71　革新的質量分析法による食道腺癌の免疫回避機序の解明	渡邊　雅之

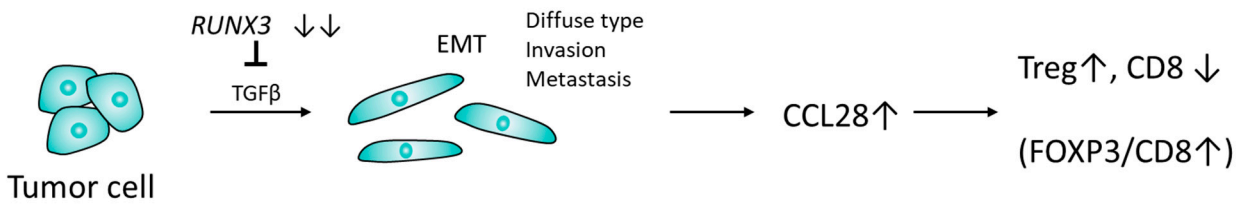
【目的】上部消化管腺癌は次の 4 つの分子亜型 : EB ウイルス（EBV）関連、高レベルマイクロサテライト異常（MSI-H）、ゲノム安定性（Genomically stable : GS）、染色体不安定性（Chromosomal instable : CIN）に分類される。このうち、EBV 関連と MSI-H 腫瘍には、PD1／PD-L1 系抑制の免疫チェックポイント阻害剤が有効とされているが、その他の腫瘍（Non-EBV／non-MSI-H）では、PD1／PD-L1 系以外の免疫回避機構の関与が示唆されている。抗腫瘍作用を有する $CD8^+$細胞傷害性 T 細胞は、$FOXP3^+$制御性 T 細胞により抑制を受け、腫瘍局所における両者のバランス（$FOXP3^+$細胞数／$CD8^+$細胞数＝FOXP3／CD8 比）が、腫瘍の悪性度と関与するのではないかと着想した。また、腫瘍間質が腫瘍免疫微小環境に及ぼすことから、FOXP3／CD8 比の悪性度への影響は、組織型（びまん型、分化型）によって異なるのではないかと考え、Non-EBV／non-MSI-H の食道胃接合部腺癌を対象とし、その仮説の検証とメカニズムを探索することとした。

【方法】CD8 および FOXP3 の免疫染色が可能であった国内多施設の Non-EBV／non-MSI-H の食道胃接合部腺癌（N＝303）を対象とした。ホルマリン包埋連続切片を自動免疫染色機で染色し、$CD8^+$細胞および $FOXP3^+$細胞の数を、腫瘍内部と浸潤部のそれぞれにおいて 3 個所、デジタル画像を使って測定した。腫瘍内部と浸潤部それぞれの $FOXP3^+$／$CD8^+$比を算出し、中央値で高群・低群に分け、悪性度の指標としては疾患特異的予後との比較検討を、メカニズム解明には選択的メチル化解析を行った。

【結果】pStage Ⅰ～Ⅲ（N＝250）において、びまん型腫瘍（N＝57）では FOXP3／CD8 比高群で有意に予後不良であった（疾患特異別 5 年生存率、高群 57.1%、低群 88.9%、*P*＝0.0096）。多変量解析では、びまん型において FOXP3／CD8 比高群は独立した予後因子であり、そのリスク比は 8.47（*P*＝0.0033）であった。さらに、びまん型と分化型において、FOXP3／CD8 比の予後に与える影響は顕著に異なり、両者の交互作用は有意であった（*P* for interatction ＝0.022）。びまん型症例においては、代表的な 11 個の CpG アイランドメチル化形質マーカーのメチル化解析で、RUNX3 の高メチル化症例の FOXP3／CD8 比が上昇していることが判明した（*P*＝0.010）。RUNX3 メチル化異常を伴うびまん型腫瘍細胞におけるケモカイン関連遺伝子発現状況を TCGA パブリックデータベースで検索したところ、CCL28 高発現のみが FOXP3／CD8 比の上昇と相関傾向にあることが判明した（*P*＝0.088）。

