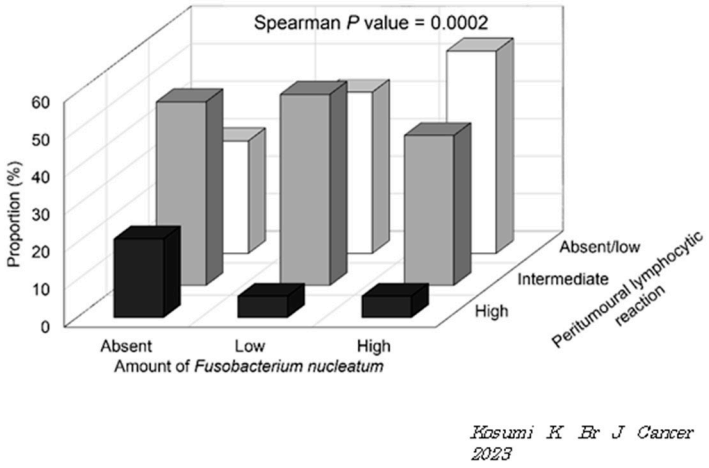
151　消化器癌Precision Medicineを目指した革新的統合解析	小澄　敬祐

【目的】腫瘍微小環境内において癌細胞は微生物や免疫細胞と複雑なネットワークを形成していると考えられ、癌研究ではそれらを統合的に解析する事が重要と考えられる。本研究の目的は、当科の消化器癌データベースを対象に、腸内細菌・腫瘍免疫・がん代謝に関する網羅的解析を行い、消化器癌の Precision Medicine を開発する事である。さらに様々な臨床情報・生活情報との統合解析も行う事で、癌治療のみならず癌予防法にも寄与する事を目指す。

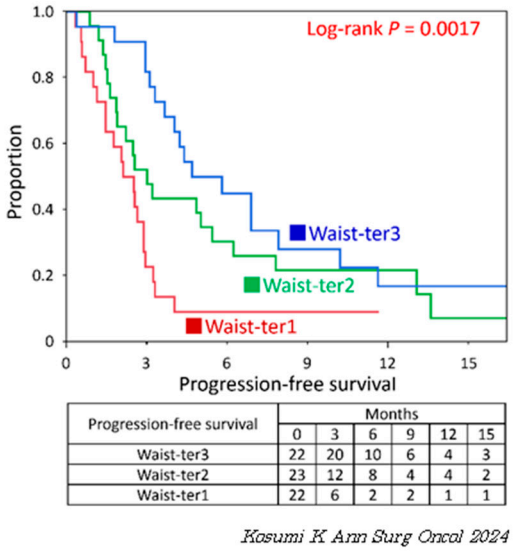
【方法】1. 食道癌切除例を対象に腸内細菌（*Fusobacterium nucleatum*）、腫瘍免疫（腫瘍細胞における CD274（PD-L1）、PDCD1LG2、IDO1 の発現レベル解析、follicle lymphocytic reaction、peritumoural lymphocytic reaction、stromal lymphocytic reaction、tumor-infiltrating lymphocytes の浸潤程度評価、腫瘍最深部における CD8 陽性細胞数、FOXP3 陽性細胞数、PDCD1 陽性細胞数）の評価を行い、関連解析を行った。2. 免疫チェックポイント阻害剤による治療を施行した切除不能、再発食道癌を対象に、治療前の体組成を Ziostation2 にて評価、様々な血液検査データと共に治療効果予測因子の解析を施行した。

【結果】1. *Fusobacterium nucleatum* は進行度と有意に相関した。また、peritumoural lymphocytic reaction と有意な逆相関を示した。多変量解析の結果、*Fusobacterium nucleatum* は宿主による免疫応答 peritumoural lymphocytic reaction と有意な逆相関を示し、*Fusobacterium nucleatum* が腫瘍免疫を抑制する可能性が示唆された。2. 免疫チェックポイント阻害剤による治療を施行した食道癌において、治療前の腹囲が大きい症例では治療効果が有意に良好であり、予後も良好だった。以上より、治療前の体組成が免疫応答と関連する可能性が示唆された。

