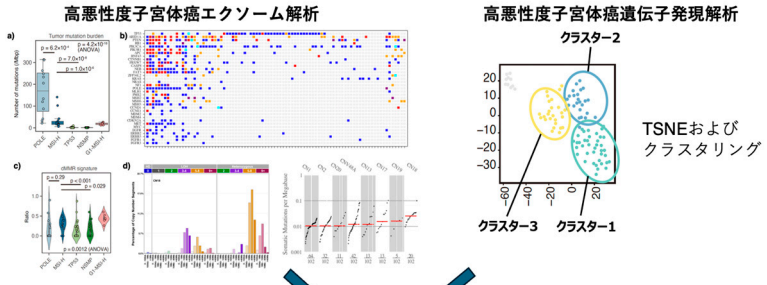
21　子宮体癌の免疫回避に関わるゲノム異常の探索	河津　正人

【目的】近年、免疫チェックポイント阻害剤のがん治療における有用性が着目されており、とくにマイクロサテライト不安定性の高い（MSI-H）腫瘍で効果的である。しかし、免疫チェックポイント阻害剤が有効でない症例もあり、その耐性機序に応じて必要な薬剤と組み合わせるなどの対策が必要である。MSI-H 腫瘍は様々ながん種に見られ、特に大腸癌と子宮体癌で頻度が高いが、同じ MSI-H 腫瘍でも、臓器によって抗腫瘍免疫の状態が異なり、臓器やがんの組織型に応じた治療戦略を考える必要がある。したがって、抗腫瘍免疫応答性を規定する因子の同定や、臓器や組織型による違いの分子的機構の解明は、がん種やその組織型に応じて最適化された治療法開発につながることが期待される。子宮体癌の発生率は近年増加しており、若年層でも増加傾向が見られる。従来、エストロゲン依存性であるタイプⅠと非依存性であるタイプⅡに分類されてきたが、近年はゲノム解析の結果に基づいて、4 つの異なるゲノムサブタイプに分類して理解されるようになった。しかし、これらのゲノムサブタイプと子宮体癌の組織学的分類との関連については、まだ理解が十分に進んでいない。これらのゲノム異常のがん発生過程における役割や、免疫応答性や特徴的な組織形態との正確な関連は未解明である。ゲノム異常と組織学的分類と免疫応答性の相互の関連を解明するために、特に高悪性度子宮体癌に焦点を当てたゲノム解析を実施した。

【方法】非類内膜癌および Grade 3 類内膜癌（EMG3）を含む、タイプⅡに分類される 81 個の高悪性度子宮体癌を対象とした。組織診断は、ゲノム解析の結果を知らされていない病理医により判定された。ゲノム異常を検出するためにエクソーム配列解析を行い、変異検出の後に、変異シグネチャー解析、染色体コピー数解析、および染色体コピー数シグネチャー解析を行った。エクソーム解析の結果に基づき「ゲノム」サブタイプを判定した。また、網羅的遺伝子発現解析を行い、細胞表現型の解析を行い、CD8 陽性細胞の免疫染色およびその計測により、抗腫瘍免疫状態を評価した。

【結果】ゲノム異常に基づくサブタイプ分類によって、*POLE* 変異により高度に変異が蓄積する「POLE 型」が 12 例、マイクロサテライト不安定性の高い「MSI-H 型」が 12 例、*TP53* 変異により染色体コピー数異常が顕著に見られる「TP53 型」が 35 例、これらの特徴を持たない「特定の分子プロファイルを持たない型」（NSMP 型）が 20 例同定された。ゲノム分類は必ずしも組織型や免疫応答性との対応が明確でなかったため、遺伝子発現プロファイルに基づいたクラスター分類を行い、3 つの腫瘍クラスターを同定した。クラスター1 においては、免疫応答性に関わるシグナル伝達系の活性化が見られ、一方クラスター2 には「MSI-H 型」が多く含まれ腫瘍抗原が多くなっていた。腫瘍抗原量と免疫応答性に関わるシグナル伝達系の活性が一致していない点が、大腸癌との大きな相違点であると考えられた。

本研究の概要



MSI-H子宮体癌とMSI-H大腸癌の違いについての仮説

	ミスマッチ修復	免疫チェックポイント阻害剤	ネオ抗原	免疫応答反応
大腸癌	ミスマッチ修復障害	◎	多い	高い
	ミスマッチ修復正常	×	少ない	低い
子宮体癌	ミスマッチ修復障害	○	多い	低い
	ミスマッチ修復正常	△	少ない	高い

