

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07469

研究課題名(和文) 微小組織多領域シーケンスによる免疫療法治療抵抗性分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of immunotherapy treatment resistance by microtissue multidisciplinary sequence

研究代表者

林 大久生 (Takuo, Hayashi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：70569128

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)：本研究では、治療効果のみられたがん領域と治療効果のみられなかったがん領域において、550個の発現変動遺伝子(DEG)が確認された。その中で、GO解析の結果、'extracellular matrix organization', 'extracellular structure organization'といったGO termが治療効果のみられたがん領域に優位に濃縮され、KEGG pathway解析では、'Focal adhesion'や'PIK3-AKTシグナル(が優位に濃縮されたパスウェイであった。さらに、免疫治療完全寛解例では、MT-ATP8低発現とMZB1が高発現することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MT-ATP8はミトコンドリアDNAであるが、近年、mtDNAの損傷を感知して核に伝える機構が明らかとなり、放射線や薬剤によるmtDNA損傷がインターフェロン等の免疫応答のドライバーとなる可能性が示され、細胞小器官と核のコミュニケーション機構の解明はがんの新規治療法開発に繋がる可能性が高い。さらに、MZB1は形質細胞様樹状細胞が最も発現し、その他、メモリーB細胞も発現するが、これまで機能が明らかとされていない形質細胞様樹状細胞との免疫応答の解明の先には臓器横断的な免疫治療が成立する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, 550 differential expression genes (DEGs) were identified in the cancerous areas with therapeutic and non-therapeutic effects. Among them, GO terms such as 'extracellular matrix organization' and 'extracellular structure organization' was predominantly concentrated in the cancerous area where the therapeutic effect was observed. In KEGG pathway analysis, 'focal adhesion' and 'PIK3-AKT signaling pathway' were predominantly enriched. In addition, it was shown that MT-ATP8 expression was low and MZB1 expression was high in patients in complete remission with immunotherapy.

研究分野：人体病理

キーワード：肺癌 免疫治療 多領域シーケンス PD-1 PD-L1

1. 研究開始当初の背景

本邦におけるがん死原因一位を占める肺癌の分野では、*EGFR* 遺伝子変異、*ALK* 融合遺伝子が癌発生に直接的に重要な役割を果たすドライバー遺伝子として、分子治療標的になり得ると報告されると、次なる治療標的の同定が急速に進んだ。さらには PD-1 抗体の一次治療を対象とした第 3 相臨床試験 (KEYNOTE-024) の結果、無増悪生存期間、全生存期間にて良好な成績が報告されるに至り、免疫療法を加えた治療標的層別化による個別化医療は保険診療による臨床応用の時代を迎えている。しかしながら、現行の PD-1 抗体の奏効率は 10-30% 程度であり、治療抵抗性を示す患者が多く存在している。その上、高額な薬価に対する医療費高騰は社会問題に発展しており、PD-1 抗体治療抵抗性機序の解明及び、現在用いられている PD-L1 免疫染色より優れた治療効果予測バイオマーカーの早急な開発が望まれる。

これまでに、がんの治療抵抗性の獲得の機序として、再発はがん組織に含まれる抵抗性を示す細胞集団 (サブクローン) が薬剤投与という環境変化に適応するために進化・増殖することが考えられ、再発・治療抵抗性とがんの進化構造には密接な関連性が示されている。がんにおける体細胞変異や遺伝子増幅・欠損を調べるため、次世代シーケンサー (next generation sequencer, NGS) を用いた包括的なプロファイルが実施され、さらに同一患者の腫瘍から複数箇所を無作為に得た試料において塩基配列を解読する多領域シーケンス (multi-region sequencing) とよばれるアプローチにより、がん組織内にはゲノム的に広範な不均一性が存在することが明らかとなった。多領域シーケンスはがん進化研究に応用され、統計科学的なアプローチにより様々な遺伝子異常の組み合わせを有するサブクローンの進化原理が明らかとなりつつあるが、これまでの NGS を用いたがん研究は、がんを構成する細胞集団の平均的なデータ (バルク解析) を提供するが、顕微鏡レベルでの病理組織形態とサブクローン進化構造の対応を示す包括的ゲノムデータは未だ報告が無い。