本研究で得られた結果



Fusobacterium nucleatum & peritumoural lymphocytic reaction



Progression-free survival	Months					
	0	3	6	9	12	15
Waist-ter3	22	20	10	6	4	3
Waist-ter2	23	12	8	4	4	2
Waist-ter1	22	6	2	2	1	1

腹囲と治療効果

151. 消化器癌 Precision Medicine を目指した革新的統合解析

小澄　敬祐

熊本大学病院 消化器癌先端治療開発学寄附講座

Key words：消化器癌，腫瘍微小環境，腸内細菌，腫瘍免疫

緒　言

悪性新生物は本邦の死因第一位であり、消化器癌が約半数を占める。これまで多くの基礎研究、臨床研究によって様々な治療法が開発されているが、消化器癌の予後は未だ不良であり、より革新的な治療法の開発そして癌予防が求められている。近年の癌研究によって、腸内細菌（微生物）や腫瘍免疫の重要性が注目されている。腸内細菌は腸管内のみならず腫瘍微小環境内にも存在する事が明らかになり、癌の遺伝子変異や癌進展に寄与する可能性がある。一方、腫瘍微小環境内において宿主の免疫応答（腫瘍免疫）は癌進展の制御に大きく寄与すると考えられ、実際に免疫チェックポイント阻害薬の登場は臨床の現場に大きな変革をもたらしている。注目すべき点は、腫瘍微小環境内や腸管内に存在する腸内細菌が、免疫チェックポイント阻害薬による抗腫瘍効果に影響を与える可能性があるという事である。腫瘍微小環境内において癌細胞は微生物や免疫細胞と複雑なネットワークを形成していると考えられ、癌研究ではそれらを統合的に解析する事が重要と考えられる。

本研究の目的は、当科の消化器癌データベースを対象に、腸内細菌・腫瘍免疫・がん代謝に関する網羅的解析を行い、消化器癌の Precision Medicine を開発する事である。さらに様々な臨床情報・生活情報との統合解析も行う事で、癌治療のみならず癌予防法にも寄与する事を目指す。本研究の結果を報告する［1，2］。

方　法

1. 消化器癌臨床検体におけるマイクロバイオーム解析

当科にて切除を行った食道癌を対象とした。食道癌切除検体より作成されたホルマリン固定パラフィン包埋（Formalin fixed paraffin embedded：FFPE）を用いて、癌部の DNA を抽出した。抽出した DNA を用いて qPCR で食道癌腫瘍内に存在する *Fusobacterium nucleatum* および *Bifidobacterium genus* の腫瘍内存在量を qPCR で測定した。プライマー配列は以下の通りである［3］。

F. nucleatum forward primer, 5′-TGGTGTCATTCTTCCAAAAATATCA-3′
F. nucleatum reverse primer, 5′-AGATCAAGAAGGACAAGTTGCTGAA-3′
F. nucleatum FAM probe, 5′-ACTTTAACTCTACCATGTTCA-3′
SLCO2A1 forward primer, 5′-ATCCCCAAAGCACCTGGTTT-3′
SLCO2A1 reverse primer, 5′-AGAGGCCAAGATAGTCCTGGTAA-3′
SLCO2A1 VIC probe, 5′-CCATCCATGTCCTCATCTC-3′

2. 消化器癌臨床検体における腫瘍免疫解析

当科にて切除を行った食道癌を対象とし、腫瘍細胞における腫瘍免疫関連マーカーとして、CD274（PD-L1）、PDCD1LG2、IDO1 の免疫染色を施行し、Negative 群と Positive 群に分類した（図 1）。

