

令和 2 年 9 月 14 日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07209

研究課題名(和文) Hypermutator腫瘍のバイオマーカー開発に向けた免疫学的解析

研究課題名(英文) Immune response-associated gene expression profiling for biomarker development in hypermutated tumors

研究代表者

秋山 靖人 (Akiyama, Yasuto)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：70222552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍特異的なSNV数500 (tumor mutation burden 20)以上を示したhypermutator108例を対象として免疫応答関連遺伝子の発現解析を行い、予後に関するバイオマーカーの同定に繋げる。Hypermutator腫瘍では、PD-L1, TNFSF9, IL-6, GZMB, CD3G遺伝子の発現増加を認めており、腫瘍内のT細胞の活性化が想定された。PD-L1陽性CD8陽性である腫瘍では、良好な予後の傾向が見られた。この結果より hypermutationの現象のみでは良好な予後には、繋がりにくくネオアンチゲンに対するTILの誘導等のトリガーが必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Hypermutator腫瘍は、PD-L1やTILマーカーと並んで免疫チェックポイント抗体治療の良好な予後を示唆するマーカーとして認知されている。しかし、これまでに多くの癌腫の患者において免疫チェックポイント抗体を用いた臨床試験が実施されてきているが、hypermutator腫瘍でも治療予後の悪い症例が少なからず存在する。治療前のhypermutator腫瘍内での免疫応答に関連する遺伝子の発現解析を行い、予後と相関するバイオマーカーを同定すればさらに治療予後の良い症例を選別することが可能となり、引いては抗体医療のコストパフォーマンスの改善にもつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Hypermutator tumors from 108 cancer patients with more than 500 SNV (20 TMB) were analyzed in terms of immune response-associated gene expression with aiming at the identification of biomarkers associated prognosis. In hypermutator tumors, specific T-cell activating genes, such as PD-L1, TNFSF9, IL-6, GZMB and CD3G, were upregulated in expression, which may suggest the functional activation of intratumoral T-cells. Hypermutator tumors with immune-inflamed signature (PD-L1+CD8+) showed a better prognosis compared with other immune types. Therefore, not only a hypermutation, but also the initiation of TIL induction against tumor-specific neoantigens in the tumor can be needed to obtain a better cancer prognosis.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：Hypermutator 腫瘍内浸潤リンパ球 T細胞受容体 次世代シーケンサー がん免疫療法

### 1. 研究開始当初の背景:

免疫チェックポイント抗体(抗 PD-1/PD-L1 抗体等)は、メラノーマや非小細胞性肺癌など多くの PD-L1 陽性固形がんに対するがん免疫治療薬として延命効果が示されている。Hypermutator 腫瘍は、PD-L1 や TIL マーカーと並んで免疫チェックポイント抗体治療の良好な予後を示唆するマーカーとして認知されているが、その詳細なメカニズムは明らかではない。これまでに多くの癌腫の患者において免疫チェックポイント抗体を用いた臨床試験が実施されてきているが、hypermutator 腫瘍でも治療予後の悪い症例が少なからず存在する。治療前の hypermutator 腫瘍内での免疫応答に関連する遺伝子の発現解析を行い、予後と相関するバイオマーカーを同定すればさらに治療予後の良い症例を選別することが可能となる。

### 2. 研究の目的

これまでに HOPE プロジェクトに登録された 2,141 例のがん患者において腫瘍特異的な全 SNV 数 500 以上を hypermutator と定義すると 108 例が該当し、肺・胃・大腸がんが大半を占めていた。これらの hypermutator 症例を対象に免疫応答関連遺伝子パネルの発現解析と腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)の T 細胞受容体遺伝子(TCR)レパトワ解析およびネオアンチゲンの同定を行い、生存期間のデータを合わせることで hypermutator 症例の予後に関するバイオマーカーの同定に繋げて行く。またこれらの成果を基に hypermutator 症例における免疫チェックポイント抗体の優れた治療効果のメカニズムを解明し、高い臨床効果を期待できる症例の選別に役立てる。これらの hypermutator 症例を対象とした遺伝子解析のアプローチは、国内の臨床的なゲノム解析を施行するアカデミアでもまだ行われておらず新しい試みであると思われる。

