

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08664

研究課題名(和文) 免疫ゲノム解析による直腸癌術前放射線化学療法の治療効果に寄与する免疫環境の解明

研究課題名(英文) Immunogenomic profile associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with rectal cancer

研究代表者

秋吉 高志 (AKIYOSHI, Takashi)

公益財団法人がん研究会・有明病院 大腸外科・副部長

研究者番号：50625598

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)：進行直腸癌に対する術前化学放射線療法(CRT)の治療効果における腫瘍浸潤T細胞の多様性の意義は不明である。我々は、67症例の治療前生検検体のT細胞受容体(TCR)レパトア解析を行った。また、23症例については手術検体のTCRレパトア解析を行い、CRT前後のTCRレパトアの変化を解析した。TCRレパトアの多様性(DI)は効果良好群で効果不良群より有意に高く、CRT前後のTCRレパトアの変化の大きい群は小さい群より無再発生存率が有意に良好であった。治療前のTCRレパトアの複雑性と治療前後の動的な変化が進行直腸癌における術前CRTの治療効果を予測する有用な指標になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍浸潤CD8陽性T細胞の密度が直腸癌に対する術前化学放射線療法(CRT)の治療効果と相関することはこれまで報告されていたが、本研究でははじめて腫瘍浸潤CD8陽性T細胞の密度だけでなくT細胞レパトアの多様性がCRTの治療効果の予測に有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：The significance of T-cell complexity in patients with locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT) remains unknown. High-throughput T-cell receptor (TCR) sequencing was applied to quantify the TCR repertoire of pre-treatment biopsies from 67 patients with advanced rectal cancer receiving preoperative CRT. Diversity index was used to represent the complexity of the TCR repertoire in a tumor. Changes in TCR repertoire before and after CRT were also analyzed in 23 patients. Diversity indices were significantly higher for good responders than for non-responders. Larger changes in TCR repertoires before and after CRT were correlated with better recurrence-free survival. The complexity and dynamic change in the TCR repertoire might serve as a useful indicator of response to CRT in patients with rectal cancer.

研究分野：大腸外科

キーワード：直腸癌 術前放射線化学療法 免疫ゲノム解析

## 1. 研究開始当初の背景

下部進行直腸がんは、術後再発率が約 30%と高く、術後排便障害や永久人工肛門などにより患者の生活の質 (QOL) は大きく低下する。局所再発すれば疼痛や出血をきたし、QOL をさらに低下させるが、局所再発を抑制する目的で、術前化学放射線療法 (chemoradiotherapy: CRT) が標準治療として行われている。術前 CRT の効果は症例により様々であるが、特にがん細胞が完全に消失する、病理学的完全奏効 (pathological complete response: pCR) (約 10~15%) 症例は良好な長期成績を示すことが報告されている。最近では術前 CRT により臨床的完全奏効 (clinical complete response: cCR) が得られた症例に対し、手術を回避し慎重に経過観察を行う watch & wait (WW) approach が行われるようになってきた。しかし、MRI や内視鏡などの現存する診断モダリティでは pCR を正確に予測することは困難であり、WW 症例の約 30% は局所再増大をきたす。術前 CRT の効果を高精度に予測できれば、効果不良予測群には不必要な術前 CRT の省略や、より強力な術前全身化学療法と組み合わせるなどの戦略が可能となり、効果良好予測群には高確率で根治切除が省略可能になると考えられる。

