

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17918

研究課題名（和文）中枢神経胚細胞腫に対する免疫療法導入に向けた、腫瘍・腫瘍間質の免疫機構の解析

研究課題名（英文）Analysis on tumor-immune interaction landscape in CNS germ cell tumors

研究代表者

高見 浩数（Takami, Hirokazu）

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50548625

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）：中枢神経胚細胞腫のRNAシーケンスによりジャーミノーマと非ジャーミノーマが異なる発現を示し、非ジャーミノーマはM2マクロファージを含む免疫細胞の浸潤が多いこと、精巣胚細胞腫と発現・メチル化が相同であることを示した。腫瘍マーカーと組織型の比較解析を行った結果、ジャーミノーマや奇形腫でも腫瘍マーカーの上昇が多く見られ、腫瘍マーカーだけで治療方針を決めることに疑義を投げかけたメチル化解析を行い、12p増幅が最も頻度の高く、非ジャーミノーマであることの強い相関が見られ、12p増幅がある症例は予後が悪いことが示された。ジャーミノーマにおける腫瘍免疫細胞の多い症例は予後が良いことを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経胚細胞腫は東アジアに多い疾患であり、歴史的に日本が臨床研究において大きな成果を出してきた分野である。基礎研究についても過去10年において日本が主導権を握りつつあり、この科研費研究はその主導権の掌握において極めて大きい役割を果たした。具体的には中枢神経胚細胞腫の特徴的な発現様式、免疫細胞浸潤のプロファイルと予後マーカーとしての役割、そして12p増幅という新たなバイオマーカーの同定が新しい発見であった。これに続く科研費研究にて更なる発展を目指し、胚細胞腫の治療標的の同定を目標としている。

研究成果の概要（英文）：RNA sequence was performed for 58 CNS germ cell tumors (GCTs), which demonstrated germinoma and non-germinomatous GCTs (NGGCTs) were clearly distinct on transcriptome, that NGGCTs harbor immune cells including M2 macrophages, and that they were akin to testicular GCTs with regards to transcriptome and methylome. Tumor markers and histopathological entities were correlated in 162 cases. This analysis unraveled that tumor markers were unexpectedly elevated in germinomas and teratomas, which casted a cautious look on the standardized treatment decision-making based on tumor markers alone. Another important achievement was that methylation analysis in 82 CNS GCT cases demonstrated 12p gain was frequent in CNS GCTs; and 12p gain was associated with NGGCT histology, and also was correlated with worse prognosis. Finally, abundance of lymphocytes in germinoma was proved to be a good prognosis marker, which was demonstrated in histopathologica/clinical studies.

