

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08676

研究課題名(和文)次世代シーケンサーを用いたメルケル細胞癌の抗腫瘍免疫関連バイオマーカーの検索

研究課題名(英文)A discovery of anti-tumor immunity-related biomarkers for Merkel cell carcinoma using next-generation sequencers.

研究代表者

中村 元樹 (Nakamura, Motoki)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・准教授

研究者番号：70645051

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)：我々はMCC患者71名、90検体を収集した。mRNA発現を次世代シーケンサーで解析した結果、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ(G6PD)がPD-L1発現と転移に相関することが明らかになった。生存解析により、G6PD高発現の患者の予後が悪いことが明らかになった。血清G6PD活性値はステージが進むにつれて高くなり、治療後には低下していた。G6PDは、MCC患者を高リスク群と低リスク群に層別化するための有望なマーカーとなると考えられた。これらの結果は、J Immunother Cancerとして報告された。2020 Dec;8(2):e001679 として発表しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行期メルケル細胞癌の治療には免疫チェックポイント阻害薬が使用されることが多いが、約半数の患者が治療抵抗性であり、適切な治療選択、効果予測のためにバイオマーカーの発見が急務であった。今回発見した抗腫瘍免疫の活性に基づくバイオマーカーである、グルコース-6-リン酸脱水素酵素により、免疫チェックポイント阻害薬の効果の予測、モニタリングが可能となり、より適切な治療選択が可能になると考える。

研究成果の概要(英文)：We collected 90 specimens from 71 patients (26 men, median age 77.3 years) with MCC from 9 facilities. Next-generation sequencing of mRNA from 40 FFPE MCC samples revealed that glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) correlated with PD-L1 expression and metastasis. Kaplan-Meier survival analysis revealed a poor prognosis for patients with high-G6PD expression. G6PD+ immunostaining predicted MCC patient prognosis, with a median survival of 3.4 years for G6PD+ patients and 6.7 years for G6PD- patients. G6PD activity assay was performed using 50 serum samples from 19 cases. Three cases showed high G6PD activity, and two of them were all of stage cases and the last one was stage and died of another cause soon after sampling. G6PD regulates NADPH production and high G6PD expression enhances cellular oxidative resistance. G6PD is a promising marker to stratify MCC patients into high- and low-risk groups. These results were reported as J Immunother Cancer. 2020 Dec;8(2):e001679.

研究分野：皮膚癌

キーワード：メルケル細胞癌 バイオマーカー 免疫チェックポイント阻害薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メルケル細胞がん (MCC) は、まれではあるが悪性度の高い皮膚がんである。報告されている予後は不良で、5年生存率は0%~18%である。しかし、中には予後良好な症例もあり、生検後に自然退縮を起こすこともある。MCCにおける自然退縮の頻度は1.7%~3.0%である。この比率は、他の固形がんに比べてはるかに高い。腫瘍の退縮にはT細胞介在性免疫などの免疫応答が関与している可能性があり、MCCの種類によっては免疫応答に対する感受性が高い可能性がある。我々は以前、転移性MCC病変におけるprogrammed death ligand 1 (PD-L1)の発現量の増加が、より良い臨床転帰と強く相関することを報告した。PD-L1は、T細胞の活性化を抑制する免疫抑制分子である。がん細胞におけるPD-L1の発現増加は、通常、抗腫瘍免疫の回避を示すが、MCCにおける予後とPD-L1発現との関係は、他のがん腫とは逆である。PD-L1の高発現は、MCCにおける抗腫瘍免疫の活性化に起因すると考えられ、したがって予後マーカーとして報告されている。しかし、PD-L1発現は同一症例でも不均一であることがある。PD-L1発現は評価時の免疫状態を反映しますが、PD-L1発現に基づいて患者さんの転帰を予測することはまだ困難です。PD-L1とその受容体であるプログラム細胞死1 (PD-1)を含む免疫チェックポイントの遮断を含む治療法が、MCCに対して成果を上げています。PD-L1発現は、免疫チェックポイント遮断に対する感受性の予測バイオマーカーとして期待されているが、その不均一性からPD-L1発現に基づく予測の可能性は限定的であることが明らかになっている(9)。

