

博士論文

胃がんにおける腫瘍内免疫応答の解析

所属： 東京大学大学院医学系研究科 医学博士課程

外科学専攻 消化管外科学

指導教員： 瀬戸 泰之

申請者： 佐藤 靖祥

目次

略号一覧.....	3
要旨.....	5
序文.....	6
胃癌について.....	6
胃癌に対する免疫治療の現状.....	7
がん免疫サイクル（Cancer-Immunity Cycle）と免疫グラム.....	8
目的.....	13
方法.....	13
対象患者.....	13
臨床検体の処理.....	14
全エクソームシーケンス.....	15
RNA シーケンス.....	16
免疫グラム.....	17
ネオアンチゲン候補予測.....	20
遺伝子変異解析.....	21
コピー数解析.....	21
The Cancer Genome Atlas (TCGA) による分子生物学的分類.....	21
Asian Cancer Research Group (ACRG) による分子生物学的分類.....	22
TIDE (Tumor Immune Dysfunction and Exclusion) を用いた解析.....	23
フローサイトメトリー.....	23
液性因子の解析.....	27
遺伝子発現変動解析.....	28

統計解析.....	28
結果.....	29
対象患者.....	29
イムノグラムによる解析.....	31
イムノグラムスコア (IGS) によるクラスター解析.....	33
免疫関連遺伝子のパネルによるバリデーション.....	34
IGS によるクラスター (IGS cluster) と臨床的特徴との関係.....	37
腫瘍の遺伝子異常の解析.....	45
トランスクリプトームによる腫瘍浸潤細胞 (TIC) の解析.....	49
腫瘍微小環境 (TME) の解析.....	51
フローサイトメトリーによる TIL と PBMC の比較.....	56
フローサイトメトリーによる患者個々の TIL の比較.....	59
T 細胞の機能不全を認めた 3 症例の検討.....	65
液性因子の解析.....	71
IGS cluster と予後との関係.....	73
考察.....	74
結語.....	85
謝辞.....	86
引用文献.....	87

略号一覽

ACRG	Asian Cancer Research Group
APC	antigen presenting cell
CAF	cancer associated fibroblast
CAR	chimeric antigen receptor
CIN	chromosomal instability
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen-4
DEG	differential expressed genes
EBV	Epstein-Barr virus
EMT	epithelial-mesenchymal transition
FDR	false discovery rate
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FPKM	fragments per kilobase of exon per kilobase of exon per million fragments mapped
FTD	fresh tumor digest
GS	genomically stable
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
IFN γ	interferon-gamma
IGS	immunogram score
IL-2	interleukin-2
LOF	loss of function
LOH	loss of heterozygosity
MDSC	myeloid-derived suppressor cell
MSI	microsatellite instability
OS	overall survival
PBMC	peripheral blood mononuclear cells

PD-1	programmed cell death-1
PD-L1	programmed cell death ligand-1
PFS	progression-free survival
PMA	phorbol-12-myristate-13-acetate
RIN	RNA integrity number
ssGSEA	single sample Gene Set Enrichment Analysis
TAAAs	tumor-associated antigens
TAM	tumor-associated macrophage
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCR	T-cell receptor
TIC	tumor infiltrating cell
TIDE	Tumor Immune Dysfunction and Exclusion
TIL	tumor infiltrating lymphocyte
Tim-3	T-cell immunoglobulin and mucin domain-3
TME	tumor microenvironment
TNF α	tumor necrosis factor α
Treg	regulatory T cell

要旨

胃癌患者 31 症例の、手術検体（腫瘍組織・正常組織）と末梢血検体を用いて、次世代シーケンサー解析、フローサイトメトリー解析、液性因子解析を行い、胃癌における腫瘍内免疫応答を多層的に解析した。「がん免疫サイクル（Cancer-Immunity Cycle）」の概念に基づき、RNA シークエンスデータから抽出した 9 つの評価軸からなる「イムノグラム（Immunogram）」で腫瘍内免疫応答を表現した。患者個々にイムノグラム解析を行い、各評価軸のイムノグラムスコア（IGS, immunogram score）をもとにクラスター解析を実施したところ、胃癌の腫瘍内免疫応答は、大きく 2 つの群（“Immune Hot”と“Immune Cold”）、さらに詳細に 4 つの群（IGS cluster; “hot1”, “hot2”, “middle”, “cold”）に分類された。IGS cluster は従来の臨床分類とは相関を認めなかったが、クラスター毎に、腫瘍、がん抗原数や上皮間葉転換、遺伝子変異、腫瘍微小環境（TME, tumor microenvironment）、さらには腫瘍浸潤 T 細胞（TIL, tumor infiltrating lymphocyte）の機能不全や浸潤排除の有無など、腫瘍内免疫応答が特徴づけられ、腫瘍内免疫応答の評価に有用と考えられた。“hot1”群には、TCGA（The Cancer Genome Atlas）分類の MSI（microsatellite instability）型が多く含まれ、いずれも遺伝子変異数が多かった。“hot2”群には、TCGA 分類の EBV（Epstein-Barr virus）型が多く含まれていた。“middle”群には、上皮間葉転換をきたした Mesenchymal 型が多く集まっていた。

本研究をもととして、腫瘍内免疫応答の解析に基づいた、胃癌に対する治療法の開発が期待される。

序文

胃癌について

世界における胃癌の2012年の罹患数および死亡数は、それぞれ95.2万人と72.3万人と推定され、先進国では減少傾向にあるものの、悪性新生物の罹患数では第5位、死亡数では肺癌、肝臓癌に次いで第3位を占めている[1]。本邦では、全がんで年齢調整罹患率が増加している中で、全がん罹患数における胃癌の罹患割合は減少しているものの、依然として男性では第1位、女性では乳癌、結腸・直腸癌に次いで第3位を占めている（2013年）。また年齢調整死亡率（対人口10万人）も男女それぞれ69.9、34.1（1980年）、28.2、9.23（2013年）と減少しているが、胃癌による死亡数は年間約4.5万人と全がん死数37万人の約1/8を占め、悪性新生物による死因の第3位を占めている（2016年）[2]。

胃癌の組織学的分類に関しては、本邦における胃癌取扱い規約第14版では、高頻度に出現する腺癌を一般型とし、その他を特殊型としている。腺癌は分化型（乳頭腺癌、管状腺癌）、未分化型（低分化腺癌、印環細胞癌、粘液癌）に分類される。分化型癌は腺管形成の良好な癌で膨張性の発育を示し、肉眼形態は境界明瞭な限局型が多い。進行すると血行性の肝転移が多く、また比較的高齢者に多い。未分化型癌は腺管形成に乏しくびまん性に浸潤する癌とされ肉眼的に境界不明瞭なものが多く、リンパ行性転移や腹膜播種が多くみられる。分化型に比し若年者の割合が高い。国際的にはLauren分類が用いられることが多く、胃癌を腸型（intestinal type）とびまん型（diffuse type）に分類する。これは概ね分化型と未分化型に相当する。

胃癌の病期分類については、UICC-TNM分類と胃癌取扱い規約が用いられるが、本邦での日常臨床では胃癌取扱い規約によりIA、IB、IIA、IIB、IIIA、IIIB、IIIC、IVに分類され、病期に基づき治療が選択されることが一般的である。現在の胃癌に

対する標準治療としては、Stage IA から III の限局期の胃癌では、内視鏡的治療や外科的治療によって治癒を目指す。術後病理所見で pStage II/III (T1 を除く) かつ治癒切除の場合は、テガフル・ギメラシル・オテラシル (S-1) による術後補助化学療法が標準治療である。5 年生存率は Stage I : 99.1%、Stage II : 72.6%、Stage III : 45.9% である。Stage IV の進行胃癌 (または再発胃癌) の場合は、症状緩和目的の化学療法が施行されるが、5 年生存率は 7.2% 程度であり、満足のいく治療成績は得られていない。

胃癌に対する免疫治療の現状

悪性腫瘍患者では抗腫瘍免疫応答は様々な機序で抑制されている。近年その抑制因子の一つである免疫チェックポイント分子を抗体で阻害することで、メラノーマ、肺癌などの患者で生存期間の延長が示された。胃癌でも複数の国際共同試験が行われ、第 III 相試験 (ATTRACTION-2 試験) において、標準治療不応または不耐容の切除不能進行・再発胃癌に対して、抗 PD-1 (Programmed cell death-1) 抗体であるニボルマブがプラセボと比較して、全生存期間 (OS, overall survival) を 1.2 ヶ月 (5.3 ヶ月 vs 4.1 ヶ月, HR 0.63, 95%CI 0.50-0.78, $P < 0.0001$) 延長したことが報告された[3]。この結果をもとに、本邦でもニボルマブは「がん化学療法後に増悪した治癒切除不能な進行・再発の胃癌」を効能・効果として 2017 年 9 月 22 日に適応拡大され、2018 年 1 月改訂の胃癌治療ガイドライン第 5 版ではニボルマブ療法が本邦での三次治療における標準治療と位置づけられた[4]。

しかし、免疫チェックポイント阻害薬は非常に高価であり、また重篤な副作用の報告も多数あり、治療効果が期待できる患者の選別を可能にするバイオマーカーの確立が求められている。今後、胃癌に対して、免疫チェックポイント阻害薬をさらに

早期の段階で使用したり、複数の免疫チェックポイント阻害薬や他の抗がん剤・分子標的薬と併用して、より効果的な治療法を開発したりするために、胃癌における腫瘍内免疫応答を理解することが急務となっている。

がん免疫サイクル (Cancer-Immunity Cycle) とイムノグラム

生体内のがん免疫応答は、ダイナミックなシステムとして成り立っており、単一の因子で評価するのは困難である。がん免疫応答を一連のサイクルとして理解する「がん免疫サイクル (Cancer-Immunity Cycle)」という概念が広く受け入れられており、次の 7 つのステップからなる (図 1)。①腫瘍組織から腫瘍抗原が放出され、②腫瘍抗原を樹状細胞などの抗原提示細胞 (APC, antigen presenting cell) が取り込み、MHC 分子に結合させて細胞表面へ提示しつつリンパ節へ遊走する。③リンパ節に到達した APC は T 細胞へ抗原を提示し、抗原特異的な T 細胞が活性化する。④活性化 T 細胞が腫瘍組織へと遊走し、⑤浸潤する。⑥腫瘍抗原を発現する腫瘍細胞を T 細胞が認識し、⑦攻撃する。T 細胞に攻撃され細胞死を起こした腫瘍細胞から新たな腫瘍抗原が放出され、①に戻る[5]。この一連のサイクルのどのステップが障害されても効果的ながん免疫応答の誘導が困難となり、がんは免疫監視機構から逃避する。

例えば、活性化 T 細胞に発現される細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 (CTLA-4, cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) は、樹状細胞上の CD80/CD86 と結合すると、T 細胞に抑制性のシグナルを伝達する (ステップ③の抑制)。また、活性化 T 細胞に発現される PD-1 は、腫瘍細胞に発現した PD-L1 (programmed cell death ligand-1) と結合することで、T 細胞に抑制性のシグナルを伝達する (ステップ⑦の抑制)。このように免疫応答を制御する作用を持つ分子を免疫チェックポイント分子と呼ぶが、免疫チェックポイント阻害薬はこれらの抑制作用を阻害することで、停滞していた

Cancer-Immunity Cycle を再び進行させ、がん免疫応答の再活性化をもたらす。例えば、抗 CTLA-4 抗体はステップ③の抑制を解除し、抗 PD-1/PD-L1 抗体はステップ⑦の抑制を解除する[6]。しかし、障害されるステップは1か所とは限らない。投与された免疫チェックポイント阻害薬が働くステップ以外のステップが障害されている場合には、Cancer-Immunity Cycle は回らず、効果的ながん免疫応答の誘導は困難となる。また、個々の患者によって障害されるステップが異なるため、個々の患者における問題点を明らかにすることが求められている。

