

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09220

研究課題名（和文）肝内胆管癌のゲノム進化様式と微小環境解析に基づく免疫療法に対する感受性予測の検討

研究課題名（英文）Understanding of the genomic evolution and cancer microenvironment to identify a susceptible marker to immune therapy for IHCC.

研究代表者

江口 英利 (Eguchi, Hidetoshi)

九州大学・大学病院・特別教員

研究者番号：90527756

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）：肝内胆管がん（ICC）は治療抵抗性で予後不良な疾患である。ICCのゲノム変異は症例間多様性が大きいことも難治の原因であり、標的抗原を特定することなく高い抗腫瘍効果をもたらすICIを中心とした免疫療法への期待が大きい。まずはICCに関する腫瘍免疫応答機構に関する理解を深める。ICC10例の予後と腫瘍免疫応答関連遺伝子との関係性を解析したところサイトカイン関連遺伝子pathwayなどが予後増悪因子として同定された。さらにCytolytic activityに関連する遺伝子群が無再発群で有意に過剰発現を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高い悪性度にも関わらず有効な治療法の乏しい肝内胆管がんは喫緊の社会問題の一つである。新たな治療法が期待される社会においてゲノム医療による個別ゲノム変異に対する適合化合物の同定が期待される。しかしTCGAなどpublic databaseでは特に創薬に繋がる変異は乏しいことも明らかである。したがってICIを基軸とする免疫療法は高い期待が寄せられている。本研究では腫瘍免疫賦活化に関連する遺伝子群が無再発群で有意に過剰発現を認めたことから免疫療法の適応する意義が再確認された。

研究成果の概要（英文）：ICC is recognized as a treatment-resistant disease rendering a poor prognosis. Inter-tumor heterogeneity in the genome profile of ICC confers intractable traits. High expectations for immunotherapy centered on ICI provide high anti-tumor efficacy without identifying target antigens. At first, we will comprehend the tumor immune response system in ICC. Then, we analyzed the prognostic magnitude of tumor immune-response-related genes in 10 cases of ICC and identified cytokine pathways as a poor prognosis-related factor. In addition, cytolytic activity-associated genes were abundantly observed in non-recurrence ICC cases.

研究分野：消化器外科

キーワード：腫瘍免疫応答 症例間多様性 Cytokine NK活性 CYT

## 1. 研究開始当初の背景

肝内胆管がん (ICC) は、肝発生悪性腫瘍の中で 2 番目に多いタイプで、原発性肝がんの約 15% を占める。過去数十年にわたり ICC の罹患率は着実に増加している。外科的切除が第一選択の治療法だが ICC 患者のほとんどは治療抵抗性で残念な転帰を辿る。化学療法や放射線療法などの一般的な治療法は余り有効ではないことから、新しい治療戦略を開発するためには、ICC の病態と腫瘍内免疫を理解することが必要である。

一方、がん研究において、腫瘍内・腫瘍間の不均一性はますます注目されている。がんの発生と進行の過程で、腫瘍内不均一性 (ITH) はがんの診断と治療を複雑にしている。近年、ゲノム解析によ、ICC の遺伝子状況が得られている。個別化治療の治療戦略は数多くあるが、これまでのところ、標準化学療法による従来の治療と比較して、生存率の改善を示すことができたのはごくわずかである。これまでに報告された IDH、KRAS、TP53 などのドライバー遺伝子の分類は、シングルサンプリングに基づくものであった。しかし、これらの研究では、ICC の個々の症例における膨大な腫瘍間異質性の重要性は解明されていない。また、腫瘍免疫応答に関する知見は不十分であり、これからの解析が求められている。

## 2. 研究の目的

ICC における腫瘍免疫応答寛容を誘導する代謝産物及び遺伝子群を明らかにするため、ICC 10 例に対して、各切除組織の癌部より 3-9 ヶ所、非癌部より 1 ヶ所の合計 74 検体を採取し、それぞれの検体に対して Whole Exome Sequence ( 遺伝子変異解析、 Spectrum 解析、 コピー数解析 ) RNA sequence ( 遺伝子発現解析、 fusion gene の解析 ) プロテオーム解析、代謝産物の測定によるメタボローム解析による数理的統合解析を行った。その結果、440 種類の免疫関連細胞関連分子の胆管癌症例における発現プロファイルを得た。近年、次世代シーケンサーなどの技術革新により標的分子が明確化され高い抗腫瘍効果が期待できる様になったが、特に肝内胆管がんは極めて高い悪性度にも拘わらず近年増加傾向にあることから、本研究により肝内胆管がんにおける進化と腫瘍免疫応答の理解を深めたい。