21. 子宮体癌の免疫回避に関わるゲノム異常の探索

河津　正人

千葉県がんセンター 研究所 細胞治療開発研究部

Key words：子宮体癌，マイクロサテライト不安定性，ゲノム解析，抗腫瘍免疫

緒　言

近年、免疫チェックポイント阻害剤のがん治療における有用性が着目されており、とくにマイクロサテライト不安定性の高い（MSI-H）腫瘍で効果的である。しかし、免疫チェックポイント阻害剤が有効でない症例もあり、その耐性機序に応じて必要な薬剤と組み合わせるなどの対策が必要である。MSI-H 腫瘍は様々ながん種に見られ、特に大腸癌と子宮体癌で頻度が高いが、同じ MSI-H 腫瘍でも、臓器によって抗腫瘍免疫の状態が異なり、臓器やがんの組織型に応じた治療戦略を考える必要がある。したがって、抗腫瘍免疫応答性を規定する因子の同定や、臓器や組織型による違いの分子的機構の解明は、がん種やその組織型に応じて最適化された治療法開発につながることが期待される。

子宮体癌の発生率は近年増加しており、若年層でも増加傾向が見られる。従来、エストロゲン依存性であるタイプⅠと非依存性であるタイプⅡに分類されてきたが、近年は広範なゲノム解析の結果に基づいて、以下の 4 つの異なるゲノムサブタイプに分類して理解されるようになった［1, 2］。1. 超突然変異型（POLE 型）は、*POLE* 変異により 100/Mbp 以上の変異が蓄積することを特徴とする。2. マイクロサテライト不安定性高（MSI-H）型は、ミスマッチ修復機構の障害により 10/Mbp 以上の変異が蓄積する。3. 染色体コピー数異常が顕著なタイプである copy number high（CN-H）型は、*TP53* 変異に起因すると考えられる。4. それ以外のものは、染色体コピー数異常が少なく、copy number low（CN-L）型とされる。しかし、これらのゲノムサブタイプと子宮体癌の組織学的分類との関連については、まだ理解が十分に進んでいない。これらのゲノム異常のがん発生過程における役割や、免疫応答性や特徴的な組織形態との正確な関連は未解明である。ゲノム異常と組織学的分類と免疫応答性の相互の関連を解明するために、特に高悪性度子宮体癌に焦点を当てたゲノム解析を実施した。

方法および結果

1. 高悪性度子宮体癌のエクソーム解析およびその結果にもとづくサブタイプ分類

非類内膜癌および Grade 3 類内膜癌（EMG3）を含む、タイプⅡに分類される 81 個の高悪性度子宮体癌を対象とした。組織診断は、ゲノム解析の結果を知らされていない病理医により判定され、漿液性癌 15 例、明細胞癌 23 例、癌肉腫 21 例、EMG3 20 例、およびその他（小細胞癌 1 例および分類不能な腫瘍 1 例を含む）であった。明細胞癌のうち、7 例は類内膜癌成分を含む混合型であり、2 例は漿液成分を含む混合型であった。マイクロサテライト高度不安定性（MSI-H）の Grade1 類内膜癌 7 例も解析した。ゲノム異常を検出するためにエクソーム配列解析を行い、変異検出の後に、変異シグネチャー解析、染色体コピー数解析、および染色体コピー数シグネチャー解析を行った。エクソーム解析の結果に基づき「ゲノム」サブタイプを判定したが、その際には、腫瘍含有量の少ない症例では染色体コピー数異常の検出感度が低くなること、また染色体不安定性の定義づけにおいて曖昧性が避けられないことを考慮し、染色体コピー数異常に代えて *TP53* 変異を判定基準に加えた。すなわち、まず、*POLE* 変異を有する症例を POLE 型として分類し、次に、残りの症例からの MSI 分析または MSI スコアに基づいて MSI-H 型が決定され、その次に *TP53* 変異または *MDM2* 増幅を有する症例は TP53 型とし、最後

に、その他の症例は特定の分子プロファイルを持たない型（NSMP）と分類した。また、*POLE* 変異と TP53、PMS2、および MSH6 の組織染色に基づいた「病理学」サブタイプの判定、*POLE* 変異と染色体コピー数異常の状態に基づく「TCGA」サブタイプの判定も合わせて行った。その際には 1 Gbp 以上のコピー数変動領域を有する腫瘍を染色体コピー数異常が多いもの（CN-H 型）と定義した。

