

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07012

研究課題名(和文) EBV関連胃癌をモデルとした胃癌細胞と免疫・炎症細胞との相互作用の解明

研究課題名(英文) Analysis of interaction between gastric cancer cells and immune cells in Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma

研究代表者

阿部 浩幸 (Abe, Hiroyuki)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師

研究者番号：40708632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Epstein-Barr virus関連胃癌(EBV胃癌)及び予後不良なことが知られる神経内分泌細胞癌(胃癌だけでなく食道癌も含む)を対象に、腫瘍免疫状態について病理組織標本を用いた解析を行った。EBV胃癌では腫瘍細胞1個当たりのウイルスコピー数が高い症例で予後不良かつPD-L1を高発現していることが分かり、ウイルスコピー数が腫瘍免疫回避に重要と考えられた。また少数例の検討ではあるが、腹膜播種巣ではCD8陽性細胞が少ない傾向が認められ、播種に対する免疫治療は慎重に検討すべきと考えられた。胃や食道の神経内分泌細胞癌では6割～7割の症例でPD-L1を発現しており、治療標的となり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス感染を特徴とするEpstein-Barr virus関連胃癌(EBV胃癌)、及び予後不良で有効な治療標的が確立されていない神経内分泌細胞癌(Neuroendocrine carcinoma, NEC)を対象に、腫瘍免疫状態の解析を行った。その結果、EBV胃癌での腫瘍細胞内ウイルス量とPD-L1(腫瘍免疫回避に重要な分子)の発現が相関することが分かり、腫瘍免疫回避機構の一端を明らかにすることができた。また胃や食道に発生するNECは高頻度にPD-L1を発現しており、PD-L1が治療標的となり得ることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：I analyzed tumor immune status in Epstein-Barr virus associated gastric cancer (EBVaGC) and neuroendocrine carcinoma (NEC). In EBVaGC, high viral copy number in a single tumor cell was associated with poor prognosis and frequent PD-L1 expression. Viral copy number is thought to be an important factor for tumor immune evasion in EBVaGC. However, in peritoneal dissemination of EBVaGC, the number of CD8-positive cells infiltrating in the tumor was small compared to the primary tumor, although the number of cases analyzed was small. Use of immune checkpoint therapy should be considered carefully in cases with peritoneal disseminations. Neuroendocrine carcinoma in the stomach and esophagus expressed PD-L1 in 60% to 70% cases. PD-1/PD-L1 pathway was thought as a potential therapeutic target in gastric and esophageal NEC.

研究分野：人体病理学

キーワード：胃癌 食道癌 腫瘍免疫 Epstein-Barr virus 神経内分泌細胞癌

1. 研究開始当初の背景

近年、PD-1/PD-L1 等の免疫チェックポイントを阻害する薬剤の開発により悪性黒色腫や肺癌などの様々な悪性腫瘍において高い治療効果が報告され、腫瘍免疫の重要性が広く認識されている。Epstein-Barr virus (EBV) 関連胃癌は個々の癌細胞にモノクローナルな EBV 感染が認められる腫瘍で、近年の網羅的ゲノム解析では胃癌の 4 つの分子生物学的サブタイプのうちの 1 つと位置づけられ、注目が集まっている。EBV 関連胃癌は腫瘍内に細胞障害性 T 細胞を主体とする豊富なリンパ球浸潤を伴う特徴的な組織像(carcinoma with lymphoid stroma)を呈し、PD-L1 遺伝子増幅とタンパク高発現の頻度が高い[1,2]が、腫瘍細胞が宿主の免疫反応を抑制するメカニズムは十分に解明されていない。

2. 研究の目的

(1) 腫瘍内に豊富なリンパ球浸潤を有する EBV 関連胃癌を対象とし、免疫関連分子の発現に影響を与える腫瘍細胞の特徴を、外科切除検体の臨床病理学的解析を通じて明らかにし、腫瘍の免疫回避機構や免疫治療の標的を見出すことを目指した。本研究では特に腫瘍細胞内のウイルスゲノムコピー数と IDO1 発現という二つの特徴に注目し解析した。