近年がん局所に浸潤した T リンパ球 (tumor-infiltrating lymphocytes; TILs) の重要性が明らかになってきている。T 細胞はその表面上に発現する T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) を介して、体細胞変異を有するたんぱく質由来のがん特異的抗原であるネオ抗原を認識し、抗腫瘍効果を示すとされる。これまでに複数のがん腫において、CD8 陽性 TIL が良好な予後と関連することや、TCR レパトアの多様性が抗がん剤や免疫チェックポイント阻害剤の治療効果と関連することが報告されている。しかしながら、直腸がん局所の TCR レパトアの多様性と術前 CRT 治療効果の相関の有無や、CRT 前後で TCR レパトアの多様性がどのように変化するかなど、直腸がんにおいては全く報告がなく不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、CRT 前後の直腸がん組織から抽出した RNA を用いて次世代シーケンサーによる TCR レパトア解析を行い、直腸がん術前 CRT の治療効果に寄与する腫瘍周囲の免疫環境の一端を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) 術前 CRT 施行前の新鮮凍結生検検体 (n=67) より laser-capture microdissection より癌細胞を抽出し、RNeasy Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて RNA を抽出後、TCR レパトア解析を行った。ライブラリ調整は iRepertoire multiplex primer set および iR-Processor and iRock 2.0 (iRepertoire, Huntsville, AL, USA) を用いて行い、シーケンスは MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いて行った。また、67 症例のうち 23 症例は切除検体からも RNA を抽出し、TCR レパトア解析を行った。

(2) 術前 CRT の効果判定として、切除検体の病理学的効果判定 (tumor regression grade: TRG) を用いた。癌細胞が全く認められない TRG4 とごくわずかに癌細胞が遺残する TRG3 を効果良好群とし、ほとんど効果が見られない TRG1 を効果不良群とした。癌細胞よりも線維化が有意な TRG2 は効果中間群として今回の解析対象からは予め除外した。

(3) 生検検体における腫瘍浸潤 CD8 陽性 TIL の密度を免疫染色および Aperio ImageScope system (Leica Biosystems) を用いて評価した。

## 4. 研究成果

(1) 術前 CRT 施行前の生検検体から抽出した RNA を用いて、67 症例の TCR レパトア解析を行った。男性 40 例/女性 27 例、年齢の中央値 60 歳、腫瘍肛門縁距離の中央値: 40mm、clinical stage II: 28 例/III: 39 例、効果良好群: 32 例/効果不良群: 35 例であった。

レパトア解析により、 $646,753 \pm 155,125$  (平均  $\pm$  SD) のシーケンスリードを得た。また、HLA 上の腫瘍抗原の認識に重要な相補性決定領域 (complementary determining region 3: CDR3) のアミノ酸配列が同一のリード (クロナタイプ) を  $1,734 \pm 1,212$  同定した。上位 10 のクロナタイプの占める頻度は 1.9% から 89.7% ( $54.5 \pm 23.8\%$ ) と症例により大きなばらつきがあった (図 1)。Diversity index (DI) を計算し、TCR レパトアの多様性の指標とした。DI は効果良好群で効果不良群より有意に高かった ( $P=0.0309$ )。また、DI は ypN(-) 症例で ypN(+) 症例より有意に高かった ( $P=0.0309$ ) (図 2)。