研究分野：腫瘍のゲノム解析

キーワード：胚細胞腫 RNAシーケンス メチル化解析 コピー数異常 予後

1. 研究開始当初の背景

中枢神経胚細胞腫(CNSGCT)は小児・AYA 世代に好発し、小児脳腫瘍の中では14%を占め我が国において2番目に頻度の高い悪性脳腫瘍である。一方でCNSGCTは欧米では頻度が低く(米国脳腫瘍統計で3.6%)手術も避けられる傾向にあるため、近年欧米を中心に飛躍的に研究が進んだ小児脳腫瘍の中で唯一ゲノム解析が進んでいない。一方我が国ではCNSGCTの頻度が高く、従来より臨床研究で世界をリードしており、症例の集積が進んでいる。CNSGCTは思春期の男児の松果体、視床下部、基底核などに好発し、水頭症による意識障害、脳神経症状、尿崩症をはじめとした分泌異常などさまざまな症状を示す。CNSGCTはWHO脳腫瘍分類によりgerminoma(ジャーミノーマ), embryonal carcinoma, yolk sac tumor, choriocarcinoma, teratoma (mature, immature, or with malignant transformation)の亜型に分類されているが、約30%に複数の亜型が混在するmixed GCTを認め、時に異なる組織型で再発することもある。ジャーミノーマはCNSGCT全体の半数以上を占め、放射線・化学療法に比較的反応が良いが約10%で治療抵抗性症例が存在する(Matsutani *J Neurosurg* 1997)。一方でノンジャーミノーマは放射線・化学療法に抵抗性であることが多く、長期治療成績が不良である(Al-Hussaini *J Neurooncol* 2009, Calaminus *Neuro Oncol* 2017)。またこの疾患が小児～若年成人に発生することから、特に放射線治療による長期合併症への懸念が大きく、二次性癌や頭蓋内血管病変、また高次脳機能の障害が多く報告されている(Sawamura *Eur J Cancer* 1998, Doyle *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008)。これらのため、放射線・化学療法に代わる治療が求められている。2013年に中枢神経内胚細胞腫ゲノム解析コンソーシアム(iGCT genome analysis consortium)が創設され、2019年までに日本全国56施設から300を超える凍結検体、FFPE、臨床情報が国立がんセンターに集積されていた。これらを対象としてそれまでにエクソームシーケンシによる遺伝子変異解析、メチル化解析によるエピゲノム解析、コピー数解析、発現解析などの多くの報告を行ってきており、日本が世界において研究の第一人者としての地位を築いた(Fukushima *Acta neuropathol* 2014, 2017, Takami *J Neurooncol* 2015, Ichimura *Acta neuropathol* 2016, Takami *Neuropathol Appl Neurobiol* 2019, Takami *Neuro Oncol* 2019)。悪性腫瘍に対する新たな治療戦略として、免疫治療への期待が高まっていた。特に免疫チェックポイントであるPD-1とPD-L1に対する阻害剤がメラノーマをはじめとして他の臓器腫瘍で有効であると証明され実際の臨床で選択肢となっていた。各症例において免疫チェックポイント阻害剤が奏功するかどうかのバイオマーカーとして、腫瘍間質におけるTリンパ球の量、腫瘍細胞のPD-1発現率、腫瘍間質におけるリンパ球のPD-L1発現率の高さが重要であることも報告されていた(Berger *Clin Cancer Res* 2008)。CNSGCTは元来リンパ球浸潤の多い腫瘍であり、特にジャーミノーマは腫瘍細胞とリンパ球の混在が顕著で、病理学的にいわゆる”two-cell pattern”の像が特徴である(Nitta *Cancer Lett* 1995)。申請者はジャーミノーマではPD-1発現率が93.8%、間質のリンパ球におけるPD-L1発現率が73.5%であったことを報告し、また発現解析によりB-cellおよびT-cellの様々なsubtypeを含む免疫細胞が腫瘍間質に存在することを示した(Takami H, et al. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2019)。日本を含む他の研究グループの結果においてもジャーミノーマではPD-1が高発現しているとする報告があった(Liu *PloS one* 2018, Wildeman *Neuropathol Appl Neurobiol*)。興味深かったのは、胚細胞腫の頭蓋外での好発部位である精巣において、ジャーミノーマのカウンターパートであるセミノーマでもほぼ同様のPD-1, PD-L1の発現率であったということであった(Fankhauser *Br J Cancer* 2015)。このようにCNSGCTは腫瘍浸潤リンパ球の多い腫瘍のため免疫療法の潜在的有効性があり期待は高いがまた導入に向けた基礎的データを欠いていた。また若年発症であるため放射線・化学療法の長期合併症が大きな問題となっている。CNSGCTのゲノム、エピゲノム解析を行い、その統合解析により中枢神経胚細胞腫の病態を解明し、また微小環境の詳細な解析により、今後の免疫治療の治験の導入を見据えた新たな治療ターゲットを解明することを目標として研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究課題の目的はノンジャーミノーマにおける免疫チェックポイントの発現の解明 腫瘍間質の免疫細胞の同定 T細胞、B細胞受容体のレパトア解析による腫瘍への免疫応答の解明が軸であった。先行するジャーミノーマでの解析では腫瘍間質におけるリンパ球系・骨髄球系の様々な免疫細胞の存在と、免疫細胞・腫瘍細胞における免疫チェックポイントの発現を解明したが、より予後の悪いノンジャーミノーマでは未解明であった。症例の約50%がノンジャーミノーマであり、この予後不良な腫瘍に対しても引き続き精力的に治療開発のための解析を行っていかねばならなかった。ノンジャーミノーマにおける腫瘍免疫の研究は、検体の質・量につ

