

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18095

研究課題名(和文) 胃癌腹膜播種におけるがん免疫システムの解明と革新的バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Elucidation of immune system and search for innovative biomarkers in peritoneal dissemination of gastric cancer

研究代表者

清住 雄希 (KIYOZUMI, Yuuki)

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：30827324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌の腫瘍微小環境におけるPD-L1発現の評価方法として、腫瘍細胞と免疫細胞のPD-L1発現の総合的に評価するCombined Positive Scoreが有用であることを示し、切除検体と生検検体のPD-L1発現の評価には複数回の生検が必要であるという結果が得られた。次に、経時的な不均一性を解明するために、実臨床を想定し、胃癌細胞株と5FU、CDDP、Trastuzumab等を共培養したところ、PD-L1発現が上昇するという結果が得られた。本機序に関わる免疫エフェクター細胞を同定するため、NK細胞や単球を分離し、in vivoで実験を行い、NK細胞の関与が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌に対する免疫チェックポイント阻害薬の効果を予測するうえで重要と考えられる、免疫関連因子の発現の空間的不均一性、経時的不均一性を評価するために、本研究を行った。その結果、複数回の生検を行わないと免疫関連因子の発現を正確に評価できないことや、化学療法が発現に影響を与えることを証明できたため、今後の臨床における治療予測因子として重要な役割を果たすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：PD-L1 expression as a predictive biomarker for PD-1 inhibitor efficacy in gastric cancer (GC) remains controversial. Firstly, PD-L1 expressions in biopsy and paired resected samples by IHC staining were compared according to the number of biopsies. Single biopsy showed a lower accordance rate compared with multiple biopsies. Therefore, Multiple biopsies are recommended for accurate diagnosis of PD-L1 expression in GC. Secondly, we aimed to elucidate the effects of trastuzumab (Tmab) on PD-L1 expression in GC. PD-L1 expression was upregulated by Tmab in HER2-amplified GC cell lines co-cultured with peripheral blood mononuclear cells. PD-L1 upregulation by Tmab was also observed in the GC cells co-cultured with NK cells in time-dependent manner, but not with monocytes. Tmab can upregulate PD-L1 expression on GC cells through interaction with NK cells. These results suggest clinical implications in the assessment of predictive significance of PD-L1 expression for PD-1 inhibitors.

研究分野：消化器外科分野における消化管悪性腫瘍

キーワード：胃癌 免疫寛容 免疫チェックポイント阻害薬 不均一性

## 1. 研究開始当初の背景

我が国において、胃癌は癌死亡数の第 3 位と非常に高頻度のがん種である。胃癌に対する集学的治療の発展により治療成績は向上しているものの腹膜播種などの遠隔転移を伴う Stage IV 症例の 5 年生存率は 7.8% に留まっている。

癌治療の分野では免疫チェックポイント阻害剤を中心とした免疫療法が注目を集めており、胃癌においても消化器癌領域で初めて抗 PD-1 抗体が平成 29 年 9 月に保険償還されたが、第三相比較試験のサブグループ解析によると、腹膜播種を伴う症例での治療効果は乏しいという結果が示された (Kang et al. *Lancet*, 2017)。治療効果に差異が生じる原因として、1) 胃癌における腫瘍免疫環境の多様性、2) 治療の影響による腫瘍免疫環境の変化、3) 免疫染色による検査方法の差異等が考えられるが、現時点ではこうした胃癌の特性に応じて治療対象の選択に資するようなバイオマーカーが存在しない。

IDO1 は代謝産物であるキヌレニンを通じて Treg の誘導や細胞障害性 T 細胞の不活化を促し、免疫寛容を成立させることが知られている。われわれはこれまで、食道癌の臨床検体を用いた研究で IDO1 の臨床病理学的意義を明らかにした (*Ann Surg*, 2018)。IDO1 は食道癌の予後予測因子であるとともに、他の免疫学的因子との相関性も明らかとなったことから、コンパニオン診断のためのバイオマーカーとしての役割が期待される。

胃癌のコンパニオン診断を目的としたバイオマーカーを確立するうえでの課題が胃癌における heterogeneity である。免疫染色では、生体内の単一箇所の評価に留まるため、heterogeneity を特徴とする胃癌においてはバイオマーカーとなり得る因子を正確に評価できていない可能性が考えられる。更に、臨床的には免疫チェックポイント阻害薬の使用が、3rd line 以降のタイミングであることから、他の化学療法の影響を受けている可能性が懸念される。