2. 研究の目的

がん組織内には広範な不均一性が存在することが明らかとなり、従来の多種多様な細胞集団に対するバルク解析では謎であったがん細胞の特性を解き明かす事を目的として単一の細胞に焦点を当てて解析するシングルセル解析が広く認識されているが、がん微小環境における小胞体ストレス応答誘導や exosome の研究により、がん細胞とその周囲の正常細胞からなるがん微小環境の評価が様々な治療に対する抵抗性・感受性の推定と適切な治療法選択につながる可能性が示唆されている。近年、研究分担者の細川 (早稲田大学理工学術院総合研究所) が開発した Automated tissue micro-dissection punching system は直径 50-100 μm の微小组織を正確かつ迅速に採取する事を可能にし、申請者がこれまで行って来た NGS 研究との組み合わせにより、がん組織局所における特異的遺伝子異常の包括的解析が可能となった。そこで、本手法を用いて免疫チェックポイント阻剤薬投与を受けたがん組織の多領域かつ包括的なゲノム解析を行い、がん進化の観点から免疫療法治療抵抗性を示す分子機構の解明を目的に研究を行った。

3 . 研究の方法

順天堂大学医学部附属順天堂医院で手術された症例で、術前に PD-1 抗体治療（ペンブ
ロリズマブ 1 例、ニボルマブ 3 例）を行った肺癌手術検体ホルマリン固定パラフィン
包埋（FFPE）サンプルを用いて多領域シーケンスを行い、がん細胞及びがん微小環境
を含む直径 100 μ m 程度の組織がどのような遺伝子異常・遺伝子発現を示しているかを
包括的に解析する。具体的には、HE 標本をデジタル画像化した後、早稲田大学理工学
術院総合研究所で開発された Automated tissue micro-dissection punching system を用いて
各症例 10 箇所程度、治療効果のみられたがん領域、治療効果の乏しいがん領域、及び
正常肺組織を正確かつ迅速に収集した。得られた試料は核酸抽出、ライブラリー作製し、
全エクソン及び RNA シーケンスを施行した。

4 . 研究成果

術前に PD-1 抗体治療を行った患者の臨床病理学的特徴は、男性 2 例、女性 2 例、平均年齢
は 64 歳、病理学的治療効果判定は、E1a が 3 例、E3(完全寛解)1 例である。治療効果の
みられたがん領域と治療効果のみられなかったがん領域において、550 個の発現変動遺伝子
(DEG)が確認された。その中で、GO 解析の結果、extracellular matrix organization,
extracellular structure organization といった GO term が治療効果のみられたがん領域に
優位に濃縮されていた。また、KEGG pathway 解析では、Focal adhesion や PIK3-AKT シ
グナルが優位に濃縮されたパスウェイであった。