いて他が比肩しない世界的競争力があり、またこれまでの解析結果を基にした統合解析ができることも大きな強みであり、研究成果の意義は高かった。また CNSGCT に対する免疫療法については企業が高い関心を示しており、すでに治験に向けた協議が始められていた。従って本研究の成果は CNSGCT の免疫学的微小環境の解明につながるとともに、CNSGCT に対する新たな治療法の開発に直結することが期待された。

ノンジャーミノーマ 86 検体を対象に、まず病理組織に対して免疫染色、RNA in-situ hybridization (RNA scope)を用いて腫瘍細胞と間質の免疫細胞での PD-1, PD-L1 の発現をそれぞれ調べることにした。また RNA シークエンスの発現データにより腫瘍間質の免疫細胞の同定を行う。さらに次世代シークエンサーを用いた B・T 細胞性リンパ球受容体のレパトア解析も行い受容体遺伝子の多様性を調べる予定とした。これにより B・T 細胞の多様性を定量化し、受容体の clonal amplification の有無の精査、そして T 細胞の clonal amplification が見られる受容体の遺伝子配列が特定され腫瘍との関連が発見されれば、腫瘍特異的受容体が同定されると思われる。また多様性の程度により免疫治療の効果予測も可能になると思われた。これらのデータによりノンジャーミノーマにおける免疫療法に向けたデータの蓄積、腫瘍微小環境と腫瘍免疫の詳細を解明する。またゲノムデータ(遺伝子変異、メチル化、発現、コピーナンバー異常)との統合解析により、ノンジャーミノーマにおけるキーとなる病態の異常を特定し、腫瘍免疫と強く関連するゲノム異常や発現・メチル化プロファイルを特定する予定とした。

以上のように、本研究は CNSGCT の免疫学的微小環境を解明し、ノンジャーミノーマに対する免疫治療への道のりを開く足掛かりにすることを目的とした。

3. 研究の方法

中枢神経胚細胞腫ゲノム解析コンソーシアムが保有する 58 症例の中枢神経胚細胞腫(49 例は初発、9 例は再発)に対して RNA シークエンスを行った。SureSelect Strand Specific RNA library preparation kit (Agilent Technologies)を用いた。RNA シークエンスデータから免疫細胞の定量予測を行う際は、CIBERSORT をウェブブラウザ上で用いた。また同様に gene-set enrichment analysis (GSEA)や gene ontology (GO)解析なども公開ツールを用いて行った。

これとオーバーラップする 84 症例において Infinium HumanMethylation450 BeadChips (イルミナ社)を用いてメチル化解析を行った。データからコピー数異常を網羅的に解析した。R のパッケージ "conumee" を用いた。

これらの中枢神経胚細胞腫ゲノム解析コンソーシアムの症例は全例、WHO 分類に基づいた中央病理診断を行った。43 例のジャーミノーマ、6 例の成熟奇形腫、4 例の未熟奇形腫、1 例の悪性奇形腫、19 例のジャーミノーマを含む混合性胚細胞腫、1 例のジャーミノーマを含まない混合性胚細胞腫、5 例の卵黄嚢腫、1 例の胎児性癌、1 例の絨毛癌、1 例の squamous epithelial tumor (精巣胚細胞腫からの転移)、2 例の高悪性度胚細胞腫が含まれた。これらはすべて別々の患者から採取された検体であった。

臨床解析においては中枢神経胚細胞腫ゲノム解析コンソーシアムの 122 例とアメリカメイヨークリニックの 40 症例を用いた。臨床データ(腫瘍マーカー、病理所見、予後など)はカルテ上から後方視的に収集した。特に腫瘍マーカーの値と病理所見との比較解析と、腫瘍マーカーと予後との関係について解析を行った。

またジャーミノーマにおける腫瘍含有率の解析では中枢神経胚細胞腫ゲノム解析コンソーシアムの 114 症例を用い、2 人の神経病理医が独立して HE 染色標本を精査し、最も腫瘍含有率が高いと観察された部分において全ての有核細胞の中の腫瘍細胞の数の割合を計算した。

