

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07185

研究課題名(和文)免疫機能再生指標によるepigeneticバイオマーカーの構築

研究課題名(英文)Construction of epigenetic biomarkers by regenerative indices of immune function

研究代表者

谷岡 洋亮(Tanioka, Hiroaki)

川崎医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：40775491

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)：本研究では、切除不能進行再発胃癌に対しImmune-checkpoint-blockade (ICB)を投与することによって治療前後でICBのメインターゲットであるCD8陽性T細胞中のPD1陽性細胞の末梢血中の割合に変化が見られた。また、治療前のPD1陽性細胞の割合が高い症例でICBによる治療効果が高い傾向もみられた。このことはICBの投与が末梢血中のCytotoxic T lymphocyteに何らかの影響を与えていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では末梢血中のCD8陽性T細胞中のPD1陽性細胞の割合や変化が切除不能進行再発胃癌に対するImmune-checkpoint-blockade (ICB)の効果予測因子になりうることが示唆された。このことは胃癌患者における免疫チェックポイント阻害の予後・効果予測因子を簡便に測定しうる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we found that administration of Immune-checkpoint-blockade (ICB) to patients with unresectable advanced or recurrent gastric cancer altered the percentage of PD1-positive cells in the peripheral blood among CD8-positive T cells, the main target of ICB, before and after treatment. The study showed that administration of Immune-checkpoint-blockade (ICB) to patients with unresectable advanced recurrent gastric cancer changed the percentage of PD1-positive cells in the peripheral blood among CD8-positive T cells, the main target of ICB, before and after treatment. There was also a trend toward greater efficacy of ICB treatment in patients with a higher percentage of PD1-positive cells before treatment. This suggests that the administration of ICB has some effect on Cytotoxic T lymphocytes in the peripheral blood.

研究分野：腫瘍内科学

キーワード：胃癌 バイオマーカー 免疫チェックポイント阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

切除不能進行再発胃癌(mGC)では、Immune-checkpoint-blockade (ICB)と殺細胞剤併用療法が1st-lineで使用可能となる。この流れは、他の分子標的薬と同じであり、EGFR-blockadeに示されているように、獲得耐性やre-challenge投与の可否といった検証が行われることが推測される。しかしながら、それらを規定可能な明確なbiomarkerは存在しない。ICBによる抗腫瘍効果はT細胞に依存しており、T細胞は抗原曝露によりNaïve Effector Exhaustedという3つのstageを経ることが知られている(T cell stage)。PD1は抗原曝露された瞬間から発現し、Effector stageではICBによるPD1 blockは奏功するが、Exhausted stageでは、ICB不応となる。この事実は、反対にT細胞のstageを同定できれば、ICBの奏功を推測することが可能となると考えられる。本研究では、mGC患者のICB投与前血液を対象に、このT cell stagingによるICB predictive biomarkerの構築を試みる。

## 2. 研究の目的

乳癌や大腸癌患者の治療前血液中Peripheral blood cells(PBC)では、PD1やPD-L1だけでなく、CTLA4、TIM3、TIGIT等の複数のT細胞抑制レセプターがupregulateされており、これら発現はpromoter CpGsの低メチル化やヒストンのH3K9me3 / H3K27me3の減少など、epigenetic修飾が関与することが示唆されている。これらメチル化解析はすべてPBCで行われており、すなわち、腫瘍浸潤T細胞がPBCにも反映されている可能性が示唆されている。

そこで我々は本研究にて、今までに得た知見を鑑み、ICB感受性を規定するEffector function associated genes・Naïve/Memory-associated genesのDMR methylation patternをPBC中のCD8T細胞から検出し、ICBのpredictive biomarkerの構築を試みる。また、我々の得たデータのDMR methylation patternの変化は腫瘍細胞やapoptosisに至った免疫細胞の変化をみている可能性もあるため、circulating cell-freeDNA(ccfDNA)から検出も併せて行い、臨床データと照合を行い、その有益性を検証する。