ICC のゲノム変異は症例間多様性が大きく、標的抗原を特定することなく高い抗腫瘍効果をもたらす ICI を中心とした免疫療法への期待が大きい。まずは ICC に対する免疫療法の適応を伺うために腫瘍免疫応答に関する理解を深める。

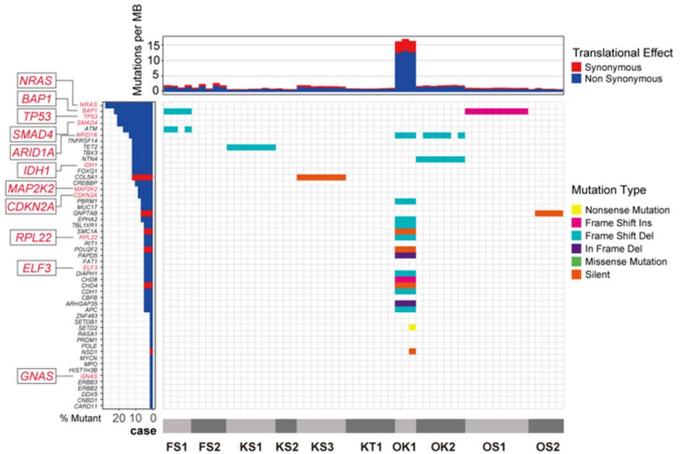
## 3. 研究の方法

- 1) 肝内胆管がんの進化系統樹：肝内胆管がん 10 例より ( 原発巣よりまんべんなく各 4 カ所採取 ) LMD にてがん組織およびがん間質を採取する ( がん周囲間質も含む ) ( 研究代表者担当 )。ゲノム DNA 抽出を行い、全エキソン解析 (SNV) を実施する。また HLA 発現レベルを勘案したパイプライン Neoantimon において、進化系統樹を考慮した NAG アルゴリズムを開発する。
- 2) 肝内胆管がんの腫瘍免疫応答の評価：Bidea らは癌組織由来の RNA Seq 解析の結果より腫瘍免疫応答関連分子を抽出し包括的網羅的に腫瘍免疫応答を評価した (Immunity 39, 782-795, 2013)。本疾患においても、マルチサンプル検体について total RNA 抽出を実施し、RNA Seq 解析を実施した。各検体におけるゲノム進化や多様性に伴う腫瘍免疫応答について包括的に評価

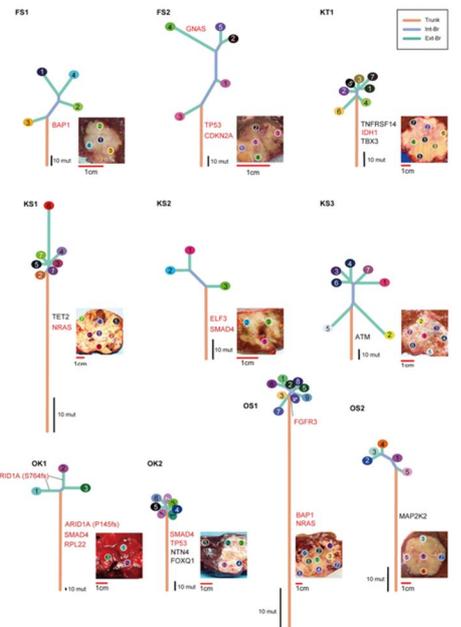
する。

#### 4. 研究成果

1)肝内胆管癌 10 例では、SMAD4 (3 例で変異) BAP1 (2 例) NRAS (2 例) TP53 (2 例) ELF3 (1 例) CDKN2A (1 例) FGFR3 (1 例) GNAS (1 例) IDH1 (1 例) PIK3CA (1 例) および RPL22 (1 例) など既知の胆道癌ドライバー遺伝子に多数突然変異を認めた。この肝内胆管癌について、我々の多領域シーケンスデータに Treeomics アルゴリズムを用いて進化系統樹を構築した。すべての樹は長い幹と短い枝からなる「ヤシの木」のような形をした中立進化型であった。これは進行大腸がん病変によく見られた。各腫瘍の進化を調べるために、進化ツリーに沿って機能