2. 研究の目的

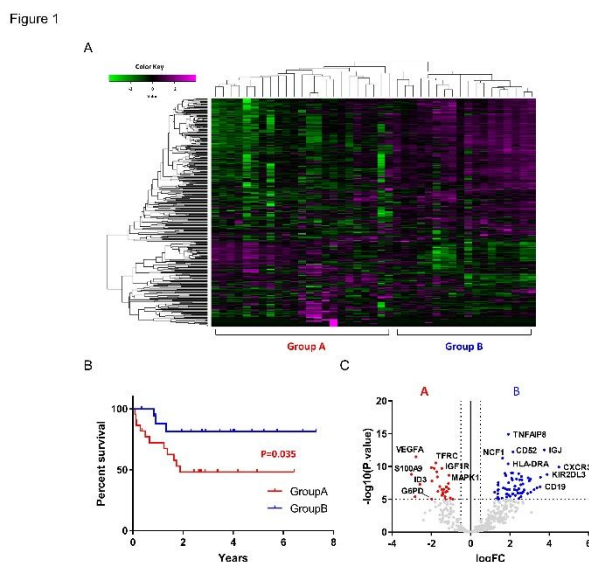
MCCにおける免疫療法の潜在的な予測バイオマーカーとして、免疫反応を評価し、免疫原性因子の予後を包括的に推定するためにRNAシーケンサーを実施した。

3. 研究の方法

10施設でMCC患者71名から90検体、MCC患者21名から53検体の血漿を採取した。ホルマリオン固定パラフィン包埋組織からmRNAを抽出した。次世代シーケンサー、免疫組織化学染色、血中血清検査を実施した。

4. 研究成果

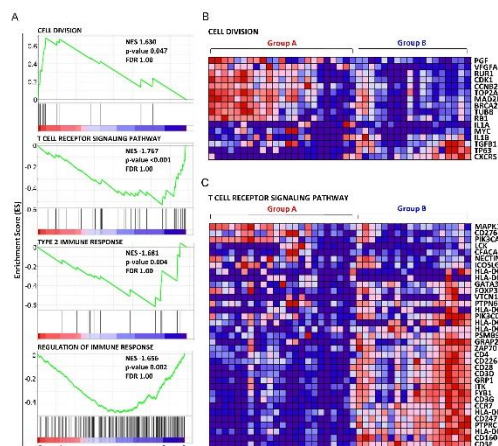
RNAシーケンスによりMCCの分類:
44検体から全RNAを抽出し、腫瘍と免疫系の相互作用に関与し、免疫療法反応を示す395のがんバイオマーカーの発現をNGSターゲットで解析した。評価したすべての遺伝子の発現が低いため、3サンプルを除外した。41サンプルのデータをさらに解析した。このコホートには、男性13名、女性24名が含まれ、年齢中央値は76.57歳(範囲40-98歳)であった。最も多く発症した部位は頭頸部(25検体、67.6%)で、次いで四肢(11検体、29.7%)と体幹(1検体、2.8%)でした。生検後に自然退縮を示したのは4検体(9.8%)であった。平均RNAインテグリティ数は2.08(1.0-2.6)、平均DV200値は53.0(28-88)であった。41検体について階層的クラスタ解析を行い、評価した全395遺伝子の発現パターンに応じて2群に分けた(Fig.1A)。A群は23検体、B群は18検体であった。 Kaplan-Meier生存解析の結果、A群の患者さんはB群の患者さんに比べて予後不良であった($p=0.035$, ロジランク検定, Fig.1B)。各群の遺伝子発現量は、Fig.1Cのボルケーノプロットで示した。縦と横の破線は、 \log_2 fold-change (-0.5 と $+0.5$)とp値(1.0×10^{-5})の閾値を示す。



各タイプにおける遺伝子発現の機能的濃縮解析:

各グループで発現量が増加または減少した遺伝子のクラスを解釈するために、10,192 個の遺伝子セットを含む Gene Ontology リソースを用いて GSEA を実施した。p 値が 0.05 未満でグループ A で濃縮された唯一の遺伝子セットは、「cell division」セットであった。正規化濃縮スコアは 1.63、p 値は 0.047 であった。B 群では、p 値が 0.05 未満の遺伝子セットが 49 個、p 値が 0.01 未満の遺伝子セットが 7 個検出された。また、FDR が 0.25 未満の遺伝子セットは検出されなかった。各グループの代表的な遺伝子セットのエンリッチメントプロットを Fig.2A に示す。グラフは、濃縮スコア (y 軸) 対順序付けされたデータセットにおける遺伝子ランク (x 軸) を表示し、グループ A で相対発現が高い遺伝子には低いランク順値 (左端の尾) が与えられ、グループ B で相対発現が高い遺伝子には高いランク順値 (右端の尾) が遺伝子ランク表現の中で与えられた。それぞれの遺伝子セットにおける各遺伝子のランクは、濃縮プロットの下にある水平線で示されている。各解析の正規化濃縮スコア、p 値、FDR q 値が示されている。各グループの最高ランク遺伝子セットの遺伝子発現ヒートマップを Fig.2B に示す。これらの結果から、2つのグループは「細胞分裂型 (A 群)」と「免疫活性型 (B 群)」と注釈をつけることができた。