また、免疫治療完全寛解例では、日腫瘍部位で MT-ATP8 低発現と腫瘍部位で MZB1 が
高発現することが示された。MT-ATP8 はミトコンドリア DNA であるが、近年、mtDNA
の損傷を感知して核に伝える機構が明らかとなり、放射線や薬剤による mtDNA 損傷
がインターフェロン等の免疫応答のドライバーとなる可能性が示され、細胞小器官と
核のコミュニケーション機構の解明はがんの新規治療法開発に繋がる可能性が高い。さ
らに、MZB1 は形質細胞様樹状細胞が最も発現し、その他、メモリーB 細胞も発現する
が、これまで機能が明らかとされていない形質細胞様樹状細胞との免疫応答の解明の先
には臓器横断的な免疫治療が成立する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Hayashi Takuo, Takamochi Kazuya, Kohsaka Shinji, Kishikawa Satsuki, Suehara Yoshiyuki, Takahashi Fumiyuki, Suzuki Kenji, Saito Tsuyoshi, Yao Takashi	4. 巻 70
2. 論文標題 Transformation from EGFR/PTEN co mutated lung adenocarcinoma to small cell carcinoma in lymph node metastasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 295 ~ 299
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12919	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 Asahina Miki, Hayashi Takuo, Takamochi Kazuya, Saito Tsuyoshi, Onagi Hiroko, Kishi Monami, Fukumura Yuki, Arakawa Atsushi, Suzuki Kenji, Yao Takashi	4. 巻 477
2. 論文標題 Identification of CTNNB1-PLAG1 gene rearrangement in a patient with pulmonary pleomorphic adenoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 739 ~ 742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-020-02810-y	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 Hayashi Takuo, Kohsaka Shinji, Takamochi Kazuya, Hara Kieko, Kishikawa Satsuki, Sano Kei, Takahashi Fumiyuki, Suehara Yoshiyuki, Saito Tsuyoshi, Takahashi Kazuhisa, Suzuki Kenji, Yao Takashi	4. 巻 103
2. 論文標題 Clinicopathological characteristics of lung adenocarcinoma with compound EGFR mutations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Pathology	6. 最初と最後の頁 42 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.humpath.2020.07.007	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 Kishikawa Satsuki, Hayashi Takuo, Saito Tsuyoshi, Takamochi Kazuya, Kohsaka Shinji, Sano Kei, Sasahara Noriko, Sasa Keita, Kurihara Taisei, Hara Kieko, Suehara Yoshiyuki, Takahashi Fumiyuki, Suzuki Kenji, Yao Takashi	4. 巻 34
2. 論文標題 Diffuse expression of MUC6 defines a distinct clinicopathological subset of pulmonary invasive mucinous adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Modern Pathology	6. 最初と最後の頁 786 ~ 797
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41379-020-00690-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 Hayashi Takuo, Kohsaka Shinji, Takamochi Kazuya, Kishikawa Satsuki, Ikarashi Daiki, Sano Kei, Hara Kieko, Onagi Hiroko, Suehara Yoshiyuki, Takahashi Fumiyuki, Saito Tsuyoshi, Nakatsura Tetsuya, Kitano Shigehisa, Suzuki Kenji, Yao Takashi	4. 巻 78
2. 論文標題 Histological characteristics of lung adenocarcinoma with uncommon actionable alterations: special emphasis on MET exon 14 skipping alterations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 987-999
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/his.14311	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 Sano Kei, Hayashi Takuo, Suehara Yoshiyuki, Hosoya Masaki, Takamochi Kazuya, Kohsaka Shinji, Kishikawa Satsuki, Kishi Monami, Saito Satomi, Takahashi Fumiyuki, Kaneko Kazuo, Suzuki Kenji, Yao Takashi, Ishijima Muneaki, Saito Tsuyoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Transcription start site level expression of thyroid transcription factor 1 isoforms in lung adenocarcinoma and its clinicopathological significance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology: Clinical Research	6. 最初と最後の頁 361 ~ 374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cjp2.213	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 Kishikawa Satsuki, Hayashi Takuo, Saito Tsuyoshi, Takamochi Kazuya, Sasa Keita, Suehara Yoshiyuki, Takahashi Fumiyuki, Sasahara Noriko, Kohsaka Shinji, Suzuki Kenji, Yao Takashi	4. 巻 480
2. 論文標題 Distinct properties of pure- and mixed-type high-grade fetal lung adenocarcinomas by genetic profiling and transcription factor expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 609 ~ 619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-021-03247-7	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	高持 一矢 (Takamochi Kazuya) (30397369)	順天堂大学・医学部・先任准教授 (32620)	
研究分担者	細川 正人 (Hosokawa Masato) (60722981)	早稲田大学・理工学術院・准教授(任期付) (32689)	
研究分担者	末原 義之 (Suehara Yoshiyuki) (70509405)	順天堂大学・医学部・客員教授 (32620)	
研究分担者	齋藤 剛 (Saito Tsuyoshi) (80439736)	順天堂大学・医学部・准教授 (32620)	

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