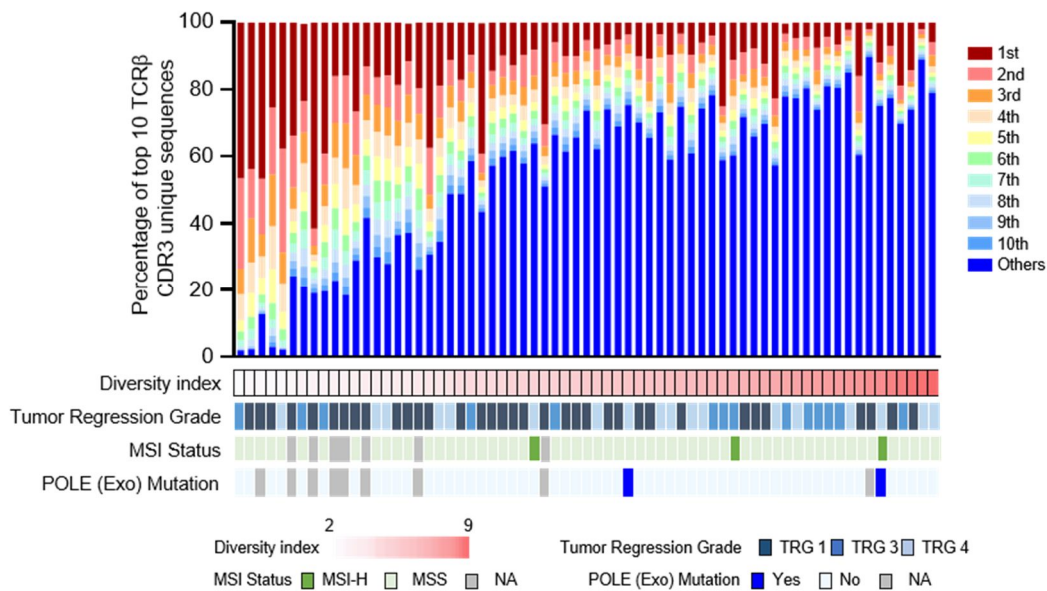


図 1 67 症例の Top10 のクロナタイプの頻度

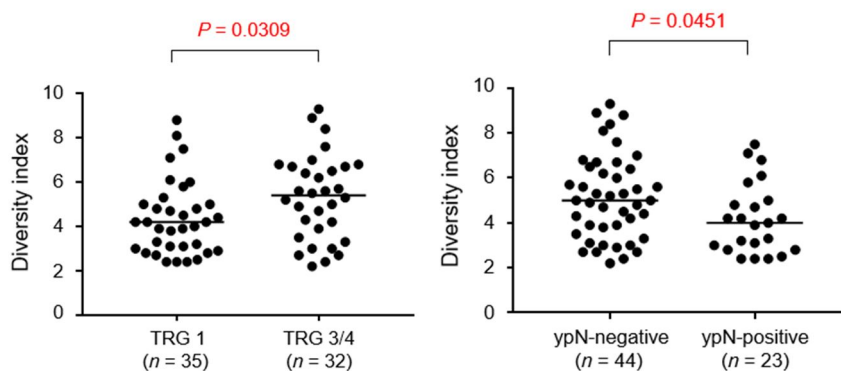


図 2 Diversity index と CRT 治療効果または病理学的リンパ節転移の有無との相関

(2) 腫瘍浸潤 CD8 陽性 TIL 密度と TCR レパトアの DI の相関を解析したところ、 $r = 0.2076$ 、 $P = 0.0970$  (Spearman) と弱い相関を認めた。多変量解析を行ったところ、腫瘍浸潤 CD8 陽性 TIL 密度および DI はそれぞれ独立した治療効果の予測因子であった ( $P < 0.001$ ,  $P = 0.049$ )。CD8 陽性 TIL 密度 ( $TIL^{hi}/TIL^{lo}$ ) および TCR diversity index ( $DI^{hi}/DI^{lo}$ ) により 4 群にわけて解析すると、 $TIL^{hi}/DI^{hi}$  群で最も治療効果良好の頻度が高く (84.2%)、 $TIL^{lo}/DI^{lo}$  群で最も治療効果良好の頻度が低かった (16.7%)。  $TIL^{hi}/DI^{lo}$  群および  $TIL^{lo}/DI^{hi}$  群の治療効果良好の頻度はその中間であった (52.9%、36.4%) (図 3)。以上より、TCR レパトアの多様性は CRT の治療効果と相関することが示唆された。

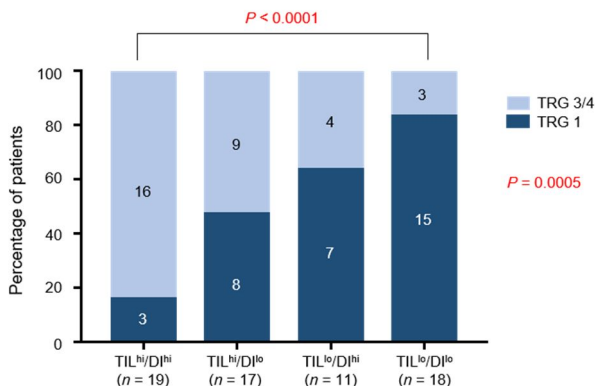


図 3 CD8 陽性 TIL 密度および TCR diversity index の組み合わせと CRT 治療効果との相関

(3) 23 症例においては切除検体から抽出した RNA を用いて CRT 前後のレパトア解析を行った。DI は治療後に有意に上昇していた ( $P = 0.0085$ )。治療効果別に分けて解析すると、効果不良群で DI