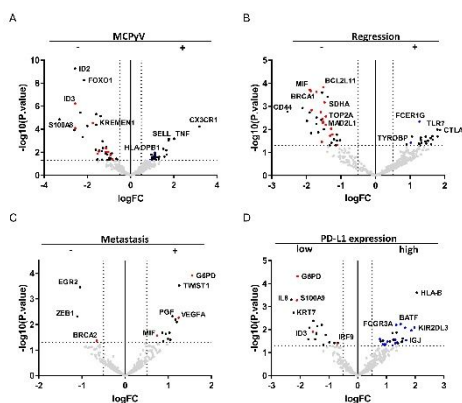
Figure 2



G6PD は、腫瘍の免疫活性に基づき MCC を 2 種類に分類するための指標となる:

MCPyV 感染陽性 (n=24) 対陰性 (n=10) (Fig.3A)、生検後の自然退縮陽性 (n=4) 対陰性 (n=29) (Fig.3B) で遺伝子発現に有意な差がある。3B)、経過観察中にリンパ節転移や遠隔転移があった症例陽性 (n=17) 対陰性 (n=17) (Fig.3C)、腫瘍細胞における PD-L1 発現が高い (n=10) 対低い (n=18) (Fig.3D) を分析した。赤い点は、A 群「細胞分裂型」で p 値 < 1.0x10⁻⁵ で有意に発現が上昇した遺伝子、青い点は B 群「免疫活性型」で p 値 < 1.0x10⁻⁵ で有意に発現が上昇した遺伝子である。フィッシャーの正確検定により、MCC 細胞における PD-L1 発現に関して、A 群と B 群の間に有意な関連があることが明らかになった (p 値=0.032, OR=7.0, 95%CI: 1.18 - 41.36)。PD-L1 の高発現は、B 群で観察された免疫活性の上昇の一因であり、MCC における PD-L1 高発現は、より良好な臨床転帰と関連している。しかし、PD-L1 発現は同じ症例でも不均一である。この不均一性は、この免疫因子を予後指標として使用することを複雑にしている。実際、同じ 90

Figure 3



サンプルを用いた以前の免疫組織化学的解析では、MCC 原発病変における PD-L1 発現と臨床転帰との間に有意な相関は認められなかった。PD-L1 発現が患者の予後と相関するのは、皮膚転移病変のみであった。我々は、PD-L1 に代わる予後予測因子として G6PD に着目した。G6PD は、A 群「細胞分裂型」において高度かつ有意に発現が上昇した遺伝子の一つであった (log2FC=-1.98, p 値=8.65x10⁻⁶, FDR=3.25x10⁻⁵, Fig.1C)。G6PD の発現は、追跡調査中のリンパ節転移や遠隔転移と正の相関があり (log2FC=1.55, p-value=1.22x10⁻⁴, FDR=0.020, Fig.3C) PD-L1 発現と負の相関があり (log2FC=2.10, p-value=4.84x10⁻⁵, FDR=0.017, Fig.3D) 両方の分析で 395 遺伝子のうち最も小さい p 値でした。G6PD は、2 種類の MCC を分類する指標として用いることができ、PD-L1 発現や予後と負の相関を示す。

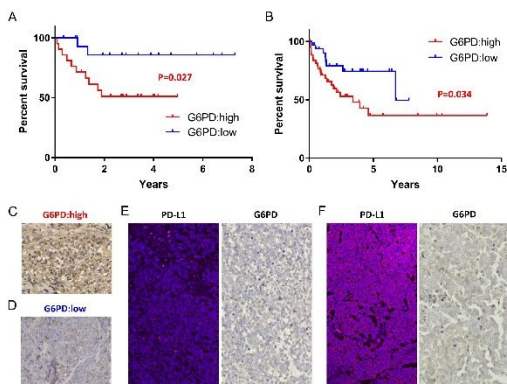
G6PD の免疫組織化学的発現は、PD-L1 発現よりも有用な予後予測因子となる:

G6PD は有望な予後予測マーカーとして用いることができる。NGS で算出した RNA 発現量 (counts per million; CPM) に基づいて分類した G6PD の発現量が多い MCC と少ない MCC を比較した Kaplan-Meier 生存曲線では、疾患特異的生存期間に有意差が認められた (n=40, p=0.027, ログランク検定, Fig.4A)。カットオフ値 (1072 CPM) は、受信者動作特性曲線により算出した。原発巣と皮膚転移巣を含むすべての FFPE サンプルを用いた G6PD の免疫組織化学染色も、患者の転帰と相関していた (n=79, p=0.034, ログランク検定, Fig.4B)。腫瘍細胞の 50% 以上の染色を「G6PD-high」と定義した。G6PD-high と G6PD-low の代表サンプルを Fig.4C と 4D に示す。両症例とも生検後に自然退縮した。しかし、Fig.4C の症例は、10 ヶ月後に遠隔再発を起こし、数日

