

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16477

研究課題名(和文)革新的免疫治療開発を目指した食道扁平上皮癌の免疫回避機構解明と新規免疫治療の開発

研究課題名(英文)Elucidation of immune evasion mechanism and development of novel immunotherapy for esophageal squamous cell carcinoma for development of innovative immunotherapy

研究代表者

問端 輔 (Toihata, Tasuku)

熊本大学・病院・特任助教

研究者番号：60879881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：切除検体495例のパラフィン包埋切片の作成に膨大な時間を要した。未染の分子マーカー及び、Laser microdissection法にて採取されたDNAを用いたExome解析を行い得られた情報から変異や増幅・欠失の解析を行う(Software; Mutect2, GISTIC解析等)。抽出した免疫因子と関連する癌細胞の遺伝子変化を抽出し、495症例でreal-time PCR法で検出する。食道扁平上皮癌における互いに関連する免疫学的因子と癌細胞の遺伝子変化を、495例を対象に臨床データとの統合解析を行うことで、これまで明らかにされていない食道扁平上皮癌の腫瘍免疫回避機構を明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍免疫微小環境の解明は、近年、世界中で注目を集めている先端性の高い分野であり、我々も食道癌におけるPD-L1の発現と食道癌の予後に関与することを報告した(Yagi et al. Ann Surg. 2019)。治療としては、抗PD-1阻害剤の適応疾患も拡大しており、特にMSI-Hの固形腫瘍に対して適応になったことは初めての臓器横断的な適応となり、腫瘍の免疫学的特性をより細分化し治療効果を予測することの重要性が増してきていることを示している[TCGA, Nature. 2014, 2017]。このように腫瘍の免疫微小環境を解明することが新たな治療法の開発の一助となることが予想され注目に値する。

研究成果の概要(英文)：It took an enormous amount of time to prepare paraffin-embedded sections of 495 resected specimens.

Mutations, amplifications, and deletions were analyzed from the information obtained by Exome analysis using unstained molecular markers and DNA collected by laser microdissection (Software; Mutect2, GISTIC analysis, etc.). Genetic alterations in cancer cells that correlate with the extracted immune factors are extracted and detected by real-time PCR in 495 cases. Integrate analysis of mutually correlated immunological factors and genetic alterations of cancer cells in esophageal squamous cell carcinoma with clinical data in 495 cases to elucidate tumor immune evasion mechanisms in esophageal squamous cell carcinoma, which have not been clarified so far.