2. 高悪性度子宮体癌におけるゲノム異常の概要

POLE 型、MSI-H 型、TP53 型、NSMP 型、および G1-MSI-H 型の突然変異数の分布は図 1a の通りであった。*PTEN* と *ARID1A* の変異は、POLE 型と MSI-H 型で高頻度に観察された（図 1b、論文投稿準備中であるので、詳細なデータの提示は控えさせて頂く）。変異シグナチャー解析では、POLE 型は主に POLE シグネチャーを特徴としていた。POLE 腫瘍では、ミスマッチ修復（MMR）関連遺伝子の変異が散発的に観察され、これらの腫瘍では MMR 障害を示すシグナチャーの混在が見られた（図 1c）。*POLE* 変異による遺伝子変異の蓄積が、MMR 遺伝子に影響を与え、MSI-H の性質が獲得されたと考えられる。一方、*MLH1* のメチル化は、MSI-H 型でのみ観察され、POLE 型では観察されなかった。POLE 型では、がんの比較的後期の段階で MMR 機能が失われると考えられ、がんの初期段階で MMR 機能が失われる MSI-H 型とは病態が異なる可能性がある。また、2 つの腫瘍においては、POLD1 変異シグネチャーが検出された。これらは POLE 型に近い病態を持つものと推測されるが、*POLE* 変異がないためなので、分類手順に従い MSI-H 型に分類された。

染色体コピー数シグナチャーパターンの解析を行ったところ、TP53 型で特に相同組換え修復障害（HRD）に関連するコピー数シグネチャー18（CN18）が見られた（図 1d）。子宮内膜癌およびトリプルネガティブ乳がんの HRD 腫瘍に関連するとされる CN17 の頻度は特に高くなかった（図 1d）。CN18 と CN19 は 2 回のゲノム倍加イベントと関連付けられ、先行研究により HRD と相関すると報告されている。本研究において TP53 型の高悪性度子宮体癌では CN18 と CN19 が検出され、高度の染色体構造異常が起っていることが示された。

