

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09731

研究課題名（和文）鼻副鼻腔神経内分泌悪性腫瘍の遺伝子変化と免疫チェックポイント分子発現に関する研究

研究課題名（英文）Genetic alterations and expressions of immune check point molecules in sinonasal neuroendocrine carcinoma

研究代表者

清田 尚臣（Kiyota, Naomi）

神戸大学・医学部附属病院・特命准教授

研究者番号：40515037

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）：嗅神経芽細胞腫（ONB）の手術検体を用いて、次世代シーケンサーによる遺伝子変化の解析及び免疫多重染色を用いた腫瘍免疫微小環境の解析を行った。ONBは頭頸部領域における希少がんの一つであり、本疾患に特徴的な遺伝子異常や免疫微小環境については明らかではない。本研究において、ONBに生じている遺伝子異常と腫瘍遺伝子変異量（Tumor mutational burden: TMB）の程度を明らかにすることができ、免疫多重染色を用いて腫瘍と腫瘍周囲間質における免疫細胞の種類とその浸潤の程度を解析することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ONBは希少がんであり小さな研究成果の蓄積が病態の解明や治療法の開発につながる。このため、本研究結果から免疫チェックポイント阻害薬を始めとするがん免疫療法の臨床応用の可能性について新たな知見が得られたことは学術的にも社会的にも意義がある。

研究成果の概要（英文）：Olfactory neuroblastoma is one of the rare head and neck malignancies. There have been scarce data about genetic variant, tumor mutational burden (TMB) and tumor immune microenvironment (TIME) of ONB. This research elucidated genetic variants and frequency of TMB-High by OncoPrint tumor mutational load assay and also explored the TIME of ONB by multiplex fluorescent immunohistochemistry.

研究分野：腫瘍内科

キーワード：鼻副鼻腔神経内分泌腫瘍 嗅神経芽細胞腫 次世代シーケンサー 腫瘍免疫微小環境 腫瘍遺伝子変異量

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

我が国における頭頸部がんの罹患数は2万4千人であり、鼻副鼻腔がんは3%程度を占めるに過ぎない。実際に、頭頸部悪性腫瘍全国登録2016年度初診例11,716例の報告においても鼻副鼻腔がんは420例(3.6%)と非常に稀な腫瘍である。鼻副鼻腔がんは他の頭頸部がんと異なり、扁平上皮癌は36%程度であり、嗅神経芽細胞腫や小細胞癌を含む神経内分泌腫瘍などが含まれ、組織型が多様なのが特徴である。この鼻副鼻腔神経内分泌悪性腫瘍は2016年度全国調査でも合計すると76例であり、頭頸部がん全体の0.6%に過ぎず、非常に稀な悪性腫瘍であることから、その診断から治療法に至るまで不明な点が多い。さらに、鼻副鼻腔神経内分泌悪性腫瘍は非常に希少であるが故に国内外での研究の進捗は遅れており、がんゲノム医療やがん免疫療法が本疾患にもたらす恩恵については不明である。

2. 研究の目的

以上のような背景から、本研究では希少な鼻副鼻腔神経内分泌悪性腫瘍の中でも嗅神経芽細胞腫に焦点を絞り、次世代シーケンサー(NGS)を用いた特徴的遺伝子変化及びTML (tumor mutational load) を探索すると共に、多重免疫組織染色法を駆使してがん免疫微小環境を評価することで、がん遺伝子パネル検査や免疫チェックポイント阻害薬をはじめとするがん免疫療法の適用可能性を検討する。そして、本希少疾患におけるがん免疫療法やがんゲノム医療の開発の進展につなげることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

A) 鼻副鼻腔悪性腫瘍データベースからの研究対象の抽出

鼻副鼻腔悪性腫瘍データベースの137例中、鼻副鼻腔神経内分泌悪性腫瘍の60例を抽出し、主たる組織型である嗅神経芽細胞腫(ONB)において利用可能な十分な組織検体を有する症例に絞り込みを行った。また、ONBは希少疾患であり病理診断も非常に難しいことが知られており、病理診断の再レビューを当院病理部の協力の下に行った。その結果、ONBの病理診断が確定した全29例のうち、本研究の中心である腫瘍の体細胞遺伝子変異の程度と免疫多重染色による免疫微小環境を検討する上で十分な腫瘍組織が確保できたのは28例であった。