研究分野：腫瘍免疫

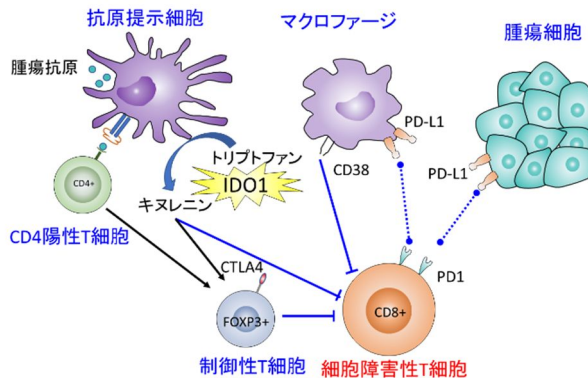
キーワード：腫瘍免疫 食道癌 免疫チェックポイント

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

食道癌は癌関連死の原因として 7 番目に多い予後不良な疾患である。その中でも食道扁平上皮癌はアジアに特に多く、本邦でも食道癌の 9 割を占める組織型である。診断時にすでに進行癌であることが多く集学的な治療が行われる。近年、腫瘍免疫微小環境における免疫細胞の働き  
の解明が進み免疫治療の進歩が著しい(図 1)。食道扁平上皮癌に対し、抗 PD-1 阻害剤の一つである Nivolumab の有用性示され本邦で治療薬として承認された[ATTRACTION-2 試験: Lancet Oncol. 2017, ATTRACTION-3 試験: Lancet Oncol. 2019]。また 2017 年 5 月米国にて、多くの臨床試験や基礎的研究成果に基づき、抗 PD-1 阻害剤の一つである Pembrolizumab が、MSI-high またはミスマッチ修復機構の欠損 (deficient mismatch repair: dMMR) の固形がんを対象に承認され[NEJM, 2017, J Clin Oncol, 2019]、本邦でも 2018 年 12 月に承認された。しかしながら、食道扁平上皮癌において PD-1 のリガンドである PD-L1 の陽性率は 4 割程度、また MSI-H の割合は 1 割程度で Nivolumab や Pembrolizumab が十分な効果をもたらす症例は限られており、腫瘍に発現している PD-L1 の発現状況や MSI-H のみならずもバイオマーカーとなりえない。このように免疫チェックポイント阻害薬による治療効果の乏しい症例における免疫回避機構が何であるかは未だ明らかではない。

【図1 腫瘍免疫微小環境における免疫細胞】



2. 研究の目的

本邦の食道癌の 90%以上が扁平上皮癌であるのに対し、欧米では腺癌が 70%以上を占めており、本邦と欧米では組織学的バックグラウンドが大きく異なる。そのため、食道扁平上皮癌に関する基礎研究・臨床研究は、日本が中心となってリードしていく必要がある。本研究では、食道扁平上皮癌における、複数の免疫分子の免疫組織学的評価と、Laser microdissection で採取された DNA による Exome 解析を行い、両者の統合解析から本腫瘍における主要な免疫回避機構を解明し、新規免疫治療法の開発を目的とする。

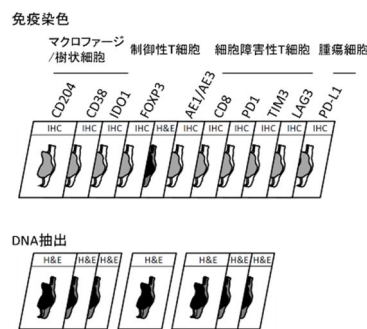
3. 研究の方法

本研究では、本施設において食道扁平上皮癌に対し 2005 年 4 月から 2015 年 12 月までに手術を施行した切除検体 495 例を用い、食道扁平上皮癌の免疫学的評価と遺伝子変化の評価を行い、臨床データとの統合解析を行うこと腫瘍免疫微小環境を解明・新規免疫治療法の開発を行う。

【連続切片の作成と免疫染色および遺伝子変化の評価】

症例の選択：本研究では図 2 に示すパラフィン包埋切片より Exome 解析に耐えうる DNA quality をもつ症例の選択が必要である。Exome 解析に十分な DNA 量を保管している 10 例を選ぶ。

【図2 連続切片を用いた詳細な腫瘍免疫の評価とExome解析】



免疫染色：本研究では、表 1 に列記した免疫細胞マーカーを連続するパラフィン包埋切片を用い免疫染色にて評価する。細胞障害性 T 細胞に  
関与する分子マーカーとして、CD8, PD1, TIM3, LAG3, TIGIT, T-bet, GATA-3 を、制御性 T 細胞  
に関与する分子マーカーとして FOXP3, CTLA4 を、マクロファージに  
関与する分子マーカーとして CD204, CD38, PD-L1 を、樹状細胞に  
関与する分子マーカーとして IDO1 を、腫瘍細胞に関する分子  
マーカーとして PD-L1 を免疫染色で評価する。連続切片の免疫染色  
であるため、腫瘍におけるほぼ同一の部位で同一の免疫細胞を  
評価することができる。評価部位は、腫瘍辺縁と腫瘍内における  
リンパ球 (Tumor infiltrating