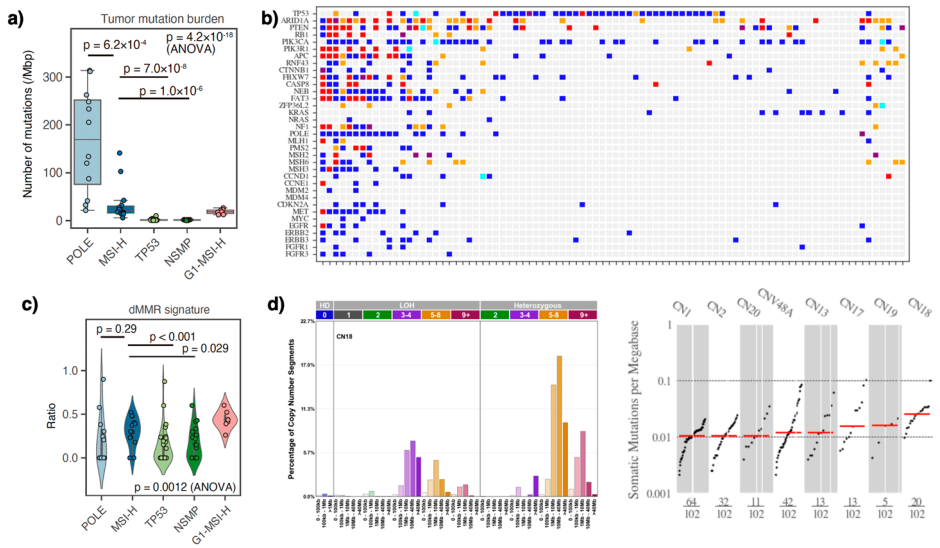


図 1. 高悪性度子宮体癌のエクソーム解析の概要

a）ゲノムサブタイプ分類ごとの腫瘍突然変異負荷（Tumor mutation burden：TMB）。

b）遺伝子変異の概要。横軸は各症例を示す。青はアミノ酸置換、赤はノンセンス変異、オレンジはフレームシフト変異、水色はアミノ酸の欠失・挿入を示す。

c）変異シグナチャー解析で検出されたミスマッチ修復障害（dMMR）シグナチャーの割合。

d）染色体コピー数シグナチャー分析の概要。左側に CN18 のプロファイルを示す。右側に、検出された各 CN シグナチャーの本コホートにおける割合の分布を示す。

One-way ANOVA により群間の差の有意差を検定し、Tukey により各群の比較を行った（a および c）。

この研究の症例では POLE 型が比較的多くの割合で含まれていた。すなわち、良好な予後で知られている POLE 型が、高悪性度子宮体癌において比較的高い割合で見られたことになるが、POLE 型にしばしば高悪性度のものがみられるという先行研究の結果と一致している。また、このコホートでは TP53 型または CN-H 型の割合が高く、NSMP 型または CN-L 型の割合が低かったことは、このコホートの高悪性度を反映しているものと考えられる。*TP53* 変異と染色体コピー数異常の間の相関は必ずしも明確ではなく、NSMP 型または CN-L 型の分類の本質的な難しさがあるものと考えられる。それでも、TP53 型と比較して NSMP 型では *KRAS* 変異の頻度が高く、染色体コピー数が増幅している遺伝子は少なかった。*CTNNB1* 変異の頻度が低かったことも、本コホートの特性（高悪性度子宮体癌）と関連している可能性があると考えられた。

全体的な変異プロファイルは先行研究と概ね一致していたが、一部の変異の頻度については TCGA コホートと違いが見られ、悪性度等の病理学的状態や人種的背景の違いを反映している可能性が考えられ、さらなる調査が必要と思われた。

3. 高悪性度子宮体癌における高腫瘍免疫の状態

MSI-H 腫瘍ではそれ以外の腫瘍（マイクロサテライト安定、MSS）と比較して、CD8 の浸潤が高度であった。これは MSI-H 腫瘍に関するこれまでの報告と一致している。また、先行研究と一致して、MSI-H 腫瘍における *ARID1A* 変異症例では CD8 の浸潤が高度であった［3］。ARID1A の機能喪失がミスマッチ修復欠損を引き起こすことが報告されているが、このコホートでは、ARID1A 機能の喪失による MSI スコア、腫瘍突然変異負荷（TMB）、または欠失・挿入の数の変化は観察されなかった。これらの結果は、MSI-H 腫瘍において MMR 障害以外の要因が子宮内膜癌の免疫応答に影響を与えている可能性を示唆し、CD8 の浸潤に与える *ARID1A* 変異の影響を示唆していると考えられた。

ゲノム分類は必ずしも組織型との対応が明確でなかったため、遺伝子発現プロファイルに基づいたクラスター分類を試みた。周辺正常組織サンプルを含めた網羅的遺伝子発現解析の結果を用いてクラスタリングしたところ、3 つの腫瘍クラスター（クラスター1、クラスター2、クラスター3（論文投稿準備中であるので、詳細は未記載とする））と正常組織クラスターが同定され、遺伝子発現に基づくクラスター分類は組織型と比較的良好に対応していた。遺伝子発現プロファイルは起源細胞や細胞の分化状態に強く影響されると考えられる。従って、子宮体癌の組織学的違いを理解するためには、ゲノム分類だけでなく、起源細胞の違いなどの細胞表現型も考慮する必要があることが示された。

組織学的分類と腫瘍免疫状態の違いを調べるために、CD8 細胞を染色し、腫瘍組織に浸潤する CD8 陽性細胞数を測定した。組織学的タイプ間やクラスター間では CD8 浸潤に明らかな差は見られず、TCGA コホートでも同様であった。一方で、クラスター1 においては、*STAT1*、*IRF1*、*ADAR*、*IFIT1*、*IFIT2*、*IFIT3*、および *CD274* などの IFN-γ 刺激に関連する遺伝子の発現が亢進しており、免疫応答が活性化している可能性が示唆された。同様の遺伝子発現の違いは、解析から MSI-H 腫瘍が除外された場合でも観察され、また TCGA コホートでも同様の結果が観察された。

考　察

大腸がんにおいては MMR 障害や POLE 変異がある場合には腫瘍免疫が活性化している［4］。しかし、この研究において MSI-H 型と POLE 型が多く含まれているクラスター2 で CD8 の浸潤は増加していなかった。一方で、クラスター1 においては、免疫応答性に関わる遺伝子の発現が高くなっていた。この遺伝子発現プロファイルの違いは、クラスター1 とクラスター2 の腫瘍細胞の起源となる細胞の表現型の違いが反映されているものと考えられる。クラスター2 においては、MMR 障害により CD8 陽性細胞の浸潤が促進されるのに対して、クラスター1 においては、がん細胞の免疫応答性シグナル経路の活性化が CD8 陽性細胞の浸潤と関連することが考えられる。これは、大腸がんにおいては、MMR 障害のある腫瘍細胞で、免疫応答性に関わるシグナル伝達系

