

博士論文（要約）

胃癌における SWI/SNF 複合体異常及び
免疫回避機構関連因子の検討

岩 崎 晶 子

背景と目的

胃癌は世界の死因の上位を占める重要な疾患であるが、腫瘍の性質の不均一性が高いことから、以前から研究結果の一致が得られにくい疾患であった。近年、胃癌は分子学的に性質が大きく異なる4サブタイプ（EBV関連胃癌、MSI胃癌、GS胃癌、CIN胃癌）に分類できることが the cancer genome atlas research network (TCGA) によって示され、以降、このサブタイプ分類は胃癌研究における基盤として用いられている。

真核細胞の核DNAはクロマチンを形成しており、転写を通じた遺伝子発現やDNA修復時にはクロマチンの局所構造を変化させる仕組みが働いている。その機構を担う分子の1つがSWI/SNFクロマチンリモデリング複合体で、その欠損は種々の腫瘍で認められ、ヒトの悪性腫瘍の20%近くにSWI/SNF複合体に関与する異常があると報告されている。中でも、最初に変異による発癌が確認されたINI1や、卵巣明細胞癌の半数で変異が確認されているARID1A、複合体のコア蛋白として機能するBRMとBRG1は、SWI/SNF複合体の主要な構成蛋白として多数の研究が行われている。胃癌においては、ARID1Aの変異や欠損が1-3割程度に認められ、特にEBV関連胃癌やMSI胃癌で高頻度であることが報告されている一方、BRM、BRG1、INI1異常の研究は少数に留まる。これらの4種の蛋白の胃癌における発現を、同時に、かつサブタイプ別に検討した研究は知られていない。

SWI/SNF複合体の各蛋白の異常が腫瘍とどのように関係しているかは研究途上であるが、最近の研究では、ARID1Aが腫瘍免疫回避機構であるPD-L1発現を誘導することが示されている。

腫瘍免疫回避機構は、近年の免疫チェックポイント阻害薬の開発により、現在盛んに研究されている分野である。この機構として、腫瘍細胞によるPD-L1発現が広く知られており、発現したPD-L1と細胞傷害性T細胞（CTL）上のPD-1が結合してCTL活性化が抑制される。免疫チェックポイント阻害薬の一種であるPD-1阻害薬やPD-L1阻害薬は、この機構を無効化することにより抗腫瘍効果を発揮する。胃癌においては、EBV関連胃癌とMSI胃癌はPD-L1発現の頻度が高く、PD-1阻害薬に対する治療反応性も良好であったことが知られ、PD-1/PD-L1阻害薬の効果が見込めるターゲットと考えられている。一方で、腫瘍免疫回避機構は他にも複数あり、ネオアンチゲンを提示するHLA class Iの発現欠損もその1つと考えられている。この機構が働いた場合、腫瘍細胞がCTLに腫瘍細胞として認識されなくなり、CTLによる免疫反応を逃れると推測されている。また、PD-L1発現腫瘍がHLA class I欠損も伴う場合、PD-1/PD-L1阻害薬を用いてもCTLによる免疫反応が起こらず薬剤の効果が十分に得られない可能性があり、HLA class Iの発現の有無は免疫チェックポイント阻害薬への反応性にも関与すると推測される。胃癌において、サブタイプ別のHLA class Iの発現異常を検討した研究はこれまでなく、HLA class I発現異常による腫瘍免疫回避が各サブタイプでどの程度起っているかは不明である。

本研究では、これらの事項を縦断的に検討するため、4サブタイプに分類した胃癌209例（EBV関連胃癌44例、MSI胃癌58例を含む）において、SWI/SNF複合体の主要な

構成蛋白である ARID1A、BRM、BRG1、INI1 の発現異常、及び、腫瘍免疫回避機構関連因子である PD-L1 と HLA class I の発現異常を、免疫組織化学的に検討し、臨床病理学的事項との関連を調べた。また、これにより胃癌治療における分子サブタイプ分類の重要性を検討した。

結果と考察

SWI/SNF 複合体構成蛋白の検討で、ARID1A 欠損を有する例は EBV 関連胃癌と MSI 胃癌で共に半数程度と有意に高頻度であり、これは既報告と同様の傾向であった。ARID1A 欠損は腫瘍内で部分的に起こっていることが多く、腫瘍内不均一性が高い事象であり、更に多巢性の欠損も多くみられた。EBV 関連胃癌では、ARID1A 欠損の頻度や広さに早期癌と進行癌の間に有意差がなかったことから、比較的早い段階で欠損が生じ、その後はその状態で保たれる傾向にあると考えられた。一方、MSI 胃癌では進行癌で完全欠損例が多かったことやリンパ節転移巣で新たに欠損が生じたと考えられる例が比較的多くみられたことから、腫瘍の進行の過程で ARID1A 欠損が生じ、広がっていくことが推測された。