Non-EBV／non-MSI-H の食道胃接合部腺癌において、RUNX3 メチル化によって発がんするびまん型腫瘍の免疫微小環境では、CCL28 の高発現を介した制御性 T 細胞の誘導と、それによる細胞傷害性 T 細胞の抑制を引き起こしていることが、抗腫瘍免疫を回避するメカニズムであると考えられた。

Non-EBV／non-MSI-H 食道胃接合部腺癌のびまん型における抗腫瘍免疫回避メカニズム



71. 革新的質量分析法による食道腺癌の免疫回避機序の解明

渡邊　雅之

がん研究会 がん研有明病院 消化器外科

Key words：食道胃接合部腺癌，免疫治療，予後，CD8，FOXP3

緒　言

癌治療において、免疫治療は新しい有望な治療体系であり、腫瘍免疫微小環境の理解は癌治療の発展に重要である。細胞傷害性 T 細胞（Cytotoxic T lymphocyte：CTL）は、CD8 分子を発現しており、抗腫瘍免疫に重要な役割を担う。特に抗原特異的 CTL は、殺腫瘍細胞効果を発揮する。一方、腫瘍細胞では programmed death-1（PD-1）／programmed death-ligand 1（PD-L1）系の免疫回避機構を獲得することで、このような宿主からの抗腫瘍免疫回避機構を獲得することが知られるようになり、臨床応用されている。

上部消化管腺癌は網羅的遺伝子解析にて次の 4 つの分子亜型に分類される：EB ウイルス関連（Epstein-Barr virus：EBV）、高レベルマイクロサテライト異常（High-level microsatellite instable：MSI-H）、ゲノム安定性（Genomically stable：GS）、染色体不安定性（Chromosomal instable：CIN）。PD-1／PD-L1 系は EBV 陽性と MSI-H 腫瘍の主要な腫瘍免疫回避機構である［1］。しかしながら、その他の腫瘍（Non-EBV／non-MSI-H）における PD-1 発現は低く、異なる免疫回避機構の存在が示唆される。

近年、腫瘍間質が腫瘍免疫微小環境に影響を及ぼすことが明らかとなった。上部消化管腺癌の組織型はびまん型（diffuse 型）と分化型（intestinal 型）に大別され、特に diffuse 型では間質の増生が顕著であり、両者における腫瘍浸潤リンパ球数も違いがあるなど、免疫微小環境が異なることが指摘されている［2，3］。腫瘍免疫微小環境における T 細胞には細胞傷害性 T 細胞、ヘルパーT 細胞、制御性 T 細胞（regulatory T 細胞：Treg）などの様々なサブセットが存在し、この中でも制御性 T 細胞は、主として転写因子 FOXP3 によって制御され、細胞傷害性 T 細胞を抑制する腫瘍免疫回避機構として重要である。しかしながら、腫瘍組織型と制御性 T 細胞の関係性は十分に検討されていない。

今回我々は、腫瘍免疫微小環境において、制御性 T 細胞と細胞傷害性 T 細胞のバランス（$FOXP3^+$細胞数／$CD8^+$細胞数＝FOXP3／CD8 比）が、腫瘍の悪性度と関与しているのではないか、さらにその相関は組織型（びまん型、分化型）によって異なるのではないかと考え、Non-EBV／non-MSI-H の食道胃接合部腺癌を対象とし、その仮説の検証とメカニズムを探索することとした。

方　法

1.　対象

2000 年～2015 年において、国内 4 施設で外科的に切除された Non-EBV／non-MSI-H の食道胃接合部腺癌 335 症例を対象とした。

2.　病理組織学的評価

腫瘍内および浸潤部の $CD8^+$細胞および $FOXP3^+$細胞の数をそれぞれ測定することとした。連続する 3 枚の切片を使い、1 枚に CD8 抗体（clone C8/144B）、1 枚に FOXP3 抗体（clone 236A/E7）を用いた。腫瘍内、浸潤部それぞれにおいてリンパ球が多く集積している場所（hotspot）を 3 つずつ選び、ImageJ software を使って $CD8^+$細胞および $FOXP3^+$細胞の数をそれぞれ測定した。解析にはその平均値を使用して $FOXP3^+$細胞数／$CD8^+$細胞数比（以下、FOXP3／CD8 比と称す）を算出し、腫瘍内および浸潤部のそれぞれの中央値で二分し、高・低群として解析に用いた。

