

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09161

研究課題名(和文)非EBV非MSI-high食道胃接合部腺癌の免疫回避機構解明と新規免疫治療の開発

研究課題名(英文)Molecular mechanism and novel target of diffuse histological type of non-EBV/non-MSI-H esophagogastric junction adenocarcinoma

研究代表者

井田 智 (IDA, Satoshi)

公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・医長

研究者番号：80583038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：上部消化管腺癌におけるTregとCTLのバランス(FOXP3/CD8比)と腫瘍の悪性度を、組織型(びまん型、分化型)別に検討を行った。FOXP3/CD8比の高群と低群を比較検討した結果、pStage I-III (N=250)のびまん型においてのみ、高群は有意に予後不良であった(疾患特異別5年生存率、高群57.1%、低群88.9%、P=0.0096)。この結果は、多変量解析でも同様であった。なお、このような現象は腫瘍内部においては確認できなかった。つまり、食道胃接合部腺癌のびまん型は浸潤部のFOXP3+細胞がCD8+細胞より多く、再発を来たしやすく癌死するリスクが高い、ということを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上部消化管腺癌での制御性T細胞(Treg)と細胞傷害性T細胞(CTL)のバランス(FOXP3+細胞数/CD8+細胞数=FOXP3/CD8比)が悪性度と関与しているのではないかと、という仮説を検証し、また組織型別に比較することにより、腫瘍組織型ごとの免疫回避機構のメカニズムを解明することができる。腫瘍免疫微小環境の理解は、有望な治療体系である免疫治療へ発展することができる。

研究成果の概要(英文)：In esophagogastric junction (EGJ) adenocarcinoma, high FOXP3/CD8 ratio was associated with unfavorable prognosis on cancer-specific survival (CSS) and time to recurrence survivals (TTR) in pStage I-III cases of diffuse type (P = 0.0096, P = 0.018, respectively). In addition, High FOXP3/CD8 ratio was one of the independent poor prognostic factors in diffuse type. The prognostic impact of FOXP3/CD8 ratio was significantly different between diffuse type and intestinal type. Clinical impact of FOXP3/CD8 ratio was different according to the histological type of EGJ adenocarcinoma.

研究分野：上部消化管外科学

キーワード：食道胃接合部腺癌 免疫回避機構 腫瘍組織型 制御性T細胞 細胞傷害性T細胞

## 1. 研究開始当初の背景

食道胃接合部腺癌では4つのMolecular subtype分類が提唱されている[ Epstein-Barr virus(EBV) 関連、 Microsatellite instability(MSI)-high、 Genomically stable (GS)、 Chromosomal instability(CIN)]。EBV 関連腫瘍や MSI-high では PD1-PDL1 を介した免疫回避機構が解明されその治療法が確立されたが、食道胃接合部腺癌の約90%と大多数を占める および (以下、非EBV 非 MSI-high 腫瘍)においては明らかではない。

上部消化管腺癌の組織型はびまん型(diffuse型)と分化型(intestinal型)に大別され、特にdiffuse型では間質の増生が顕著であり、両者における腫瘍浸潤リンパ球数は異なるなど腫瘍間質により免疫微小環境が異なることが指摘されている<sup>1) 2)</sup>。腫瘍免疫微小環境におけるT細胞には細胞傷害性T細胞(Cytotoxic T lymphocyte, CTL)、ヘルパーT細胞、制御性T細胞(regulatory T細胞, Treg)などの様々なサブセットが存在し、この中でも制御性T細胞は主として転写因子FOXP3によって制御され、CTLを抑制する腫瘍免疫回避機構として重要である。しかしながら、腫瘍組織型と制御性T細胞の関係性は十分に検討されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、非EBV 非 MSI-high の食道胃接合部腺癌での複数の免疫分子の免疫組織学的評価を行い、両者の統合解析から本腫瘍における主要な免疫回避機構を解明し、新規免疫治療法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