変異の可能性のある既知のドライバー変異をマッピングした。症例ごとに異なるドライバー遺伝子を持つ肝内胆管癌は、腫瘍のステージに関係なく中立的な進化系統樹を持ち、がん進化樹をクラスタリングすると、系統樹のこれらのパターンと臨床病理学的因子とは全く無関係であった。ゲノムレベルの症例間多様性が大きく、治療標的はオミックス解析に委ねるべきであると考えられた。



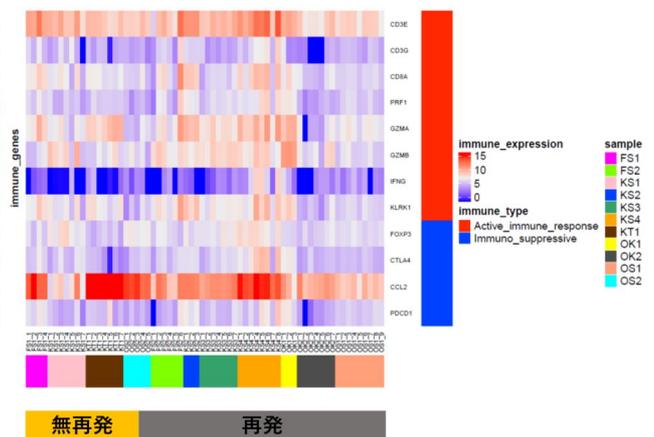
#### 2) ICC における腫瘍免疫応答関連細胞に関する分布

10 例について遺伝子発現プロファイルに基づいて微小環境関連の細胞を特定した。各症例における細胞の分布を示す。図の如く、特に症例毎に細胞プロファイルに特徴を認めなかった。

次に各症例の予後と腫瘍免疫応答関連遺伝子との関係性について pathway 解析を実施した。その結果、Cytokine-cytokine receptor interaction 9 (CCR9, CXCL5, CCR3, CCR2, CXCR6, IFNG, TNFRSF17, IL5RA, XCL2)、

	p value	qvalue
CD3E	0.9574054	0.959914
CD3G	0.6593085	0.753124
CD8A	0.6116451	0.715540
PRF1	0.0401649	0.091138
GZMA	0.4539682	0.579412
GZMB	0.0164205	0.045782
IFNG	0.0165776	0.045967
KLRK1	0.4361310	0.562364
FOXP3	0.9149303	0.932167
CTLA4	0.0850025	0.164287
CCL2	0.6116451	0.715574
PDCD1	0.4620921	0.586439

Natural killer cell mediated cytotoxicity (RF1, KIR2DS5, IFNG, KIR2DS1, GZMB)、Chemokine signaling pathway(CCR9, CXCL5, CCR3, CCR2, CXCR6, XCL2, AKT3) において有意に相関が認められた。さらに再発の有無で 2 群に分けて、発現プロファイルヒートマップに描いたところ、図のごとく



Cytolytic activity (腫瘍免疫賦活化) に関連する遺伝子群が無再発群で有意に過剰発現を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ito S, Masuda T, Noda M, Hu Q, Shimizu D, Kuroda Y, Eguchi H, Tobo T, Utsunomiya T, Mimori K.	4. 巻 98(7)
2. 論文標題 Prognostic Significance of PD-1, PD-L1 and CD8 Gene Expression Levels in Gastric Cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology.	6. 最初と最後の頁 501-511
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000506075.	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 Nambara S, Masuda T, Kobayashi Y, Sato K, Tobo T, Koike K, Noda M, Ogawa Y, Kuroda Y, Ito S, Eguchi H, Sugimachi K, Mimori K.	4. 巻 111(2)
2. 論文標題 GTF2IRD1 on chromosome 7 is a novel oncogene regulating the tumor-suppressor gene TGF R2 in colorectal cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 343-355
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14248.	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 Sato K, Masuda T, Hu Q, Tobo T, Gillaspie S, Niida A, Thornton M, Kuroda Y, Eguchi H, Nakagawa T, Asano K, Mimori K.	4. 巻 44
2. 論文標題 Novel oncogene 5MP1 reprograms c-Myc translation initiation to drive malignant phenotypes in colorectal cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EBioMedicine.	6. 最初と最後の頁 387-402
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2019.05.058.	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 Hayashi N, Kuroda Y, Saito T, Tsuruda Y, Niida A, Otsu H, Eguchi H, Masuda T, Suzuki Y, Natsugoe S, Mimori K.	4. 巻 49(9)
2. 論文標題 A clinical trial of somatic and germline analyses for healthy longevity in a postoperative cancer patient.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surg Today.	6. 最初と最後の頁 738-747
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-019-01789-7.	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 Kouyama Y, Masuda T, Fujii A, Ogawa Y, Sato K, Tobo T, Wakiyama H, Yoshikawa Y, Noda M, Tsuruda Y, Kuroda Y, Eguchi H, Ishida F, Kudo SE, Mimori K.	4. 巻 110(10)
2. 論文標題 Oncogenic splicing abnormalities induced by DEAD-Box Helicase 56 amplification in colorectal cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 3132-3144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14163.	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 -

