

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10578

研究課題名(和文)食道癌・胃癌における腫瘍内免疫応答解析に基づく最適な複合的免疫治療の検討

研究課題名(英文) Analysis of intratumoral immune response in gastric and esophageal cancer for optimal combination immunotherapy

研究代表者

八木 浩一 (Yagki, Koichi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90422310

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)：胃癌50例、食道癌58例の手術検体と末梢血検体を採取した。胃癌29例について、次世代シーケンズ、フローサイトメトリー、液性因子解析を行い、腫瘍内免疫応答を多層的に解析した。「がん免疫サイクル」の概念に基づき、RNAシーケンズデータから抽出した9つの評価軸からなる「イムノグラム」を作成し、患者個々の腫瘍内免疫応答を表現した。さらにクラスター解析により胃癌を4群に分類した。この分類は、従来の臨床分類とは相関を認めなかったが、がん抗原数や上皮間葉転換、遺伝子変異、腫瘍微小環境、腫瘍浸潤Tリンパ球の機能不全や浸潤排除の有無などが特徴づけられ、腫瘍内免疫応答の評価に有用と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、胃癌症例において、手術検体と末梢血検体を用いて、次世代シーケンズ、フローサイトメトリー、液性因子解析を行い、腫瘍内免疫応答を多層的に解析し、がん免疫サイクルの概念に基づく「イムノグラム」により腫瘍内免疫応答を視覚的に表現した。その結果、胃癌患者個々の腫瘍内免疫応答はそれぞれ異なっていることが判明し、クラスター解析から胃癌が免疫学的に4つに分類された。この分類では、胃癌における腫瘍内免疫応答が特徴づけられており、腫瘍内免疫応答の評価に有用であり、さらに、腫瘍内免疫応答の評価に基づく個別化免疫治療や新規の複合的免疫治療の開発に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We collected tumor and adjacent tissue from 50 gastric cancer patients and 58 esophageal cancer patients. We performed whole-exome and RNA sequencing, and flow cytometry in cancer of 29 gastric cancer patients. We have developed immunogram based on RNA-Seq using 9 selected gene sets. By integrating them, we generated an immunogram for each patient. Immunograms of the 29 patients differ from patient to patient. These results demonstrate that the anti-tumor immune response in gastric cancer is heterogeneous. The hierarchical clustering of Immunogram of these patients resulted in 4 novel immunological subtypes. Hot tumors were further divided into 2 subtypes, between which the functional status of T-cells was different. This novel immunological subtypes could be useful for improving the efficacy of current immunotherapies or developing novel combination immunotherapies. We are analysing for esophageal cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：食道癌 胃癌 イムノグラム 腫瘍免疫 免疫応答 複合的免疫治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性腫瘍患者では抗腫瘍免疫応答は様々な機序で抑制されている。その抑制因子の一つである免疫チェックポイント分子の阻害薬による治療は、複数のがん種で生存期間の延長を示し、食道癌・胃癌でも複数の国際共同試験が進行中である。しかし、免疫チェックポイント阻害薬は非常に高価であり、また重篤な副作用を伴うとの報告もあり、治療効果が期待できる患者の選別を可能にするバイオマーカーの確立が求められている。いくつかのがん種では、腫瘍内におけるPD-L1の発現や、腫瘍特異的遺伝子変異由来の新生抗原(ネオアンチゲン)などの因子が奏効率と関連することが示唆されているが、より信頼性の高いバイオマーカーが探索されている。食道癌・胃癌においては、治療の効果判定や適応選択のためのバイオマーカーはまだみつかっていない。さらに、他の抗腫瘍免疫応答抑制因子を標的とした薬剤を免疫チェックポイント阻害薬と併用した複合的免疫治療の開発も始まっており、今後これら新規の免疫治療薬についても、バイオマーカーの確立が求められる。

(2) これまでのがん薬物療法は、腫瘍細胞の増殖を直接阻害する作用を持つ薬物が主体であったが、免疫チェックポイント阻害薬を含む免疫治療は、腫瘍細胞に直接働きかけるのではなく、免疫細胞を介して間接的に腫瘍の増殖制御を目指す治療である。そのため、免疫治療薬のバイオマーカーの探索においては、がん細胞の特性解析に加えて、腫瘍が形成する免疫環境の解析が重要となる。申請者らの共同研究グループでは、研究開始時までに、次のような予備的な研究結果を得ている。

がん組織における腫瘍特異的遺伝子変異を全エクソンシーケンスで同定し、MHC 結合予測法を用いて遺伝子変異由来のネオアンチゲンを同定するシステムを構築した(Karasaki et al. J Thorac Oncol. 2016;11:324-33)。

同アルゴリズムを用いて、腎細胞癌 97 例におけるネオアンチゲン候補の予測と免疫学的解析を実施した(Matsushita et al. Cancer Immunol Res. 2016;4:463-71)。

肺癌 20 例において全 RNA シークエンスを行い、腫瘍内微小環境を解析し、患者個々の腫瘍内免疫応答の特性をスコア化した「イムノグラム」を作成した(Karasaki et al. J Thorac Oncol. 2017;12:791-803)。

### 2. 研究の目的

本研究では手術で切除された食道癌・胃癌の腫瘍組織における腫瘍特異的な遺伝子変異を全エクソンシーケンスで同定し、MHC 結合予測法を用いて遺伝子変異由来のネオアンチゲンを同定する。また、全 RNA シークエンスを行い、腫瘍の免疫関連遺伝子の発現を検討し、患者個々の腫瘍内免疫応答の特性を評価した「イムノグラム」を作成し、食道癌・胃癌における腫瘍内免疫応答を明らかにする。これらの情報に基づいて、食道癌・胃癌患者個々への最適な複合的免疫治療の提供を目指す。

