

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09536

研究課題名（和文）VHL病に伴う腎細胞癌のクローン進展の解明と治療戦略の基盤の確立に関する研究

研究課題名（英文）Elucidation of the clonal evolution and establishment of treatment strategies of renal cell carcinoma associated with VHL disease

研究代表者

久米 春喜 (Kume, Haruki)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：10272577

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）：VHL病では淡明細胞型腎細胞癌（ccRCC）が多発する。本研究では同一患者内における腫瘍内や腫瘍間での遺伝子変異や免疫プロファイルの不均一性について検討した。手術検体を用い、全エクソシーケンシングによる遺伝子変異の検出や、RNAシーケンシングによる遺伝子発現解析、免疫組織化学分析を行った。

VHL病患者で多発するccRCCはそれぞれ独立して発生し、孤発性ccRCCよりも遺伝子変異数が少なかった。遺伝子発現のプロファイルからは異なる免疫シグネチャーを持つ2群に分類された。同一腫瘍内だけでなく、同じ患者の異なる腫瘍間では、同様の免疫シグネチャーを示す傾向があった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同一患者内における異なる腫瘍間の免疫微環境の不均一性は、腫瘍内不均一性よりも大きい。患者間の不均一性に比べると限定的であることが示され、免疫微環境を形成する上で、腫瘍因子のみならず宿主因子が重要な役割を担っていることを立証した。本研究は遺伝性ccRCCにおける網羅的な遺伝子解析の最大の症例数を有するデータである。遺伝性ccRCCは孤発性ccRCCと比較し、ドライバー遺伝子異常のパターンが類似しているにもかかわらず、より少ない数のドライバー遺伝子異常を有していることが示され、体細胞のドライバー異常よりも生殖細胞系列のVHLの異常がより強力に腫瘍発生を促す可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Patients with Von Hippel-Lindau (VHL) disease are at risk of developing spatially and temporally multiple clear cell renal cell carcinomas (ccRCCs). In this study, we investigated inter- and intra-tumor heterogeneity of genetic and immune profiles within the same patient. We performed whole-exome and RNA sequencing as well as immunohistochemical analyses for surgical specimens from VHL patients.

Each of the multiple ccRCCs in patients with VHL disease occurred independently and had fewer gene mutations than sporadic ccRCCs. Gene expression profiles classified them into two groups with different immune signatures: immune hot and cold tumors. Not only within the same tumor, but also between different tumors of the same patient tended to show similar immune signatures.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：腎癌 VHL病 免疫環境