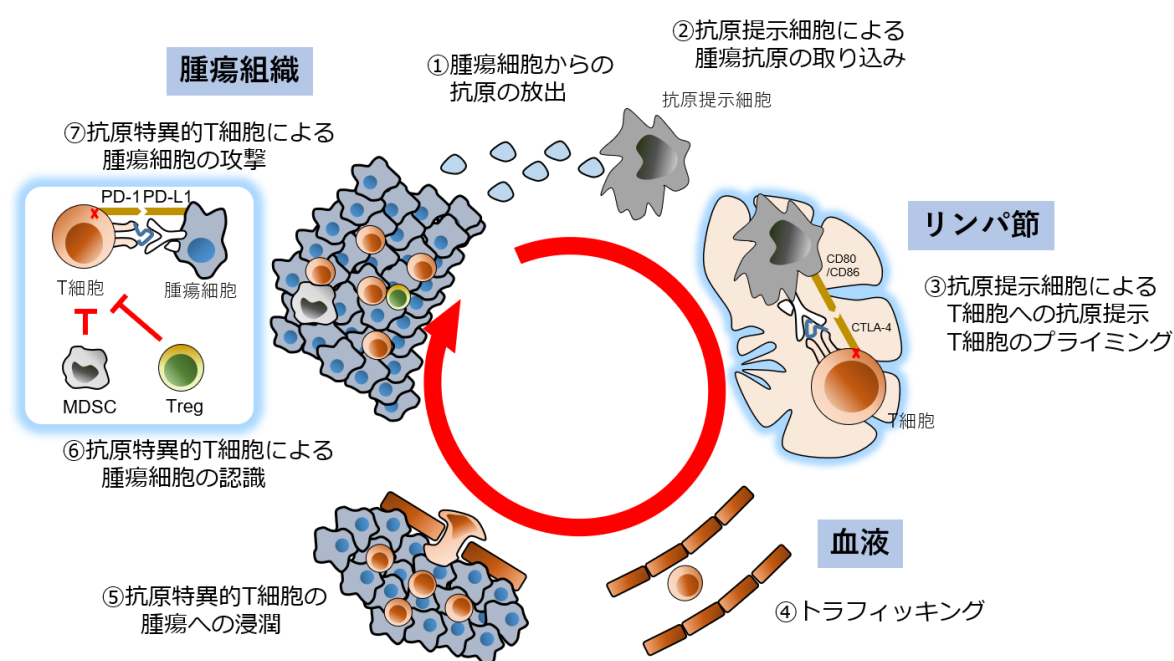


図1 がん免疫サイクル (Cancer-Immunity Cycle)

がん免疫サイクル (Cancer-Immunity Cycle) は①から⑦に示す7つのステップからなる[5]。この一連のサイクルのどのステップが障害されても効果的ながん免疫応答の誘導が困難となり、がんは免疫監視機構から逃避する。

非小細胞肺癌や悪性黒色腫、頭頸部癌などでは、免疫組織化学染色による腫瘍細胞表面の PD-L1 発現が高い症例において、抗 PD-1 抗体の効果が高いことが示されている。米国および本邦では、ペムブロリズマブについては、腫瘍細胞の PD-L1 発現陽性 (≥50%) を付帯条件として非小細胞肺癌に対する一次治療薬として承認され

ている。しかし、これらのがん種でも、PD-L1 陰性例でありながら抗 PD-1 抗体による奏効が得られた例も認めている[7][8][9]。また、腎細胞癌や胃癌などでは、腫瘍細胞の PD-L1 発現と抗 PD-1 抗体の効果に有意な相関は認めなかった[3][10]。これらのことから腫瘍細胞の PD-L1 発現は、抗 PD-L1 抗体の絶対的な効果予測因子とはみなされておらず、より信頼性の高いバイオマーカーが求められている。

これまでに、図 2 に示すように、患者由来の末梢血、腫瘍組織（腫瘍細胞・腫瘍周囲環境）などの解析が進められているが、これらの因子を単一でバイオマーカーとして個別の症例に利用するのは困難であり、末梢血から腫瘍細胞・腫瘍周囲環境までのがん免疫の全体像を評価することが重要である。

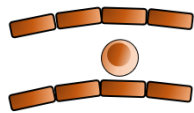
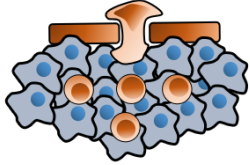
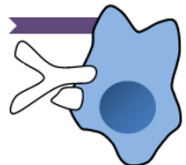
血液	腫瘍周囲環境	腫瘍
 <ul style="list-style-type: none"> • 好中球数（絶対数・比） • リンパ球数（絶対数・比） • 好中球／リンパ球比（NLR） • 好酸球数 • 単球数 • CRP • LDH • がん抗原の多寡 	 <ul style="list-style-type: none"> • 腫瘍浸潤CD8⁺T細胞 • 間質細胞のPD-L1発現 	 <ul style="list-style-type: none"> • PD-L1発現 • PD-L2発現 • マルチプレックス免疫染色 • 変異遺伝子数 • ネオアンチゲン数 • ミスマッチ修復遺伝子異常 • T細胞受容体クローン性 • 免疫遺伝子シグネチャー

図 2 免疫チェックポイント阻害薬のバイオマーカー候補

これまでに臨床研究から報告されたバイオマーカーを血液、腫瘍周囲環境、腫瘍に分けて示す。免疫チェックポイント阻害薬は、がん細胞を認識し攻撃する T 細胞の作用を介してがんの増殖を抑制するため、その作用には多くの分子や細胞が関与している。

Cancer-Immunity Cycle で表現されるように、腫瘍に対するダイナミックな免疫応答には、様々な因子が関与しているため、単一の因子のみで、免疫チェックポイント阻害薬の治療選択や効果予測に用いることは困難である。末梢血から腫瘍細胞・

腫瘍周囲環境までのがん免疫の全体像を複合的に体系的に評価する手法が求められている。その一つとして、腫瘍免疫にかかわる情報を抽出して、スコア化し、レーダーチャートを用いて可視化するイムノグラムの作成が提唱された[11]。

これを受けて、東京大学医学部附属病院免疫細胞治療学では、肺癌患者 20 例の網羅的遺伝子解析データの中から、Cancer-Immunity Cycle の各ステップに関わる免疫関連遺伝子群の発現データを解析し、Cancer-Immunity Cycle を評価するためのイムノグラム (Immunogram for Cancer-Immunity Cycle) が作成された。レーダーチャートの軸として、1. T 細胞の多寡、2. 腫瘍の抗原性、3. T 細胞のプライミング・活性化、4. T 細胞の遊走・浸潤、5. T 細胞による腫瘍の認識、6. 抑制性免疫細胞の有無、7. チェックポイント因子発現の有無、8. その他の抑制性因子の有無、の 8 つの軸が設定された (図 3) [12]。

イムノグラムは、腫瘍への T 細胞浸潤の程度から T-cell-rich、T-cell-poor、intermediate の 3 つのパターンに大別された。例えば、図 3 に示した T-cell-rich のパターンを示す症例では、Cancer-Immunity Cycle における、腫瘍の抗原性から T 細胞による腫瘍細胞の認識までは障害されていないが、制御性 T 細胞 (Treg, regulatory T cell) や骨髄性抑制細胞 (MDSC, myeloid-derived suppressor cell) の浸潤、免疫チェックポイント因子やその他の抑制因子の発現によって、免疫細胞から腫瘍細胞への攻撃が抑制されている。このような症例では、免疫チェックポイント阻害療法だけでなく、Treg や MDSC などの抑制性細胞を同時に制御することが治療法として提案される。

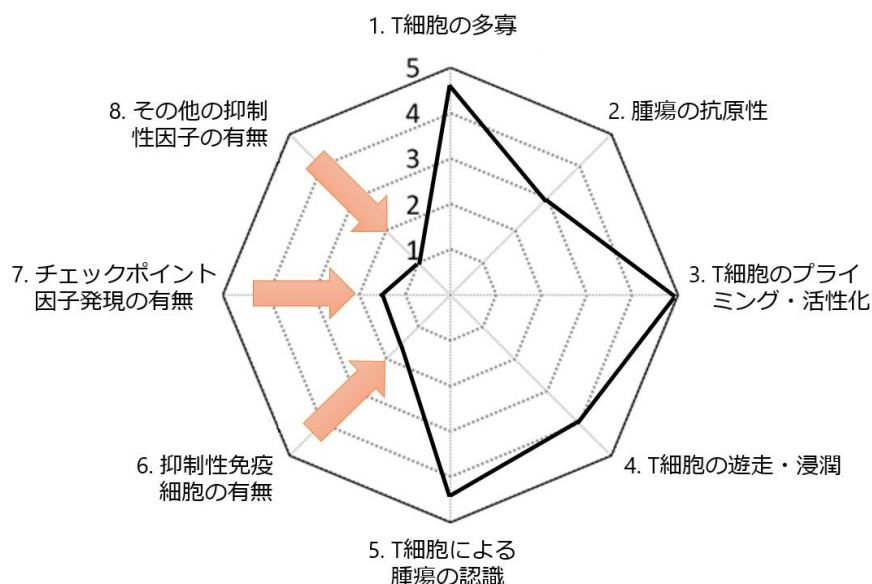


図3 イムノグラム (T-cell-rich のパターンを示す症例)

イムノグラムで T-cell-rich のパターンを示す症例。抑制性因子については発現が低くほどスコアを高く設定した。抑制性免疫細胞の浸潤、免疫チェックポイント因子やその他の抑制因子の発現によって、腫瘍細胞への攻撃が抑制されている[12]。

さらに、イムノグラムは、Cancer-Immunity Cycle のみでなく、例えば、がん-免疫相互作用に関連する腫瘍の代謝や増殖に関する因子など、評価軸を柔軟に増やすことが可能であり、腫瘍内免疫応答を統合的に理解するために有用なツールであると期待されている。

本研究では、胃切除術時に得られた組織の DNA/RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて得られた情報をもとに、遺伝子発現の解析を行うとともに、新たに7つの免疫側の因子に腫瘍側の因子として Glycolysis (解糖系) と Proliferation (細胞増殖) を加え、9つの軸でイムノグラム解析を行い、腫瘍内免疫応答を評価した。

さらに、フローサイトメーターを用いた腫瘍浸潤リンパ球 (TIL, Tumor Infiltrating Lymphocyte) の形質や機能の評価を行い、胃癌に対する免疫治療法開発のための基盤となる腫瘍内免疫応答の統合的解析を実施した。

目的

胃癌患者において、患者毎の腫瘍内免疫応答を明らかにして、将来の個別化複合的がん免疫治療法の基盤となる、腫瘍内免疫応答の評価法を確立することを目的に本研究を実施した。

方法

対象患者

共同研究機関である東京都立墨東病院において、2014年6月から2017年10月までに胃癌・食道胃接合部癌に対して外科手術（姑息的手術を含む）が行われた症例のうち、後述する解析に十分な量の研究用検体（腫瘍組織、正常組織と末梢血）を採取できた31例に対して解析を行った。手術による切除標本から腫瘍組織および正常組織を採取し、また手術時に末梢血を採取した。

手術および周術期、術後の治療は、主治医の判断に基づき、経過観察を含めて標準治療の範囲内で行われた。臨床診断や組織診断は、胃癌取扱い規約第14版[13]に従って行われた。

本研究におけるヒト試料を扱った手技・解析については、東京大学医学部附属病院の倫理指針および1964年のヘルシンキ宣言とその後の改正、それに類する倫理指針を遵守して行われた。本研究は、東京大学大学院医学系研究科および東京大学医学部附属病院のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会で承認された、臨床研究「個々のがんの遺伝子変異に基づく固有抗原の同定と腫瘍内微小環境の解析に基づく免疫制御法を組み合わせた個別化がんワクチン治療の開発」（承認番号 G3545-(18))の一部として行われた。また、共同研究機関である東京都立墨東病院でも同

課題名で倫理委員会の承認を得て行われた（受付番号 39）。本研究の全対象患者において研究参加への書面での同意取得を確認した。

臨床検体の処理

末梢血は、手術時に動脈留置カテーテルからヘパリン管に 30ml 採取した。末梢血検体は、密度勾配遠心分離法により血漿と末梢血単核球（PBMC, peripheral blood mononuclear cells）に分離し、血漿は-80°Cの超低温フリーザーで、PBMC は細胞凍結保存液 BAMBANKER (Nippon Genetics Co. Ltd., Tokyo, Japan) に懸濁して、液体窒素容器で保存した。

腫瘍組織および正常組織は、手術時に切除標本から 5mm 大の切片（腫瘍組織 2 片、正常組織 1 片）にカットして採取した。腫瘍組織 1 片は、培養用として、一部を細断して酵素処理と自動組織分散・破砕装置 gentleMACS™ Dissociator (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) による処理を行い、新鮮腫瘍分解物（FTD, Fresh tumor digest）を作成した。FTD は細胞凍害保護液 CP-1 (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co. Ltd., Tokyo, Japan) に懸濁して、液体窒素容器で保存した。残りは細断して培地上に播種し、CTS™ Immune Cell Serum Replacement (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を 5% 含む RPMI1640 培地で培養し腫瘍細胞株の樹立を試みた。また、さらに 6000 IU/ml の IL-2 (PROLEUKIN, NIPRO, Osaka, Japan) を添加した培地で TIL を培養した。3~4 週間の培養で、腫瘍細胞株の樹立あるいは TIL の培養に成功した場合には細胞凍害保護液 CP-1 で懸濁して、解析まで液体窒素容器で保存した。腫瘍組織 1 片と正常組織 1 片は、遺伝子解析用として、小片に細断して核酸安定試薬である RNA later® (Thermo Fisher Scientific) に浸漬し、4°C の冷蔵庫内で一晩以上浸透させた後、-80°C の超低温フリーザーで凍結保存した。このように保存した検体から、プロトコ

