

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11413

研究課題名(和文) 頭頸部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 head and neck cancer for optimal combination immunotherapy

研究代表者

仲野 兼司 (Nakano, Kenji)

公益財団法人がん研究会・有明病院 総合腫瘍科・副医長

研究者番号：10795553

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)：頭頸部癌50例の手術検体と末梢血検体を採取した。腫瘍組織は細断し、一部は酵素処理等を行って新鮮腫瘍分解物(FTD)を作成した。残りは培地上に播種し、腫瘍浸潤Tリンパ球(TIL)および腫瘍細胞を培養したところ、45例中40例(85%)でTILの増殖が確認された。十分な量のFTDが得られた22例について、TILとFTDを共培養し、上清を回収してELISAでインターフェロン(IFN)産生を解析したところ、20例(91%)でIFN産生の上昇を認めた。現在は、全50例について次世代シーケンスを外注で行い、またフローサイトメトリー、液性因子解析を行い、腫瘍内免疫応答の多層的な解析を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部癌においては多くの症例で腫瘍細胞内に腫瘍反応性のTILが存在していることが確認された。研究期間終了時点では、次世代シーケンス、フローサイトメトリー、液性因子解析を行って、腫瘍内免疫応答の多層的な解析を進めており、最終的には、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つながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We collected tumor and adjacent tissue and peripheral blood samples from 50 head and neck cancer patients. Tumor tissues were cut and partly treated with enzyme to be turned into fresh tumor digest (FTD). And the rest were scattered on culture mediums to culture tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and tumor cells. Then, obtained TIL and FTD were co-cultured and production of interferon- (IFN) were analysed by ELISA. TIL was increased in 85% cases. In 22 cases with sufficient FTD, increased INF production were observed in 91%. Now, we are performing whole-exome and RNA sequencing, and flow cytometry for integrating analysis.

研究分野：頭頸部外科学

キーワード：頭頸部癌 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、頭頸部癌でも複数の国際共同試験が行われ、再発または遠隔転移を有する頭頸部扁平上皮癌を対象とした第 Ⅲ 相試験(Checkmate-141 試験)において抗 PD-1 抗体 (Nivolumab) は標準化学療法と比べて全生存率を有意に延長 (7.5 カ月 vs. 5.1 カ月,  $p=0.01$ ) したと報告され (Ferris et al. *N Engl J Med.* 2016 Oct 8. Epub ahead of print)、わが国でも再発または遠隔転移を有する頭頸部癌に対する適応拡大の承認申請が行われている。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。頭頸部癌においては、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らない。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頭頸部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、頭頸部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、頭頸部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

頭頸部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、頭頸部癌 50 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。45 例中 40 例 (85%) で TIL の増殖が確認された。十分な量の FTD が得られた 22 例について、TIL と FTD を共培養し、上清を回収して ELISA でインターフェロン (IFN ) 産生を解析したところ、20 例 (91%) で IFN 産生の上昇を認めた。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多くあることが確認された。現在は、全 50 例について次世代シーケンスを外注で行い、結果が返却された 40 症例について、「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ている。また、フローサイトメトリー、液性因子解析を行い、腫瘍内免疫応答の多層的な解析を行っている。今後 50 症例すべてについ

て、これらの結果が揃った段階で、学会および論文での発表を予定している。本研究によって、頭頸部癌患者個々の腫瘍内免疫応答の特徴が明らかとなり、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15件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sato Yasuyoshi, Fukuda Naoki, Wang Xiaofei, Urasaki Tetsuya, Ohmoto Akihiro, Nakano Kenji, Yunokawa Mayu, Ono Makiko, Sato Yukiko, Mitani Hiroki, Tomomatsu Junichi, Takahashi Shunji	4. 巻 Volume 12
2. 論文標題 Efficacy of Nivolumab for Head and Neck Cancer Patients with Primary Sites and Histological Subtypes Excluded from the CheckMate-141 Trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Management and Research	6. 最初と最後の頁 4161 ~ 4168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/CMAR.S249393	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 Nakano Kenji, Seto Akira, Sasaki Toru, Shimbashi Wataru, Fukushima Hirofumi, Yonekawa Hiroyuki, Mitani Hiroki, Takahashi Shunji	4. 巻 41
2. 論文標題 Incidence and risk factors of interstitial lung disease of patients with head and neck cancer treated with cetuximab	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Head & Neck	6. 最初と最後の頁 2574 ~ 2580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hed.25727	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 NAKANO KENJI, SETO AKIRA, SASAKI TORU, SHIMBASHI WATARU, FUKUSHIMA HIROFUMI, YONEKAWA HIROYUKI, MITANI HIROKI, TAKAHASHI SHUNJI	4. 巻 39
2. 論文標題 Predictive Factors for Completion of TPF Induction Chemotherapy in Patients With Locally Advanced Head and Neck Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4337 ~ 4342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.13601	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 Nakano K, Seto A, Sasaki T, Shimbashi W, Fukushima H, Yonekawa H, Mitani H, Takahashi S	4. 巻 in press
2. 論文標題 Incidence and risk factors of interstitial lung disease of patients with head and neck cancer treated with cetuximab.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Head Neck.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hed.25727	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 Nakano Kenji, Marshall Shoko, Taira Shinichiro, Sato Yukiko, Tomomatsu Junichi, Sasaki Toru, Shimbashi Wataru, Fukushima Hirofumi, Yonekawa Hiroyuki, Mitani Hiroki, Kawabata Kazuyoshi, Takahashi Shunji	4. 巻 73
2. 論文標題 A comparison of weekly paclitaxel and cetuximab with the EXTREME regimen in the treatment of recurrent/metastatic squamous cell head and neck carcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oral Oncology	6. 最初と最後の頁 21~26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oraloncology.2017.07.022	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

〔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	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)	
研究分担者	高橋 俊二 (Takahashi shunji) (90221358)	公益財団法人がん研究会・有明病院 総合腫瘍科・部長  (72602)	