実験の詳細については研究成果を報告した論文 (Takami H, et al. Neuro-Oncology 2022) に記載の通りとする。

4. 研究成果

RNA シークエンスにより、ジャーミノーマと非ジャーミノーマが明確に異なる発現を示すこと、非ジャーミノーマは M2 マクロファージを含む多くの免疫細胞の浸潤が疑われること、また精巣の胚細胞腫と発現・メチル化において相同であることを示した。2022 年の *Neuro-Oncology* 誌に第一著者として報告した。

腫瘍マーカーの臨床的位置づけについて、日本の中枢神経胚細胞腫ゲノム解析コンソーシアムからの 122 症例とアメリカメイヨークリニックの 40 症例を用いて腫瘍マーカーと組織型の比較解析を行った。その結果、ジャーミノーマや奇形腫でも腫瘍マーカーの上昇が多く見られ、腫瘍マーカーだけで治療方針を決めることの可能な欧米の治療方針に疑義を投げかけることになった。*Cancers* 誌に 2022 年に第一著者として報告した。

またメチル化解析にてコピー数異常を網羅的に解析した。その結果、12p 増幅が最も頻度の高い

コピー数異常であり、12p 増幅と組織学的に非ジャーミノーマであることの強い相関が見られた。また 12p 増幅がある症例は非ジャーミノーマの中でも予後が悪いことが統計学的に示され、これらの結果を 2021 年の *Neuro-Oncology* 誌に共同第一著者として報告した。

また病理標本の解析において腫瘍含有率と免疫細胞の定量解析を行い、ジャーミノーマにおける腫瘍免疫細胞の多い症例は予後が良いことを発見し、*Neuro-Oncology Advances* 誌に 2021 年に報告した。

これらの結果が評価され、2020 年に脳腫瘍学会での星野賞、2020 年に間脳下垂体学会賞、2021 年、2022 年に脳腫瘍学会での Top scoring abstract 賞、2021 年に脳神経外科学会にて研究奨励賞を受賞することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takami Hirokazu, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Transcriptome and methylome analysis of CNS germ cell tumor finds its cell-of-origin in embryogenesis and reveals shared similarities with testicular counterparts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuro-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） 10.1093/neuonc/noac021	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 Takami Hirokazu, et al.	4. 巻 14
2. 論文標題 Roles of Tumor Markers in Central Nervous System Germ Cell Tumors Revisited with Histopathology-Proven Cases in a Large International Cohort	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 979 ~ 979
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14040979	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

1. 著者名 Satomi Kaishi, Takami Hirokazu, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 12p gain is predominantly observed in non-germinomatous germ cell tumors and identifies an unfavorable subgroup of central nervous system germ cell tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuro-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） 10.1093/neuonc/noab246	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 Takami Hirokazu, et al.	4. 巻 3
2. 論文標題 Low tumor cell content predicts favorable prognosis in germinoma patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology Advances	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） 10.1093/oaajnl/vdab110	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7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 高見浩数
2. 発表標題 中枢神経胚細胞腫の予後を決める病理・分子マーカー
3. 学会等名 日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高見浩数
2. 発表標題 中枢神経胚細胞腫の予後因子の解明：154症例における分子病理解析
3. 学会等名 日本脳神経外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirokazu Takami
2. 発表標題 Prognostic Factors of CNS Germ Cell Tumors; Molecular and Histopathological Analyses on 154 Cases from the iGCT Consortium
3. 学会等名 Society of Neuro-Oncology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirokazu Takami
2. 発表標題 Biology of CNS germ cell tumors: pathological and multi-omics perspectives
3. 学会等名 Society of Neuro-Oncology Latin America (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirokazu Takami
2. 発表標題 Transcriptome and methylome profiles of CNS germ cell tumors and their comparison with testicular counterpart
3. 学会等名 International Society of Pediatric Neuro-Oncology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirokazu Takami
2. 発表標題 Prognostic Factors of CNS Germinomas; Histopathological Analyses on 114 Cases from the iGCT Consortium
3. 学会等名 World Federation of Neuro Oncology Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高見浩数
2. 発表標題 中枢神経胚細胞腫のomics解析による起源細胞の同定と病態の解明
3. 学会等名 脳神経外科学術総会
4. 発表年 2022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
---------	---------