## 3. 研究の方法

本研究では、多施設共同観察研究「切除不能進行・再発胃癌患者の二次化学療法中における末梢神経障害を中心とした副作用と薬剤効果を検討する多施設共同観察研究(IVY Study, UMIN000033376, Tanioka H et al. BMC Cancer 2019)」から得られる200例の二次治療前後の血液を中心に、以下の3点に焦点を絞り研究を行う。

1) FACSにて、CD3+CD8+PD1+/CD3+CD8+PD1-/CD3+CD4+/othersの4群に分離した単核球群より得られる各DNA(b) ccfDNA(c) PBCから抽出されるDNA、の3種類のDNAからFN /TBX21/PD1/TCF7/CCR7 DMR methylation patternの検出を行う。

2) mGC患者の化学療法前原発巣と化学療法後転移巣によるmethylation microarrayによる再現性の検討を行う。HER2陽性、MSI-high、HER2陰性non-MSIの3群に対しmethylation microarrayによる解析を行い、FN /TBX21/PD1/TCF7/CCR7 DMR methylation patternの変動が大腸癌症例と同様に起きているのか検討を行う。

3) IVY Study臨床データとの照合解析

IVY StudyはOX PTXを行っているmGCが対象であるが、3次治療内容と予後も得るよ

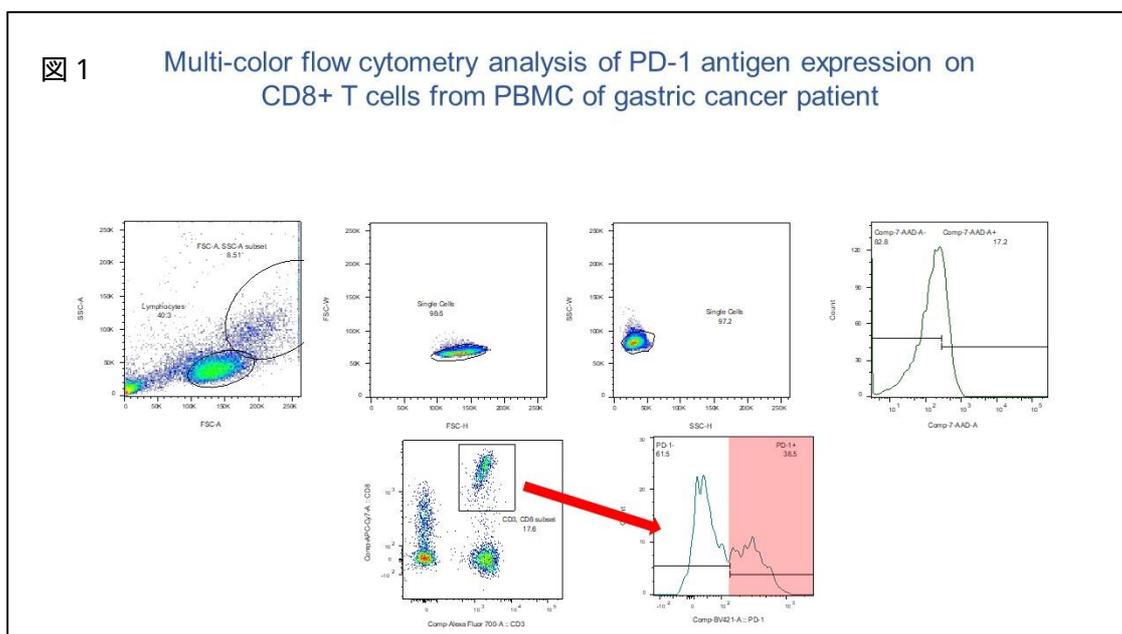
うにしている。そこで、IVY Study にて得られた血液解析結果と ICB 治療の有無、奏功や予後を比較し、DMR methylation pattern が ICB predictive biomarker かどうか検証を行う。