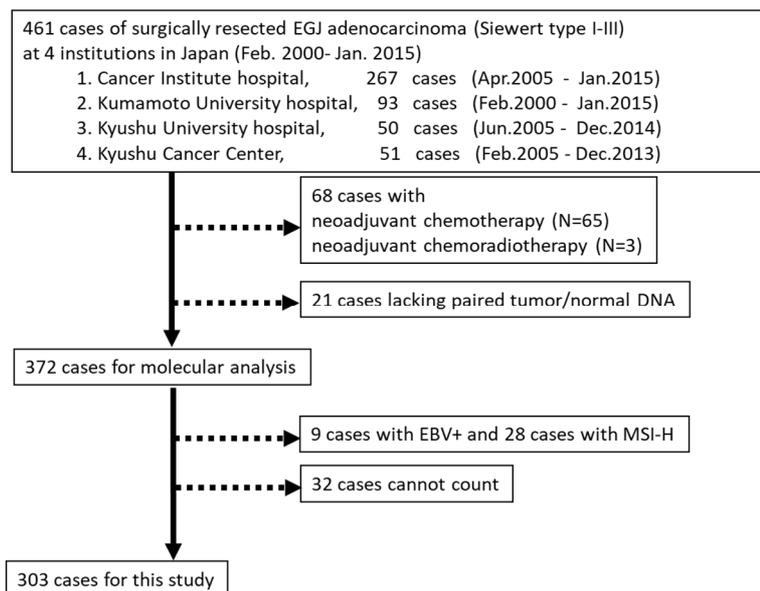
CD8 および FOXP3 の免疫染色が可能であった国内多施設からの Non-EBV/non-MSI-H の食道胃接合部腺癌(N=303)を対象とした。ホルマリン包埋連続切片を自動免疫染色機で染色し、CD8+細胞およびFOXP3+細胞の数を、腫瘍内部と浸潤部のそれぞれにおいて3箇所、デジタル画像を使って測定した。腫瘍内部と浸潤部それぞれのFOXP3+/CD8+比を算出し、中央値で高群・低群に分け、悪性度の指標としては疾患特異的予後との比較検討を、メカニズム解明には選択的メチル化解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) Non-EBV/non-MSI-H 症例の選択

本研究の症例選択を図1に示す。解析対象とした372症例のうち、EBV陽性が9症例、MSI-Hが28症例であった。さらに、CD8 および FOXP3 の免疫染色を行った結果、腫瘍内と浸潤部の判別が難しいpT1aの症例(N=16)、薄切状態の不良(N=10)、組織が小さく(N=4)、もしくは大きく(N=2)、スライドガラス上で十分なhotspotを選択できなかった32症例を除外し、最終的にFOXP3+細胞数およびCD8+細胞数のカウント可能であったのは303症例であった。

<図1. 本研究の症例選択>

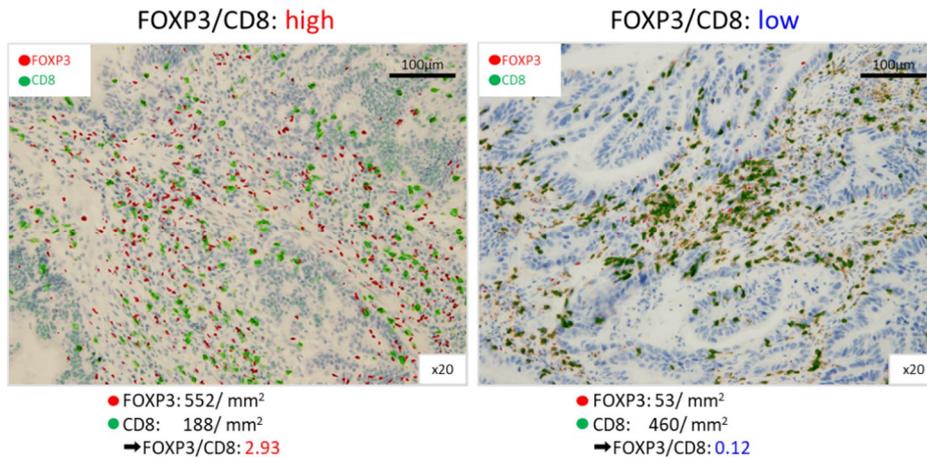


解析には、腫瘍内または浸潤部 hotspot 3 点のカウント数の平均値を使用して FOXP3 + 細胞数/CD8 + 細胞数比 (以下、FOXP3/CD8 比と称す) を算出し、腫瘍内および浸潤部のそれぞれの中央値で二分し、高・低群として解析に用いた。