ルに従い、AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit[®] (Qiagen) を用いて腫瘍および正常組織からゲノム DNA と total RNA を抽出した。組織から抽出した DNA と RNA には胃癌細胞と周囲浸潤細胞の両者の由来のものが混在している。DNA の品質評価には蛍光光度計 Qubit Assay Kit[®] (Thermo Fisher Scientific) を用い、濃度 $\geq 12.5\text{ng}/\mu\text{l}$ 、DNA 量 $\geq 2.0\mu\text{g}$ (場合によっては $1.0\mu\text{g}$ まで許容) を満たした検体を解析に用いた。RNA の品質評価には 2100 Bioanalyzer system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) を用い、濃度 $\geq 20.0\text{ng}/\mu\text{l}$ 、RNA 量 $\geq 0.4\mu\text{g}$ (場合によっては $0.1\mu\text{g}$ まで許容)、RNA integrity number (RIN) ≥ 7.0 を満たした検体を解析に用いた。遺伝子解析用に精製した DNA および RNA サンプルは、日本ジーンウィズ株式会社 (埼玉県川口市)、BGI JAPAN (兵庫県神戸市) またはケミカル同仁 (東京都港区) に送付され、次世代シーケンサーによる全エクソームシーケンスおよび RNA シーケンスが行われた。

全エクソームシーケンス

DNA サンプルは、SureSelect XT Human All Exon Kit v5 (Agilent Technologies) を用いて、プロトコルに従い標的エクソン領域を選択的に PCR 増幅して DNA シーケンスライブラリーを作成し、次世代シーケンサー HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA) を用いて、150 塩基長 (bp、base pair) のペアーエンド法でシーケンスされた。

FASTQ 形式で得られた全エクソームシーケンスリード情報を、解析ソフトウェア Burrows-Wheeler Aligner (v0.7.15) [14] および NovoAlign software (v3.01.00, Novocraft Technologies, Selangor, Malaysia) を用いて、ヒト参照ゲノム配列 GRCh38/hg38 上にマッピングした。ポストマッピング処理として、Picard (v2.1.1) を用いて重複リードを除去した後、Genome Analysis Toolkit (GATK, v.3.7) [15] を用い

てローカルリアライメント及びリキャリブレーションを行い、腫瘍・正常それぞれのサンプルの BAM ファイルを生成した。変異解析ソフト VarScan (v 2.4.2) および Mutect (v.1.1.7) を用いて、体細胞遺伝子変異を検出した [16][17]。

RNA シークエンス

RNA サンプルは、SureSelect Strand-Specific RNA library Preparation kit for Illumina (Agilent Technologies) を用いて、プロトコルに従い poly-A 選択的 RNA シークエンスライブラリーを作成し、次世代シーケンサー HiSeq2000 (Illumina) を用いてシーケンスされた。

FASTQ 形式で得られた RNA シークエンスリード情報を、解析ソフトウェア STAR(v.2.5.2b) [18] を用いて、ヒト参照ゲノム配列 GRCh38/hg38 へ、マッピングを行った。発現量は、解析ソフトウェア HTSeq (v.0.6.1) [19] を用いて、各遺伝子領域にマッピングされたリード数を算出した後に、R (The R Project for Statistical Computing) [<https://www.r-project.org/>] を用いて各遺伝子の発現量を fragments per kilobase of exon per kilobase of exon per million fragments mapped (FPKM, 全リード数が 100 万リード・各遺伝子の配列長が 1,000 塩基であったと仮定したときのリード数) の単位で定量化した。各遺伝子の発現値 FPKM が 1 以上の場合に、有意な発現と判定した。

イムノグラム

腫瘍内免疫応答を反映する遺伝子群のリストを作成し、イムノグラムの各評価軸を決定した。Cancer-Immunity Cycle の各ステップに関わる因子は、先行研究での 8 つの軸[12]から 7 つの軸に整理し、腫瘍の代謝や増殖に関わる因子として Glycolysis (解糖系)、Proliferation (細胞増殖) の 2 つの軸を加えた (評価軸として使用した遺伝子群の内容を表 1 に示す)。

次に、TCGA に登録された胃癌 375 例の各遺伝子の発現量 (FPKM 値) データをダウンロードし、解析ソフトウェア Gene Set Enrichment Analysis (GSEA, v9) [20]を用いて single sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA)を行い、イムノグラムの評価軸毎に、TCGA に登録された胃癌患者の ssGSEA スコアの平均値と標準偏差を計算した。つづいて、本研究の 31 症例の RNA シークエンスから得られた各遺伝子の発現量 (FPKM 値) データについて同様に ssGSEA を行い、各症例でイムノグラムの評価軸毎に得られた ssGSEA スコアを、TCGA データから作成した平均値と標準偏差を基準として標準化し、Z スコアを計算した。この Z スコアを、先行研究の手法に基づいて[12]、1~5 点からなるイムノグラムスコア (IGS, Immunogram score) に変換し、イムノグラムを作成した。

表 1 イムノグラムスコア (IGS) 算出に用いた遺伝子群

	Genes
Innate immunity	<i>APOBEC3G, APOL6, CCL4, CCL5, CCND2, CD244, CD247, CD69, CD7, CD96, CDK6, CSF2, CST7, CTSW, DPP4, FASLG, GNLY, GPR171, GPR18, GRAP2, GZMA, GZMB, GZMH, GZMM, IFNG, IL12RB2, IL18R1, IL18RAP, IL2RB, KIR2DL1, KIR2DL4, KIR2DS4, KIR3DL2, KLRB1, KLRC3, KLRD1, KLRF1, KLRK1, LCK, LTA, LTB, NAALADL1, NCR3, NKG7, OSM, PRF1, PRR5L, PTGDR, PTGER2, PTPRCAP, PVRIG, S1PR5, SH2D1A, SOCS1, TBX21, TNFSF14, TRDC, TXK, ZAP70</i>
Priming & activation	<i>ARHGAP22, BIRC3, CCL1, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL22, CCL5, CCL8, CCR7, CD1B, CD1E, CD80, CD86, CHST7, CLIC2, CXCL10, CXCL11, CYP27A1, DHX58, EBI3, ETV3, FPR3, HESX1, HTR2B, IDO1, IFI44L, IL12B, IL2RA, KYNU, LAMP3, MAP3K13, MMP12, MSC, NR4A3, PDCD1LG2, PLA1A, PLA2G7, PTGIR, RASSF4, RSAD2, SIGLEC1, SLC15A3, SLC2A6, SLCO5A1, ST3GAL6, TMEM255A, TNFAIP6, TNFRSF11A, TNFRSF4, TREM2</i>
T cells	<i>BCL11B, CCL5, CD2, CD247, CD27, CD3D, CD3E, CD3G, CD6, CD69, CD7, CD8A, CD8B, CD96, CRTAM, CST7, CTSW, DPP4, DSC1, DUSP2, FCMR, FLT3LG, GNLY, GPR171, GRAP2, GZMA, GZMB, GZMH, GZMK, GZMM, ICOS, IGKC, IL7R, ITK, KLRB1, KLRC3, KLRC4, KLRD1, KLRF1, KLRK1, LAG3, LCK, LEF1, LIME1, LTB, LY9, MAP4K1, MAP9, NCR3, NKG7, PIK3IP1, PRF1, PTGDR, PTPRCAP, PVRIG, RASA3, RPL3P7, SH2D1A, SIRPG, TCF7, TRAC, TRAT1, TRAV12-2, TRAV13-1, TRBC1, TRDC, UBASH3A, ZAP70</i>
IFN γ response	<i>STAT1, ISG15, IFIT1, MX1, IFIT3, IFI35, IRF7, IFIT2, OAS2, TAP1, EIF2AK2, RSAD2, MX2, IRF1, OAS3, TNFSF10, IRF9, CXCL10, IFI44, BST2, XAF1, SP110, OASL, PSMB8, IFI44L, IFITM3, DDX60, LGALS3BP, GBP4, IRF8, PSMB9, PML, IFIH1, UBE2L6, IFI27, ADAR, LY6E, STAT2, CXCL9, IL10RA, PLA2G4A, TRIM21, USP18, PTGS2, EPSTI1, C1S, DDX58, IL15, NLRC5, NMI, IDO1, PSMB10, CXCL11, ITGB7, SAMHD1, HERC6, CMPK2, SAMD9L, RTP4, PTPN2, PARP14, TNFAIP2, IFITM2, PLSCR1, SOCS1, CASP1, ICAM1, WARS, PSME1, ISG20, IRF2, TRIM14, FCGRIA, MARCH1</i>
Inhibitory cells (Tregs)	<i>BARX2, BCL11B, CD2, CD247, CD27, CD28, CD3D, CD3E, CD3G, CD4, CD5, CD6, CD70, CD96, CEMP1, CLEC2D, CTLA4, DGKA, DPP4, EFNA5, FOXP3, FRMD8, GPR1, GPR171, GPR19, GZMM, HIC1, HMGB3P30, ICOS, IL2RA, IL2RB, ITK, KIRREL, LAIR2, LCK, LILRA4, LOC126987, LTB, MAP4K1, MBL2, NPAS1, NTN3, PCDHA5, PLCH2, PMCH, PTGIR, PTPRG, RCAN3, RYR1, SEC31B, SEPT5, SH2D1A, SIRPG, SIT1, SKAP1, SPOCK2, SSX1, TRAC, TRAT1, TRAV9-2, TRBC1, TYR, UBASH3A, ZAP70</i>
(MDSC)	<i>ADORA3, C11orf96, ARG1, BIN2, C1orf162, CAPS, KIT, ITGAM, ITGAX, IL4R, CD14, FUT4, CD163L1, CR2, FCER2, CD274, PECAM1,</i>

	<i>CRI, CD40, SPN, CD44, COX2, CTR9, EBP, SUPT20H, TMEM255B, FCGRT, FERMT3, FLOT1, FLT1, GIMAP7, GLI4, GNA15, GPR34, GPSM3, IDO1, IKZF1, IL13, IL18BP, IL1R1, INPP5D, ITGA3, KDR, KRIT1, LGALS3, MGAT4A, NAIP, NEK3, NOG, PARVG, PDRG1, PIK3R5, PPP1R2P4, PSAP, PTGES2, PTPRE, RNASE1, PRPF31, S100A8, S100A9, SELPLG, SLA, SLC36A1, SLC44A1, ST8SIA4, STAT3, STAT6, TBXAS1, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TFRC, TPP1, VTCN1</i>
Inhibitory molecules	<i>ARG1, BTLA, CCL2, CCL22, CD163, CD80, CD86, COL17A1, CSF1, CTLA4, ENTPD1, FOXP3, GDF15, HAVCR2, HGF, ICOS, IDO1, IDO2, IL10, IL13, IL4, IL6, IL6ST, JAK2, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, LAG3, LAIR1, LGALS1, LGALS3, MCL1, MRC1, MSRI, MYC, NT5E, PDCD1, CD274, PDCD1LG2, PIMI, PTGS1, PTGS2, PVR, SOCS3, STAT3, STAT5B, TGFB1, TIGIT, TIMP1, TNFRSF14, VEGFA, VTCN1</i>
Recognition of tumor cells	<i>UBA2, SAE1, HUWE1, RNF41, PSMD14, STUB1, ANAPC10, ARIH2, SEC24B, UBE2E3, SEC23A, LRRC41, ATG7, RBCK1, SEC61B, WWP1, UBE2C, TRIM9, FBXO17, UBE2J2, LRR1, FBXO27, ASB17, ASB11, ASB5, ASB6, ASB7, ASB8, ASB9, UBE2F, ASB15, ASB12, PSMA8, UBE2U, DTX3L, CTSS, CYBA, CYBB, UBR1, FCGR1A, FCGR1B, RNF182, SEC31A, UBOX5, TRIM32, PSME4, FBXW11, UBR2, UBR4, SEC61G, MKRN1, CDC26, RNF144B, ANAPC13, RCHY1, WSB1, FBXO2, FBXW8, FBXO6, FBXO4, FBXO3, KLHL20, UBE2S, PDIA3, ANAPC2, SEC61A1, ANAPC4, UBE2K, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-F, HLA-G, HSPA5</i>
Glycolysis	<i>PGK1, ALDOA, ENO1, TPI1, PFKP, ERO1A, ALDOB, VEGFA, MXII, PKM, HK2, LDHA, EXT1, SLC25A10, GUSB, PFKFB1, PGAM1, PYGB, AK4, P4HA1, PMM2, FAM162A, SDC1, EGLN3, PC, B4GALT7, FBP2, IGFBP3, CHPF, B3GAT3, CHST12, HS2ST1, MPI, GNPDA1, AKR1A1, PPFIA4, B3GAT1, CHPF2, G6PD, MDH2, CHST6, PGLS, PGAM2, CHST1, GPC1, TSTA3, ALG1, GFPT1, PRPS1, GOT1, MDH1, SLC35A3, GALK1, EGFR, ANGPTL4, CITED2, PLOD2, QSOX1, ME2, SPAG4, P4HA2, GAPDHS, ENO2, GOT2, EXT2, SLC25A13, HMMR, PDK3, CXCR4, GPC4, ECD, GNE, B4GALT2, FUT8</i>
Proliferation	<i>KIF20A, CDK2, PSMD14, CDKN1A, CDKN1B, STAG1, NDC80, CENPA, CENPC, POLD3, NUDC, STAG2, DBF4, KIF2C, ZWINT, PMF1, PSMA8, SPC24, SGO2, SGO1, DNA2, E2F1, E2F2, E2F3, SKA1, FEN1, MAPRE1, PSME4, CLASP1, ITGB3BP, ORC6, ORC3, POLA2, CENPI, AHCTF1, NSL1, FBXO5, RPA4, BIRC5, SKA2, NUP43, INCENP, CENPS, KIF2A, LIG1, CENPP, MAD2L1, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6, MCM7, ORC1, ORC2, ORC4, ORC5, PAFAH1B1, GMNN, PCNA, GINS2, PLK1, POLA1, POLD1, POLD2, POLE, POLE2, ERCC6L, SPD1, PPP1CC, ZWILCH, CDCA8, PPP2CA, PPP2CB</i>