### 3. 研究の方法

静岡がんセンターで施行中のがん患者に対する網羅的な遺伝子解析研究において認められた hypermutator [総 SNV 数 500 以上, tumor mutation burden (TMB)20 以上と定義]症例を対象として免疫応答関連 174 遺伝子の発現解析や腫瘍内浸潤 T 細胞の受容体レパトワ解析および SNV 由来のネオアンチゲンペプチドのスクリーニングを行う。最終年度は、先に同定した免疫応答関連遺伝子グループの発現データと hypermutator 症例の生存期間のデータを合わせることで hypermutator 症例の予後に関するバイオマーカーの同定を行う。またネオアンチゲンペプチドに関しては、ヒットしたネオアンチゲンに対応する T 細胞の TCR 遺伝子を MiSeq システムにて同定し、TIL 由来の TCR レパトワとの比較を行い、ネオアンチゲンを認識するレパトワとの相関を検討する。

### 4. 研究成果

静岡がんセンターでは、2014 年より手術にて切除された腫瘍組織を用いた網羅的な遺伝子解析研究(HOPE プロジェクト)を施行しており、whole exome sequencing (WES)と gene expression profiling (GEP)にて得られたデータを利用して multi-OMICS 解析を行っている。今回の研究では、登録された 2,141 例のがん患者において腫瘍特異的な全 SNV 数 500 [tumor mutation burden (TMB)20]以上を示した hypermutator108 例 [SNV 数: high TMB 群 1997 vs low TMB 群 94.5]を対象として免疫応答関連遺伝子パネルの発現解析と腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)の T 細胞受容体遺伝子(TCR)レパトワ解析を行い、生存期間のデータを合わせることで症例の予後に関するバイオマーカーの同定に繋げて行くものである。まず hypermutator 腫瘍の症例 108 例について PD-L1 と CD8B 遺伝子の発現レベルを基に A ~ D 群の 4 つに免疫学的分類を行った。Chen らの分類によれば、A 群 (PD-L1+CD8+) は、immune-inflamed type, B または C 群は、immune-desert type, D 群は、immune-excluded type に相当するものと考えられた。図 1 の分布をみると A 群が最も多く、D 群の該当症例はほとんど見られなかった。Hypermutator 症例の大部分は、PD-L1 陽性群に存在しており、我々の以前の報告でも各腫瘍の SNV 数と PD-L1 遺伝子の発現レベルに明らかな正の相関が確認されている ( $P=1.00E-06$ , Akiyama Y, *et al.* Biomed Res 2016)。Hypermutator108 例を対象とした免疫応答関連遺伝子パネルの発現解析結果については、Volcano plot を利用した評価で A 群が B,C 群に比較して PD-L1, TNFSF9, IL-6, GZMB, CD3G の発現増加を認めており(図 1 C-E, 表 1)、炎症性シグナルの増大による免疫応答シグナルの活性化が惹起されているものと推察された。さらに視点を変えて hypermutator 腫瘍の 174 個の免疫関連遺伝子の発現データを基に IPA ソフトウェアを用いて各免疫分類と免疫関連シグナルとの相関を数値化(Z score)して比較したところ A 群が高い数値(23 点、C 群-21 点)を示し、他群とは明らかに異なったパスウェイパターンを表出している。この結果は、別な視点から腫瘍内 T 細胞の機能的な活性化が示唆されている。このパスウェイ解析を利用した免疫機能のスコアリングは、有用な腫瘍内免疫環境の評価法の 1 つになる可能性を示している。あと残念ながら最終年度に実施予定の TIL 細胞の TCR 解析は、技術的な問題と機器の不調が原因でまだ結果が得られておらず今回の最終報告書には間に合わなかった。一方 TMB レベル別の全生存期間解析では、有意な差は認められなかったが、免疫分類の A 群 (PD-L1+CD8B+)にあたる hypermutator 腫瘍では、良好な予後の傾向が見られた。この結果より hypermutation の現象のみでは良好な予後には、繋がりにくくネオアンチゲンに