### 3. 研究の方法

食道癌・胃癌患者から採取した腫瘍組織と末梢血を用いて、患者毎の腫瘍免疫環境を明らかにし、複合的免疫治療の可能性を検討する。研究計画の進め方として、

全エクソン、全 RNA シークエンスを行い、MHC クラス I/II 結合予測法を用いて、腫瘍特異的遺伝子変異由来のネオアンチゲンを同定する。

全 RNA シークエンスを行って得られた遺伝子発現プロファイリングなどから、患者毎の抗腫瘍免疫応答に関連している因子について、「イムノグラム」を作成する。

### 4. 研究成果

研究期間中に、胃癌 50 例、食道癌 58 例の手術検体(腫瘍組織・正常組織)と末梢血検体を採取し、末梢血検体から末梢血単核球と血清を分離して凍結保存した。十分な量の腫瘍組織が採取できた症例については、腫瘍組織を細断し、一部は酵素処理などを行って新鮮腫瘍分解物を作成した。残りは培地上に播種し、腫瘍浸潤リンパ球および腫瘍細胞を培養した。そして、得られた腫瘍浸潤リンパ球と新鮮腫瘍分解物を共培養し、上清を回収して ELISA 法でインターフェロン産生を解析した。これらの解析から腫瘍細胞内に腫瘍反応性の腫瘍浸潤リンパ球が存在している症例があることが確認された。

胃癌患者 29 例について、腫瘍組織の肉眼的な癌部と非癌部、末梢血単核球からそれぞれ DNA、RNA を抽出して次世代シーケンサー解析を行ったほか、フローサイトメトリー解析、液性因子解析を行い、腫瘍内免疫応答を多層的に解析した。

「がん免疫サイクル」の概念に基づき、RNA シークエンスデータから抽出した 9 つの評価軸からなる「イムノグラム」で腫瘍内免疫応答を表現した。イムノグラムは患者毎に異なっており、胃癌患者において腫瘍内免疫応答が患者毎に異なっていることが判明した。さらに、イムノグラムの各評価軸のスコアをもとにクラスター解析を実施したところ、胃癌の腫瘍内免疫応答は、大きく 2 つの群(“Immune Hot”と“Immune Cold”)、さらに詳細に 4 つの群(IGS cluster; “hot1”, “hot2”, “middle”, “cold”)に分類された。IGS cluster は従来の臨床分類とは相関を認めなかったが、クラスター毎に、腫瘍、がん抗原数や上皮間葉転換、遺伝子変異、腫瘍微小環境、さらには腫瘍浸潤 T 細胞の機能不全や浸潤排除の有無など、腫瘍内免疫応答が特徴づけられ、腫

瘍内免疫応答の評価に有用と考えられた。“hot1”群には、TCGA (The Cancer Genome Atlas) による分子学的分類の MSI (microsatellite instability) 型が多く含まれ、いずれも遺伝子変異数が多かった。“hot2”群には、TCGA 分類の EBV (Epstein-Barr virus) 型が多く含まれていた。“middle”群には、上皮間葉転換をきたした Mesenchymal 型が多く集まっていた。腫瘍浸潤 T 細胞は、免疫学的に Hot な腫瘍では機能不全、Cold な腫瘍では浸潤排除を示していた。さらにフローサイトメトリーにより腫瘍浸潤リンパ球の表現型と機能を解析したところ、Hot1 では 2 種類以上のサイトカインを算出する CD8 陽性 T リンパ球が少なかった。こうした腫瘍浸潤 T 細胞の機能不全は、適切なシグナルを与えたり、免疫抑制的なシグナルをブロックすることで回復した。

本研究によって、胃癌患者個々の腫瘍内免疫応答の特徴が「イムノグラム」により明らかとなった。今後の最適な複合的免疫治療の基盤となると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yasuyoshi Sato, Ikuo Wada, Akihiro Hosoi, Yukari Kobayashi, Koji Nagaoka, Takahiro Karasaki, Hirokazu Matsushita, Koichi Yagi, Hiroharu Yamashita, Shunji Takahashi, Yasuyuki Seto, Kazuhiro Kakimi.
2. 発表標題 Novel immunological classification of gastric cancer by integrative analysis
3. 学会等名 American Association for Cancer Research Virtual Annual Meeting II
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 靖祥, 八木浩一, 山下裕玄, 小林由香利, 藤枝奈緒, 長岡孝治, 細井亮宏, 垣見和宏, 瀬戸泰之
2. 発表標題 胃癌における腫瘍内免疫応答の解析
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuyoshi Sato, Koichi Yagi, Kazuhiko Mori, Hirokazu Matsushita, Kazuhiro Kakimi and Yasuyuki Seto
2. 発表標題 Autologous tumor lysate-pulsed dendritic cell vaccination therapy after resection of stage IIA (T2N0, T3N0) esophageal cancer: An analysis of immunological responses
3. 学会等名 The ASCO-SITC Clinical Immuno-Oncology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018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
研究分担者	瀬戸 泰之  (Seto Yasuyuki)  (00260498)	東京大学・医学部附属病院・教授    (12601)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	垣見 和宏  (Kakimi Kazuhiro)  (80273358)	東京大学・医学部附属病院・特任教授    (12601)	
研究 分 担 者	松下 博和  (Matsushita Hirokazu)  (80597782)	愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍免疫制御TR分野・分野 長    (83901)	