## 1. 研究開始当初の背景

腎細胞がんの罹患率は我が国では年々増加しており、2019年の罹患数は約32,200人、死亡数も10,100人と推定され増加の一途をたどっている。また根治性切除不能または転移性の腎細胞がんに対し2016年8月にPD-1免疫チェックポイント阻害薬が承認されて以降、全身治療のファーストラインはこれまでの分子標的薬から免疫チェックポイント阻害剤へと変遷した。従来の分子標的薬による一次治療と比較し全生存期間の延長が認められた一方で約半数の患者でGrade 3/4の有害事象を認めたため(Motzer et al. *N. Engl. J. Med.* 2018)、免疫チェックポイント阻害薬により奏効が期待できる患者の選定基準となるバイオマーカーの確立が必要とされている。一方腎細胞がんの組織系の約80%を占める淡明細胞型腎細胞癌のゲノム解析については、筆者らの報告(Sato et al., *Nat Genet.* 2013)を先駆けとし、大規模かつ網羅的な解析(The Cancer Genome Atlas Research Network, *Nature* 2013; Turajlic et al. *Cell*, 2018)が施行されており、遺伝子異常の全体像が徐々に明らかにされてきた。また一つの腫瘍から複数箇所のサンプリングを行うという手法を用いた研究から(Gerlinger et al. *N. Engl. J. Med.* 2012; Turajlic et al. *Cell*, 2018)、クローン進展のパターンや同一腫瘍内の遺伝子異常の不均一性が報告されている。十分な研究が行われている孤発性ccRCCに対して、遺伝性ccRCCについての報告は少ない。生殖細胞系列のVHL変異を有するVon Hippel-Lindau病(VHL病)は国内で200家系程度と推定され、患者の約50%は、時間的空間的に多発する遺伝性ccRCCを発症する。これまでの報告から孤発性ccRCCとの遺伝子異常のプロファイルの類似性(Mitchell et al. *Cell*, 2018)が指摘されているが、対象としている患者数は最大で6人と少なく、遺伝子異常の全体像の解明は不十分である。さらに、遺伝性ccRCCは時間的空間的に多発するため、同一患者における腫瘍間の遺伝子異常や腫瘍免疫微小環境の違いが評価可能な数少ないモデルである。これまでに、遺伝子異常や免疫微小環境の不均一性が示され、その違いが免疫チェックポイント阻害剤の奏効率に影響を与えたとの報告がされてきたが、(Miao Diana et al. *Science*.2018; Clark et al. *Cell* 2019)これらはいずれも異なる患者間の比較である。遺伝性ccRCCを研究対象とすることで、同一患者内における腫瘍間の比較が可能であるため、免疫学的背景が同じ状況で、異なる遺伝子異常を持つ腫瘍における免疫微小環境の比較が可能となると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の主な目的は、これまでの報告と比較しより多くの遺伝性ccRCC検体を用いて、遺伝子解析を行うことにより、遺伝性ccRCC発生のメカニズムの解明を目指すと同時に、同一患者に時間的、空間的に異なって発生した遺伝性ccRCCの比較を行い、遺伝子異常が免疫微小環境に与える影響について理解を深めることである。これまでの孤発性ccRCCの大規模トランスクリプトーム解析では、異なる患者から得られた異なる腫瘍は、免疫微小環境がいくつかのグループに分類されることが知られており(Şenbabaoğlu et al. *Genome Biol.* 2016; Wang et al. *Cancer Discov.* 2018)、同時に免疫チェックポイント阻害剤の効果も異なる可能性が指摘されている。しかしながら、それらは異なる患者間に発生した腫瘍の比較であるため、患者による免疫背景の違いの影響を完全には除外できていない。そのため遺伝性ccRCCを用いて同一患者という免疫学的背景が同じ状況下で、異なる腫瘍間の免疫微小環境を比較する意義は大きい。

## 3. 研究の方法

臨床的にVHL病と診断され、2個以上のccRCCを切除した患者計10名を対象とした。すべての病理組織標本は、UICC/AJCC第7版18に従って、病理専門医によりccRCCと診断した。計51個の原発性ccRCCを採取し、各腫瘍より1~6個部位を隣接する正常腎皮質とともに採取した。生殖細胞系列の正常コントロールとして末梢血も採取した。ゲノムDNAは、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)またはGeneRead DNA FFPE Kit (QIAGEN)を用いて、新鮮凍結切片から抽出した。RNAはRNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて新鮮凍結切片または隣接する正常皮質から抽出した。

### (1) 全エクソームシーケンシング (WES)

SureSelect Human All Exon v6 kits (Agilent)を用いて、プロトコルに従ってエクソームキャプチャーを行った。調整したDNAライブラリーは、NextSeq500またはNovaSeq6000(Illumina)を用いて、当センターまたはマクロジェン・ジャパンにて、150bpペアエンドで作成した。配列アライメントと変異コールは、Genomon pipeline version 2.6.3 (<https://github.com/Genomon-Project>)を用いて、若干の修正を加えながら、実施した。得られたリードはリファレンスゲノム(hs37d5)にマッピングした。コピー数異常はCNACS (Yoshizato et al. *Blood* 2017)を用いて検出した。