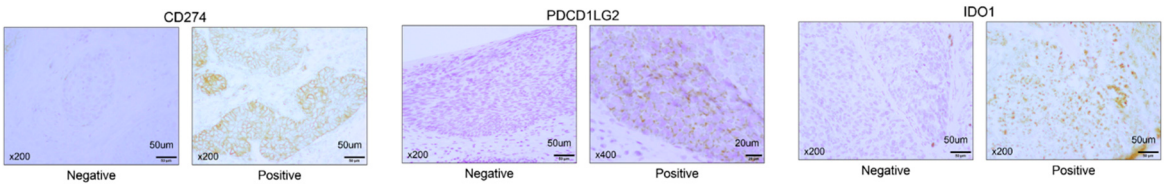


図 1. 食道癌切除検体における CD274（PD-L1）、PDCD1LG2、IDO1 の免疫染色
左から CD274（PD-L1）、PDCD1LG2、IDO1 の Negative と Positive を示す。

当科にて切除を行った食道癌を対象とし、浸潤リンパ球に関して follicle lymphocytic reaction、peritumoural lymphocytic reaction、stromal lymphocytic reaction、tumor-infiltrating lymphocytes（TILs）の 4 つに関して、absent、low、intermediate、high の 4 段階で評価した。また、腫瘍最深部における浸潤リンパ球に関して、CD8、FOXP3、PDCD1 の免疫染色を行い、陽性細胞数を計測した（図 2）。

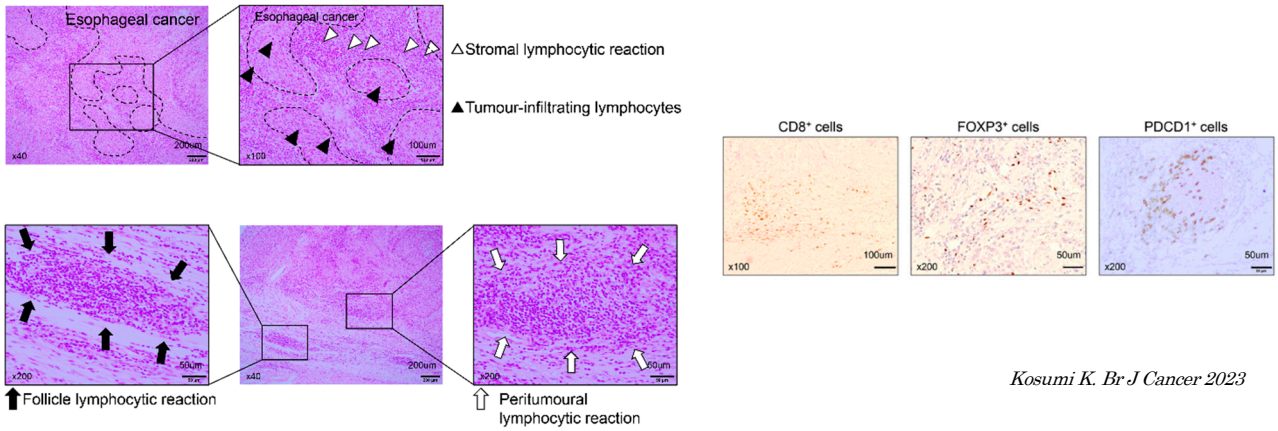
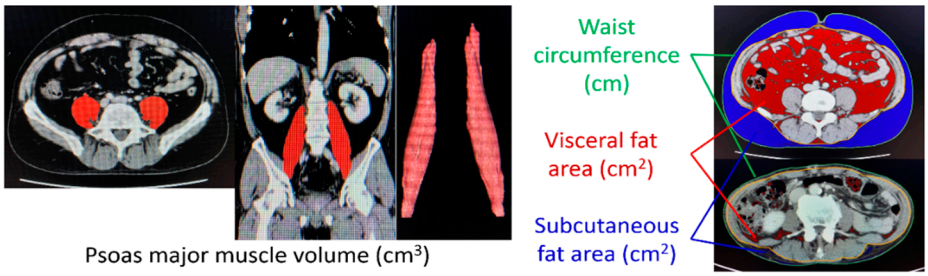