BRM 欠損は EBV 関連胃癌で半数程度みられ、有意に高頻度であった。BRM の発現欠損も腫瘍内不均一性が高かった。エピジェネティックにサイレンシングされると知られる BRM について、EBV 関連胃癌の特徴である DNA メチル化がサイレンシングに關与する可能性を考え *BRM* プロモーター領域のメチル化解析を追加で行った結果、EBV 関連胃癌の一部で、メチル化が高頻度で BRM が欠損しているクラスターの形成が認められた。これにより EBV 関連胃癌の BRM 欠損には DNA メチル化の關与があることが示唆された。更に、BRM 欠損例の半数は BRM 欠損のない腫瘍部を伴っていたことを合わせ、EBV 関連胃癌での BRM 欠損は、発癌後の腫瘍の発育・進展過程で生じる事象と推測された。

BRG1 欠損を有する例は 209 例中 1 例、INI1 欠損例は 0 例と、極めて稀であった。

臨床病理学的因子との関連では、腫瘍面積の 50%以上の欠損を有する症例を欠損例として多変量解析を行ったところ、ARID1A 欠損例はリンパ管侵襲を、BRM 欠損例は静脈侵襲を、それぞれ有意に高頻度に伴っていた。予後の有意差は認められなかった。

腫瘍免疫回避機構関連因子の検討で、EBV 関連胃癌と MSI 胃癌では PD-L1 発現と HLA class I 発現低下のいずれかの異常を有する頻度が共に半数程度と高く、特にこれらのサブタイプの進行癌では 7 割超がいずれかの異常を有していた。ネオアンチゲンの免疫原性が高く、腫瘍免疫が亢進していると考えられる EBV 関連胃癌や MSI 胃癌では、何らかの免疫回避機構を獲得したサブクローンが選択的に増殖して進行していく可能性が示された。一方この内訳では、EBV 関連胃癌では PD-L1 発現が、MSI 胃癌では HLA class I 発現低下がそれぞれ多く認められ、サブタイプ間で違いがみられた。EBV 関連胃癌は PD-L1 の遺伝子座である 9p24.1 の遺伝子増幅を伴うこと、MSI 胃癌では HLA class I の発現に關わる遺伝子の変異が高頻度であることが知られており、こういった性質が關与して、サブタイプごとに獲得しやすい免疫回避機構に違いが生じていることが推測された。

加えて、PD-L1 の腫瘍浸潤免疫細胞での発現も検討したところ、EBV 関連胃癌と MSI 胃癌では、ほぼ全例で PD-L1 発現を有する免疫細胞の浸潤が認められた。

臨床病理学的因子との関連では、PD-L1 の腫瘍細胞、浸潤免疫細胞での発現は、多変量解析で共に有意な予後不良因子であった。対して HLA class I 発現低下と予後因子との間には、総じて有意な関係は認められなかった。

HLA class I の発現欠損による免疫応答の変化を検討するため、HLA class I 発現低下を部分的に有する MSI 胃癌 6 例において、CD8 や CD56 を含む多重蛍光免疫染色を追加で実施した。この結果、HLA class I 発現低下部では CTL の浸潤が少ない傾向がみられ、HLA class I 発現低下による免疫回避効果が視覚的に観察された。本研究で HLA class I 発現低下と予後因子との相関が認められなかったこと、既報告で HLA class I 発現低下腫瘍に PD-1 阻害薬を使用すると腫瘍に浸潤する NK 細胞や $\gamma\delta$ T 細胞の数が増加していたと示されていることから、HLA class I 発現低下時には、HLA class I や CTL が関与しない免疫応答により免疫反応が補完される可能性が考えられた。今回の検討では HLA class I の発現の有無に関わらず NK 細胞の腫瘍への浸潤は極めて少数であったことから、補完する機序として、NK 細胞以外の免疫細胞の関与が考えられた。

最後に、ARID1A 欠損と PD-L1 発現の関係の検討では、対象症例全体では ARID1A 欠損を有する例では PD-L1 の腫瘍細胞、浸潤免疫細胞での発現が共に有意に多かった。ただし、各サブタイプ内での検討では、ARID1A 欠損と PD-L1 発現との間に相関は認められなかった。

まとめ

本研究では、胃癌における主要な SWI/SNF 複合体構成蛋白及び腫瘍免疫回避機構関連因子の発現状態を調べた。SWI/SNF 複合体構成蛋白の発現状態の検討から、EBV 関連胃癌と MSI 胃癌は、治療抵抗性に関わると考えられている腫瘍内不均一性が高く、特に MSI 胃癌は進行に伴って腫瘍内の変異の頻度が増し、新たな性質の変化が生じることが示された。更に、MSI 胃癌は HLA class I 発現低下による免疫回避機構も高頻度に有することも明らかとなった。これらの性質は、共に癌の治療中に抵抗性を生じる一因となっている可能性が考えられる。

胃癌の治療反応性には様々な要素が複合して関与すると考えられ、その要素には本研究で示されたようにサブタイプにより大きく異なるものがある。胃癌治療に際してサブタイプ分類を行うことの重要性が本研究で改めて示され、胃癌の個別化医療に向けて基盤となる知見が得られたと考えられる。