3. マススペクトロメトリー解析

正常／腫瘍のペア凍結組織が利用可能な症例を対象とし、iTRAQ®を用いた質量分析を行い、免疫関連タンパク群発現に着目して情報解析を行った。

4. 統計解析

本研究での統計解析は全て、JMP ver.13（SAS Institute、Cary、NC）を使用して行った。疾患特異別生存率に関する多変量解析では、バックワード除外は P=0.10 を閾値として、それ未満を最終モデルの変量採用とした。

5. TCGA データベースとの比較検討

本研究で得られた結果を、The Cancer Genome Atlas（TCGA）の食道胃接合部腺癌のパブリックデータと比較検討した［4］。データは cBioPortal for Cancer Genomics（http://www.cbioportal.org）よりダウンロードし、各遺伝子の z-score を用いて、検討を行った。

結果および考察

1. 接合部腺癌における FOXP3／CD8 比の算出

FOXP3 および CD8 の免疫染色状況とそれぞれの陽性細胞数カウント状況を図 1 に示す。腫瘍内および浸潤部の FOXP3／CD8 比の中央値を算出し、腫瘍内では 0.60、浸潤部では 0.48 であった。腫瘍内および浸潤部の解析において、それぞれの中央値で高群と低群に二分し、解析を行うことした。

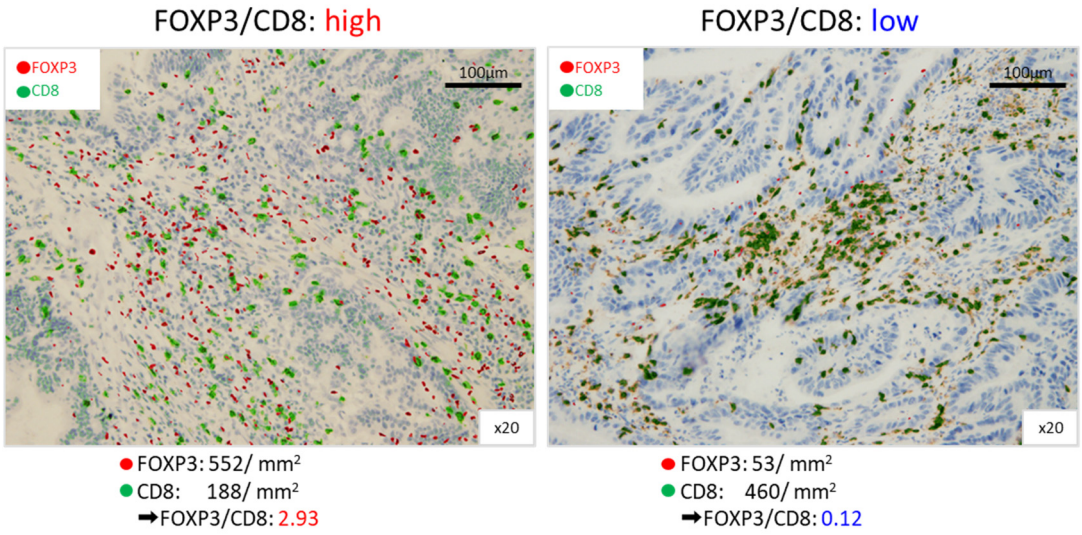


図 1. FOXP3$^+$（赤）と CD8$^+$（緑）の免疫染色

画像ソフトで認識された核内 FOXP3 タンパク発現を赤で、核内 CD8 タンパク発現を緑で示す。
FOXP3／CD8 比の高い症例（左）と低い症例（右）の代表例を提示する。スケールバー：100 μm。