B) 嗅神経芽細胞腫におけるNGS解析とTML解析

NGSに関しては、上記の28例においてDNA抽出を行った。近畿大学医学部ゲノム生物学教室と協力して解析を行った。ライブラリ調整が3例において困難であり、残りの25例分でシーケンス解析を行った。

C) 免疫多重染色によるONBの腫瘍微小環境解析

ONBは通常の上皮性腫瘍とは異なるため、腫瘍細胞を認識するための表面抗原を探索し、抗Synaptophysin抗体で認識できることを確認した。このため、これを含めた以下の9色のパネルを作成し腫瘍及び間質における免疫細胞の密度解析を行う方針とした。28例全例に免疫多重染色を行い、密度解析を行うための腫瘍組織のアノテーション作業を、がん研有明病院先端医療開発科と協力して行った。

4. 研究成果

1. 嗅神経芽細胞腫(ONB)の患者背景と生存期間解析(N=28)
十分な腫瘍組織を確保できた28例の患者背景を表1に示す

表1

	N=29
Median age (range)	54 (28-73)
Gender (M/F)	16/12

Kadish stage (A/B/C/D)	3/4/20/1
Hyams grade (I/II/III/IV)	5/10/12/1
Initial treatment	
Surgery	20
ICT+RT	2
CRT	4
Particle therapy	2
ICT: induction chemotherapy, RT: radiation therapy, CRT: chemoradiotherapy	

観察期間中央値 58.5 か月において、28 例の5年生存割合 89%であった(図1)。臨床的進行期である Kadish 分類別の5年生存割合は、Kadish A/B vs. C/D 86% vs. 90%であった(図2)。病理学的悪性度分類である Hyams grade 別の5年生存割合は、Hyams grade low grade (I/II) vs. high grade (III/IV) 86% vs. 92% (図3) であり、いずれも有意差を認めなかった。

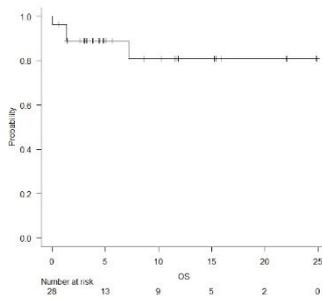


図1 全生存期間

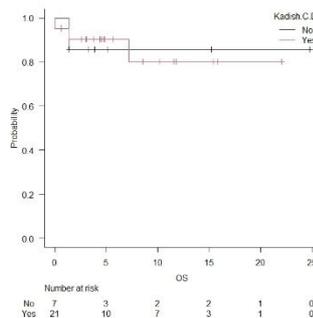


図2 Kadish 分類別

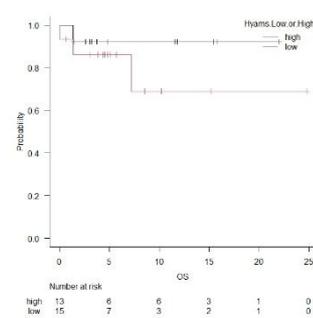


図3 Hyams grade 別

II. 嗅神経芽細胞腫(ONB)のNGS解析(N=18)

NGS に関しては、ライブラリ調整が3例において、シーケンス解析が7例において困難であり、18 例において解析を終了した。解析可能であった 18 例の5年生存割合は 89%であり全体集団と同様であった。