こうした背景から、胃癌における免疫関連因子の発現パターンや、PD-L1 をはじめとした免疫学的因子の発現の空間的な不均一性 (spatial heterogeneity)、化学療法による経時的な不均一性 (temporal heterogeneity) が生じる機序や胃癌腹膜播種症例における免疫関連因子の発現パターンを解析することで腫瘍免疫環境の特性を解明が求められる。

## 2. 研究の目的

本研究は、胃癌に対する免疫療法が実用化され、一方で奏効率が不十分であることや腹膜播種症例への治療効果が乏しいことを背景として、胃癌における免疫関連因子の発現パターンや、PD-L1 をはじめとした免疫学的因子の空間的、経時的な不均一性に着目することにより、免疫療法の効果予測バイオマーカーの確立とリキッドバイオプシー実用化へ応用することを目的とした。

## 3. 研究の方法

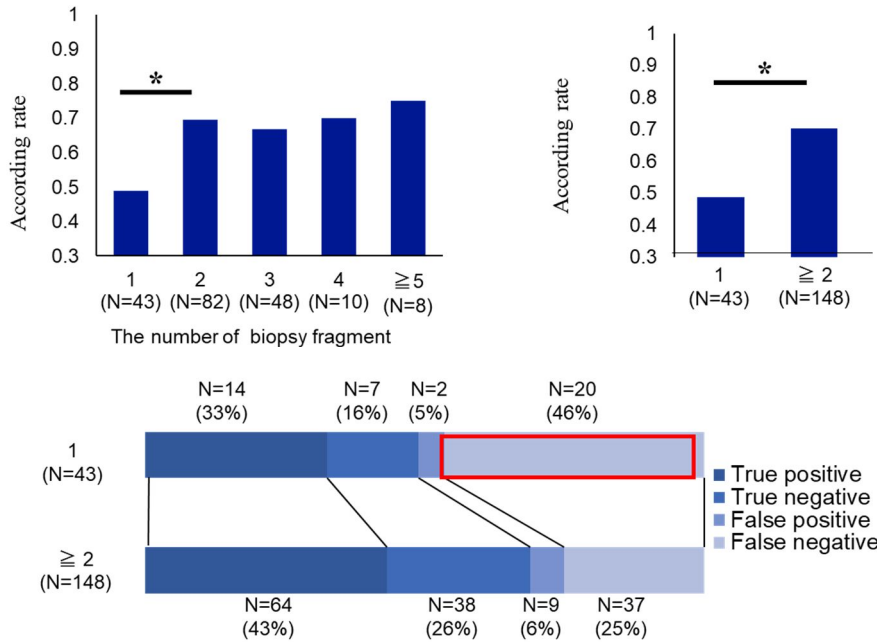
T2 以深まで浸潤を認める胃癌臨床検体における PD-L1 発現の検討を免疫組織染色によって行った。また、生検組織、切除組織 191 例を用いて Spatial heterogeneity を評価するため、両検体の発現一致率や、生検回数との相関性等の解析を行った。

胃癌における PD-L1 発現の temporal heterogeneity を明らかにするため、Trastuzumab 曝露前後での PD-L1 発現の変化に着目し、HER2 陽性胃がん細胞株を用いて、抗がん剤治療による影響を評価した。

## 4. 研究成果

胃癌における免疫関連因子の発現パターンや、PD-L1 をはじめとした免疫学的因子の空間的、経時的な不均一性に着目、まず空間的な不均一性を評価するため、同一症例における胃癌の生検組織と切除組織の PD-L1 発現、原発巣と転移巣における PD-L1 発現について解析した。腫瘍微小環境における PD-L1 発現の評価方法として、腫瘍細胞と免疫細胞の PD-L1 発現の総合的に評価する Combined Positive Score が胃癌において有用であること