ネオアンチゲン候補予測

正常組織由来の全エクソームシーケンスデータに対して、解析ソフトウェア POLYSOLVER (Broad Institute, Cambridge, MA)を用いて HLA クラス I (HLA-A, B, C) 遺伝子型を判定した [21]。各患者において同定された腫瘍特異的な体細胞遺伝子変異のうち、その患者の HLA クラス I と結合能の高いアミノ酸置換を伴う一塩基置換変異 (ミスセンス変異) 由来のアミノ酸配列パターンを、MHC 結合能計算アルゴリズム [22] により予測して、腫瘍特異的な体細胞遺伝子変異由来の変異タンパクであるネオアンチゲンを推定した。HLA クラス I は 8-11 アミノ酸長 (8-11mer) のショートペプチド (エピトープ) と結合するため、腫瘍毎に変異アミノ酸部位を中央 (11 番目) に配置した 21mer の変異ペプチド配列のリストを FASTA 形式で作成し、変異アミノ酸部位を含む 8-11mer の各ペプチド配列と、その患者 HLA-A, B, C の全ての組み合わせについて、解析ソフトウェア NetMHCpan (v3.0) [23]を用いて MHC 結合能を予測した。それぞれの組み合わせについて 50% 阻害濃度 (IC_{50} 値, 50% inhibitory concentration, 値が小さいほど結合能が高いことを示す) を算出し、先行研究に基づき、予測された IC_{50} 値が 500 nM 以下の場合に高結合能エピトープと判定した [22]。それぞれの腫瘍特異的な変異ペプチドについて、1 つ以上の高結合能エピトープを有し、かつ該当する遺伝子の FPKM 値が 1 以上で有意に発現している場合にネオアンチゲン候補と判定した。また、各腫瘍組織のミスセンス変異がネオアンチゲンを生じる頻度をネオアンチゲン頻度 (neoantigen frequency) と定義した [24]。

遺伝子変異解析

全エクソームシーケンスの結果より得られた変異リストのうち Mutect2 Filtering (v4.0.1.2) をパスした変異を各検体の変異の総数として解析を行った。Annovar[25]を用いて変異のアミノ酸変化情報のアノテーションを行い、エクソン領域の非同義変異 (nonsynonymous mutation) およびスプライス部位変異 (splice site mutation) に関して遺伝子毎の図示を行った。

コピー数解析

全エクソームシーケンス解析により得られた腫瘍・正常部の BAM ファイルから GATK (v 4.0.1.2) [15]を用いてコピー数変異の解析を行った。セグメンテーションは CBS アルゴリズムを用いた。Bedtools (v2.27.1)[26]を用いて各遺伝子領域におけるコピー数変化イベントを検出し遺伝子毎の図示を行った。また、VarScan (v2.3)を用いて変異を検出し、腫瘍・正常部の比較から、ヘテロ接合性消失 (LOH, Loss of heterozygosity) を推測し、同様に図示した。

The Cancer Genome Atlas (TCGA) による分子生物学的分類

TCGA による手法[27]をもとに以下の方法により、サンプルを4つのサブタイプに分類した。

1. EBV (Epstein-Barr virus) 陽性サブタイプの分類

RNA シーケンス解析により得られた腫瘍部の BAM ファイルから BioBloom[28] を用いて EBV 由来 mRNA の混入を検出し、リードが検出されたサンプルを EBV 陽性と判定した。

2. マイクロサテライト不安定性 (MSI, microsatellite instability) サブタイプの分類

EBV 陰性のサンプルについて、Mutect2 Filtering (v4.0.1.2) をパスした変異から MSIseq[29]を用いてリファレンス配列内の繰り返し配列領域における挿入・欠失の頻度を計算し、同領域における挿入・欠失の頻度が大きく他領域における頻度が少ない検体をマイクロサテライト不安定性 (MSI) 陽性と判定した。

3. 染色体不安定性 (CIN, chromosomal instability) サブタイプ/ゲノム安定性 (GS, genomically stable) サブタイプの分類

上記 2 つに分類されないサンプルについて、コピー数解析により得られたコピー数イベントをもとに各サンプルの非階層クラスタリングを行い、染色体不安定性 (CIN) サブタイプとゲノム安定性 (GS) サブタイプの分類を行った。

Asian Cancer Research Group (ACRG) による分子生物学的分類

Asian Cancer Research Group (ACRG)による胃癌の分子生物学的分類[30]に基づいて、表 2 に示した 71 遺伝子[31]の発現解析の結果から、サンプルを階層型クラスター解析で、Mesenchymal, MSS/EMT (間葉系) 型と Non-Mesenchymal (非間葉系) 型に分類した (EMT サブセット分類)。Mesenchymal 型では EMT down gene (11 遺伝子) の発現が低下し、残りの EMT up gene (60 遺伝子) の発現が上昇する。

表 2 EMT サブセット分類に用いた 71 遺伝子

EMT up (60 genes)	<i>ADAM23, ADAMTS1, AKAP12, ALPK2, AP1S2, ARMCX1, AXL, BICC1, BNC2, C16orf45, CIS, CLDN11, CMTM3, CTGF, CYBRD1, DIO2, DKK3, DOCK10, DPYSL3, EML1, EVI2A, FAM101B, FAT4, FGF2, FGFR1, FHL1, FLRT2, FSTL1, GLIPR1, GNB4, GNG11, HEG1, IGFBP7, JAM3, LEPREL1, LHFP, MAP1B, MMP2, MRAS, MSRB3, NDN, NEGR1, NEXN, NID1, PLAGL1, PMP22, PRKD1, PTGIS, RBMS3, RECK, RFTN1, SRPX, TCF4, TMEM47, TTC28, UCHL1, VIM, ZEB1, ZEB2, ZFPM2</i>
EMT down (11 genes)	<i>C19orf21, CLDN4, CLDN7, DSC2, GOLT1A, LIPG, MAP7, PAK6, PKP3, SH2D3A, SPINT1</i>

TIDE (Tumor Immune Dysfunction and Exclusion) を用いた解析

グラフィカルユーザインタフェースである TIDE (Tumor Immune Dysfunction and Exclusion) [<http://tide.dfci.harvard.edu/login/>] [40]を用いて、腫瘍組織の RNA シークエンス結果から、腫瘍内に浸潤した T 細胞の機能不全 (Dysfunction score) と腫瘍内 T 細胞浸潤の排除 (Exclusion score) の程度をそれぞれスコア化し、さらに免疫チェックポイント阻害薬への反応をスコア化して予測した。また、MDSC、腫瘍関連マクロファージ (TAM, tumor-associated macrophage) M2、がん間質線維芽細胞 (CAF, cancer associated fibroblast) の発現を IFN γ の発現とともに解析した。

フローサイトメトリー

凍結保存した PBMC (または培養した TIL) を核酸分解酵素 Benzonase (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 50 IU/mL を含む RPMI1640 中で融解し、その分画について、表 3 に示した各細胞表面マーカーを測定した。

表 3 細胞表面マーカー

分画	単球	B 細胞	T 細胞	CD4 陽性細胞	CD8 陽性細胞
細胞表面マーカー	CD45 ⁺ CD14 ⁺	CD45 ⁺ CD19 ⁺	CD45 ⁺ CD3 ⁺	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺

解凍した PBMC または TIL は、さらに Cytostim (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) あるいは PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate (AdipoGen Life Science, Liestal, Switzerland) とイオノマイシン (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) による刺激を加えた後に、表 4 に示したヒト特異的抗体で染色を行った。コントロールには、未刺激の PBMC (TIL) を用いた。解析時に死細胞を除くため、サンプルは Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit (BioLegend, San Diego, CA) で染色した。これらをフローサイトメーター

Gallios (Beckman Coulter)または CytoFLEX (Beckman Coulter)を用いて測定し、解析ソフトウェア Kaluza (Beckman Coulter)を用いて解析を行った。

CD8 陽性細胞および CD4 陽性細胞から産生する細胞傷害性サイトカインとしてインターフェロン γ (IFN γ , interferon-gamma)、インターロイキン-2 (IL-2, interleukin-2)、腫瘍壊死因子 (TNF α , tumor necrosis factor α)、CD8 陽性細胞上および CD4 陽性細胞上に発現する、活性化マーカーの OX40 (CD134 / TNFR-SF4, Tumor necrosis factor receptor superfamily member 4)、4-1BB (CD137 / TNFR-SF9, Tumor necrosis factor receptor superfamily member 9)、CD69、抑制性分子の T-cell immunoglobulin and mucin domain-3 (Tim-3)、PD-1 の発現を測定、解析した。ゲーティングは図 4 に示したように行った。

表 4.1 フローサイトメーター用染色抗体 (免疫チェックポイント分子測定)

抗体名	蛍光色素	クローン	メーカー
CD3	PerCP/Cy5.5	HIT3a	BioLegend
CD4	APC	RPA-T4	BioLegend
CD8	APC/Cy7	HIT8a	BioLegend
PD-1	Brilliant Violet 421™	EH12.2H7	BioLegend
Tim-3	Alexa Fluor® 488	344823	R&D
4-1BB	Brilliant Violet 421™	4B4-1	BioLegend
OX40	PE	Ber-ACT35	BioLegend
CD69	Brilliant Violet 421™	FN50	BioLegend

表 4.2 フローサイトメーター用染色抗体 (TIL、PBMC のサイトカイン測定)

抗体名	蛍光色素	クローン	メーカー
CD3	PerCP/Cy5.5	HIT3a	BioLegend
CD8	ECD	SFCI21Thy2D3 (T8)	Beckman Coulter
IFN γ	PE	45.15	Beckman Coulter
IL-2	APC	MQ1-17H12	BioLegend
TNF α	Alexa Fluor® 700	MAb11	BD Pharmingen™
PD-1	Brilliant Violet 421™	EH12.2H7	BioLegend
Tim-3	Alexa Fluor® 488	344823	R&D

表 4.3 フローサイトメーター用染色抗体 (TIL のサイトカイン測定)

抗体名	蛍光色素	クローン	メーカー
CD45	Alexa Fluor® 700	2D1	BioLegend
CD3	Brilliant Violet 605™	UCHT1	BioLegend
CD4	PE-Cy5.5	SK3	eBioscience
CD8	APC/Cy7	HIT8a	BioLegend
IFN γ	PE	45.15	Beckman Coulter
IL-2	APC	MQ1-17H12	BioLegend
TNF α	PE/Cy7	MAb11	BioLegend
PD-1	Brilliant Violet 421™	EH12.2H7	BioLegend
Tim-3	Alexa Fluor® 488	344823	R&D

図 4 TIL のフローサイトメトリー解析でのゲーティング

live cells → singlet cell → CD45 陽性 → CD3 陽性 → CD4 または CD8 陽性の順にゲーティングし、その後、IFN γ , IL-2, TNF α の発現を解析した。

Live, live cells; Singlet, singlet cells; SS, side scatter; FS, forward scatter; -H, high; -A, area; CD, cluster of differentiation; Tim-3, T-cell immunoglobulin and mucin domain; IFN γ , interferon-gamma; IL-2, interleukin-2; TNF α , tumor necrosis factor α