ARID1A のようなエピジェネティクス関連のバリエーションを3例に認めしたが、いわゆるドライバー遺伝子異常のような直接治療につながるようなバリエーションは認められなかった。腫瘍遺伝子変異量(Tumor mutational burden: TMB)については、いわゆる TMB High (>10 mutations/Mgb) を2例(11%)に認めた。臨床病期である Kadish 分類別の TMB や病理学的悪性度分類別の TMB においては、早期(Kadish A/B)および Low grade (Hyams I/II) において TMB が高い傾向を認めたが想定される結果とは異なっており、生存期間解析、免疫多重染色による免疫微小環境の状態も含めて更に詳細な検討が必要である。

III. 嗅神経芽細胞腫(ONB)の腫瘍免疫微小環境(N=28)

腫瘍免疫微小環境(tumor immune microenvironment: TME)解析のために免疫多重染色の調整を行い、ONB は通常の上皮性腫瘍と異なるためサイトケラチンではなく、抗 synaptophysin 抗体で腫瘍細胞を標識することが可能であることが確認できた。このため、9色の免疫パネル(CD3, CD4, CD8, CD 20, PD-L1, Foxp3, CD204, Synaptophysin, DAPI)を作成し、28 例において染色が完了した。免疫多重染色における腫瘍組織と腫瘍間質の区別、免疫細胞の密度解析を行うためのマーキングを行うにあたり、腫瘍の特殊性から長時間を要したが、解析方針を決定できた。図4のように、ONB は腫瘍周囲間質の広がり特徴的であり、腫瘍内への免疫細胞浸潤は目立たず、特徴的な腫瘍周囲間質への免疫細胞浸潤は一定程度認められた。最終的な腫瘍細胞及び間質細胞における各種免疫細胞の分布については、TMB や予後因子も含めて更に詳細な解析を行っており、ONB におけるがん免疫療法による介入の可能性が示唆されている。

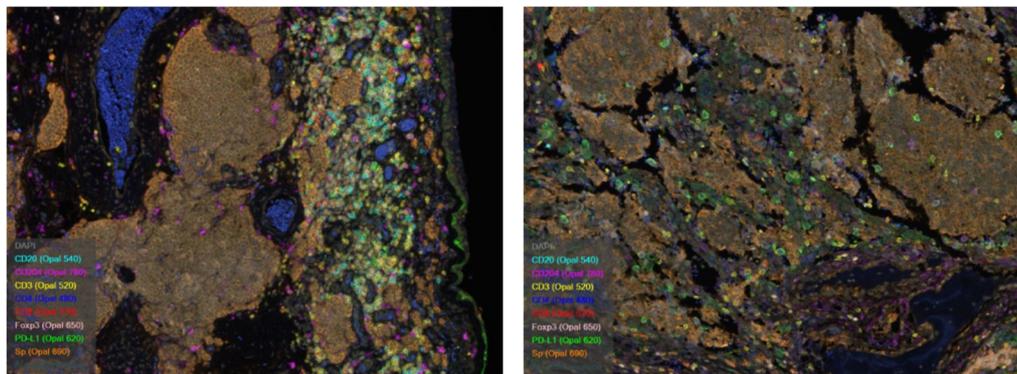


図 4 嗅神経芽細胞腫における腫瘍細胞と間質における免疫細胞浸潤

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Teshima Masanori, Shinomiya Hiroataka, Kimura Hidehito, Hashikawa Kazunobu, Kiyota Naomi, Miyawaki Daisuke, Sasaki Ryohei, Kohmura Eiji, Nibu Ken ichi	4. 巻 6
2. 論文標題 Roles of skull base surgery and particle radiotherapy for orbital malignant tumors involving the skull base	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laryngoscope Investigative Otolaryngology	6. 最初と最後の頁 1347 ~ 1352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/lio2.687	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 Funakoshi Yohei, Suto Hiroataka, Nagatani Yoshiaki, Imamura Yoshinori, Toyoda Masanori, Kiyota Naomi, Matsumoto Hisayuki, Tanaka Shinwa, Takai Ryo, Hasegawa Hiroshi, Yamashita Kimihiro, Matsuda Takeru, Kakeji Yoshihiro, Minami Hironobu	4. 巻 17
2. 論文標題 Microsatellite instability-high colorectal cancer patient-derived xenograft models for cancer immunity research	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1358 ~ 1358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/jcrt.JCRT_1092_20	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 Imamura Yoshinori, Tanaka Kaoru, Kiyota Naomi, Hayashi Hidetoshi, Ota Ichiro, Arai Akihito, Iwae Shigemichi, Minami Shujiro, Yane Katsunari, Yamazaki Tomoko, Nagatani Yoshiaki, Toyoda Masanori, Takahama Takayuki, Sakai Kazuko, Nishio Kazuto, Otsuki Naoki, Nibu Ken-ichi, Minami Hironobu	4. 巻 38
2. 論文標題 Docetaxel plus cisplatin in recurrent and/or metastatic non-squamous-cell head and neck cancer: a multicenter phase II trial	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Oncology	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/s12032-021-01581-z	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 -