### (2) 全ゲノムシーケンシング (WGS)

WES解析で1症例の患者のVHLの生殖細胞系列の非同義置換を検出できなかったため、その生殖細胞系列の検体のWGSを行い、構造異常またはコピー数異常を探索した。TruSeq Nano DNA sample preparation kit (Illumina)を用いてシーケンスライブラリーを調製し、

NovaSeq6000 (Illumina) を用いてシーケンスを行い、マクロジェン・ジャパンで 150 bp ペアエンドでデータを生成した。シーケンスリードは、WES 解析と同じリファレンス配列を用い、Genomon pipeline version 2.6.3 を用いてマッピングした。VHL 遺伝子座は IGV (Robinson et al. Nat Biotechnol 2011) を用いて目視で確認し、生殖細胞系列の VHL の第一エクソンの欠失を検出した。

### (3) 遺伝性 ccRCC と孤発性 ccRCC の比較

遺伝性 ccRCC と孤発性 ccRCC のゲノム異常の全体像を比較するために、我々の先行研究 (EGAS00001000509) の 104 人の患者の腫瘍と正常のペア検体の WES データを遺伝性 ccRCC と同じ方法で Genomon と CNACS を用いて再解析を行った。ドライバー遺伝子および全変異数の解析では VHL 遺伝子の異常を除いて評価した。

### (4) RNA シークエンシング (RNA-seq)

RNA の品質評価には 4200 TapeStation (Agilent) を用いた。RNA integrity number [RIN]  $\geq 7$  の検体とその同一のタイミングで採取された検体は RNA-seq で解析した。RNA-seq 用のライブラリーは、NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina (New England BioLabs) を用いて調製し、HiSeq (Illumina) を用いてシーケンスを行い、マクロジェン・ジャパンで 150 bp ペアエンドデータを作成した。マッピングおよび発現解析は、WES の解析と同じリファレンス配列を用いて、Genomon pipeline version 2.6.3 を用いて行った。FPKM 値は UCSC RefSeq 遺伝子 (MHC クラス II 遺伝子を除く) について計算し、オフセットを 1 として  $\log_2$  変換した。階層的クラスタリングおよび発現変動遺伝子解析では、平均発現量  $\geq 1.5$  FPKM の遺伝子を評価対象とした。

### (5) nCounter デジタルカウント遺伝子発現解析

nCounter アッセイ (NanoString) では、トータル RNA を nCounter Human Immunology V2 Panel CodeSet (NanoString) に 65 で 18 時間ハイブリダイズし、プロトコルに従って nCounter Preparation Station (NanoString) に適用し、nSolver 解析ソフトウェア (バージョン 4.0.70) (NanoString) で品質評価および geNorm アルゴリズムで選択した 13 のハウスキーピング遺伝子を用いて正規化を行ってから解析した。569 の遺伝子 (MHC クラス II 遺伝子を除く) の発現値は、オフセットを 1 として  $\log_2$  変換された。

### (6) 階層型クラスタリングによる免疫クラスターの決定

R パッケージ ComplexHeatmap を用いて、Pearson 距離と complete linkage アルゴリズムにより遺伝子と検体の教師なし階層的クラスタリングを行った。2 つの免疫クラスターが同定され、発現変動遺伝子に基づいて免疫 hot クラスターおよび免疫 cold クラスターと定義された。免疫 hot クラスターと免疫 cold クラスターの腫瘍間の比較を行った。

### (7) 発現変動遺伝子のパスウェイエンリッチメント解析

2 つの免疫クラスター (hot と cold) 間の発現変動遺伝子は R パッケージ limma を用いて腫瘍検体の  $\log_2$  変換された発現データに基づいて評価した。遺伝子発現は、腫瘍をランダム効果、免疫クラスターと患者を固定効果としてモデル化した線形混合効果モデルを用いて評価した。 $\log_2$  fold change  $\geq 1$ 、 $P < 0.001$  の遺伝子を有意とした。パスウェイエンリッチメント解析は、Gene Ontology Biological Process、Reactome、KEGG、WikiPathways の遺伝子セットを用いて、R パッケージ gprofiler232 version 0.2.1 を用いて、発現変動遺伝子について評価した