対する TIL の誘導等のトリガーが必要であり、今後の TCR レパトワの解析が必要となると考える。

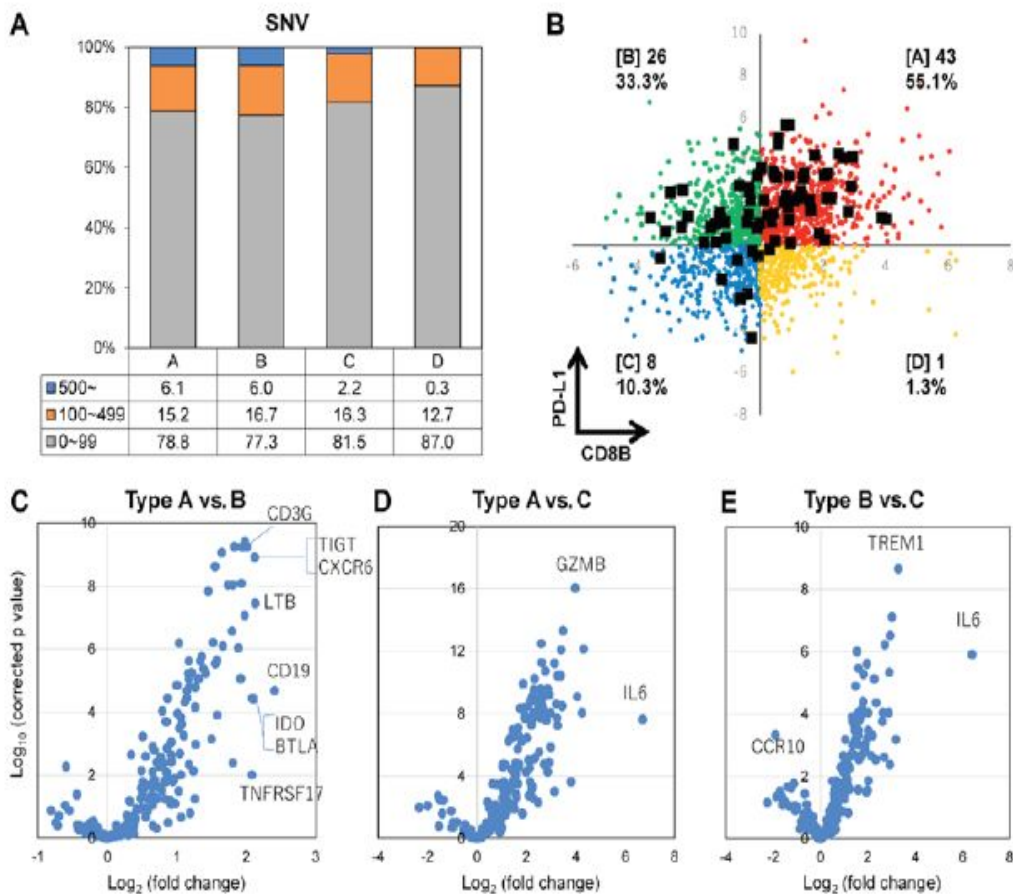


図1 Hypermutator 腫瘍の免疫タイプ分類による遺伝子発現パターンの比較 (A) 各免疫カテゴリーの hypermutator 症例の比率。(B)Hypermutator 腫瘍の免疫タイプ別分布(黒四角)。(C) 免疫タイプ A 群と B 群の遺伝子発現パターンの比較。(D) A 群と C 群の遺伝子発現パターンの比較。(E) B 群と C 群の遺伝子発現パターンの比較。