1. 著者名 Funakoshi Yohei, Nagatani Yoshiaki, Suto Hiroataka, Imamura Yoshinori, Toyoda Masanori, Kiyota Naomi, Yamashita Kimihiro, Minami Hironobu	4. 巻 17
2. 論文標題 Immunosuppressive effects and mechanisms of three myeloid-derived suppressor cells subsets including monocytic-myeloid-derived suppressor cells, granulocytic-myeloid-derived suppressor cells, and immature-myeloid-derived suppressor cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Research and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1093 ~ 1093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/jcrt.JCRT_1222_20	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 Tahara Makoto, Kiyota Naomi, Nibu Ken-ichi, Akamatsu Ayumi, Hoshino Tomohiro, Hayashi Ryuichi	4. 巻 26
2. 論文標題 Real-world safety and effectiveness of nivolumab for recurrent or metastatic head and neck cancer in Japan: a post-marketing surveillance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1619 ~ 1627
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-021-01949-1	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 Haddad RI., Harrington K, Tahara M, Ferris RL., Gillison M, Fayette J, Daste A, Koralewski P, Zurawski B, Taberna M, Saba NF., Mak M, Kawecky A, Girotto G, Alvarez A, Even C, Toledo J, Guminski A, Muller-Richter U, Kiyota N, Roberts M, Khan T, Miller-Moslin K, Wei L, Argiris A	4. 巻 41
2. 論文標題 Nivolumab Plus Ipilimumab Versus EXTREME Regimen as First-Line Treatment for Recurrent/Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: The Final Results of CheckMate 651	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 2166 ~ 2180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1200/JCO.22.00332	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 Okumura S, Ishihara M, Kiyota N, Yakushijin K, Takada K, Kobayashi S, Ikeda H, Endo M, Kato K, Kitano S, Matsumine A, Nagata Y, Kageyama S, Shiraishi T, Yamada T, Horibe K, Takesako K, Miwa H, Watanabe T, Miyahara Y, Shiku H	4. 巻 12
2. 論文標題 Chimeric antigen receptor T-cell therapy targeting a MAGE A4 peptide and HLA-A*02:01 complex for unresectable advanced or recurrent solid cancer: protocol for a multi-institutional phase 1 clinical trial	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMJ Open	6. 最初と最後の頁 e065109 ~ e065109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjopen-2022-065109	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 Gillison ML, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington KJ, Kasper S, Vokes EE, Even C, Worden F, Saba NF, Iglesias Docampo LC, Haddad R, Rordorf T, Kiyota N, Tahara M, Jayaprakash V, Wei L, Ferris RL.	4. 巻 27
2. 論文標題 Long-term Outcomes with Nivolumab as First-line Treatment in Recurrent or Metastatic Head and Neck Cancer: Subgroup Analysis of CheckMate 141	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncologist	6. 最初と最後の頁 e194-e198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/oncolo/oyab036	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 Nose Taku, Funakoshi Yohei, Suto Hirotaka, Nagatani Yoshiaki, Imamura Yoshinori, Toyoda Masanori, Kiyota Naomi, Minami Hironobu	4. 巻 16
2. 論文標題 Transition of the PD?1 occupancy of nivolumab on T cells after discontinuation and response of nivolumab re?challenge	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	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) 10.3892/mco.2022.2537	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 -