(2) これまでの腫瘍免疫に関する先行研究の殆どは、原発巣を解析の対象としているが、実際の免疫治療の対象となる患者には遠隔転移を有する症例が多いと想定される。本研究では病理解剖症例の検体を用いて、遠隔転移巣における腫瘍免疫状態を検討した。

(3) 上記(1)の知見を踏まえつつ、EBV 関連胃癌以外の特殊型胃癌や食道癌を対象に、治療標的となり得る免疫関連分子の発現を調べることとした。本研究では予後不良として知られる神経内分泌癌に着目し、胃・食道それぞれで PD-L1 や HLA Class I の発現を解析した。

3. 研究の方法

(1) EBV 関連胃癌の外科切除材料の FFPE ブロックから DNA を抽出し、RT-PCR 法で EBNA1 遺伝子のコピー数を測定した。EBV ゲノムに対する probe を作成し、FISH 法を用いてコピー数を求め、RT-PCR 法による算出結果の妥当性を検討した。また同一ブロックの病理組織画像から画像解析ソフトウェアを使って腫瘍細胞割合を算出し、「腫瘍細胞 1 個あたり」のウイルスゲノムコピー数を計算した。得られたコピー数の臨床病理学的意義、PD-L1 発現との関係を検討した。

IDO1 については胃癌(EBV 関連胃癌以外を含む)の tissue microarray (TMA)を用いた免疫染色を行い、IDO1 発現の意義を検討した。

(2) 胃癌の病理解剖症例を東京大学病理学教室の過去のアーカイブから検索し、腫瘍部から TMA を構築して EBER-in situ hybridization で EBV 関連胃癌を検索した。見つかった EBV 関連胃癌の病理解剖症例の検体を用い、原発巣と転移巣の免疫微小環境を形態学的、免疫組織学的に検討した。

(3) 東京大学医学部附属病院病理部のアーカイブから胃・食道の神経内分泌癌の症例を抽出し、PD-L1 及び HLA Class I の発現、ミスマッチ修復蛋白の発現、炎症細胞浸潤の程度を評価した。

4. 研究成果

(1) EBV 関連胃癌 43 例において、腫瘍細胞 1 個あたりのウイルスコピー数を求めたところ、RT-PCR 法と FISH 法では良い相関が認められた。ウイルスコピー数が高い群は予後不良であり、PD-L1 陽性率も高いことが示された。細胞内の高ウイルス量が腫瘍細胞の PD-L1 発現に寄与している可能性が示唆された。なお本研究と関連し、EBV 関連胃癌で変異と蛋白発現消失の頻度が高いとされる ARID1A について免疫組織学的に調べたところ、ARID1A 発現陰性例(遺伝子変異のある症例)は発現保持例(遺伝子変異の無い症例)と比べウイルスコピー数が高いことも判明した(図 1)。クロマチンリモデリング因子異常と腫瘍内のウイルスゲノムの保持・増幅機構との間に

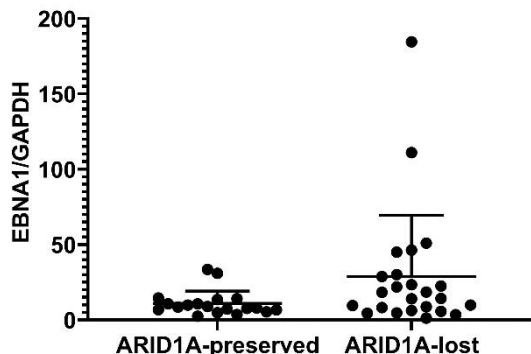


図 1 EBV 胃癌における ARID1A 発現と EBNA1/GAPDH 値の関係

何らかの関連が示唆された。

また我々は T 細胞活性化を抑制する作用を持つ分子 IDO1 に着目し、胃癌 276 例を集めた tissue microarray を用いて免疫染色を行った。その結果、IDO1 低発現が 170 例、中等度発現が 61 例、高発現が 45 例認められた。低発現、高発現の症例に比べ、中等度発現の症例は腫瘍径が小さく、早期胃癌が多く、予後が良好であることが判明した。分子生物学的サブタイプ別の解析では EBV 関連胃癌において中等度陽性症例が多い傾向を示したのに対し、EBV 胃癌と同様にリンパ球浸潤が比較的多いとされるミスマッチ修復タンパク陰性の胃癌(MSI 胃癌)では、IDO1 の発現が低い傾向を示し、必ずしも腫瘍内炎症細胞浸潤の多いサブタイプに IDO1 発現が強いわけではないことが示唆された(図 2)。