表1 Hypermutator 腫瘍の免疫カテゴリー群別の遺伝子発現パターンの比較

Category	Gene Symbol	Probe ID	P-value	Log FC
A vs. B	CD19	A_23_P113572	2.04x10 <sup>-5</sup>	2.41
A vs. B	LTB	A_33_P3248265	3.55x10 <sup>-8</sup>	2.13
A vs. B	TIGIT	A_33_P3342056	1.21x10 <sup>-9</sup>	2.12
A vs. B	CXCR6	A_23_P109913	1.21x10 <sup>-9</sup>	2.12
A vs. B	IDO1	A_23_P112026	3.79x10 <sup>-5</sup>	2.10
A vs. B	BTLA	A_33_P3358923	3.65x10 <sup>-5</sup>	2.08
A vs. B	TNFRSF17	A_23_P37736	9.64x10 <sup>-3</sup>	2.08
A vs. B	CD3G	A_23_P98410	5.57x10 <sup>-10</sup>	2.01
A vs. C	IL6	A_23_P71037	2.36x10 <sup>-8</sup>	6.71
A vs. C	GZMB	A_23_P117602	8.93x10 <sup>-17</sup>	3.98
B vs. C	IL6	A_23_P71037	1.21x10 <sup>-6</sup>	6.41
B vs. C	TREM1	A_33_P3319905	2.16x10 <sup>-9</sup>	3.29
B vs. C	CCR10	A_33_P3221303	4.72x10 <sup>-4</sup>	-1.90