は CRT 後有意に上昇していたが ( $P=0.0074$ )、効果良好群では有意差は認めなかった ( $P=0.6875$ ) (図 4)。DI の増加の有無で無再発生存率に有意差を認めなかった (図 4)。

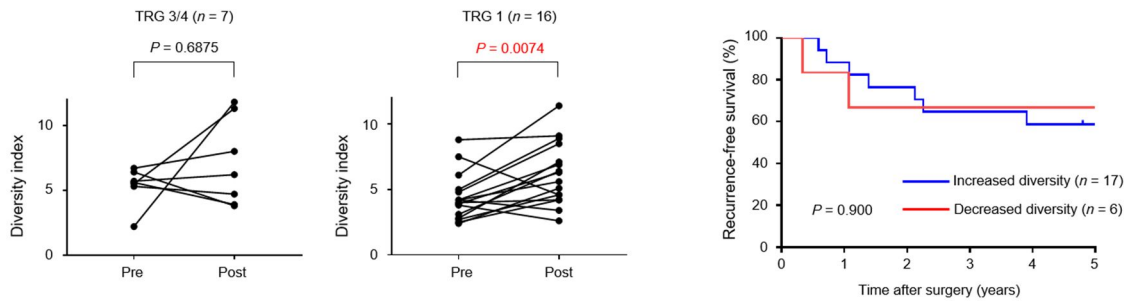


図 4 TCR レパトアの CRT 前後での変化

TCR 前後でのレパトアの類似度を Morisita-Horn index を用いて解析した。類似度が高いほど Morisita-Horn index は高値を示す。Morisita-Horn index は再発症例で高い傾向を認め ( $P=0.0810$ )、Morisita-Horn index の高い群では無再発生存率は有意に不良であった ( $P=0.0270$ ) (図 5)。以上の結果、CRT 前後の TCR レパトアの多様性の変化が予後予測因子となる可能性が示唆された。