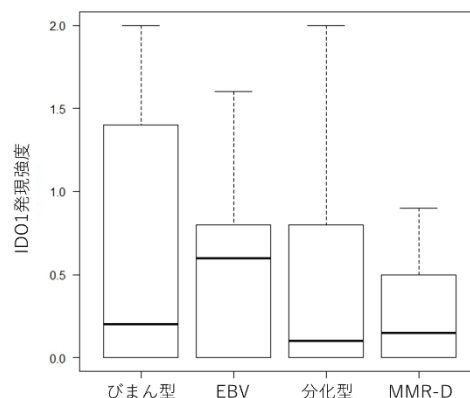


図 2 胃癌サブタイプと IDO1 発現強度

(MMR-D: ミスマッチ修復蛋白陰性)

(2) 東京大学病理学教室のアーカイブから胃癌約 100 症例が見つかったが、EBER-ISH 陽性を示す症例は 2 例のみであった(EBV 関連胃癌の予後は通常の胃癌に比べ良好であることから、頻度が低いのはやむを得ないものと考えられ、今回見出した 2 例は貴重な症例だと考えられる)。1 例は肝転移を有していたが、組織像や腫瘍内 CD8 陽性 T 細胞の密度は原発・転移いずれも差が見られなかった。もう 1 例は腹膜播種を有しており、播種巣ではリンパ球の浸潤が原発に比べ少ない傾向が見られた。2 例のみの検討であり確定的なことは言えないが、転移巣では腫瘍免疫状態が原発巣と異なる可能性があり、今後は転移・播種巣の外科切除検体等に対象を拡大して検討を進める必要があると考えられた。

(3) 予後不良として知られる胃の神経内分泌癌 25 症例(腺癌との混在例を含む)について PD-L1 免疫染色を行い、combined positive score (CPS: PD-L1 陽性の腫瘍細胞・炎症細胞数の合計を、腫瘍細胞数で割り、100 を掛けたもの。CPS>1 が抗 PD-1 抗体による治療効果の予測因子とする報告がある[3])を算出した。結果、18 例(72%)において CPS が 1 を越え、免疫チェックポイント治療の対象となり得ることが示唆された。CPS の低い症例では腫瘍辺縁のリンパ球浸潤が少なく、リンパ節転移やリンパ管侵襲の頻度が有意に高く、(有意差が無いものの)予後不良となる傾向があることも示された。ミスマッチ修復遺伝子の発現消失(マイクロサテライト不安定性を示し、遺伝子変異が蓄積することから抗 PD-1 抗体薬が効きやすいとされる)は 4 例(16%)のみに認められた。HLA Class I は 21 例(84%)において発現が保持されており、PD-L1 CPS>1 の 18 例に限定すると 16 例(89%)で発現が保持されており、抗 PD-1 抗体治療による T 細胞免疫活性化が胃の神経内分泌癌に対する治療法として期待される結果であった。

食道の神経内分泌癌 15 例についても同様の検討を行った。食道神経内分泌癌 15 例中、PD-L1 の CPS が 10 を越えるものは 5 例(33%)、1 を越えるものは 9 例(60%)認められた。少数例の検討ではあるが、CPS>1 の症例は予後良好な傾向を示した。HLA Class I について調べたところ、15 例中 10 例(66%)で発現が保たれており、PD-L1 CPS>10 の症例に限ると 5 例中 4 例(80%)が HLA Class I 発現保持されており、PD-1/PD-L1 経路が食道 NEC における有効な治療標的となり得ることが示唆された。ミスマッチ修復遺伝子の発現消失は 15 例全てで認められなかった。また同一症例で神経内分泌癌成分と扁平上皮癌成分を含む症例を比較したところ、神経内分泌癌成分では PD-L1 の発現低下、HLA Class I の発現消失、腫瘍内浸潤リンパ球の減少など、免疫回避的な表現型を示す傾向が一部の症例で認められ、免疫治療の適応を検討する上では扁平上皮癌のみならず NEC 成分でも PD-L1 等の評価を行うことが重要と考えられた。

