

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07636

研究課題名(和文)放射線治療が行われた扁平上皮癌患者における腫瘍免疫学的解析と治療効果との相関

研究課題名(英文) Immunological analysis and clinical outcome of patients with squamous cell carcinoma treated with radiation therapy

研究代表者

田巻 倫明 (Tamaki, Tomoaki)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20400749

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、術前の化学療法・化学放射線治療が食道扁平上皮癌に及ぼす腫瘍免疫学的影響を治療前生検検体と手術検体で免疫組織化学的手法を用いて解析した。今回の結果では、化学療法および化学放射線治療による術前治療によって、腫瘍細胞におけるHLA Class I分子発現の有意な増加によりCD8陽性細胞の腫瘍内浸潤が促進され抗腫瘍免疫反応が惹起されていることが示唆された。また、この抗腫瘍免疫に関連する分子マーカーの発現も解析したが、これらの発現と術前治療の組織学的効果や予後とは相関が認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、食道扁平上皮癌において、化学療法や化学放射線治療が細胞障害性T細胞による免疫反応を介して抗腫瘍効果を示している可能性が示唆された。一方で、抗腫瘍免疫反応と組織学的治療効果や予後との有意な相関は認められず、今回解析された複数の分子マーカーの発現は抗腫瘍効果や予後との有意な相関が認められなかった。今後は、食道扁平上皮癌に対する抗腫瘍免疫反応と更なる解明とその効果を予測できる新たな分子マーカーの解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：The effect of chemotherapy and chemoradiotherapy on anti-tumor immunology in cases of esophageal squamous cell carcinoma was studied in the pre-treatment biopsy specimen and the surgical specimen by using immuno-histomechemistry methods. In this analysis, the anti-tumor immunology was observed by the increase in the intra-tumor invasion of CD8-positive lymphocytes suggestively triggered by the significant increase in the expression level of HLA Class I molecules on the tumor cells. In the analysis of the expression of other molecular biomarkers related to the anti-tumor immunology, the expression of the studied molecules did not show significant correlation to the histopathological response or the prognosis of the studied patients.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：放射線腫瘍学 食道癌 扁平上皮癌 抗腫瘍免疫 放射線治療 化学療法

### 1. 研究開始当初の背景

近年の腫瘍免疫学の進歩により、癌治療における腫瘍免疫の重要性が世界的に再認識されている。放射線治療分野において、放射線治療の抗腫瘍効果は DNA2 本鎖切断による直接的な殺細胞作用が主とされてきたが、近年、放射線治療の局所的な抗腫瘍効果にも腫瘍免疫が関与していることが報告されている。これまでに我々は、in vivo 実験にて放射線治療による局所効果には CD8 陽性 T リンパ球が関わること、化学放射線治療が施行された食道扁平上皮癌患者において、末梢血中に抗原特異的な細胞傷害性 T リンパ球 (Cytotoxic T lymphocyte: CTL) が増加すること、直腸がん患者において術前温熱化学放射線治療により Human leukocyte antigen (HLA) class I 発現が増強することなど、放射線治療と腫瘍免疫の関係を明らかにしてきた。

Nivolumab など、免疫チェックポイント阻害剤の承認・適応拡大が進んでいるが、もともと免疫原性が高いと考えられる悪性黒色腫や腎細胞癌から、肺癌・頭頸部癌といった扁平上皮癌に適応拡大が進んでいる。さらには、現在、食道癌、子宮頸癌、といった放射線治療が主たる治療法である扁平上皮癌での免疫チェックポイント阻害剤の有効性を検証するため、主に標準治療後の再発症例などに対する救済治療として臨床試験が試みられている。しかしながら、バイオマーカーとして腫瘍免疫の効果に直結する HLA class I / class II の発現や腫瘍微小環境へ浸潤している CTL やマクロファージなどの存在が予後と相関しているのかについての報告は乏しく、免疫療法と放射線治療の併用療法 (免疫放射線療法) が相加・相乗効果を示すか、どのような患者が対象になるか、など確立した知見はほぼない。