#### 4. 研究成果

IVY 試験は 162 名が登録され、そのうち以下の患者背景の 156 名が解析可能であった(表 1)。

Baseline Characteristics		
		n (%)
Gender	Male	113 (72)
	Female	43 (28)
Age, years	Median (range)	69 (40-82)
	<75	124 (80)
	≥75	32 (20)
ECOG PS	0	82 (52)
	1	59 (38)
	2	15 (10)
Primary tumor location	Upper	49 (31)
	Middle	58 (38)
	Lower	49 (31)
Gastrectomy	Yes	43 (28)
	No	113 (72)
HER2 status	Positive	32 (21)
	Negative	122 (78)
	unknown	2 (1)
Lauren classification	Intestinal type	74 (47)
	Diffuse type	81 (52)
	Unknown	1 (1)
Number of metastatic organs	≤1	81 (52)
	≥2	75 (48)
Liver metastasis	Yes	59 (38)
	No	97 (62)
Peritoneal Dissemination	Yes	68 (44)
	No	88 (56)
Ascites	Yes	73 (47)
	No	83 (53)

その中で3次治療として抗 PDL1 抗体薬である Nivolumab を施行した mGC 患者 22 名の Nivolumab 治療前後の血液サンプルの FACS によるリンパ球分画の解析および CD3+CD8+PD1+/CD3+CD8+PD1-/CD3+CD4+PD1+/CD3+CD4+PD1- のリンパ球の分離を行った(図 1)。



22例の抗腫瘍効果は complete response(CR) 0名、partial response (PR) 3名、stable disease (SD) 4名であった(表 2)。

表 2

response rate of 22 GC patients who received NIVO monotherapy

	ALL
n	22
ORR % (95%CI)	13.6 (4.7–33.3)
DCR % (95%CI)	31.7 (12.0–71.4)
n (%)	
CR	0 (0)
PR	3 (13.6)
SD	4 (18.2)
PD	15 (68.2)

抗腫瘍効果の有無にて2群に分け検討を行ったところ、治療前の ICB メインターゲットである CD8 陽性 T 細胞中の PD1 陽性細胞の割合は治療効果の有無で有意差は無かったが、治療効果が有った群でやや割合が高い傾向にあった(図2)。また、治療前後の PD1 陽性細胞の変化率の検討を行ったところ、治療効果を認めた群では投与前が約 40%であり、投与後は約 10%と全例減少していた(図3)。

図 2

PD1+ CD8+ T cell ratio before treatment between patients with and without clinical benefit

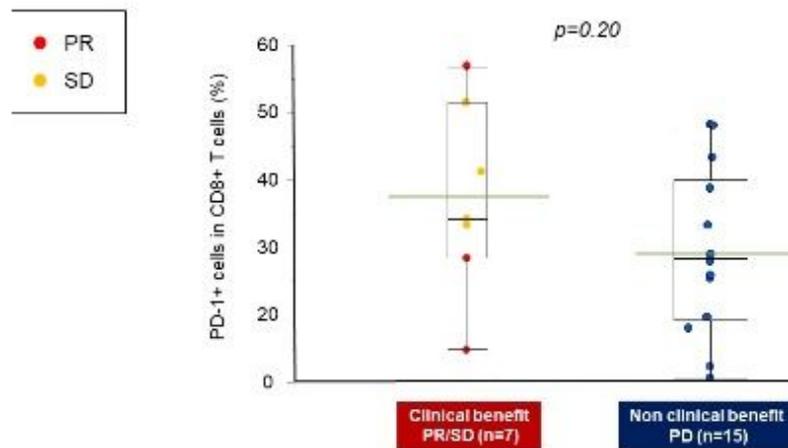
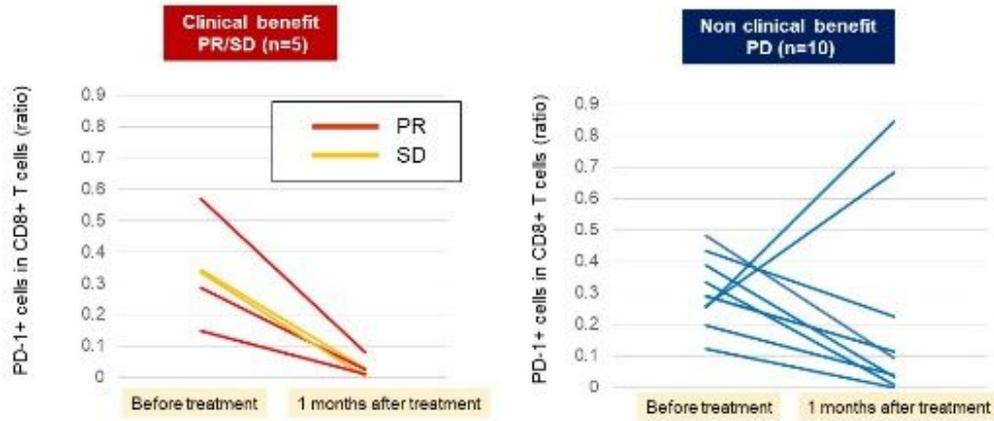