〔学会発表〕 計21件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Kensuke Koike, Takaaki Masuda, Kuniaki Sato, Yushi Motomura, Junuchi Takahashi, Dai Shimizu, Shotaro Kuramitsu, Atsushi Fujii, Akihiro Kitagawa, Miwa Noda, Yusuke Tsuruda, Hajime Otsu, Yousuke Kuroda, Hidetoshi Eguchi, Takashi Nakagawa, Koshi Mimori.
2. 発表標題 Clinical significance of GET4 expression in colorectal cancer.
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Junichi Takahashi, Takaaki Masuda, Yosuke Kuroda, Akihiro Kitagawa, Yushi Motomura, Kensuke Koike, Dai Shimizu, Shotaro Kuramitsu, Atsushi Fujii, Miwa Noda, Kuniaki Sato, Yusuke Tsuruda, Hajime Otsu, Hidetoshi Eguchi, Keishi Sugimachi, Masaki Mori, Koshi Mimori.
2. 発表標題 Clinical significance of Fanconi anemia complementation group E (FANCE) DNA repair-related gene expression in hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yushi Motomura, Takaaki Masuda, Kuniaki Sato, Atsushi Fujii, Akihiro Kitagawa, Hiroaki Wakiyama, Kensuke Koike, Junichi Takahashi, Dai Shimizu, Shotaro Kuramitsu, Miwa Noda, Yusuke Tsuruda, Hajime Otsu, Yosuke Kuroda, Hidetoshi Eguchi, Katsumi Sakamoto, Msakazu Hirakawa, Hiroshi Honda, Koshi Mimori.
2. 発表標題 Clinical significance of eif5 mimic protein 1 in pancreatic cancer.
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北川彰洋、増田隆明、高橋純一、倉光正太郎、藤井昌志、清水大、吉川幸宏、野田美和、鶴田祐介、大津甫、黒田陽介、江口英利、江口英利、森正樹、土岐祐一郎、三森功士
2. 発表標題 肝細胞癌における細胞内輸送関連遺伝子KIF15発現の微小環境での発現意義の探求
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 江口英利、高橋純一、北川彰洋、倉光正太郎、清水大、藤井昌志、野田美和、吉川幸宏、鶴田祐介、大津甫、黒田陽介、増田隆明、三森功士
2. 発表標題 大腸癌における7番染色体上のドライバー遺伝子RNF32の同定
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 倉光正太郎、増田隆明、胡慶江、高橋純一、清水大、藤井昌志、北川彰洋、吉川幸宏、野田美和、鶴田祐介、大津甫、黒田陽介、江口英利、佐伯浩司、沖英次、吉住朋晴、三森功士
2. 発表標題 腹膜播種関連遺伝子としてのSpondin2の同定とその臨床的意義
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 大津甫、南原翔、胡慶江、高橋純一、倉光正太郎、藤井昌志、北川彰洋、吉川幸宏、野田美和、清水大、鶴田祐介、黒田陽介、江口英利、増田隆明、三森功士
2. 発表標題 血液中microRNAプロファイリングにより同定されたMicroRNA-196b-3plは、早期胃癌、前癌病変に対する診断バイオマーカーとなり得る
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 鶴田祐介、増田隆明、野田美和、清水大、吉川幸宏、倉光正太郎、藤井昌志、北川彰洋、高橋純一、大津甫、黒田陽介、江口英利、夏越祥次、三森功士
2. 発表標題 末梢血中pre-miR-488発現の胃癌予後予測因子としての有用性
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 藤井昌志、増田隆明、倉光正太郎、北川彰洋、清水大、吉川幸宏、野田美和、胡慶江、鶴田祐介、黒田陽介、伊藤修平、江口英利、大塚隆生、中村雅史、三森功士