抗腫瘍免疫の中でも、HLA class I を介する腫瘍抗原の提示や、CTL による腫瘍細胞の認識・排除は中心的な役割を果たす (図 1)。特に HLA class I は腫瘍細胞表面に存在し、CTL に抗原提示を行い、活性化を促す。逆に、腫瘍は HLA class I 発現を低下させ、腫瘍免疫から“逃避”すると考えられており、HLA class I 発現が低下した病態は、理論的にも免疫療法の効果も期待できず、実際に予後不良との報告がある。また、腫瘍微小環境へ浸潤した CTL やマクロファージ、腫瘍細胞の PD-L1 発現、PD-L1 発現を促す IFN- $\gamma$  の細胞内シグナル伝達経路の 1 つである phosphorylated signal transducer and activator of transcription (pSTAT) の活性化などは、腫瘍免疫活性化の指標となり得ると想定される。これらの因子が、放射線治療によってどのような影響を受けるのか、放射線治療の効果予測のバイオマーカーとなり得るのかについて解明することは、今後の免疫療法併用放射線療法の適応拡大に必須と考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、放射線治療が主たる治療法であり、免疫チェックポイント阻害剤の適応拡大が進むと考えられる扁平上皮癌において、放射線治療前後の腫瘍微小環境を解析することにより、これらの腫瘍において、実際にヒト体内で放射線治療が抗腫瘍免疫を誘導しているか、予後と相関する腫瘍免疫学的バイオマーカーがあるか、を検討し、今後の抗 PD-1/抗 PD-L1 抗体などと放射線治療の併用療法の可能性について検討することである。従来、放射線治療の生物学的効果は DNA 鎖切断に起因する直接的な殺細胞効果が中心であるとされており、放射線治療効果と腫瘍微小環境 (低酸素、癌幹細胞など) に関する研究がこれまで放射線腫瘍学のメインテーマであり広く研究されてきたが、腫瘍浸潤リンパ球などの腫瘍微小環境における免疫応答については研究フォーカスから外れていた。

本研究は、放射線の抗腫瘍効果における免疫応答の関与について検証するものであり、放射線の抗腫瘍効果や生物学的影響について新たな知見を与え得るものである。また、そのメカニズムを解明することで、放射線治療と免疫療法の相乗的もしくは補完的な応用についての知見により、今後の新しい治療戦略の開発を繋がる。更に、本研究では、臨床検体を用いて解析することで、より実地臨床に直結する結果や知見を得ることを目標とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、当研究施設で平成 19 年 6 月 1 日～平成 29 年 12 月 31 日の期間に根治的手術が施行された食道扁平上皮癌症例で、術前生検検体が入手できる計 48 症例 (術前化学療法施行群 30 例、術前化学放射線治療施行群 11 例、手術単独治療群 8 例) の治療開始前生検組織標本と手術摘出標本を使用した。これらの腫瘍組織標本で、腫瘍微小環境における CD8 陽性リンパ球 (抗原特異的な細胞傷害性 T リンパ球、Cytotoxic T lymphocyte: CTL) の腫瘍内浸潤数および腫瘍辺縁部浸潤数、腫瘍細胞の HLA class I・PD-L1・PD-L2・CEACAM-1・LSECtin・pSTAT1 発現について比較し、予後・病理組織学的効果判定との相関を検討することにより、これらの扁平上皮癌に対する (化学)放射線治療と免疫療法の併用療法の可能性を検討した。CD8 陽性細胞の浸潤数の集計には、免疫染色画像解析ソフトを使用した。