【表1 免疫細胞の分子マーカーとその機能・役割】

発現細胞	分子マーカー	機能・役割
マクロファージ/樹状細胞	CD204, CD38, IDO1, FOXP3, AEL/AE3	腫瘍免疫抑制
制御性T細胞	FOXP3, CTLA4	免疫抑制
細胞障害性T細胞	CD8, PD1, TIM3, LAG3, PD-L1	免疫攻撃
腫瘍細胞	PD-L1	免疫回避

免疫染色	免疫染色	免疫染色	免疫染色
腫瘍辺縁	腫瘍内	腫瘍辺縁	腫瘍内
HE x4	AE1/AE3 x4	HE x4	AE1/AE3 x4
Abundant TLS area x20	Abundant TLS area x20	Abundant TLS area x20	Abundant TLS area x20
CD8 x20	FOXP3 x20	CD8 x20	FOXP3 x20
197/mm <sup>2</sup> x20	275/mm <sup>2</sup> x20	181/mm <sup>2</sup> x20	122/mm <sup>2</sup> x20

lymphocytes: TILs)が多く存在している部位それぞれ3カ所ずつとする。TILsが多く存在している部位の決定はHE染色を用いる。また、腫瘍辺縁は、サイトケラチンの抗体であるAE1/AE3で染色することで腫瘍の辺縁を明らかにし、対物レンズ x20の視野においてAE1/AE3で染色された腫瘍の占める割合が50%となる視野とする。上記の方法で決定した視野3カ所における陽性細胞数をイメージアナライザーにて計測する(図3)。PD-L1の評価は、腫瘍細胞の細胞膜上に1%以上発現(Tumor Proportion Score: TPS)した症例を陽性とし、1%未満を陰性とする(間質のPD-L1は評価の対象としない)。

#### 4. 研究成果

切除検体495例ごとの連続するパラフィン包埋切片の作成に膨大な時間を要した。その後、免疫染色を行っておりCD8, FOXP3, PD-L1の免疫染色は終了しているが、その他のマーカーに関してはまだ完遂できておらず、また免疫染色のqualityにも問題があり、当初計画していた評価を十分に行えていない状況にある。未染のマーカーの染色及び、Laser microdissection法にて採取されたDNAを用いたExome解析を行う。Exome解析に十分なDNA量を保管している10例を選択し、選択した10例のDNA quality評価後、Next Ultra II DNA Library Prep KitとNext Multiplex Oligosを用いてサンプル調整を行いHiSeq2500でのExome解析を行う。得られた情報から変異や増幅・欠失の解析を行う(Software; Mutect2, GISTIC解析等)。上記抽出した免疫因子と相関する癌細胞の遺伝子変化を抽出し、全495症例でreal-time PCR法で検出する。食道扁平上皮癌における互いに相関する免疫学的因子と癌細胞の遺伝子変化を、全495例を対象に臨床データとの統合解析を行うことで、これまで明らかにされていない食道扁平上皮癌の腫瘍免疫回避機構を明らかにし急ぎ報告する。

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 1件）

1. 著者名 Imamura Y, Toihata T, Haraguchi I, Ogata Y, Takamatsu M, Kuchiba A, Tanaka N, Gotoh O, Mori S, Nakashima Y, Oki E, Mori M, Oda Y, Taguchi K, Yamamoto M, Morita M, Yoshida N, Baba H, Mine S, Nunobe S, Sano T, Noda T, Watanabe M	4. 巻 148
2. 論文標題 Immunogenic characteristics of microsatellite instability low esophagogastric junction adenocarcinoma based on clinicopathological, molecular, immunological and survival analyses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1260 ~ 1275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33322	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 問端 輔
2. 発表標題 進行再発食道癌に対するNivolumab治療の免疫関連有害事象(irAE)と予後との関連
3. 学会等名 第54回制癌剤研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 問端 輔
2. 発表標題 切除不能進行・再発食道癌に対する当院のNivolumab使用経験
3. 学会等名 第72回日本気管食道学会
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
---------------------------	-----------------------	----

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