1. 著者名 Imamura Yoshinori, Kiyota Naomi, Tahara Makoto, Hanai Nobuhiro, Asakage Takahiro, Matsuura Kazuto, Ota Ichiro, Saito Yuki, Sano Daisuke, Kodaira Takeshi, Motegi Atsushi, Yasuda Koichi, Takahashi Shunji, Yokota Tomoya, Okano Susumu, Tanaka Kaoru, Onoe Takuma, Ariizumi Yosuke, Homma Akihiro	4. 巻 52
2. 論文標題 Systemic therapy for salivary gland malignancy: current status and future perspectives	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 293 ~ 302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyac008	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 -

1. 著者名 TAKAI RYO, FUNAKOSHI YOHEI, SUTO HIROTAKA, NAGATANI YOSHIAKI, IMAMURA YOSHINORI, TOYODA MASANORI, YAKUSHIJIN KIMIKAZU, KIYOTA NAOMI, HARADA KEN-ICHI, YAMASHITA KIMIHIRO, KAKEJI YOSHIHIRO, MINAMI HIRONOBU	4. 巻 41
2. 論文標題 Serum Soluble Interleukin-2 Receptor as a Potential Biomarker for Immune-related Adverse Events	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1021 ~ 1026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.14857	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 -

1. 著者名 Naito Y, Aburatani H, Amano T, Baba E, Furukawa T, Hayashida T, Hiyama E, Ikeda S, Kanai M, Kato M, Kinoshita I, Kiyota N, Tsuchihara K	4. 巻 26
2. 論文標題 Clinical practice guidance for next-generation sequencing in cancer diagnosis and treatment (edition 2.1)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 233 ~ 283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-020-01831-6	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 Minami Hironobu, Doi Toshihiko, Toyoda Masanori, Imamura Yoshinori, Kiyota Naomi, Mitsuma Ayako, Shimokata Tomoya, Naito Yoichi, Matsubara Nobuaki, Tajima Takeshi, Tokushige Kota, Ishihara Kae, Cameron Scott, Ando Yuichi	4. 巻 112
2. 論文標題 Phase I study of the antiprogrammed cell death 1 Ab spartalizumab (PDR001) in Japanese patients with advanced malignancies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 725 ~ 733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14678	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 Yokota T, Homma A, Kiyota N Hayashi R, Japan Clinical Oncology Group (JCOG) Head and Neck Cancer Study Group	4. 巻 50
2. 論文標題 Immunotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1089 ~ 1096
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa139	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 -

1. 著者名 Yen Chia Jui, Kiyota Naomi, Hanai Nobuhiro, Takahashi Shunji, Yokota Tomoya, Iwae Shigemichi, Shimizu Yasushi, Hong Ruey Long, Goto Masahiro, Kang Jin Hyoung, Li Wing Sum Kenneth, Ferris Robert L., Gillison Maura, Endo Toshimitsu, Jayaprakash Vijayvel, Tahara Makoto	4. 巻 42
2. 論文標題 Two year follow up of a randomized phase <sc>III</sc> clinical trial of nivolumab vs. the investigator's choice of therapy in the Asian population for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (<sc>CheckMate</sc> 141)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Head & Neck	6. 最初と最後の頁 2852 ~ 2862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hed.26331	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

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	北野 滋久 (Kitano Shigehisa)	がん研有明病院 (72602)	免疫微小環境研究
研究協力者	山下 万貴子 (Yamashita Makiko)	がん研有明病院 (72602)	免疫微小環境研究
研究協力者	西尾 和人 (Nishio Kazuto)	近畿大学 (34419)	がん遺伝子パネル検査
研究協力者	坂井 和子 (Sakai Kazuko)	近畿大学 (34419)	がん遺伝子パネル検査
研究協力者	小山 泰司 (Koyama Taiji)	神戸大学 (14501)	症例管理、解析

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