## 4. 研究成果

### 抗原特異的な細胞障害性 T リンパ球の浸潤細胞数 (CD8 陽性リンパ球細胞数)

治療開始前生検組織標本と手術摘出標本における比較では、術前化学療法施行群で CD8 陽性リンパ球細胞の腫瘍内浸潤数は有意に術前治療によって増加していた (図 1: 治療前標本  $27.2 \pm 19.6$ 、手術標本  $34.0 \pm 22.3$ 、 $p$  値=0.004)。術前化学放射線治療施行群では、増加している傾向はあったものの有意な増加は認められなかった (図 1: 治療前標本  $19.2 \pm 14.1$ 、手術標本  $22.8 \pm 16.3$ 、 $p$  値=0.069)。手術検体における腫瘍内の CD8 陽性細胞リンパ球浸潤数には術前治療の違いによる有意な差は認められなかった。また、手術単独群では治療前の生検検体と手術標本における HLA Class I 発現の変化は認められなかったが、術前化学療法及び化学放射線治療の術前治療により腫瘍細胞における HLA Class I の発現は有意に増加していた。

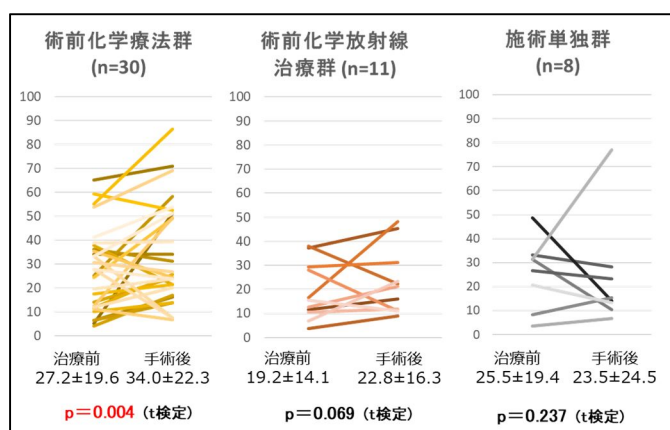


図 1: 治療前生検検体と手術標本 (術前治療後) における CD8 陽性細胞の腫瘍内浸潤数の比較

CD8 陽性細胞の腫瘍内・腫瘍辺縁部浸潤数と予後・病理組織学的効果判定の相関を解析した結果、術前化学療法施行群において、腫瘍内の CD8 陽性リンパ球浸潤が高い群 (中央値以上 vs. 中央値未満) で生存予後が良い傾向にあったが有意な差ではなかった ( $p$  値=0.064)。HLA Class I の治療前発現量および術前治療による発現変化についても解析したが、予後や組織学的効果判定における有意な相関は認められなかった。

### 腫瘍免疫反応に関連する分子マーカー発現

腫瘍免疫反応のバイオマーカーとなり得る分子マーカーの発現を解析した結果、腫瘍細胞における pSTAT-1 の発現は、術前化学療法において有意な発現の増加が認められた。一方で、pSTAT-1 の発現と PD-L1 の発現に相関は認められなかった。また、PD-L1、PD-L2、CEACAM-1、LSECtin、pSTAT-1 の治療前発現と術前治療による発現変化は、予後や組織学的効果判定との有意な相関は認められなかった。

### 結語

今回の解析では、食道扁平上皮癌において、術前治療 (化学療法、化学放射線治療) において細胞障害性 T リンパ球の腫瘍内浸潤の増加が示され、HLA Class I 発現が関連していることが示唆されたが、予後および組織学的効果判定との有意な相関が認められなかった。また、腫瘍免疫反応のバイオマーカーとなり得ると考えられ今回解析された分子マーカーに関しては、術前治療により予後、組織学的効果判定、および腫瘍免疫反応との相関を示す結果に至らなかった。

本研究の全般的な結果に関しては、今回の研究期間内には十分な発表に繋げることができる内容ではなかったが、更なる解析によって有意な関連結果が示されるかどうかを検討の上、今後、発表に繋げていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0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	鈴木 義行  (Suzuki Yoshiyuki)  (60334116)	福島県立医科大学・医学部・教授   (21601)	
研究分担者	三村 耕作  (Mimura Kosaku)  (90568031)	福島県立医科大学・医学部・准教授   (21601)	
研究分担者	小此木 範之  (Okonogi Noriyuki)  (00750572)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 重粒子線治療研究部・医長(定常)   (82502)	

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