後に死亡した (12)。Fig.4D の症例は、再発もなく予後良好であった。これらの臨床成績は、原

発巣における G6PD の高発現によって予測されるのかもしれない。G6PD の免疫組織化学的発現は、PD-L1 のそれよりも不均一性が少ない。同じ症例であっても、PD-L1 の発現が不均一であることは、以前に報告したとおりである。その症例では、原発巣で PD-L1 発現が低かった (Fig.4F 左)。皮膚やリンパ節に多発転移を起こしたが、皮膚転移病巣で PD-L1 発現が劇的に増加し (Fig.4F 右) 最終的には予後良好となった。PD-L1 発現の変化とは逆に、G6PD 発現は原発巣と転移巣で一貫して低かった (Fig.4E、F 右)。G6PD 発現は PD-L1 発現よりも有用な予測因子であり、免疫活性の測定値を予後因子として用いることの可能性を反映している。

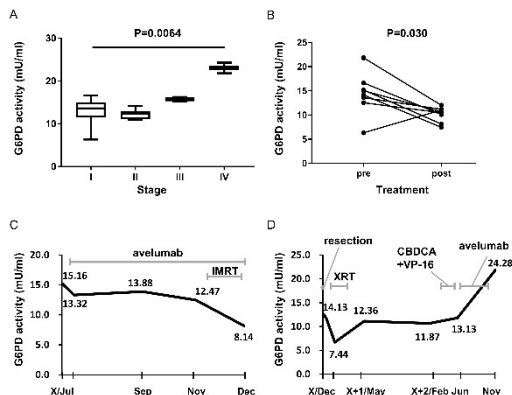
Figure 4



血清中の G6PD 活性は、臨床経過を敏感に反映する：

G6PD 活性は、血中血清検査で測定可能である。我々は、様々なステージの MCC 患者 21 名から 53 サンプルを収集した。G6PD の免疫組織化学的発現とは対照的に、血清中の G6PD 活性は常に変化している。血清中の G6PD 活性は、前治療を受けた患者から得られたサンプルでは、腫瘍のステージが進むにつれて有意に増加し (n=19, p=0.0064, Kruskal-Wallis test, Fig.5A) 手術、放射線またはその両方を含む治療後には減少しました (n=8 ペア, p=0.030, paired-t test, Fig.5B)。免疫チェックポイント阻害剤 (ICI)アベルマブを投与した代表的な 2 症例における G6PD 活性の変化を Fig.5C および Fig.5D に示す。Fig.5C に示す症例は、アベルマブに反応し、治療中に血清 G6PD 活性が低下した。一方、Fig.5D の症例は、アベルマブに反応せず、ICI の投与中に血清 G6PD 活性が上昇し、患者はしばらくして死亡した。したがって、血清 G6PD 活性は、腫瘍の進行を反映し、治療に対する反応を評価する有用な腫瘍マーカーとなる可能性がある。

Figure 5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Nakamura Motoki, Magara Tetsuya, Kano Shinji, Matsubara Akihiro, Kato Hiroshi, Morita Akimichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Tertiary Lymphoid Structures and Chemokine Landscape in Virus-Positive and Virus-Negative Merkel Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 811586
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2022.811586	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 Nakamura Motoki, Nagase Kotaro, Yoshimitsu Maki, Magara Tetsuya, Nojiri Yuka, Kato Hiroshi, Kobayashi Tadahiro, Teramoto Yukiko, Yasuda Masahito, Wada Hidefumi, Ozawa Toshiyuki, Umemori Yukie, Ogata Dai, Morita Akimichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Glucose-6-phosphate dehydrogenase correlates with tumor immune activity and programmed death ligand-1 expression in Merkel cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e001679 ~ e001679
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1136/jitc-2020-001679	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 中村元樹
2. 発表標題 Blockade of glucose-6-phosphate dehydrogenase induces immunogenic cell death in malignant melanoma and Merkel cell carcinoma
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村元樹
2. 発表標題 メルケル細胞癌におけるG6PD(グルコース-6-リン酸脱水素酵素)の予後マーカーとしての可能性
3. 学会等名 第36回日本皮膚悪性腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村元樹
2. 発表標題 Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Correlates with the Tumor Immune Activity Including PD-L1 Expression in Merkel Cell Carcinoma
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村元樹
2. 発表標題 メルケル細胞癌におけるG6PD(グルコース-6-リン酸脱水素酵素)の予後マーカーとしての可能性
3. 学会等名 第36回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 皮膚癌の予後予測方法およびその利用	発明者 中村元樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PA1038, C12N 5/078	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 皮膚癌の予後予測方法およびその利用	発明者 中村元樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PA1038, C12N 5/078	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------