図 2. 食道癌切除検体におけるリンパ球浸潤、および浸潤リンパ球における CD8、FOXP3、PDCD1 の免疫染色
左） follicle lymphocytic reaction、peritumoural lymphocytic reaction、stromal lymphocytic reaction、tumor-infiltrating lymphocytes（TILs）。
右） CD8、FOXP3、PDCD1。

3. 免疫チェックポイント阻害剤治療前の CT 画像を用いた解析

免疫チェックポイント阻害剤による治療を施行した切除不能・再発食道癌症例を対象に、Ziostation 2 を用いて体組成を解析した。具体的には腸腰筋体積（psoas major muscle volume）、腹囲（waist circumference）、内臓脂肪面積（visceral fat area）、皮下脂肪面積（subcutaneous fat area）の 4 項目を計測した（図 3）。様々な患者背景（年齢、性別、各体組成マーカー）、腫瘍因子（腫瘍局在、組織型、適応）、血液検査データ（WBC、Hb、Neutrophil、CRP、Albumin など）と治療効果の関連解析を行った。



Kosumi K. Ann Surg Oncol

図 3. Ziostation2 を用いた体組成解析

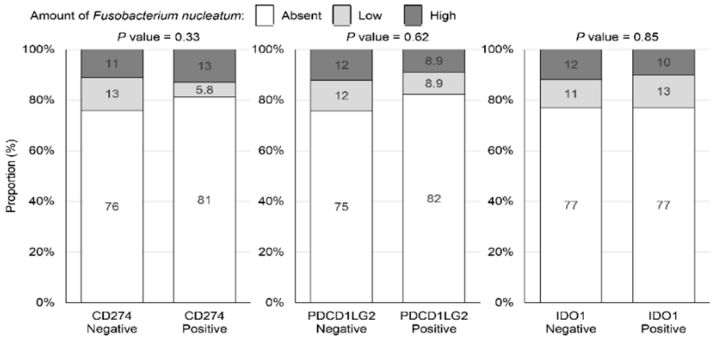
左）腸腰筋体積（psoas major muscle volume）。

右）腹囲（waist circumference）、内臓脂肪面積（visceral fat area）、皮下脂肪面積（subcutaneous fat area）。

結果および考察

1. 食道癌における腫瘍内 *Fusobacterium nucleatum* と患者因子・腫瘍因子

食道癌 300 例中、*Fusobacterium nucleatum* は 70 例（23%）に認められ、Absent 群（N＝230）、Low 群（N＝35）、High 群（N＝35）の 3 群間で比較検討した。*Fusobacterium nucleatum* と様々な患者背景（性別、年齢、Body mass　index、飲酒歴、喫煙歴、併存疾患の有無）に関連は認めなかった（P＞0.06）。*Fusobacterium nucleatum* と腫瘍因子に関して検討すると、*Fusobacterium nucleatum* は進行癌と有意に相関したが（P＝0.011）、組織型・腫瘍局在とは有意な相関は認めなかった（P＞0.1）。食道癌細胞における CD274（PD-L1）、PDCD1LG2、IDO1 との関連解析も行ったが、有意な相関は認めなかった（図 4）。