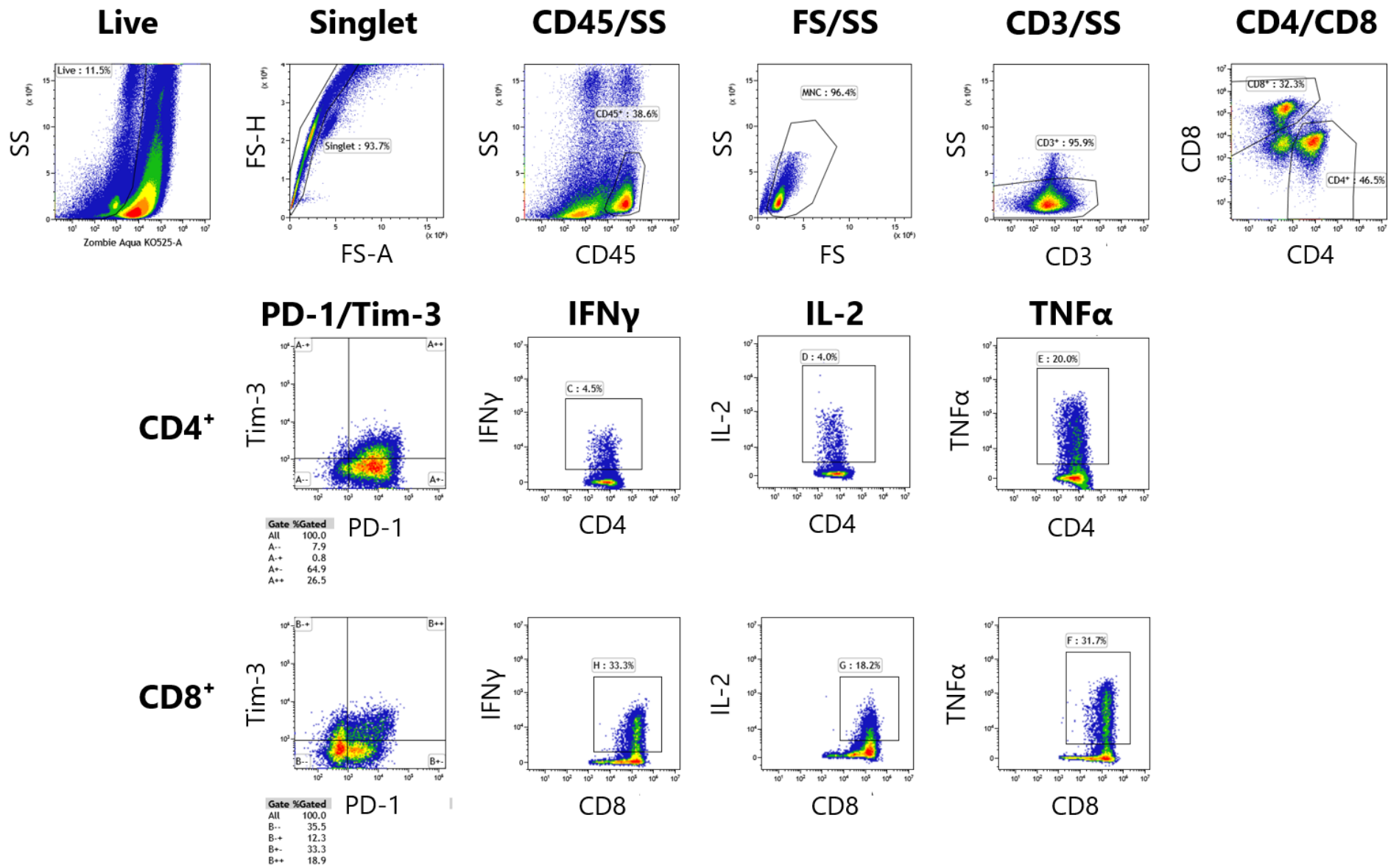


図4 TILのフローサイトメトリー解析でのゲーティング

液性因子の解析

末梢血から分離した血漿中のサイトカイン・ケモカインや抗体産生などの液性因子を解析した。

サイトカイン・ケモカインは、Bio-Plex ヒトサイトカイン GI 27-Plex アッセイパネル(Bio-Rad, Hercules, CA)を用いて、プロトコルに従い 1/4 に希釈した血漿に、ビーズ、検出用抗体、ストレプトアビジンを順に加え、MAGPIX システム (Merck, Darmstadt, Germany)で測定した。測定した 27 種のサイトカインを表 5 に示す。

表 5 Bio-Plex ヒトサイトカイン GI 27-Plex アッセイパネルの対象リスト

FGF basic, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF α , VEGF

また、59 種の腫瘍関連抗原 (TAAs, tumor-associated antigens) またはがん精巣抗原 (CT 抗原, cancer/testis antigens) のパネル [32] を用いて、ビーズイノムアッセイ法で各抗原に対する抗体産生を測定した。測定した抗原を表 6 に示す。

表 6 ビーズイノムアッセイ法で抗体産生を測定した抗原のリスト

MAGE-A1(CT1.1), BAGE(CT2), MAGE-B3(CT3.3), SSX2(CT5.2), SSX4(CT5.4), NY-ESO1(CT6), SYCP1(CT8), XAGE1b(CT12.1), XAGE2(CT12.2), ACRBP(CT23), CSAG2(CT24.2), DDX53(CT26), BORIS(CT27), LUZP4(CT28), TFDP3(CT30), FTHL17(CT38), NXF2(CT39), CT45A1(CT45), HSPB9(CT51), ZNF165(CT53), Cxorf61(CT83), PLAC1(CT92), LY6K(CT97), DPPA2(CT100), DCAF12(CT102), SEMG1(CT103), NUF2(CT1106), CEP55(CT111), SPEF2(2)(CT122), MAEL(CT128), TEKT5(CT149), WT-1, Survivin2b, HSP105, gp100, p53, SOX2, PSG5, PSG8, CEACAM4, MAGE-A3(CT1.3), MAGE-A4(CT1.4), MAGE-A6(CT1.6), MAGE-C1(CT7), MAGE-C2(CT10), PAGE5(CT16), SPA17(CT22), HORMAD1(CT46), CABYR(CT88), Her2, CEACAM19, SPANXD(CT11), MORC1(CT33), PBK(CT84), ACTL8(CT57), TSSK6(CT72), CCDC36(CT74), SYCE1(CT76), OIP5(CT86)

遺伝子発現変動解析

2群間の比較トランスクリプトーム解析では、RパッケージTCC [33]のグラフィカルユーザインタフェースであるTCC-GUI (Graphical User Interface for TCC package [https://infinityloop.shinyapps.io/TCC-GUI/])を用いて、RパッケージDESeqによる正規化、RパッケージDESeq2による発現変動解析を行い [34]、FDR (False Discovery Rate)のカットオフ値を0.05として、発現変動遺伝子 (DEG, differential expressed genes)を同定した。さらに、遺伝子の発現変動を可視化するために、M-Aプロット (Y軸, M: 発現変動の大きさの差、X軸, A: 発現変動の大きさの平均値)、Volcanoプロット (X軸, Fold change : 2群間における遺伝子発現の比、Y軸, p -value: 統計学的有意差)を描画した。

統計解析

階層型クラスター解析には、IGSを用いて、Ward法によって、ヒートマップおよび樹形図を作図した。

生存解析には、Kaplan-Meier法により生存曲線の描画を行い、log-rank検定を用いて異なる群間の生存期間の比較を行った。

対応する2群間の比較にはWilcoxon符号付順位和検定、独立した3群以上の群間の比較にはKruskal-Wallis検定を用い、事後検定 (post hoc test)として各2群間の比較にSteel-Dwass多重比較検定を用いた。

統計解析および作図には、統計解析ソフトウェアEZR (v1.3.7) [35]またはJMP Pro 14 (SAS Institute Japan, Tokyo, Japan)を使用した。統計検定においては特記しない場合はすべて $p < 0.05$ の場合に統計学的有意差ありと定義した。

結果

対象患者

本研究では胃癌・食道胃接合部癌症例 31 例について解析を行った。患者背景について表 7 に示す。31 例すべてが腺癌であり、食道胃接合部癌は 2 例、胃癌は 29 例であった。年齢中央値は 71.2 歳（範囲 57～88 歳）で、根治手術を行った症例（Stage I-III）は 25 例、姑息的手術を行った症例（Stage IV）は 6 例であった。術前化学療法を受けた症例は 1 例のみ（BKT40）であった。術後観察期間は中央値 14.2 カ月（範囲 1.6-51.2 カ月）であった。

表 7 患者背景 (n=31)

患者背景	n (%)
性別	
男性	26 (84)
女性	5 (16)
年齢	
中央値 (歳)	71.2
範囲 (歳)	57-88
pStage	
I	4 (13)
II	7 (23)
III	14 (45)
IV	6 (19)
pT	
1b	2 (6)
2	3 (10)
3	15 (48)
4a	8 (26)
4b	3 (10)
組織型 (Lauren 分類)	
腸型	19 (61)
びまん型	1 (3)
混合型	10 (32)
中間型	1 (3)
原発巣	
食道胃接合部 (E)	2 (6)
上部 (U)	10 (10)
中部 (M)	7 (23)
下部 (L)	12 (39)

肉眼分類 (Borrmann 分類)	
1 型 (腫瘍型)	2 (6)
2 型 (潰瘍限局型)	15 (48)
3 型 (潰瘍浸潤型)	11 (35)
4 型 (びまん浸潤型)	2 (6)
5 型 (分類不能)	1 (3)
HER2	
過剰発現あり	6 (19)
過剰発現なし	20 (65)
不明	5 (16)
血清抗ヘリコバクターピロリ IgG 抗体	
陽性	20 (65)
陰性	11 (35)
術式	
胃全摘術	15 (48)
幽門側胃切除	14 (45)
噴門側胃切除	1 (3)
バイパス術	1 (3)
周囲組織に対する浸潤増殖様式 (INF)	
INFa	4 (13)
INFb	19 (61)
INFc	5 (16)
不明	3 (10)
リンパ管侵襲 (ly)	
ly0	11 (35)
ly1	5 (16)
ly2	8 (26)
ly3	5 (16)
不明	2 (6)
静脈侵襲 (v)	
v0	9 (29)
v1	2 (6)
v2	6 (19)
v3	12 (39)
不明	2 (6)
術前化学療法	
あり	1 (3)
なし	30 (97)

HER2、 Human Epidermal Growth Factor Receptor 2;

イムノグラムによる解析

患者 31 症例の腫瘍組織の RNA シークエンスによって得られた網羅的トランスクリプトームの情報の中から、腫瘍内免疫応答の誘導に関する Cancer-Immunity Cycle の各ステップに関わる因子と、腫瘍の代謝や増殖に関わる因子を抽出し、ssGSEA を用いてスコア化した。Cancer-Immunity Cycle に関して、1. Innate immunity（自然免疫系細胞）、2. Priming & activation（T 細胞のプライミング・活性化）、3. T cells（T 細胞の多寡）、4. IFN γ response（インターフェロン γ 放出の多寡）、5. Inhibitory cells（抑制性免疫細胞）、6. Inhibitory molecules（抑制性因子）、7. Recognition of tumor cells（T 細胞による腫瘍の認識）の 7 つの軸と、腫瘍の代謝や増殖に関する 8. Glycolysis（解糖系）、9. Proliferation（細胞増殖）の 2 つの軸を統合して、がん-免疫相互作用にも着目した 9 つの軸を持ったイムノグラムを描いて、各患者の腫瘍内免疫応答を評価した。患者個々の腫瘍内免疫応答の相違を反映して、31 症例それぞれに異なった形態のイムノグラムが示された（図 5）。

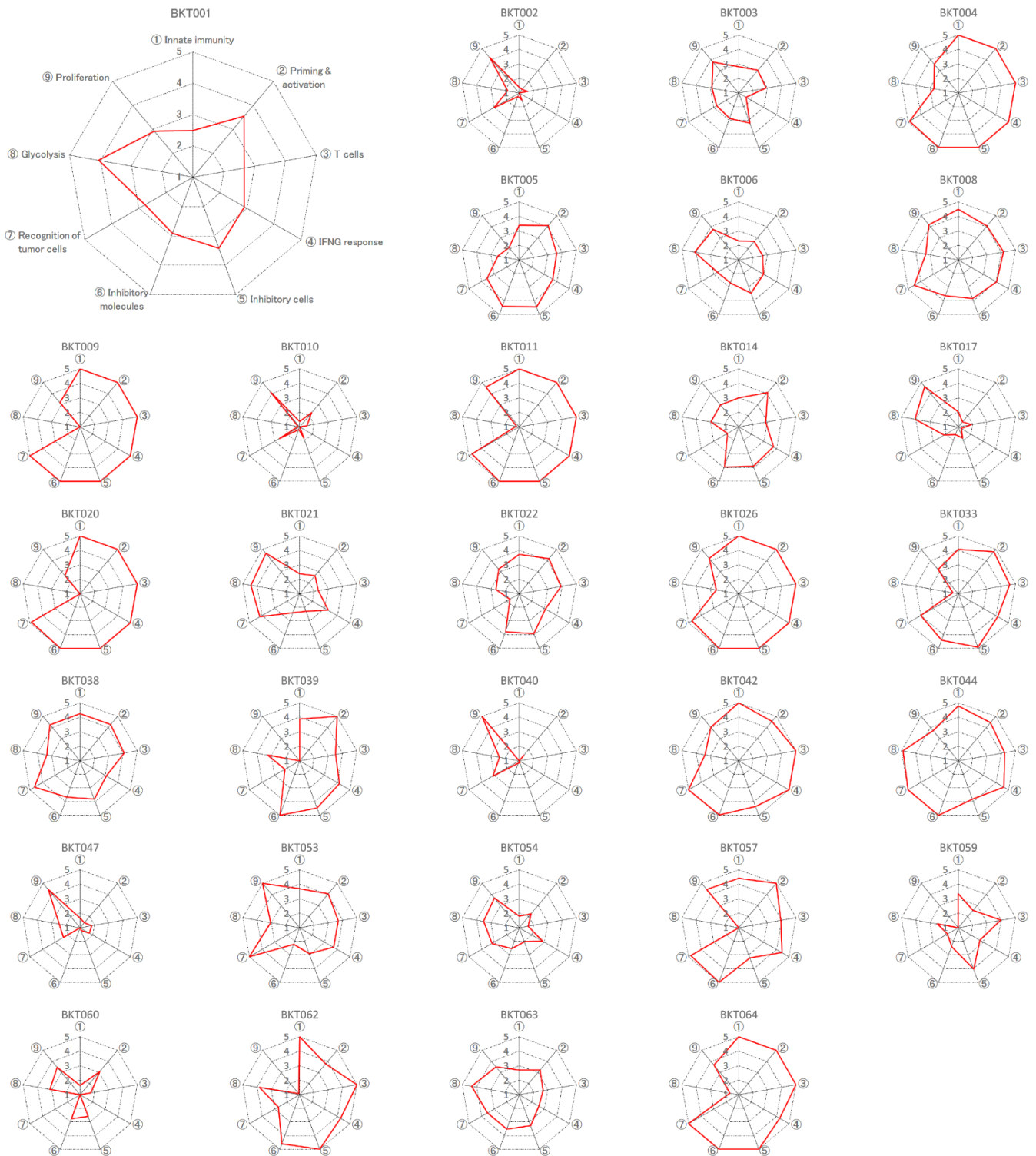


図 5. 患者 31 症例の免疫グラム

患者 31 症例の腫瘍組織のトランスクリプトームデータから、① Innate immunity（自然免疫系細胞）、② Priming & activation（T細胞のプライミング・活性化）、③ T cells（T細胞の多寡）、④ IFN γ response（インターフェロン γ 放出の多寡）、⑤ Inhibitory cells（抑制性免疫細胞）、⑥ Inhibitory molecules（抑制性因子）、⑦ Recognition of tumor cells（T細胞による腫瘍の認識）、⑧ Glycolysis（解糖系）、⑨ Proliferation（細胞増殖）に関連する遺伝子発現を single sample Gene Set Enrichment Analysis (ssGSEA) を用いてスコア化し、免疫グラムを作成した。

