイント分子との関連解析: 主藤朝也、最所公平、日野東洋、野北英史、長主祥子、森直樹、的野吾、藤田文彦、田中寿明、衣笠哲史、赤木由人 第 118 回日本外科学会定期学術集会 2018 年 4 月

Trial of Analysis the expression of PD-L1 expression and the subset of tumor infiltrating lymphocyte in Esophageal Squamous Cell Carcinoma: 主藤朝也 第 55 回日本癌治療学会 2017 年 10 月

食道癌における PD-L1 発現と tumor infiltrating lymphocyte サブセットの解析: 主藤朝也 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：山田亮

ローマ字氏名：(Yamada Akira)

所属研究機関名：久留米大学

部局名：先端癌治療研究センター

職名：教授

研究者番号（8 桁）： 50158177

研究分担者氏名：三森功士

ローマ字氏名：(Mimori Koshi)

所属研究機関名：九州大学病院別府病院

部局名：外科

職名：教授

研究者番号（8 桁）：50322748

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：溝口充志

ローマ字氏名：(Mizoguchi Atsushi)

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。