<引用文献>

1. Abe H, Kaneda A, Fukayama M. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: use of host cell machineries and somatic gene mutations. Pathobiology 2015;82(5):212-23.
2. Saito R, Abe H, Kunita A, et al. Overexpression and gene amplification of PD-L1 in cancer cells and PD-L1⁺ immune cells in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: the prognostic implications. Mod Pathol 2017;30(3):427-439.
3. Kulangara K, Zhang N, Corigliano E, et al. Clinical utility of the combined positive score for programmed death ligand-1 expression and the approval of pembrolizumab for treatment of gastric cancer. Arch Pathol Lab Med 2019;143(3):330-337.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Nakayama Atsuhito, Abe Hiroyuki, Kunita Akiko, Saito Ruri, Kanda Teru, Yamashita Hiroharu, Seto Yasuyuki, Ishikawa Shumpei, Fukayama Masashi	4. 巻 14
2. 論文標題 Viral loads correlate with upregulation of PD-L1 and worse patient prognosis in Epstein-Barr Virus-associated gastric carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0211358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0211358	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 Furuya Genta, Abe Hiroyuki, Shinozaki-Ushiku Aya, Yamashita Aya, Ihara Sozaburo, Hirata Yoshihiro, Chiba Akira, Fujioka Yosei, Kurokawa Mineo, Koike Kazuhiko, Fukayama Masashi	4. 巻 214
2. 論文標題 Extranodal NK/T-cell lymphoma of the nasal cavity developed in a patient with intestinal Epstein-Barr virus-positive T/NK-cell lymphoproliferative disorder	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 1051 ~ 1055
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prp.2018.05.022	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 -
1. 著者名 Abe Hiroyuki, Saito Ruri, Ichimura Takashi, Iwasaki Akiko, Yamazawa Sho, Shinozaki-Ushiku Aya, Morikawa Teppei, Ushiku Tetsuo, Yamashita Hiroharu, Seto Yasuyuki, Fukayama Masashi	4. 巻 472
2. 論文標題 CD47 expression in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: coexistence with tumor immunity lowering the ratio of CD8+/Foxp3+ T cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 643 ~ 651
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-018-2332-2	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 Yamashita Satoshi, Abe Hiroyuki, Kunita Akiko, Yamashita Hiroharu, Seto Yasuyuki, Ushiku Tetsuo	4. 巻 78
2. 論文標題 Programmed cell death protein 1/programmed death ligand 1 but not HER2 is a potential therapeutic target in gastric neuroendocrine carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 381 ~ 391
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/his.14230	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿部浩幸、六反啓文、十時泰、牛久哲男、柴田龍弘、深山正久
2. 発表標題 胃癌背景粘膜におけるARID1A及びp53の発現異常と遺伝子変異
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大井手 慶、阿部 浩幸、山澤 翔、牛久 哲男、深山 正久
2. 発表標題 胃癌組織におけるEZH2の臨床病理学的意義およびARID1A、BAP1との関係について
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部 浩幸、深山 正久、Vieth Michael
2. 発表標題 バレット食道の表在腺癌におけるp53、ARID1A、EZH2の免疫組織学的発現検討
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山敦仁、阿部浩幸、国田朱子、深山正久
2. 発表標題 EBV関連胃癌におけるウイルスコピー数とその臨床病理学的意義
3. 学会等名 第15回EBウイルス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部浩幸、国田朱子、牛久哲男、深山正久
2. 発表標題 胃癌細胞におけるARID1A発現低下はEBVの感染を促進する
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下智、阿部浩幸、山下裕玄、瀬戸泰之、牛久哲男
2. 発表標題 胃内分泌細胞癌における治療標的分子発現
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020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

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