イムノグラムスコア (IGS) によるクラスター解析

イムノグラム作成過程において、評価軸毎に求めたイムノグラムスコア (IGS) を用いて階層的クラスター解析を行った。図 6 に示すように、患者 31 症例は、Innate immunity (自然免疫系細胞の有無)、Priming & activation (T 細胞のプライミング・活性化)、T cells (T 細胞の多寡)、IFN γ response (インターフェロン γ 放出の多寡) のスコアが高く、腫瘍内免疫応答が活性化されている“Immune Hot”と、これらのスコアが低く、腫瘍内免疫応答が抑制されている“Immune Cold”の 2 つのクラスターに大別された。

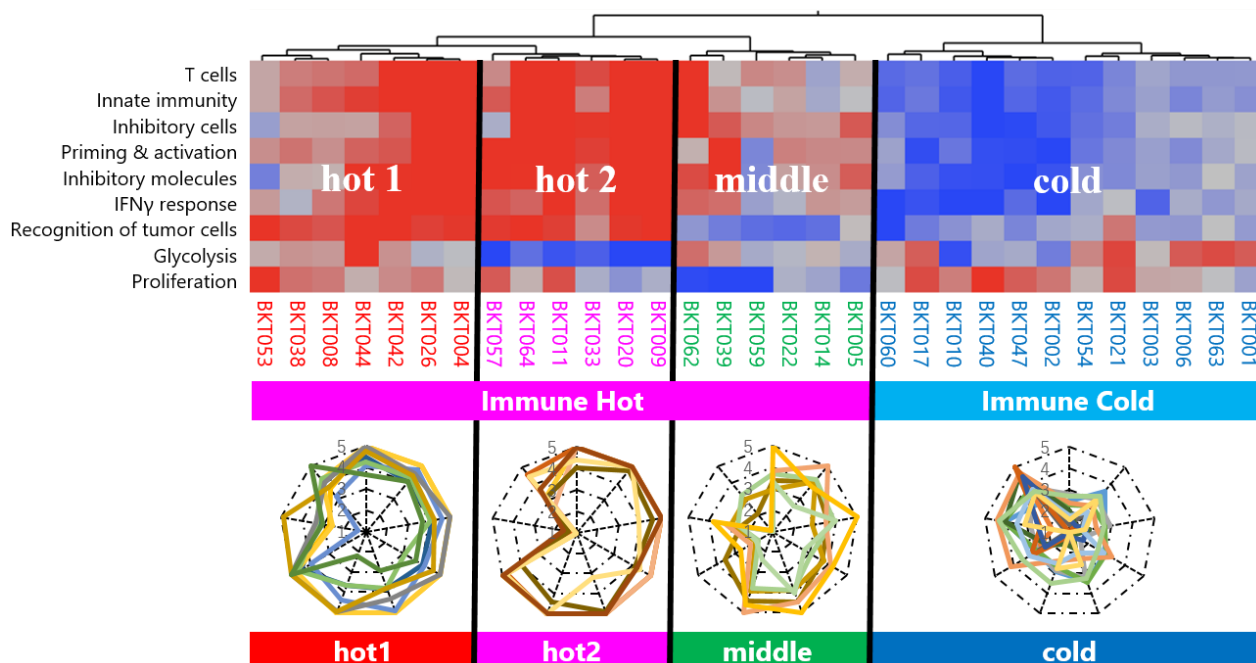


図 6 イムノグラムスコア (IGS) による階層的クラスター解析

患者 31 症例を、イムノグラム作成過程において評価軸毎に算出されたイムノグラムスコア (IGS) により階層的クラスター解析した。患者 31 症例は、腫瘍内免疫応答が活性化されている“Immune Hot”と、抑制されている“Immune Cold”の 2 つのクラスターに大別された。さらに“Immune Hot”は 3 つのクラスターに分かれ、患者 31 症例は最終的に“hot1”、“hot2”、“middle”、“cold”の 4 つのクラスターに分類された。

さらに“Immune Hot”は、Recognition of tumor cells（T細胞による腫瘍の認識）、Glycolysis（解糖系）、Proliferation（細胞増殖）のスコアがいずれも高い“hot1”、Glycolysis（解糖系）のスコアが低い“hot2”、Recognition of tumor cells（T細胞による腫瘍の認識）、Glycolysis（解糖系）、Proliferation（細胞増殖）のスコアが低い“middle”の3つのクラスターに分かれた。胃癌患者31症例の腫瘍内免疫応答を、最終的に“hot1”、“hot2”、“middle”、“cold”の4つのクラスター（IGS cluster）に分類した。

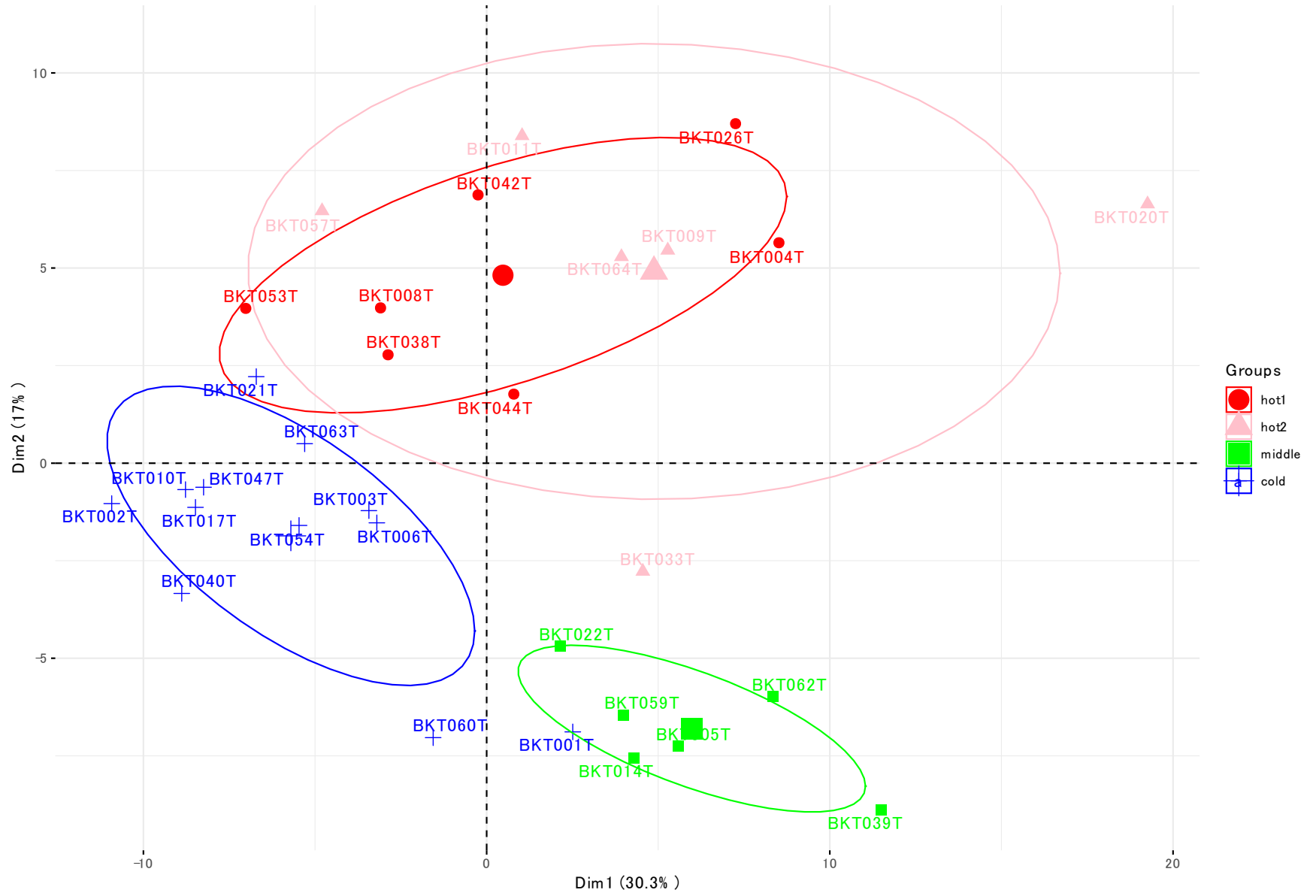
免疫関連遺伝子のパネルによるバリデーション

IGSによる階層的クラスター解析の結果（IGS cluster）の妥当性を検証するため、患者31症例のRNAシーケンス結果を、免疫グラム作成に用いた遺伝子セットとは異なる免疫関連遺伝子のパネルを用いて解析することで、バリデーションを行った。RNAシーケンス結果を、免疫グラム作成に用いた遺伝子群とは異なる免疫関連遺伝子のパネル Immunoduct [<https://github.com/msfuji/immunoduct>] を用いて解析した。Immunoductのパネルを用いて主成分分析（principal component analysis; PCA）による次元圧縮を行なったところ、“hot1”と“hot2”、“middle”、“cold”の各症例が、それぞれが別のグループに分散していた（図7A）。また、各遺伝子の発現量をヒートマップで表すと、“hot1”、“hot2”、“middle”、“cold”では発現の高い遺伝子群と低い遺伝子群に特徴を認めた（図7B）。これらの結果から、IGSによる腫瘍内免疫応答の階層的クラスター解析の結果は妥当性が高いと考えられた。

図7 免疫関連遺伝子のパネルによるバリデーション

患者31症例のRNAシーケンス結果を、免疫関連遺伝子のパネル Immunoduct [<https://github.com/msfuji/immunoduct>] を用いて解析した。(A)主成分分析（principal component analysis; PCA）により次元圧縮を行い、31症例のばらつきを、IGSによるクラスター（IGS cluster）毎に色付けして示した。(B)各遺伝子の発現量をヒートマップで表し、IGS cluster 毎に示した。

图 7A



IGSによるクラスター (IGS cluster) と臨床的特徴との関係

IGS cluster と臨床的特徴との関係を検討し、図 8 に示した。“hot1”, “hot2”, “middle”, “cold” の各 IGS cluster と、組織型 (Lauren 分類) や肉眼分類 (Borrmann 分類)、原発巣の局在 (Locus)、臨床病期 (Stage) といった従来の臨床分類における相関は認めなかった。また、IGS cluster と、ヒト上皮成長因子受容体 2 (HER2, human epidermal growth factor receptor 2) の過剰発現の有無 (病理組織標本の免疫組織化学染色が 3+, または 2+かつ蛍光 in situ ハイブリダイゼーション[FISH, Fluorescence in situ hybridization] 法陽性の場合を過剰発現ありとする) やヘリコバクターピロリ菌感染の有無 (血清中の抗ヘリコバクターピロリ IgG 抗体により評価) の相関も認めなかった。これまでの臨床分類だけでは、腫瘍内の免疫応答の状態を予測することは困難であった。