### (8) 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色は、CD3 (ウサギモノクローナル抗体; clone 2GV6; 希釈済み; Roche Diagnostics)、CD4 (ウサギモノクローナル抗体; clone SP35; 希釈済み; Roche Diagnostics)、CD8 (ウサギモノクローナル抗体; clone SP57; 希釈済み; Roche Diagnostics)、CD204 (マウスモノクローナル抗体; clone SRA-E5; 1:500 希釈; Transgenic)、FOXP-3 (マウスモノクローナル抗体; clone 236A/E7; 1:100 希釈; Abcam) の抗体を用いて、Ventana BenchMark ULTRA Autostainer (Roche Diagnostics) のプロトコルに従い実施された。

各免疫組織化学染色のスライドから 3 つの腫瘍領域を無作為に選択し、20 倍の倍率でデジタル化した。非腫瘍部を除外した後、画像解析ソフトウェア Tissue Studio v.3.5 (Definiens AG) を用いてマーカー陽性領域の割合を定量化した。無作為に選択した 3 領域の平均を計算し、患者をランダム効果、免疫クラスターを固定効果としてモデル化する線形混合効果モデル (R パッケージ lmerTest) を用いて、2 つの免疫クラスター間で比較した。

### (9) 同一腫瘍間、同一患者内における異なる腫瘍間、異なる患者間の免疫微小環境の不均一性の評価

同一腫瘍間、同一患者内における異なる腫瘍間、異なる患者間の免疫微小環境の不均一性を評価するため、RNA-seq または nCounter 解析の  $\log_2$  変換した発現データを用いて、すべての検体の組み合わせの Pearson 距離を計算し、同一腫瘍間、同一患者内の異なる腫瘍間、異なる患者間の組合せで比較した。検体が得られた腫瘍の組み合わせをランダム効果、不均一性のカテゴリー (同一腫瘍間、同一患者内の異なる腫瘍間、異なる患者間) および患者を固定効果としてモデル化した線形混合効果モデルを使用し R パッケージ limma を用いて、統計解析を行った。

### (7) 統計解析

統計解析は、R 3.6.2 ソフトウェア (The R Foundation for Statistical Computing) を用いて行った。カテゴリカルデータおよび連続データの比較は必要に応じて Benjamini-Hochberg 補正を行った両側 Fisher の正確確率検定および両側 Wilcoxon 順位和検定を用いて行った。一つの

腫瘍からの多部位生検を補正するために、lmerTest または limma を用いた線形混合効果モデルを採用した。

#### 4. 研究成果

遺伝子異常とトランスクリプトームを組み合わせた解析により、空間的・時間的に多発する遺伝性 ccRCC の遺伝子異常および免疫学的なプロファイルを系統的に全体的に評価することができた。この解析により、異なる患者間のみならず、同一患者内における腫瘍内および異なる腫瘍間の不均一性を比較することができる。患者間の不均一性に加え、腫瘍内不均一性は、孤発性 ccRCC および他のがん種において次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析に関して広く研究されている。このような腫瘍内不均一性は、予後に悪影響を及ぼし、化学療法や分子標的薬に対する抵抗性の一因となることが報告されている (Vitale et al. Nat Med. 2021)。最近では、トランスクリプトーム解析、免疫組織化学染色による解析および単一細胞解析を用いたいくつかの研究により、臨床病型および免疫チェックポイント阻害療法に対する感受性を形作る免疫プロファイルの腫瘍内不均一性が明らかになった (Rosenthal et al. Nature 2018)。しかしこれらの研究は、同一クローンから発生した腫瘍の免疫学的不均一性を解明したものであり、腫瘍因子と宿主因子の影響を識別することは困難である。我々の研究は、同一患者内の異なるクローンから発生した腫瘍の免疫不均一性を初めて評価した研究である。これにより、免疫状態の腫瘍内、腫瘍間、患者間の不均一性の違いを明らかにすることができ、同一患者内における腫瘍間の不均一性は、腫瘍内不均一性よりも大きいことが示された。これらの知見は、腫瘍微小環境を形成する上で、腫瘍因子のみならず宿主因子が重要な役割を担っていることを立証するものである。このような宿主要因として、インターフェロンシグナル伝達、細胞毒性活性、抗原提示に関連する生殖細胞変異などの生殖細胞系列の遺伝子の変異などが免疫微小環境に影響を与えることが知られている (Sayaman et al. Immunity 2021)。さらに、メタゲノム解析のアプローチにより、腸内細菌叢が免疫微小環境に寄与することが示された。これらの宿主因子は、いくつかのがん種において、免疫チェックポイント阻害剤に対する反応を調節することが報告されている (Helmink et al. Nat Med. 2019)。