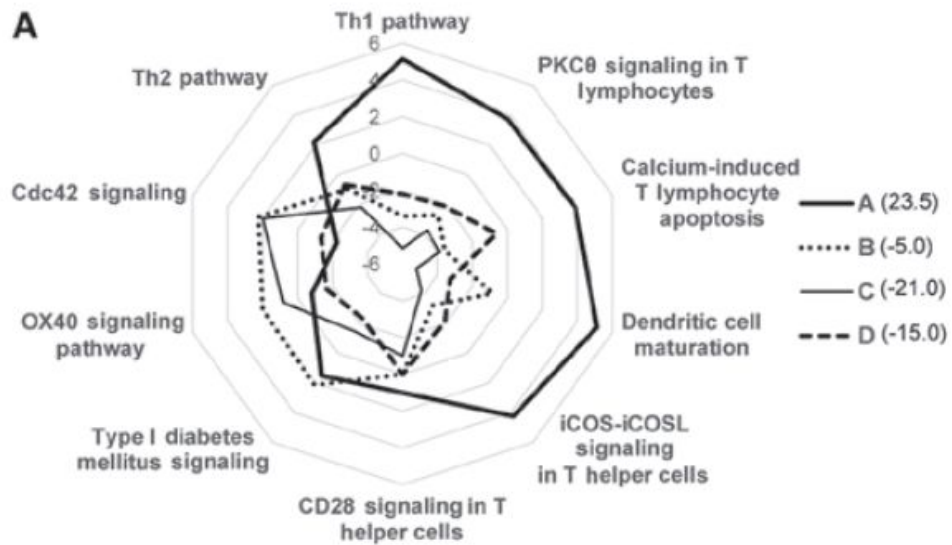


図 2 免疫タイプ分類と免疫関連シグナルパスウェイとの相関。Hypermutator 腫瘍の 174 個の免疫関連遺伝子の発現データを基に IPA ソフトウェアを用いて各免疫分類と免疫関連シグナルとの相関を数値化 (Z score) して比較した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17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 Nonomura C, Akiyama Y	4. 巻 208
2. 論文標題 Identification of a neoantigen epitope in a melanoma patient with good response to anti-PD-1 antibody therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunol Lett	6. 最初と最後の頁 52-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.imlet.2019.02.004	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Iizuka A, Akiyama Y	4. 巻 25
2. 論文標題 A T-cell-engaging B7-H4/CD3-bispecific Fab-scFv antibody targets human breast cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Cancer Res	6. 最初と最後の頁 2925-2934
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-17-3123	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Hatakeyama K, Akiyama Y	4. 巻 110
2. 論文標題 Mutational burden and signatures in 4000 Japanese cancers provide insights into tumorigenesis and response to therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 2620-2628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14087	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Shigeto H, Akiyama Y	4. 巻 144
2. 論文標題 Imaging analysis of EGFR mutated cancer cells using peptide nucleic acid (PNA)-DNA probes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analyst	6. 最初と最後の頁 4613-4621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c9an00725c.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Ohshima K, Akiyama Y	4. 巻 110
2. 論文標題 Driver gene alterations and activated signaling pathways toward malignant progression of gastrointestinal stromal tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 3821-3833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14202	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Ashizawa T, Akiyama Y	4. 巻 216
2. 論文標題 Impact of combination therapy with anti-PD-1 blockade and a STAT3 inhibitor on the tumor-infiltrating lymphocyte status	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunol Lett	6. 最初と最後の頁 43-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imlet.2019.10.003.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Ashizawa T, Akiyama Y	4. 巻 40
2. 論文標題 Antitumor activity of the PD-1/PD-L1 binding inhibitor BMS-202 in the humanized MHC-double knockout NOG mouse	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomed Res	6. 最初と最後の頁 243-250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.40.243	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Nagashima T, Akiyama Y	4. 巻 111
2. 論文標題 Japanese version of The Cancer Genome Atlas, JCGA, established using fresh frozen tumors obtained from 5143 cancer patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 687-699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14290	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Ono A, Akiyama Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Assessment of associations between clinical and immune microenvironmental factors and tumor mutation burden in resected nonsmall cell lung cancer by applying machine learning to whole-slide images	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Med	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3107	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Hatakeyama K, Akiyama Y	4. 巻 8
2. 論文標題 Molecular profiling and sequential somatic mutation shift in hypermutator tumours harbouring POLE mutations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 8700
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26967-4	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 Hatakeyama K, Akiyama Y	4. 巻 39
2. 論文標題 Tumor mutational burden analysis of 2,000 Japanese cancer genomes using whole exome and targeted gene panel sequencing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomed Res	6. 最初と最後の頁 159-167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.39.159	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Omori S, Akiyama Y	4. 巻 23
2. 論文標題 Changes in programmed death ligand 1 expression in non-small cell lung cancer patients who received anticancer treatments	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1052-1059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-018-1305-4	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kondou R, Akiyama Y	4. 巻 54
2. 論文標題 Classification of tumor microenvironment immune types based on immune response-associated gene expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 219-228
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2018.4617	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Ohshima K, Akiyama Y	4. 巻 7
2. 論文標題 Integrated analysis of gene expression and copy number identified potential cancer driver genes with amplification-dependent overexpression in 1,454 solid tumors	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-00219-3	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Akiyama Y	4. 巻 190
2. 論文標題 The anti-tumor activity of the STAT3 inhibitor STX-0119 occurs via promotion of tumor-infiltrating lymphocyte accumulation in temozolomide-resistant glioblastoma cell line	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Immunology Letters	6. 最初と最後の頁 20 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.imlet.2017.07.005	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Akiyama Y	4. 巻 39
2. 論文標題 Immune response-associated gene profiling in Japanese melanoma patients using multi-omics analysis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 1125 ~ 1131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2017.6173	査読の有無 有
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 -



1. 著者名 Kiyohara Y, Akiyama Y	4. 巻 44
2. 論文標題 Melanoma patient response to nivolumab treatment for metastatic lung lesion: Multi-OMICS analysis in project HOPE	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 1156-1159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.13879	査読の有無 有
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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Akiyama Y
2. 発表標題 Identification of a neoantigen epitope in a melanoma patient with good response to anti-PD-1 antibody therapy
3. 学会等名 第78回癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiyama Y
2. 発表標題 Characterization of hypermutated tumors based on tumor microenvironment immune types classification
3. 学会等名 第77回日本癌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiyama Y
2. 発表標題 Classification of tumor microenvironment immune types based on the immune response-associated gene expression
3. 学会等名 第76回日本癌学会総会
4. 発表年 2017年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----