Kosumi K. Br J Cancer 2023

図 4. *Fusobacterium nucleatum* と腫瘍細胞における免疫関連マーカー（by chi-square test）

左）CD274（PD-L1）。

中）PDCD1LG2。

右）IDO1。

2. 食道癌における腫瘍内 *Fusobacterium nucleatum* と宿主の免疫応答

Absent 群（N＝230）、Low 群（N＝35）、High 群（N＝35）の 3 群間で、様々な宿主の免疫応答（follicle lymphocytic reaction、peritumoural lymphocytic reaction、stromal lymphocytic reaction、tumor-infiltrating lymphocytes（TILs）、CD8 陽性細胞数、FOXP3 陽性細胞数、PDCD1 陽性細胞数）との関連解析を行った。その結果、*Fusobacterium nucleatum* は peritumoural lymphocytic reaction と有意な逆相関（P＝0.0002）を示した（図 5）。多変量解析においても、*Fusobacterium nucleatum* は宿主による免疫応答 peritumoural

lymphocytic reaction と有意な逆相関を示し、*Fusobacterium nucleatum* が腫瘍免疫を抑制する可能性が示唆された。

Fusobacterium nucleatum が腫瘍免疫を抑制する機序としては、骨髄由来免疫抑制細胞を介して T 細胞を枯渇化させる[4]、M2 マクロファージへの移行を誘導する[5]、TIGIT を介した免疫抑制などが考えられる[6]。

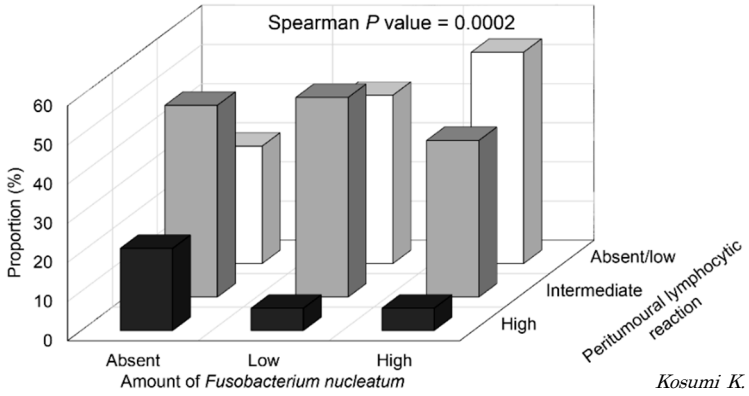


図 5. *Fusobacterium nucleatum* と peritumoural lymphocytic reaction の関連性

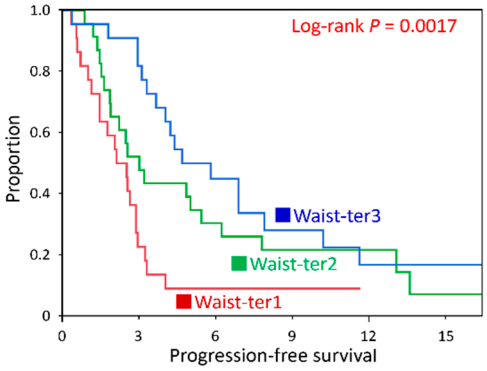
Fusobacterium nucleatum と peritumoural lymphocytic reaction が有意な逆相関を示した。

統計解析は Spearman で行った。

3. 切除不能・再発食道癌における免疫チェックポイント阻害剤の治療押下予測因子の検討

免疫チェックポイント阻害剤による治療を施行した切除不能・再発食道癌症例を対象に、Ziostation 2 を用いて体組成を解析した。患者背景（年齢、性別、腸腰筋体積、腹囲、内臓脂肪面積、皮下脂肪面積）、腫瘍因子（腫瘍局在、組織型、適応）、血液検査データ（WBC、Hb、Neutrophil、CRP、Albumin など）と治療効果の関連解析を行った。

Nivolumab 施行例において腹囲が大きい症例は有意に予後良好であり（図 6）、多変量解析においても独立予後規定因子だった。



Progression-free survival	Months					
	0	3	6	9	12	15
Waist-ter3	22	20	10	6	4	3
Waist-ter2	23	12	8	4	4	2
Waist-ter1	22	6	2	2	1	1