を示し(Yamashita et al. Gastric Cancer)、これを用いて切除検体と生検検体の腫瘍部位の

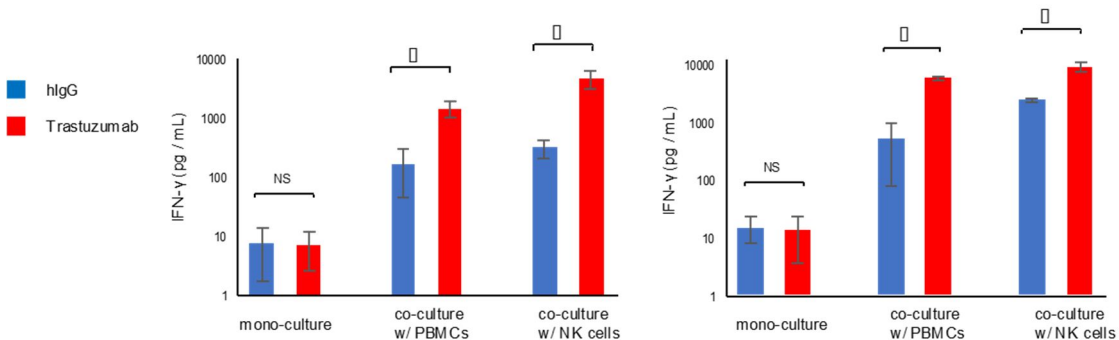


Yamashita et al. *Br J Cancer*. 2019

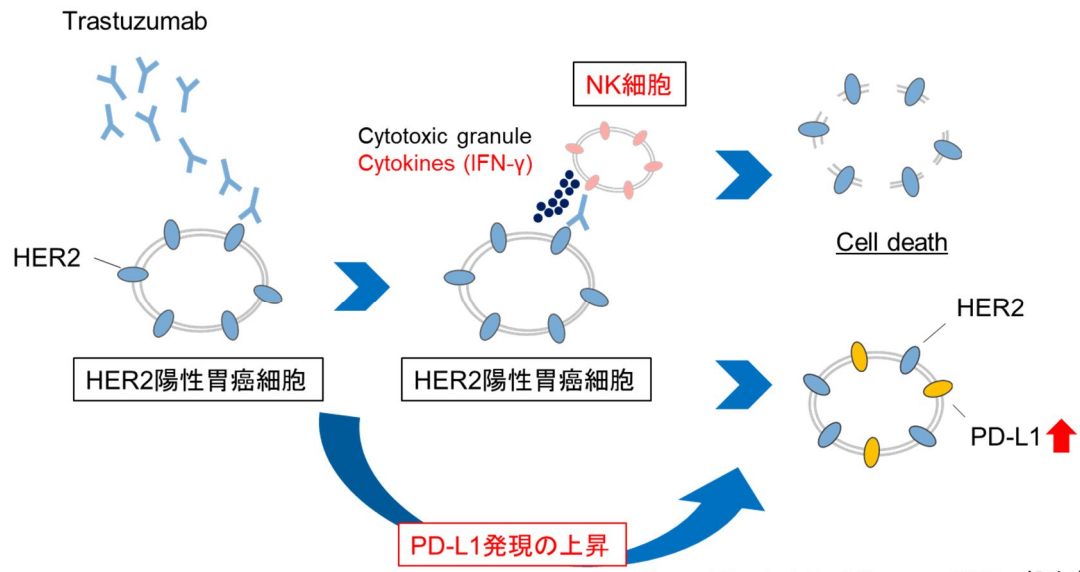
PD-L1 発現を解析したところ、正確な評価には複数回の生検が必要であるという結果が得られ、これを報告した(Yamashita et al. Br J Cancer)。また、併せて CPS 評価での PD-L1 高発現についても解析を行い、予後不良であることを示し、CPS 評価による評価の妥当性を示した。単変量/多変量解析でも CPS 評価による PL-L1 高発現胃癌は非常に予後が悪く、独立予後不良因子であることともに、予後予測のバイオマーカーとなり得ることについて報告を行った。

次に、経時的な不均一性を解明するために、実臨床を想定し、胃癌細胞株と 5FU、CDDP 等実際に使用されている殺細胞性抗癌剤を用いた研究を行った。胃癌細胞は殺細胞性抗癌剤への曝露により PD-L1 発現が上昇するという結果が得られた。

更に、PD-L1 発現上昇に関わる細胞内シグナル経路について更に検証すると、分子標的薬である Trastuzumab が免疫エフェクター細胞との相互作用を介して抗腫瘍効果を発することが既に報告されていることを踏まえ、HER2 陽性胃癌細胞を Trastuzumab に曝露させたところ、PD-L1 発現が上昇するという結果が得られた。