2. 腫瘍部および浸潤部における FOXP3／CD8 比高群・低群別の予後解析

浸潤部または腫瘍内のそれぞれにおいて、組織型［びまん型（diffuse 型）および分化型（intestinal 型）］別に FOXP3／CD8 比の予後に及ぼす影響を、疾患特異的な生存曲線と生存多変量解析を用いて検討した。浸潤部での FOXP3／CD8 比の高群と低群を組織型別に比較検討したところ、pStage Ⅰ～Ⅲ（N＝250）での解析（図 2）で、FOXP3／CD8 比の予後に与える影響は顕著に異なり、びまん型においてのみ、FOXP3／CD8 比高群は有意に予後不良であった（疾患特異別 5 年生存率、高群 57.1%、低群 88.9%、P=0.0096）。この結果は、多変量解析でも同様であった［びまん型における FOXP3／CD8 比高群、リスク比（Hazard ratio：HR）8.47、95%信頼区間（confidence interval：CI）、2.04～35.19）、P=0.0033］。さらに、この FOXP3／CD8 比と組織型の予後に及ぼす交互作用は、有意に相関した

（*P* for interatction＝0.022）。なお、このような現象は腫瘍内部においては確認できず、浸潤部特有の現象であった。

すなわち、食道胃接合部腺癌のびまん型において、浸潤部の FOXP3^{+}細胞の割合が CD8^{+}細胞の割合より多い腫瘍免疫微小環境では、再発を来たしやすく癌死するリスクが高い、ということを示している。

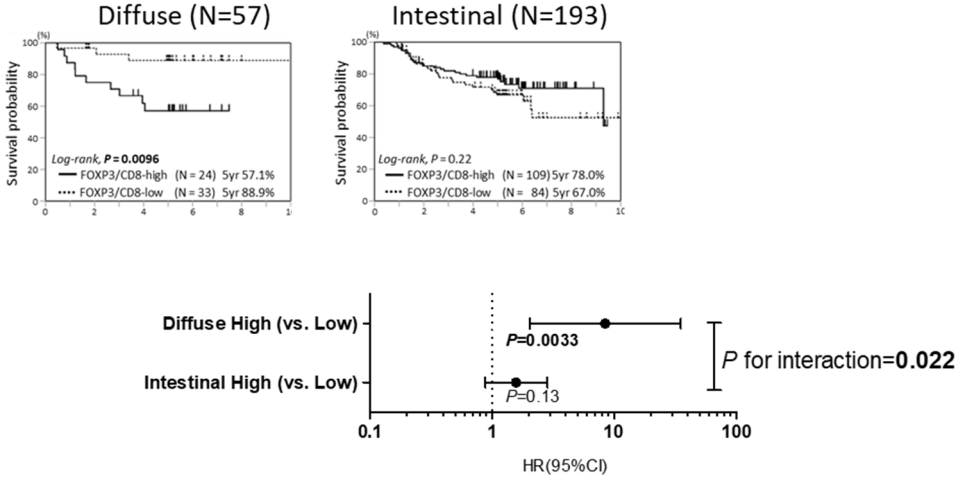


図 2. 浸潤部 FOXP3／CD8 比の高群（High）および低群（Low）別にみた疾患特異的生存解析［pStage Ⅰ～Ⅲ（N=250）］
びまん型（Diffuse）の症例（N＝57）では、FOXP3／CD8 比高群（N＝24）は低群（N＝33）に比較して有意に予後不良であった。しかしながら、このような差は分化型（intestinal 型）において認められなかった。