(2) 接合部腺癌における FOXP3/CD8 比の算出

FOXP3 および CD8 の免疫染色状況とそれぞれの陽性細胞数カウント状況を図 2 に示す。腫瘍内および浸潤部の FOXP3/CD8 比の中央値を算出し、腫瘍内では 0.60、浸潤部では 0.48 であった。腫瘍内および浸潤部の解析において、それぞれの中央値で高群と低群に二分し、解析を行うこととした。

<図 2. 免疫染色による FOXP3 + (赤)/CD8 + (緑) 比の高群(左)・低群(右)の代表例>



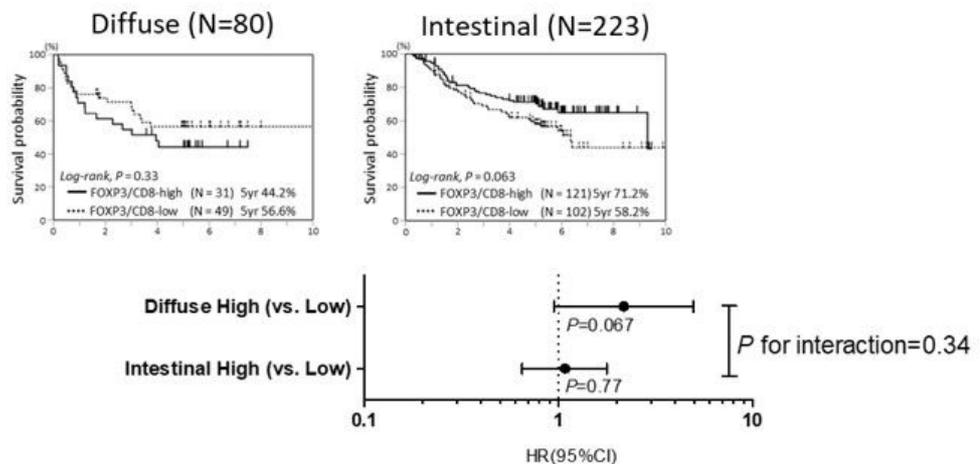
(3) 腫瘍部および浸潤部における FOXP3/CD8 比高群・低群別の予後解析

浸潤部または腫瘍内のそれぞれにおいて、組織型 [びまん型 (diffuse 型) および分化型 (intestinal 型)] 別に FOXP3/CD8 比の予後に及ぼす影響を、疾患特異的な生存曲線と生存多変量解析を用いて検討した。