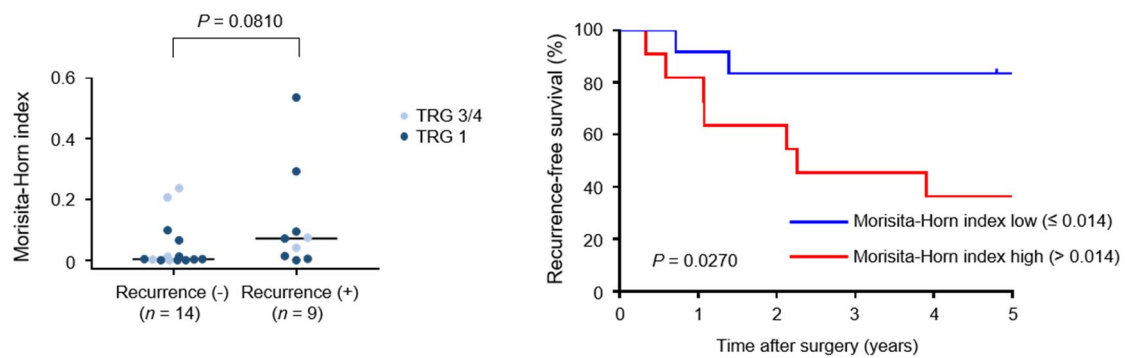


図 5 CRT 前後での TCR レパトアの変化と再発率の相関

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Murahashi Satoshi, Akiyoshi Takashi, Sano Takeshi, Fukunaga Yosuke, Noda Tetsuo, Ueno Masashi, Zembutsu Hitoshi	4. 巻 123
2. 論文標題 Serial circulating tumour DNA analysis for locally advanced rectal cancer treated with preoperative therapy: prediction of pathological response and postoperative recurrence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 803 ~ 810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-0941-4	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 Nakanishi Ryota, Akiyoshi Takashi, Toda Shigeo, Murakami Yu, Taguchi Senzo, Oba Koji, Hanaoka Yutaka, Nagasaki Toshiya, Yamaguchi Tomohiro, Konishi Tsuyoshi, Matoba Shuichiro, Ueno Masashi, Fukunaga Yosuke, Kuroyanagi Hiroya	4. 巻 27
2. 論文標題 Radiomics Approach Outperforms Diameter Criteria for Predicting Pathological Lateral Lymph Node Metastasis After Neoadjuvant (Chemo)Radiotherapy in Advanced Low Rectal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 4273 ~ 4283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-08974-w	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 Akiyoshi Takashi, Gotoh Osamu, Tanaka Norio, Kiyotani Kazuma, Yamamoto Noriko, Ueno Masashi, Fukunaga Yosuke, Mori Seiichi	4. 巻 70
2. 論文標題 T-cell complexity and density are associated with sensitivity to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with rectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 509 ~ 518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-020-02705-6	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 Hiyoshi Yukiharu, Akiyoshi Takashi, Fukunaga Yosuke	4. 巻 5
2. 論文標題 The advantage of one step nucleic acid amplification for the diagnosis of lymph node metastasis in colorectal cancer patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 60 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12392	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 Akiyoshi T, Tanaka N, Kiyotani K, Gotoh O, Yamamoto N, Oba K, Fukunaga Y, Ueno M, Mori S	4. 巻 106
2. 論文標題 Immunogenomic profiles associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with rectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Br J Surg	6. 最初と最後の頁 1381-1392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bjs.11179	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 Tominaga T, Akiyoshi T, Yamamoto N, Oba K, Nagasaki T, Yamaguchi T, Konishi T, Fukunaga Y, Ueno M	4. 巻 166
2. 論文標題 Prognostic value of metastatic lymph node regression grade after neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 1061-1067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.surg.2019.06.009	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 Suzuki S, Akiyoshi T, Oba K, Otsuka F, Tominaga T, Nagasaki T, Fukunaga Y, Ueno M	4. 巻 27
2. 論文標題 Comprehensive Comparative Analysis of Prognostic Value of Systemic Inflammatory Biomarkers for Patients with Stage II/III Colon Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol	6. 最初と最後の頁 844-852
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-019-07904-9	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 Akiyoshi T, Toda S, Tominaga T, Oba K, Tomizawa K, Hanaoka Y, Nagasaki T, Konishi T, Matoba S, Fukunaga Y, Ueno M, Kuroyanagi H	4. 巻 3
2. 論文標題 Prognostic impact of residual lateral lymph node metastasis after neoadjuvant (chemo)radiotherapy in patients with advanced low rectal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BJS Open	6. 最初と最後の頁 822-829
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bjs5.50194	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 Tominaga T, Akiyoshi T, Yamamoto N, Taguchi S, Mori S, Nagasaki T, Fukunaga Y, Ueno M	4. 巻 14
2. 論文標題 Clinical significance of soluble programmed cell death-1 and soluble programmed cell death-ligand 1 in patients with locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0212978
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0212978	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 Ogura A, Akiyoshi T, Yamamoto N, Kawachi H, Ishikawa Y, Mori S, Oba K, Nagino M, Fukunaga Y, Ueno M	4. 巻 14
2. 論文標題 Pattern of programmed cell death-ligand 1 expression and CD8-positive T-cell infiltration before and after chemoradiotherapy in rectal cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 European Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 11-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejca.2017.12.005	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 -

〔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 秋吉 高志, 村橋 賢, 向井 俊貴, 長崎 寿也, 山口 智弘, 小西 毅, 長山 聡, 上野 雅資, 福長 洋介
2. 発表標題 当院における進行直腸癌に対するwatch and waitの治療成績
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋吉 高志, 森 誠一, 清谷 一馬, 向井 俊貴, 長崎 寿也, 山口 智弘, 小西 毅, 長山 聡, 福長 洋介, 上野 雅資
2. 発表標題 Immunogenomic profiles associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with advanced low rectal cancer
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村橋 賢, 秋吉 高志, 向井 俊貴, 山口 智弘, 長崎 寿矢, 小西 毅, 長山 聡, 上野 雅資, 福長 洋介
2. 発表標題 術前治療を施行した進行直腸癌症例を用いたcirculating tumor DNAと術後再発の関連解析
3. 学会等名 第120回日本外科学会総会定期学術集会
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