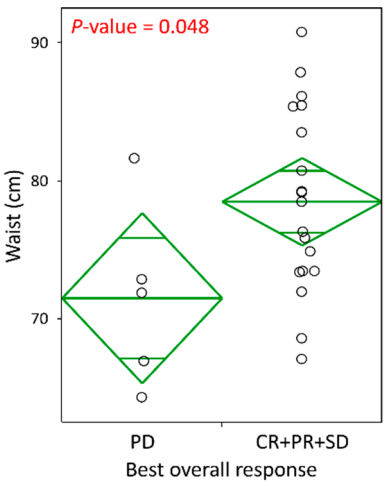


図 6. 切除不能再発食道癌における治療前腹囲と免疫チェックポイント阻害剤の治療効果

左）Nivolumab 療法施行例における腹囲と無増悪生存期間。

右）Pembrolizumab+chemotherapy 療法施行例における腹囲と最良総合効果。

統計解析は Log-rank または analysis of variance で行った。

文　献

1) Kosumi K, Baba Y, Yamamura K, Nomoto D, Okadome K, Yagi T, Toihata T, Kiyozumi Y, Harada K, Eto K, Sawayama H, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Miyamoto Y, Yoshida N, Watanabe M, Baba H. Intratumour Fusobacterium nucleatum and immune response to oesophageal cancer. Br J Cancer. 2023 Apr;128(6):1155-1165. doi: 10.1038/s41416-022-02112-x. Epub 2023 Jan 4. PMID: 36599917

2) Kosumi K, Baba Y, Hara Y, Wang H, Nomoto D, Toihata T, Ohuchi M, Harada K, Eto K, Ogawa K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H. Body Composition and Clinical Outcomes in Esophageal Cancer Patients Treated with Immune Checkpoint Inhibitors. Ann Surg Oncol. 2024 Feb 29. doi: 10.1245/s10434-024-15093-3. Online ahead of print. PMID: 38421531

3) Mima K, Sukawa Y, Nishihara R, Qian ZR, Yamauchi M, Inamura K, Kim SA, Masuda A, Nowak JA, Nosho K, Kostic AD, Giannakis M, Watanabe H, Bullman S, Milner DA, Harris CC, Giovannucci E, Garraway LA, Freeman GJ, Dranoff G, Chan AT, Garrett WS, Huttenhower C, Fuchs CS, Ogino S. Fusobacterium nucleatum and T Cells in Colorectal Carcinoma. JAMA Oncol. 2015 Aug;1(5):653-61. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.1377. PMID: 26181352

4) Groth C, Hu X, Weber R, Fleming V, Altevogt P, Utikal J, Umansky V. Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. Br J Cancer. 2019 Jan;120(1):16-25. doi: 10.1038/s41416-018-0333-1. Epub 2018 Nov 9. PMID: 30413826

5) Chen T, Li Q, Wu J, Wu Y, Peng W, Li H, Wang J, Tang X, Peng Y, Fu X. Fusobacterium nucleatum promotes M2 polarization of macrophages in the microenvironment of colorectal tumours via a TLR4-dependent mechanism. Cancer Immunol Immunother. 2018 Oct;67(10):1635-1646. doi: 10.1007/s00262-018-2233-x. Epub 2018 Aug 18. PMID: 30121899

6) Gur C, Ibrahim Y, Isaacson B, Yamin R, Abed J, Gamliel M, Enk J, Bar-On Y, Stanietsky-Kaynan N, Coppenhagen-Glazer S, Shussman N, Almogy G, Cuapio A, Hofer E, Mevorach D, Tabib A, Ortenberg R, Markel G, Miklić K, Jonjic S, Brennan CA, Garrett WS, Bachrach G, Mandelboim O. Binding of the Fap2 protein of Fusobacterium nucleatum to human inhibitory receptor TIGIT protects tumors from immune cell attack. Immunity. 2015 Feb 17;42(2):344-355. doi: 10.1016/j.immuni.2015.01.010. Epub 2015 Feb 10. PMID: 25680274