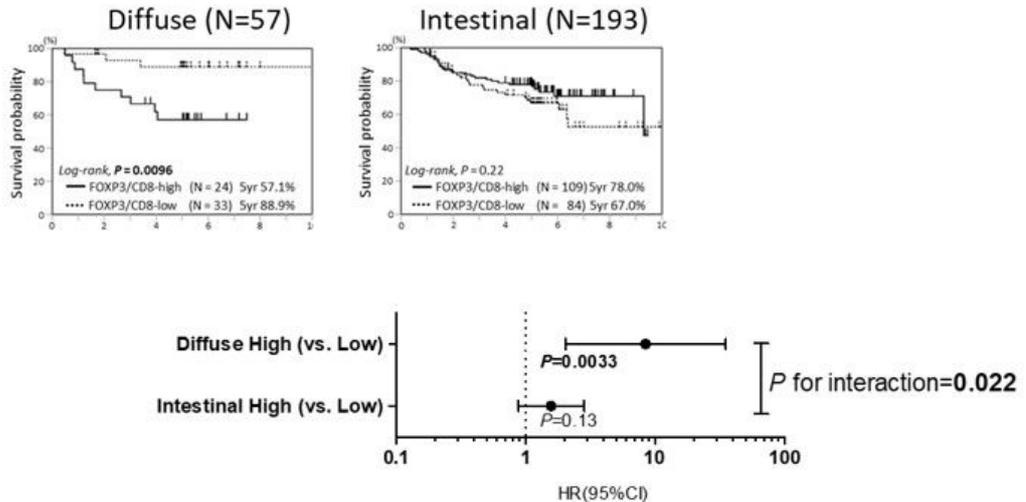
浸潤部において FOXP3/CD8 比の高群と低群を比較検討したところ、pStage I-IV (N=303) の解析 (図 3a) では、組織型の違いに関わらず FOXP3/CD8 比と予後との相関は認められなかった。しかしながら、pStage I-III (N=250) での解析 (図 3b) では、びまん型と分化型において、FOXP3/CD8 比の予後に与える影響は顕著に異なり、びまん型においてのみ、FOXP3/CD8 比高群は有意に予後不良であった (疾患特異別 5 年生存率、高群 57.1%、低群 88.9%、 $P = 0.0096$ )。この結果は、多変量解析でも同様であった [びまん型における FOXP3/CD8 比高群、リスク比 (Hazard ratio, HR) 8.47、95% 信頼区間 (confidence interval, CI), 2.04-35.19 ],  $P = 0.0033$ 。さらに、この FOXP3/CD8 比と組織型の予後に及ぼす交互作用は、有意に相関した ( $P$  for interaction = 0.022)。なお、このような現象は腫瘍内部においては確認できず、浸潤部特有の現象であった。

<図 3. 浸潤部 FOXP3/CD8 比 [高群(High)および低群(Low)]の疾患特異的予後との関連;組織型 [びまん型および分化型]別の生存解析>

a) EGJ-cancer-specific, pStage I-IV (N=303)



b) EGI-cancer-specific, pStage I-III (N=250)



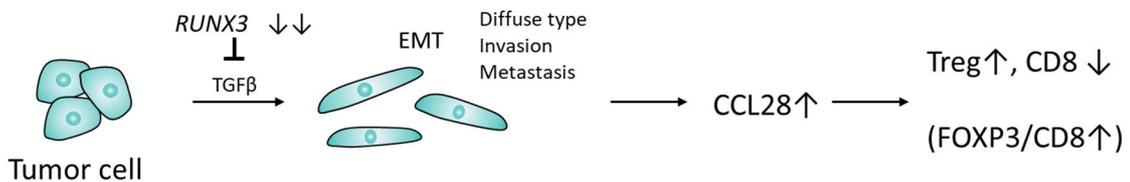
すなわち、食道胃接合部腺癌においては、びまん型において、浸潤部の FOXP3 + 細胞の割合が CD8 + 細胞の割合より多い腫瘍免疫微小環境は、再発を来たしやすく癌死するリスクが高い、ということを示している。

(4) FOXP3/CD8 比のメカニズムの解明

この様なびまん型腫瘍における FOXP3/CD8 比が高くなるメカニズムを、消化管腺癌の代表的な 11 個の CpG アイランドメチル化形質(CpG island methylator phenotype, CIMP) マーカーのメチル化の観点から検討した。その中で、RUNX3 の高メチル化が有意に FOXP3/CD8 比が上昇していた ( $P=0.010$ )。RUNX3 は TGF- $\beta$  や Wnt シグナル系を抑制することで、正常上皮細胞の上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) の抑制や、腫瘍前駆細胞への変化を抑制すると考えられているが、RUNX3 のメチル化により、これらの抑制が解除され、びまん型の組織型の胃がんの発がんに関与することが示唆されている<sup>3)</sup>。そこで、RUNX3 メチル化異常を伴うびまん型腫瘍細胞が、何らかのケモカインやケモカインレセプターを介して腫瘍免疫微小環境におけるリンパ球数に影響を及ぼし、その結果 FOXP3/CD8 比が高くなるのではないかと考えた。これを検討するため、TCGA のパブリックデータを用いて、RUNX3 低発現状況と相関する 39 種類のケモカインリガンドと 18 種類のケモカインレセプターの遺伝子発現状況を検索したところ、CCL28 高発現のみが相関傾向を示した ( $P=0.088$ )。さらに、この傾向は pStage I-IV (N=64) で有意であった ( $P=0.014$ )。CCL28 に関しては、過去の文献によると、低酸素下の状況で腫瘍辺縁に FOXP3 + 細胞をリクルートすると報告されており、本研究での減少を説明するメカニズムの一因となりうる (図 4)。