本研究は、遺伝性 ccRCC における網羅的な遺伝子解析の最大の症例数を有するデータであるため、遺伝性 ccRCC と孤発性 ccRCC の類似点と相違点を明らかにすることができた。特に、遺伝性 ccRCC は孤発性 ccRCC とドライバー遺伝子異常のパターンが類似しているにもかかわらず、より少ない数のドライバー遺伝子異常を有していることが示され、体細胞のドライバー異常よりも生殖細胞系列の VHL の異常がより強力に腫瘍発生を促す可能性が示唆された。これらの知見は、遺伝性 ccRCC のが多発する特徴や若年発症を説明することができる。

VHL 病を有する患者の切除不能または転移性の遺伝性 ccRCC に対して全身治療が必要な場合、現在は孤発性 ccRCC と同じ治療法が選択される。現在のガイドラインでは、このような患者には免疫チェックポイント阻害療法が推奨されているが、VHL 病にともなう ccRCC の患者では複数の原発性腫瘍にまたがって免疫プロファイルの腫瘍間不均一性の程度が大きく、これが免疫療法に対する抵抗性に寄与する可能性が十分あることに留意する必要がある。したがって、免疫プロファイルの腫瘍間および腫瘍内の不均一性を考慮することは、遺伝性 ccRCC に対する治療戦略を改善するために非常に重要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mariko Tabata, Yusuke Sato, Yasunori Kogure, Marni B. McClure, Yuji Oshikawa-Kumade, Yuki Saito, Sumito Shingaki, Yuta Ito, Mitsuhiro Yuasa, Junji Koya, Kazushi Yoshida, Takashi Kohno, Yu Miyama, Teppei Morikawa, Kenichi Chiba, Ai Okada, Seishi Ogawa, Tetsuo Ushiku, Yuichi Shiraishi, Haruki Kume, and Keisuke Kataoka	4. 巻 -
2. 論文標題 Inter- and intra-tumor heterogeneity of genetic and immune profiles in inherited renal cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	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） 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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田畑真梨子
2. 発表標題 遺伝性淡明細胞型腎細胞癌における腫瘍内または腫瘍間の遺伝的、免疫的不均一性
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田畑真梨子
2. 発表標題 Influences of host and tumor factors on tumor microenvironment in inherited clear cell renal cell carcinomas
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023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	佐藤 悠佑 (Sato Yusuke) (20372378)	東京大学・医学部附属病院・講師  (12601)	
研究分担者	片岡 圭亮 (Kataoka Keisuke) (90631383)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長  (82606)	
研究分担者	山田 雄太 (Yamada Yuta) (10376452)	東京大学・医学部附属病院・講師  (12601)	
研究分担者	川合 剛人 (Kawai Taketo) (60343133)	東京大学・医学部附属病院・講師  (12601)	
研究分担者	杉原 亨 (Sugihara Toru) (20529127)	自治医科大学・医学部・講師  (32202)	
研究分担者	田口 慧 (Taguchi Satoru) (40625737)	杏林大学・医学部・助教  (32610)	

## 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
---------	---------