が活性化していることと対照的であり、MMR 障害のある腫瘍の臓器特異性の一つの要因であると考えられる（表 1）。本研究で見出したクラスター1 の子宮体癌において、なぜ免疫応答性シグナル経路が活性化しているのか、今後のさらなる研究が必要である。

当初の目的である、免疫回避につながるゲノム異常の同定には至らなかったが、MSI-H 子宮体癌と MSI-H 大腸癌の免疫状態の違いについての重要な知見が得られたと考えられる。

表 1. マイクロサテライト不安定性子宮体癌と大腸癌の特性の違いについての仮説

	ミスマッチ修復	免疫チェックポイント阻害剤	ネオ抗原	免疫応答反応
大腸癌	ミスマッチ修復障害	◎	多い	高い
	ミスマッチ修復正常	×	少ない	低い
子宮体癌	ミスマッチ修復障害	○	多い	低い
	ミスマッチ修復正常	△	少ない	高い

本研究によって得られたMSI-H子宮体癌とMSI-H大腸癌の特性の違いについての仮説。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立がん研究センター研究所細胞情報学分野の上野敏秀先生、井上聡先生、間野博行先生、国立がん研究センター中央病院病理診断科の吉田裕先生、同婦人腫瘍科の宇野雅哉先生、加藤友康先生、石川光也先生、東京大学医学部附属病院産婦人科の田口歩先生、同ゲノム診療部の織田克利先生、順天堂大学医学部産婦人科学講座の寺尾泰久先生、吉田惠美子先生です。共同研究者の先生方、また、公益財団法人上原記念生命科学財団の皆様にこの場を借りて深謝申し上げますとともに、貴財団の益々のご発展をお祈り申し上げます。

文　献

1） Cancer Genome Atlas Research Network; Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, Shen H, Robertson AG, Pashtan I, Shen R, Benz CC, Yau C, Laird PW, Ding L, Zhang W, Mills GB, Kucherlapati R, Mardis ER, Levine DA. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. Nature. 2013 May 2;497(7447):67-73. doi: 10.1038/nature12113. PMID: 23636398.

2） DeLair DF, Burke KA, Selenica P, Lim RS, Scott SN, Middha S, Mohanty AS, Cheng DT, Berger MF, Soslow RA, Weigelt B. The genetic landscape of endometrial clear cell carcinomas. J Pathol. 2017 Oct;243(2):230-241. doi: 10.1002/path.4947. Epub 2017 Sep 5. PMID: 28718916.

3） Shen J, Ju Z, Zhao W, Wang L, Peng Y, Ge Z, Nagel ZD, Zou J, Wang C, Kapoor P, Ma X, Ma D, Liang J, Song S, Liu J, Samson LD, Ajani JA, Li GM, Liang H, Shen X, Mills GB, Peng G. ARID1A deficiency promotes mutability and potentiates therapeutic antitumor immunity unleashed by immune checkpoint blockade. Nat Med. 2018 May;24(5):556-562. doi: 10.1038/s41591-018-0012-z. Epub 2018 May 7. PMID: 29736026.

4） Kawazu M, Ueno T, Saeki K, Sax N, Togashi Y, Kanaseki T, Chida K, Kishigami F, Sato K, Kojima S, Otsuka M, Kawazoe A, Nishinakamura H, Yuka M, Yamamoto Y, Yamashita K, Inoue S, Tanegashima T, Matsubara D, Tane K, Tanaka Y, Iinuma H, Hashiguchi Y, Hazama S, Khor SS, Tokunaga K, Tsuboi M, Niki T, Eto M, Shitara K, Torigoe T, Ishihara S, Aburatani H, Haeno H, Nishikawa H, Mano H. HLA Class I Analysis Provides Insight Into the Genetic and Epigenetic Background of Immune Evasion in Colorectal Cancer With High Microsatellite Instability. Gastroenterology. 2022 Mar;162(3):799-812. doi: 10.1053/j.gastro.2021.10.010. Epub 2021 Oct 21. PMID: 34687740.