従って、Non-EBV / non-MSI-H の食道胃接合部腺癌中でも、RUNX3 メチル化によって発がんするびまん型腫瘍の腫瘍免疫微小環境では、CCL28 の高発現を介した FOXP3 + 細胞に代表される制御性 T 細胞の誘導と、それによる CD8 + 細胞の抑制を引き起こしていることが、宿主からの抗腫瘍免疫を回避メカニズムであり、予後不良となる一因であることが示唆された<sup>4)</sup>。

<図 4. Non-EBV/nonMSI-H 食道胃接合部腺癌のびまん型における抗腫瘍免疫回避メカニズム>



このような腫瘍の新たな治療戦略としては、制御性 T 細胞の作用を抑制する、もしくは腫瘍浸潤部への遊走そのものを抑制することが有効と考えられる。制御性 T 細胞は恒常的 CTLA-4 を発現して抗原提示樹状細胞の働きを抑制するとされているおり、抗 CTLA-4 抗体は抗体依存性細胞傷害 (antibody dependent cellular cytotoxicity, ADCC) 活性により腫瘍組織から制御性 T 細胞を除去することが可能と考えられている<sup>5)</sup>。従って本研究により、Non-EBV / non-MSI-H の食道胃接合部腺癌中でも、RUNX3 のメチル化によって発がんするびまん型腫瘍では、抗 CTLA-4 抗体の有効性が示唆された。

<引用文献>

- 1) Kim TS, da Silva E, Coit DG, Tang LH. Intratumoral Immune Response to Gastric Cancer Varies by Molecular and Histologic Subtype. *Am J Surg Pathol* 2019; 43: 851-860.
- 2) Pernot S, Terme M, Radosevic-Robin N, Castan F, Badoual C, Marcheteau E, et al. Infiltrating and peripheral immune cell analysis in advanced gastric cancer according to the Lauren classification and its prognostic significance. *Gastric Cancer* 2020; 23: 73-81.
- 3) Voon DC, Wang H, Koo JK, Nguyen TA, Hor YT, Chu YS, et al. Runx3 protects gastric epithelial cells against epithelial-mesenchymal transition-induced cellular plasticity and tumorigenicity. *Stem Cells* 2012; 30: 2088-99.
- 4) Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang LP, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* 2011; 475: 226-30.
- 5) Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008; 322: 271-5.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 4件）