図 3

### Changes in the PD1+ CD8+ T cell ratio during Nivolumab monotherapy



このことは ICB の投与が末梢血中の Cytotoxic T lymphocyte に何らかの影響を与えていることが考えられる。近年、胃癌における ICB のバイオマーカーとしては tumor infiltrating lymphocyte の免疫担当細胞の割合や PD1 の発現などに注目がされているが、ICB 投与前の組織採取は必ずしも容易ではない。我々は末梢血中のリンパ球解析することにより、より実用性の高いバイオマーカーの構築を目指し、ICB 投与前に分離されたリンパ球を用い、IFN /TBX21/PD1/TCF7/CCR7 DMR methylation pattern による T cell staging を行い、抗腫瘍効果との関連を検討していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Inada Ryo, Nagasaka Takeshi, Shimokawa Mototsugu, Ojima Hitoshi, Noura Shingo, Tanioka Hiroaki, Munemoto Yoshinori, Shimada Yasuhiro, Ishibashi Keiichiro, Shindo Yoshiaki, Mishima Hideyuki, Okajima Masasumi, Yamaguchi Yoshiyuki	4. 巻 169
2. 論文標題 Phase 3 trial of sequential versus combination treatment in colorectal cancer: The C-cubed study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 166 ~ 178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejca.2022.04.009	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 Ooki Akira, Morita Satoshi, Tsuji Akihito, Iwamoto Shigeyoshi, Hara Hiroki, Tanioka Hiroaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Impact of early tumor shrinkage on quality of life in patients treated with first-line cetuximab plus chemotherapy for unresectable metastatic colorectal cancer: results of Phase II QUACK trial	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 711-723
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-022-09811-x	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 Tanioka Hiroaki, Okawaki Makoto, Yano Shuya, Yoshimitsu Tomomi, Tokuda Kikue, Nyuya Akihiro, Yamaguchi Yoshiyuki, Nagasaka Takeshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Neutrophil-to-lymphocyte ratio before each chemotherapy line predicts clinical outcomes in patients with unresectable gastric cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 98-108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2023.13684	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 Toshima Toshiaki, Tanioka Hiroaki, Mori Yoshiko, Tanaka Takehiro, Yasui Kazuya, Kimura Keisuke, Umeda Yuzo, Fujiwara Toshiyoshi, Nyuya Akihiro, Yano Shuya, Nagasaka Takeshi	4. 巻 101
2. 論文標題 Genomically Stable Gastric Cancer Characterized by Hypomethylation in Wnt Signal Cascade	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oncology	6. 最初と最後の頁 105 ~ 116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000527098	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 Taniguchi Fumitaka, Nyuya Akihiro, Toshima Toshiaki, Yasui Kazuya, Mori Yoshiko, Okawaki Makoto, Kishimoto Hiroyuki, Umeda Yuzo, Fujiwara Toshiyoshi, Tanioka Hiroaki, Yamaguchi Yoshiyuki, Goel Ajay, Nagasaka Takeshi	4. 巻 7
2. 論文標題 Concordance of acquired mutations between metastatic lesions and liquid biopsy in metastatic colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Future Science OA	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) 10.2144/fsoa-2021-0059	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 TANIOKA HIROAKI, SHIMADA KEN, TSUJI AKIHITO, KOCHI MITSUGU, KIM HO MIN, TAKAHASHI TAKAO, DENDA TADAMICHI, TAKAGANE AKINORI, WATANABE TAKANORI, KOTAKA MASAHITO, NAKAMURA MASATO, SUNAKAWA YU, TAKEUCHI MASAHIRO, ICHIKAWA WATARU, FUJII MASASHI	4. 巻 42