TCGA Project による胃癌の分子生物学的分類では、胃癌が EB ウイルス陽性 (EBV) (9%)、マイクロサテライト不安定性 (MSI) (22%)、ゲノム安定性 (GS) (20%)、染色体不安定性 (CIN) (50%) の 4 種に分類された[36]。本研究における 31 症例の内訳は、EBV 型 3 例 (9.7%)、MSI 型 7 例 (22.6%)、GS 型 4 例 (12.9%)、CIN 型 17 例 (54.8%) であり、TCGA project の先行研究と比べて GS 型が少ない傾向にあったが、Fisher の正確検定で有意差は認めなかった ($p=0.863$)。このうち EBV 型 3 例は全て “hot2” に集まり、MSI 型は 7 例中 5 例が “hot1” に集まっており、EBV やネオアンチゲンが胃癌におけるがん抗原として腫瘍内免疫応答の誘導に関与している可能性が示唆された。

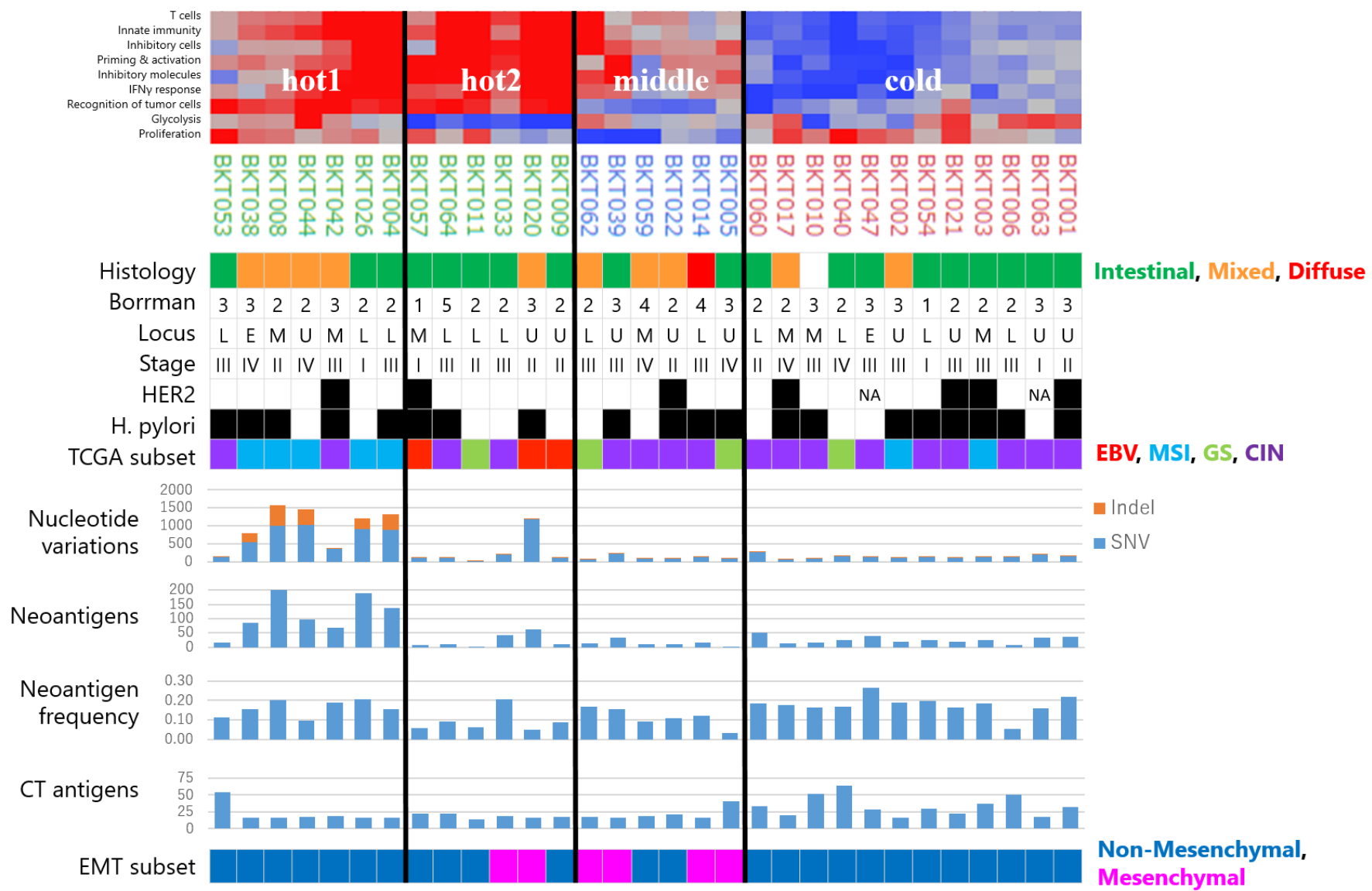


図8 IGSによるクラスター解析結果と臨床的特徴の関係

図 8 IGS によるクラスター解析結果と臨床的特徴の関係

IGS によるクラスター (IGS cluster) と臨床的特徴との関係を示す。Histology, Lauren 分類による組織型 (緑, Intestinal; 橙, Mixed; 赤, Diffuse) ; Borrmann, 肉眼分類 (Borrmann 分類, 1, 腫瘍型; 2, 潰瘍限局型; 3, 潰瘍浸潤型; 4, びまん浸潤型; 5, いずれにも分類し難いもの) ; Locus, 原発巣の局在 (E, 食道胃接合部; U, 上部; M, 中部; L, 下部) ; Stage, 臨床病期 (I~IV 期) ; HER2, 病理組織標本の HER2 タンパクの過剰発現の有無 (黒, 過剰発現あり, 免疫組織化学染色が 3+または 2+かつ蛍光 in situ ハイブリダイゼーション[FISH, Fluorescence in situ hybridization] 法陽性; 白, 過剰発現なし) ; H.pylori, ヘリコバクターピロリ菌感染の有無 (黒, 感染あり, 血清中の抗ヘリコバクターピロリ IgG 抗体陽性; 白, 感染なし) ; TCGA subset, the Cancer Genome Atlas (TCGA) Project による分子生物学的分類[27] (赤, EBV[EB ウイルス陽性]型; 青, MSI[マイクロサテライト不安定性]型; 緑, GS[ゲノム安定性]型; 紫, CIN[染色体不安定性]型) ; Nucleotide variations, ヌクレオチド変異数; Neoantigens, ネオアンチゲン数; CT antigens, CT 抗原数; ENT subset, Asian Cancer Research Group (ACRG)による胃癌の分子生物学的分類[30][31] (桃, Mesenchymal 型; 青, Non-Mesenchymal)

そこで、遺伝子変異に由来するネオアンチゲン、CT 抗原など、腫瘍特異的 T 細胞が認識するがん抗原について解析した。腫瘍組織と正常組織の全エクソームシーケンセスにより算出した、31 症例の腫瘍組織中のヌクレオチド変異 (Nucleotide variations) 数とネオアンチゲン (Neoantigens) 数は、図 9 に示すように、Kruskal-Wallis 検定の結果、いずれも“hot1”で有意に多かった ($P=0.0056$ 、 $P=0.0034$)。事後検定 (post hoc test) として Steel-Dwass 多重比較検定により各 cluster 間を比較すると、両者は“hot1”で“middle”あるいは“cold”と比較して有意に多く ($P=0.027$ 、 $P=0.021$)、 “hot2”と比較して多い傾向にあった ($P=0.10$)。

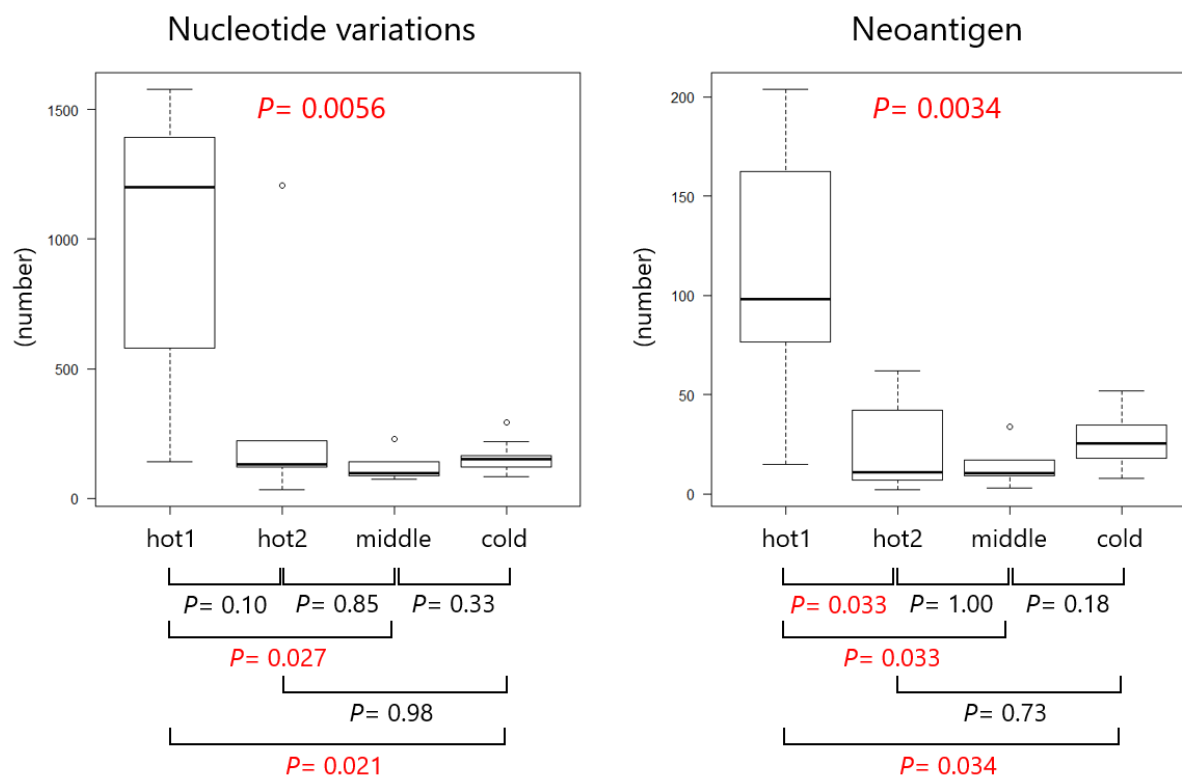


図9 IGS cluster 毎のヌクレオチド変異数とネオアンチゲン数

IGS cluster 毎のヌクレオチド変異数とネオアンチゲン数を Kruskal-Wallis 検定により比較した。また、事後検定 (post hoc test) として Steel-Dwass 多重比較検定を用いて各 cluster 間を比較した。

各 IGS cluster 間で遺伝子変異の出現頻度が高い遺伝子 (フィッシャーの正確確率検定で有意差がある遺伝子) 抽出した (図 10)。抽出された変異遺伝子の機能から、各クラスターの特徴は説明できなかったが、遺伝子変異数は MSI 群を含む“hot1”で多く、“hot2”, “middle”, “cold”の順に少なくなっていた。

ヌクレオチド変異とネオアンチゲンが多い症例では、図 8 の priming & activation, T-cell の軸が高値を示し、腫瘍内免疫応答の誘導と腫瘍への T 細胞浸潤が活性化していた。ヌクレオチド変異とそれに伴うネオアンチゲンの存在は、免疫応答の標的となり、がん抗原として抗腫瘍免疫の誘導に重要であることが示唆された。

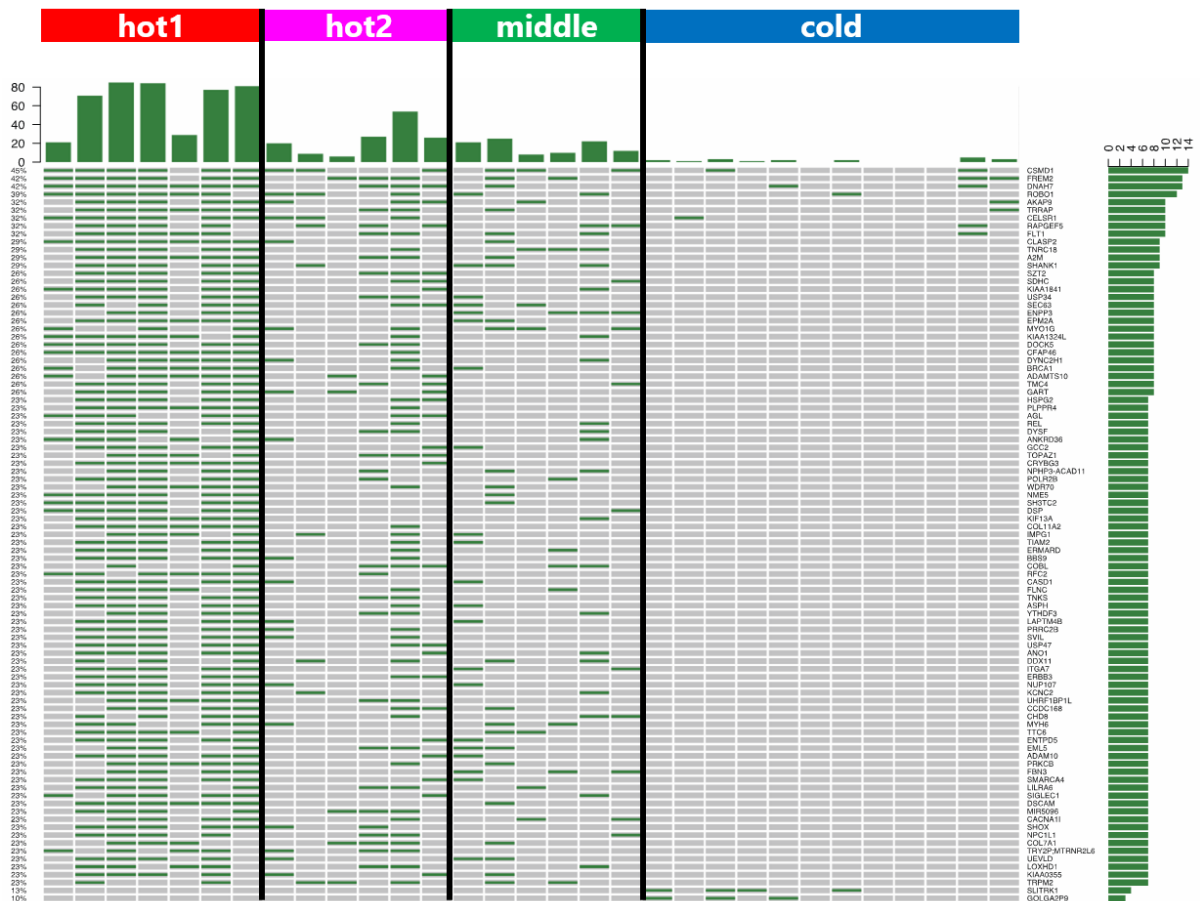


図 10 各 IGS cluster 間で変異数に有意差がある遺伝子

各 IGS cluster 間でフィッシャーの正確確率検定で遺伝子変異数に有意差がある遺伝子を集めて図示した。上段の棒グラフは症例毎の遺伝子変異数の合計を、右列の棒グラフは遺伝子毎の変異数の合計を示した。