本機序に関わる免疫エフェクター細胞を同定するため、NK 細胞や単球を分離し、in vivo で実験を行い、NK 細胞の関与が示され、これを報告した(Yamashita et al. Br J Cancer)。



Yamashita et al. *Br J Cancer*. 2020一部改変

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamashita Kohei, Iwatsuki Masaaki, Yasuda-Yoshihara Noriko, Morinaga Takeshi, Nakao Yosuke, Harada Kazuto, Eto Kojiro, Kurashige Junji, Hiyoshi Yukiharu, Ishimoto Takatsugu, Nagai Yohei, Iwagami Shiro, Baba Yoshifumi, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Ajani Jaffer A., Baba Hideo	4. 巻 124
2. 論文標題 Trastuzumab upregulates programmed death ligand-1 expression through interaction with NK cells in gastric cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 595 ~ 603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-01138-3	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 該当する
1. 著者名 Kiyozumi Yuki, Baba Yoshifumi, Okadome Kazuo, Yagi Taisuke, Ogata Yoko, Eto Kojiro, Hiyoshi Yukiharu, Ishimoto Takatsugu, Iwatsuki Masaaki, Iwagami Shiro, Miyamoto Yuji, Yoshida Naoya, Watanabe Masayuki, Baba Hideo	4. 巻 110(6)
2. 論文標題 Indoleamine 2, 3 dioxygenase 1 promoter hypomethylation is associated with poor prognosis in patients with esophageal cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1863-1871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14028	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 Yamashita K, Iwatsuki M, Ajani JA, Baba H	4. 巻 4
2. 論文標題 Programmed death ligand-1 expression in gastrointestinal cancer: its clinical significance and challenging issues.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Gastroenterol Surg	6. 最初と最後の頁 369-378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する
1. 著者名 Yamashita K, Harada K, Ajani JA	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinical utility and future perspectives of liquid biopsy in gastrointestinal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Future Oncol	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

1. 著者名 Yamashita K, Iwatsuki M, Harada K, Eto K, Hiyoshi Y, Ishimoto T, Nagai Y, Iwagami S, Miyamoto Y, Yoshida N, Komohara Y, Ajani JA, Baba H	4. 巻 23(1)
2. 論文標題 Prognostic impacts of the combined positive score and the tumor proportion score for programmed death ligand-1 expression by double immunohistochemical staining in patients with advanced gastric cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastric Cancer.	6. 最初と最後の頁 95-104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-019-00999-9	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 該当する

1. 著者名 Yamashita K, Iwatsuki M, Harada K, Koga Y, Kiyozumi Y, Eto K, Hiyoshi Y, Ishimoto T, Iwagami S, Baba Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Komohara Y, Ajani JA, Baba H	4. 巻 121(3)
2. 論文標題 Can PD-L1 expression evaluated by biopsy sample accurately reflect its expression in the whole tumour in gastric cancer?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Br J Cancer.	6. 最初と最後の頁 278-280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kohei Yamashita, Masaaki Iwatsuki, Shiro Iwagami, Kojiro Eto, Yuki Koga, Yuki Kiyozumi, Yoshifumi Baba, Naoya Yoshida, Hideo Baba.
2. 発表標題 Chemotherapy induces upregulation of programmed death ligand-1 expression in gastric cancer.
3. 学会等名 American Association for Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohei Yamashita, Masaaki Iwatsuki, Kojiro Eto, Yukiharu Hiyoshi, Takatsugu Ishimoto, Yohei Nagai, Shiro Iwagami, Yuji Miyamoto, Naoya Yoshida and Hideo Baba.
2. 発表標題 5-FU induces upregulation of PD-L1 expression in gastric cancer.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohei Yamashita, Masaaki Iwatsuki, Yuki Koga, Yuki Kiyozumi, Kojiro Eto, Yukiharu Hiyoshi, Shiro Iwagami, Yoshifumi Baba, Yuji Miyamoto, Naoya Yoshida and Hideo Baba.
2. 発表標題 Can PD-L1 expression by biopsy specimen accurately reflect its expression of the entire tumor in gastric cancer?
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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