このようなびまん型腫瘍における FOXP3／CD8 比が高くなるメカニズムの解明を行った。質量分析は十分な検体量が得られなかったため、消化管腺癌の代表的な 11 個の CpG アイランドメチル化形質（CpG island methylator phenotype：CIMP）マーカーのメチル化の観点から検討した。その中で RUNX3 の高メチル化が有意に FOXP3／CD8 比が上昇していた（*P*＝0.010）。RUNX3 は TGF-β や Wnt シグナル系を抑制することで、正常上皮細胞の上皮間葉転換（epithelial-mesenchymal transition：EMT）の抑制や、腫瘍前駆細胞への変化を抑制すると考えられているが、RUNX3 のメチル化により、これらの抑制が解除され、びまん型の組織型の胃がんの発がんと関与することが示唆されている［5］。そこで、RUNX3 メチル化異常を伴うびまん型腫瘍細胞が、何らかのケモカインやケモカインレセプターを介して腫瘍免疫微小環境におけるリンパ球数に影響を及ぼし、その結果 FOXP3／CD8 比が高くなるのではないかと考えた。これを検討するため、TCGA のパブリックデータを用いて、RUNX3 低発現状況と相関する 39 種類のケモカインリガンドと 18 種類のケモカインレセプターの遺伝子発現状況を検索したところ、CCL28 高発現のみが相関傾向を示した（*P*＝0.088）。さらに、この傾向は pStage Ⅰ～Ⅳ（N＝64）で有意であった（*P*＝0.014）。CCL28 に関しては、過去の文献によると、低酸素下の状況で腫瘍辺縁に FOXP3^{+}細胞をリクルートすると報告されており［6］、本研究での減少を説明するメカニズムの一因となりうる。従って、Non-EBV／non-MSI-H の食道胃接合部腺癌中でも、RUNX3 メチル化によって発がんするびまん型腫瘍の腫瘍免疫微小環境では、CCL28 の高発現を介した FOXP3^{+}細胞に代表される制御性 T 細胞の誘導と、それによる CD8^{+}細胞の抑制を引き起こしていることが、宿主からの抗腫瘍免疫を回避メカニズムであり、予後不良となる一因であることが示唆された［6］。

このような腫瘍の新たな治療戦略としては、制御性 T 細胞の作用を抑制する、もしくは腫瘍浸潤部への遊走そのものを抑制することが有効と考えられる。制御性 T 細胞は恒常的に CTLA-4 を発現して抗原提示樹状細胞の働きを抑制するとされているおり、抗 CTLA-4 抗体は抗体依存性細胞傷害（antibody dependent cellular cytotoxicity：ADCC）活性により腫瘍組織から制御性 T 細胞を除去することが可能と考えられている［7］。従って、今回の研究により、Non-EBV／non-MSI-H の食道胃接合部腺癌中でも、RUNX3 メチル化によって発がんするびまん型腫瘍では、抗 CTLA-4 抗体の有効性が示唆される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者はがん研有明病院食道外科今村裕さん、原口郁実さんである。本稿を終えるにあたり、本研究にご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文　献

1） Kim ST, Cristescu R, Bass AJ, Kim KM, Odegaard JI, Kim K, et al. Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer. Nature medicine. 2018 Jul 16. Epub 2018 Jul 16. PMID: 30013197 DOI: 10.1038/s41591-018-0101-z

2） Kim TS, da Silva E, Coit DG, Tang LH. Intratumoral Immune Response to Gastric Cancer Varies by Molecular and Histologic Subtype. Am J Surg Pathol. 2019 Jun;43(6):851-60. Epub 2019 Jun. PMID: 30969179 DOI: 10.1097/pas.0000000000001253

3） Pernot S, Terme M, Radosevic-Robin N, Castan F, Badoual C, Marcheteau E, et al. Infiltrating and peripheral immune cell analysis in advanced gastric cancer according to the Lauren classification and its prognostic significance. Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association. 2019 Jul 2. Epub 2019 Jul 2. PMID: 31267360 DOI: 10.1007/s10120-019-00983-3

4） The Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. Nature. 2017 Jan 12;541(7636):169-75. Epub 2017 Jan 12. PMID: 28052061 DOI: 10.1038/nature20805

5） Voon DC, Wang H, Koo JK, Nguyen TA, Hor YT, Chu YS, et al. Runx3 protects gastric epithelial cells against epithelial-mesenchymal transition-induced cellular plasticity and tumorigenicity. Stem Cells. 2012 Oct;30(10):2088-99. Epub 2012 Oct. PMID: 22899304 DOI: 10.1002/stem.1183

6） Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang LP, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. Nature. 2011 Jul 13;475(7355):226-30. Epub 2011 Jul 13. PMID: 21753853 DOI: 10.1038/nature10169

7） Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. Science. 2008 Oct 10;322(5899):271-5. Epub 2008 Oct 10. PMID: 18845758 DOI: 10.1126/science.1160062