2. 発表標題 肺癌関連遺伝子ASAP2(ArfGAP with SH3 domain, ankyrin repeat and PH domain2)の癌進展に関わる機序
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 伊藤修平、増田隆明、野田美和、清水大、吉川幸宏、胡慶江、鶴田祐介、黒田陽介、東保太郎、江口英利、大賀丈史、江崎卓弘、三森功士
2. 発表標題 胃癌における免疫関連遺伝子発現の臨床的意義
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 高橋純一、増田隆明、黒田陽介、北川彰洋、清水大、倉光正太郎、藤井昌志、吉川幸宏、野田美和、鶴田祐介、大津甫、江口英利、吉住朋晴、三森功士
2. 発表標題 肝細胞癌におけるDNA修復関連遺伝子FANCE発現の臨床的意義
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 増田隆明、清水大、鶴田祐介、大津甫、黒田陽介、江口英利、三森功士
2. 発表標題 治療抵抗性の原因である腫瘍内多様性の克服に向けた“真の”分子治療標的の同定への取り組み～大腸がんゲノム進化モデルからのアプローチ～
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 吉川幸宏、福永光子、清水大、高橋純一、倉光正太郎、藤井昌志、北川彰洋、野田美和、鶴田祐介、大津甫、黒田陽介、江口英利、増田隆明、山田一隆、土岐祐一郎、森正樹、三森功士
2. 発表標題 大腸がんにおける術前術後の経時的血清中microRNA解析
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 伊藤修平、野田美和、清水大、鶴田祐介、黒田陽介、江口英利、増田隆明、坂本勝美、平川雅和、三森功士
2. 発表標題 食道癌に対するESD後、敗血症を繰り返した食道アカラシア合併症例
3. 学会等名 第73回日本食道学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増田隆明、脇山浩明、鶴田祐介、大津甫、黒田陽介、江口英利、三森功士
2. 発表標題 活性酸素安定効果を有する抗リウマチ薬スルファサラジン（SSZ）による食道癌放射線治療の増強効果
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 鶴田祐介、増田隆明、倉光正太郎、北川彰洋、藤井昌志、大津甫、黒田陽介、江口英利、夏越祥次、三森功士
2. 発表標題 切除不能胃癌・大腸癌の化学療法症例における増悪様式別の予後検討
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 黒田陽介、増田隆明、高橋純一、倉光正太郎、北川彰洋、藤井昌志、鶴田祐介、大津甫、江口英利、三森功士
2. 発表標題 大腸癌における13番染色体長腕に存在する新規がん遺伝子候補PDX1の同定とその臨床的意義
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 伊藤修平、増田隆明、野田美和、清水大、胡慶江、鶴田祐介、黒田陽介、東保太郎、江口英利、三森功士
2. 発表標題 胃癌におけるPD-1, PD-L1, CD8発現の臨床的意義
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 大津甫、増田隆明、鶴田祐介、北川彰洋、倉光正太郎、清水大、藤井昌志、黒田陽介、江口英利、三森功士
2. 発表標題 Cytolytic activity(CYT)は肝細胞癌において宿主免疫を反映した予後バイオマーカーとなりうる
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 北川彰洋、増田隆明、鶴田祐介、大津甫、黒田陽介、江口英利、江口英利、土岐祐一郎、森正樹、三森功士
2. 発表標題 肝細胞癌（HCC）における細胞内輸送関連遺伝子Kinesin family member15(KIF15)発現の臨床的及び生物学的意義
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 藤井昌志、増田隆明、北川彰洋、清水大、大津甫、黒田陽介、江口英利、大塚隆生、中村雅史、三森功士
2. 発表標題 IMPAQT法を用いた膵癌における治療標的となるmetabolic pathway同定の試み
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

〔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 穰  (Suzuki Yutaka)  (40323646)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授   (12601)	
研究分担者	三森 功士  (Mimori Koshi)  (50322748)	九州大学・大学病院・教授   (17102)	

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