1. 著者名 Kano Yosuke, Ohashi Manabu, Ida Satoshi, Kumagai Koshi, Makuuchi Rie, Sano Takeshi, Hiki Naoki, Nunobe Souya	4. 巻 23
2. 論文標題 Therapeutic value of splenectomy to dissect splenic hilar lymph nodes for type 4 gastric cancer involving the greater curvature, compared with other types	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 927 ~ 936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-020-01072-6	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 Takahashi Ryo, Nunobe Souya, Makuuchi Rie, Ida Satoshi, Kumagai Koshi, Ohashi Manabu, Sano Takeshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Survival outcomes of elderly patients with pathological stages II and III gastric cancer following curative gastrectomy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Gastroenterological Surgery	6. 最初と最後の頁 433 ~ 440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ags3.12339	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 Yagi Shusuke, Nunobe Souya, Makuuchi Rie, Ida Satoshi, Kumagai Koshi, Ohashi Manabu, Sano Takeshi	4. 巻 406
2. 論文標題 Oncological outcomes in patients with pT1N0?3 or pT2?3N0 gastric cancer after curative resection without adjuvant chemotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Langenbeck's Archives of Surgery	6. 最初と最後の頁 419 ~ 426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00423-021-02084-1	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 Kumagai Koshi, Hiki Naoki, Nunobe Souya, Jiang Xiaohua, Makuuchi Rie, Ida Satoshi, Ohashi Manabu, Yamaguchi Toshiharu, Sano Takeshi	4. 巻 35
2. 論文標題 Intraoperative conversion from laparoscopic gastrectomy to an open procedure: a decade of experience in a Japanese high-volume center	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgical Endoscopy	6. 最初と最後の頁 1834 ~ 1842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00464-020-07584-7	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 Takahashi Ryo, Nunobe Souya, Osumi Hiroki, Takahari Daisuke, Yamamoto Noriko, Ida Satoshi, Kumagai Koshi, Ohashi Manabu, Sano Takeshi, Hiki Naoki	4. 巻 50
2. 論文標題 Clinical outcomes of radical gastrectomy following trastuzumab-based chemotherapy for stage IV HER2-positive gastric or gastroesophageal junction cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 1240 ~ 1248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-020-02011-9	査読の有無 無
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 Matsuda Tatsuo, Ohashi Manabu, Tsujiura Masahiro, Ida Satoshi, Kumagai Koshi, Nunobe Souya, Sano Takeshi, Hiki Naoki	4. 巻 27
2. 論文標題 Shorter Survival of Patients with Upper-Third Gastric Cancer Preoperatively Diagnosed as Stage IA Compared with Those with Middle to Lower Lesions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 276 ~ 283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-019-07782-1	査読の有無 無
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 Takahashi R, Ohashi M, Hiki N, Makuuchi R, Ida S, Kumagai K, Sano T, Nunobe S	4. 巻 -
2. 論文標題 Risk factors and prognosis of gastric stasis, a crucial problem after laparoscopic pylorus-preserving gastrectomy for early middle-third gastric cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-019-01037-4	査読の有無 無
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 1件）

1. 発表者名 井田智、熊谷 厚志、幕内 梨恵、大橋 学、佐野 武、布部 創也
2. 発表標題 胃切除術後の早期運動および栄養介入が術後骨格筋量の変化に及ぼす影響
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 井田智、李 基成、幕内 梨恵、熊谷 厚志、大橋 学、佐野 武、布部 創也
2. 発表標題 胃切除術後の術式ごとの血糖変動とダンピング症状の発生との関連
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 Daisuke Takahari, Manabu Ohashi, Atsuo Takashima, Takuro Mizukami, Naoki Ishizuka, Hitoshi Katai, Shinya Mikami, Takeru Wakatsuki, Keisho Chin, Satoshi Ida, Koshi Kumagai, Souya Nunobe, Satoru Iwasa, Miki Ito, Takeyuki Wada, Yukinori Yamagata, Takashi Ogura, Takeshi Sano, Narikazu Boku, Kensei Yamaguchi
2. 発表標題 Feasibility study of TAS-118 plus oxaliplatin as perioperative chemotherapy for patients with locally advanced gastric cancer (APOLLO-11).
3. 学会等名 Gastrointestinal Cancers Symposium, ASCO GI 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井田智、Jiang Xiaohua、熊谷厚志、布部創也、大橋学、佐野武、比企直樹
2. 発表標題 腹腔鏡下胃切除術後膵液漏を避けるための膵臓を圧迫しない術野展開
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井田智、大橋拓馬、熊谷厚志、布部創也、大橋学、佐野武、比企直樹
2. 発表標題 胃切除後早期筋肉量減少を抑える取り組み
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井田智、李基成、幕内梨恵、熊谷厚志、大橋学、佐野武、布部創也
2. 発表標題 胃切除術後の血糖変動とダンピング症状発生との関連
3. 学会等名 第92回日本胃癌学会総会
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
研究分担者	高松 学  (TAKAMATSU Manabu)  (00750366)	公益財団法人がん研究会・有明病院 病理部・医員   (72602)	
研究分担者	森 誠一  (MORI Seiichi)  (10334814)	公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター 次世代がん研究シーズ育成プロジェクト・プロジェクトリーダー   (72602)	
研究分担者	今村 裕  (IMAMURA Yu)  (70583045)	公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・医長   (72602)	
研究分担者	渡邊 雅之  (WATANABE Masayuki)  (80254639)	公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・部長   (72602)	

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
---------	---------