2. 論文標題 Phase II Study of S-1 and Irinotecan Plus Bevacizumab as Second-line Treatment for Patients With Metastatic Colorectal Cancer Resistant to the Fluoropyrimidine-oxaliplatin-cetuximab Regimen	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2675 ~ 2681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15745	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 Kato Takeshi, Kagawa Yoshinori, Kuboki Yasutoshi, Gamoh Makio, Komatsu Yoshito, Yasui Hirofumi, Satake Hironaga, Oki Eiji, Tanioka Hiroaki, Kotaka Masahito, Makiyama Akitaka, Denda Tadamichi, Goto Masahiro, Yoshino Takayuki, Yamazaki Kentaro, Soeda Junpei, Shibuya Kazunori, Iwata Masaru, Oba Koji, Yamaguchi Kensei	4. 巻 26
2. 論文標題 Safety and efficacy of panitumumab in combination with trifluridine/tipiracil for pre-treated patients with unresectable, metastatic colorectal cancer with wild-type RAS: The phase 1/2 APOLLON study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1238 ~ 1247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-021-01902-2	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 Kawai Takashi, Nyuya Akihiro, Mori Yoshiko, Tanaka Takehiro, Tanioka Hiroaki, Yasui Kazuya, Toshima Toshiaki, Taniguchi Fumitaka, Shigeyasu Kunitoshi, Umeda Yuzo, Fujiwara Toshiyoshi, Okawaki Makoto, Yamaguchi Yoshiyuki, Goel Ajay, Nagasaka Takeshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Clinical and epigenetic features of colorectal cancer patients with somatic POLE proofreading mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Epigenetics	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) 10.1186/s13148-021-01104-7	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 Satake Hironaga, Hashida Hiroki, Tanioka Hiroaki, Miyake Yasuhiro, Yoshioka Shinichi, Watanabe Takanori, Matsuura Masato, Kyogoku Takahisa, Inukai Michio, Kotake Takeshi, Okita Yoshihiro, Matsumoto Toshihiko, Yasui Hisateru, Kotaka Masahito, Kato Takeshi, Kaihara Satoshi, Tsuji Akihito	4. 巻 26
2. 論文標題 Hepatectomy Followed by Adjuvant Chemotherapy with 3-Month Capecitabine Plus Oxaliplatin for Colorectal Cancer Liver Metastases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Oncologist	6. 最初と最後の頁 e1125 ~ e1132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/onco.13816	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 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 谷岡 洋亮, 安井 和也, 母里 淑子, 田中 健大, 木村 圭介, 入谷 光洋, 岡脇 誠, 矢野 修也, 山口 佳之, 永坂 岳司
2. 発表標題 Wnt signaling cascadeにおける低メチル化を特徴とするGenomically stable 胃癌
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroaki Tanioka, Takeshi Nagasaka, Shuya Yano, Makoto Okawaki, Masahiro Yamamura, Yoshiyuki Yamaguchi
2. 発表標題 Pre-treatment PD-1 lymphocyte ratio in blood may predict clinical outcome of gastric cancer patients under Nivolumab monotherapy
3. 学会等名 第20回日本臨床腫瘍学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 [演者] 谷岡 洋亮:1 [共同演者] 永坂 岳司:1, 堅田 洋佑:1, 岡脇 誠:1, 山村 真宏:1, 山口 佳之:1
2. 発表標題 胃癌ニボルマブ投与による末梢血PD1CD8陽性Tリンパ球変化は効果予測となりうる
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷岡洋亮、永坂岳司、堅田洋佑、佐野史典、岡脇誠、山村真弘、山口佳之
2. 発表標題 胃癌薬物療法における投与前低好中球リンパ球比は良好な予後予測因子となりうる
3. 学会等名 第43回日本癌局所療法研究会
4. 発表年 2021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	永坂 岳司 (Nagasaka Takeshi)  (30452569)	川崎医科大学・医学部・教授  (35303)	
研究分担者	岡脇 誠 (Okawaki Makoto)  (40509254)	川崎医科大学・医学部・講師  (35303)	

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