強力な抗腫瘍免疫応答の存在下では、ネオアンチゲンを発現するがん細胞が排除され、ネオアンチゲンを発現したがん細胞クローンが選択的に排除される免疫編集 (Immunoediting) が起こり、腫瘍組織におけるミスセンス変異数に占めるネオアンチゲン数の割合であるネオアンチゲン頻度 (neoantigen frequency) が低下する。図 11 に示すように、ネオアンチゲン頻度は、“Immune hot” 群で “Immune cold” 群より低下していた。胃癌においても抗腫瘍免疫応答の存在下では、免疫編集により、ネオアンチゲンを発現したがん細胞が消失し、ネオアンチゲンを喪失したがん細胞クローンが選択されていることが示された。

Kruskal-Wallis 検定の結果、“cold”, “hot1”, “middle”, “hot2” の順に高かった ($P=0.018$)。post hoc test として Steel-Dwass 多重比較検定により各 cluster 間を比較すると、ネオアンチゲン頻度は、“cold”と比較して“middle”で有意に少なく ($P=0.048$)、“hot2”で少ない傾向にあった ($P=0.13$)。胃癌においても抗腫瘍免疫応答の存在下 (“middle”, “hot2”) では、免疫編集により、ネオアンチゲンを発現したがん細胞が消失し、ネオアンチゲンを喪失したがん細胞クローンが選択されていることが示された。免疫編集を受けた腫瘍では、遺伝子変異数から予測されるネオアンチゲンより、実際に発現を認めるネオアンチゲン数が減少することが報告されている[24]。

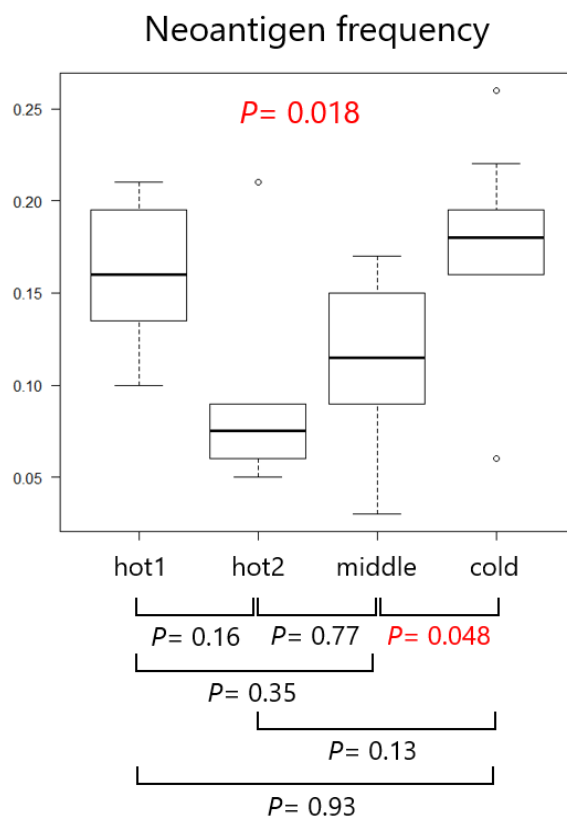


図 11 IGS cluster 毎のネオアンチゲン頻度

IGS cluster 毎のネオアンチゲン頻度を Kruskal-Wallis 検定により比較した。また、post hoc test として Steel-Dwass 多重比較検定を用いて各 cluster 間を比較した。

また、CT 抗原 (CT antigens) 数は、図 12 に示すように、Kruskal-Wallis 検定の結果、“cold”で有意に多かった ($P=0.043$)。post hoc test として Steel-Dwass 多重比較検定により各 cluster 間を比較すると、ネオアンチゲン頻度は、統計学的有意差は認めなかったが、“cold”で“hot1”、“hot2”、“middle”と比較して多い傾向にあった ($P=0.17$ 、 $P=0.070$ 、 $P=0.30$)。CT 抗原の機能は未だ不明なものが多いが、がん抗原として抗腫瘍免疫の標的となるよりも、むしろその機能には、免疫抑制性の作用が存在する可能性も否定できない[37]。

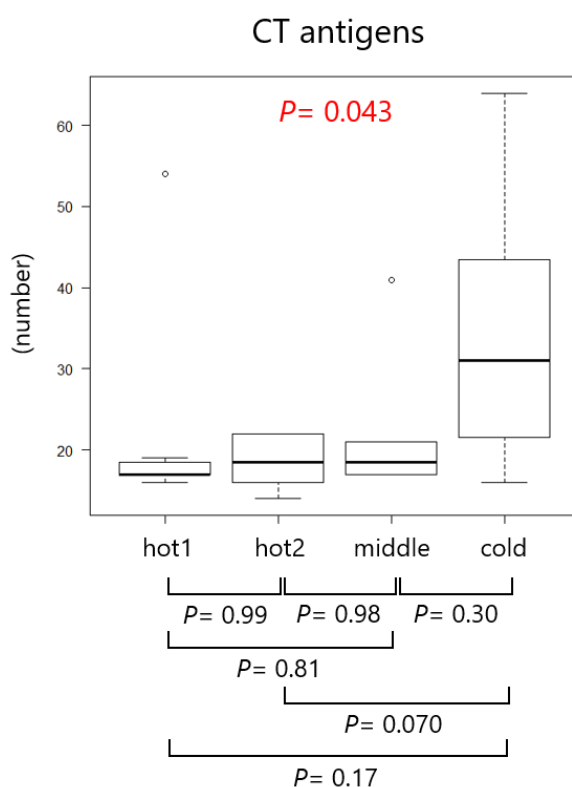


図 12 IGS cluster 毎の CT 抗原数

IGS cluster 毎の CT 抗原数を Kruskal-Wallis 検定により比較した。また、post hoc test として Steel-Dwass 多重比較検定を用いて各 cluster 間を比較した。

ACRGによる胃癌の分子生物学的分類[30]に基づいて、71遺伝子[31]の発現解析により、31症例を間葉系（Mesenchymal, 上皮から間葉系への遷移を伴うマイクロサテライト安定; MSS/EMT）型と非間葉系（Non-Mesenchymal）型に分類（EMTサブセット）したところ、Mesenchymal型6例（19%）、Non-Mesenchymal型25例（81%）であった（図13）。Mesenchymal型6例のうち4例は“middle”に集まっていた（図8）。

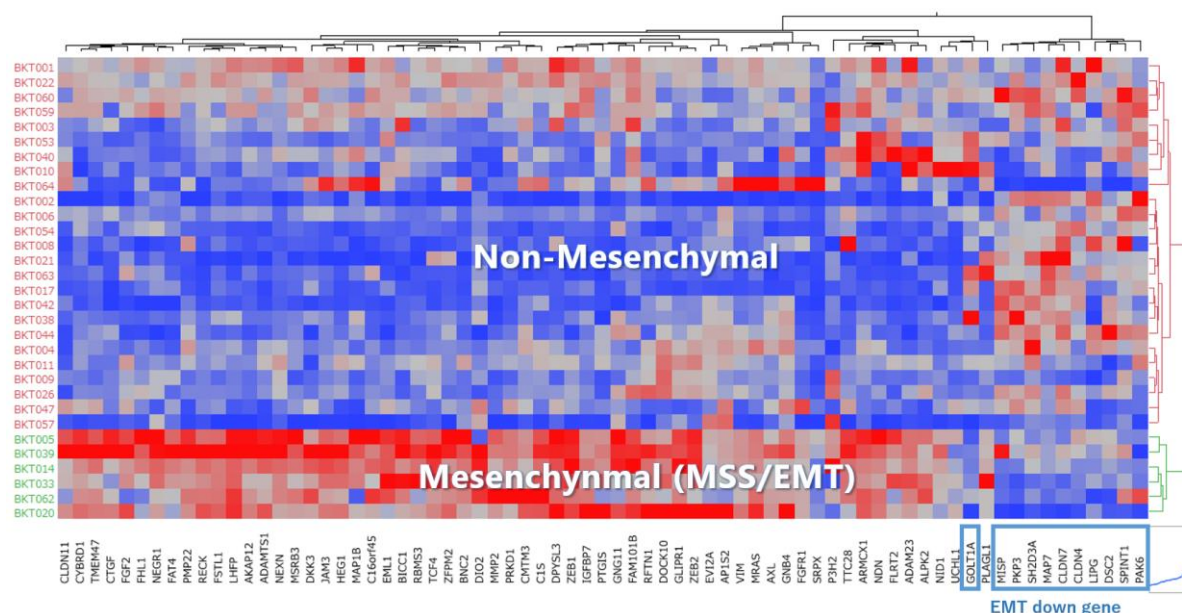


図13 31症例の EMT サブセット分類

ACRGによる胃癌の分子生物学的分類[30]に基づいて、71遺伝子[31]の発現解析により、31症例を Mesenchymal, MSS/EMT（間葉系）型と Non-Mesenchymal（非間葉系）型に分類した。71遺伝子のうち青枠で囲った11遺伝子（EMT down gene）は Mesenchymal型で発現が低下する遺伝子群で、残りの60遺伝子（EMT up gene）は Mesenchymal型で発現が上昇する遺伝子群である。

これらの結果から、腫瘍内免疫応答は従来の臨床分類だけでは予測が困難であるが、腫瘍のヌクレオチド変異数・ネオアンチゲン数、ウイルス抗原などのがん抗原数や、上皮間葉転換（EMT, epithelial-mesenchymal transition）など、腫瘍側の因子が密接に関与していることが示唆された。

腫瘍の遺伝子異常の解析

腫瘍内免疫応答に関する内因性因子として、腫瘍組織と正常組織の全エクソームシーケンス結果から、腫瘍の遺伝子異常と腫瘍内免疫応答の関係を検討した。

最初に、代表的ながん遺伝子・がん抑制遺伝子の変異を解析した。がん遺伝子・がん抑制遺伝子のリストとしては、遺伝子パネル検査である **Todai OncoPanel** で対象とする DNA 465 遺伝子を用いた。図 14 に示したように、“hot1”でミスセンス変異 (mutation) が多く、“cold”で増幅 (amplification) が多かった。各 IGS cluster を特徴づけるドライバーオンコジーン (driver oncogene) などの遺伝子変異は認められなかった。

次に、遺伝子変異のうち、抗原ペプチドの産生に関わるプロテアソームやトランスポーター遺伝子群や、抗原提示に関する HLA 遺伝子や $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子について解析した。図 15 に示したように、抗原提示経路にかかわる遺伝子に絞っても、“hot1”でミスセンス変異 (mutation) が多く、“cold”で増幅 (amplification) が多かった。特に“cold”では全ての症例で抗原提示に関わるいずれかの遺伝子に変異や欠失を認めた。さらにヘテロ接合性消失 (LOH) が加わる機能欠失変異 (LOF, loss of function) に陥っており、腫瘍免疫における抗原提示経路の重要性が示された。

つづいて、インターフェロン γ 経路に関わる遺伝子群について解析した。図 16 に示したように、“hot1”でミスセンス変異 (mutation) が多く、“cold”で増幅 (amplification) が多かった。特に“cold”では全ての症例でいずれかの遺伝子に LOF が認められ、腫瘍免疫におけるインターフェロン γ シグナルの重要性が示唆された。

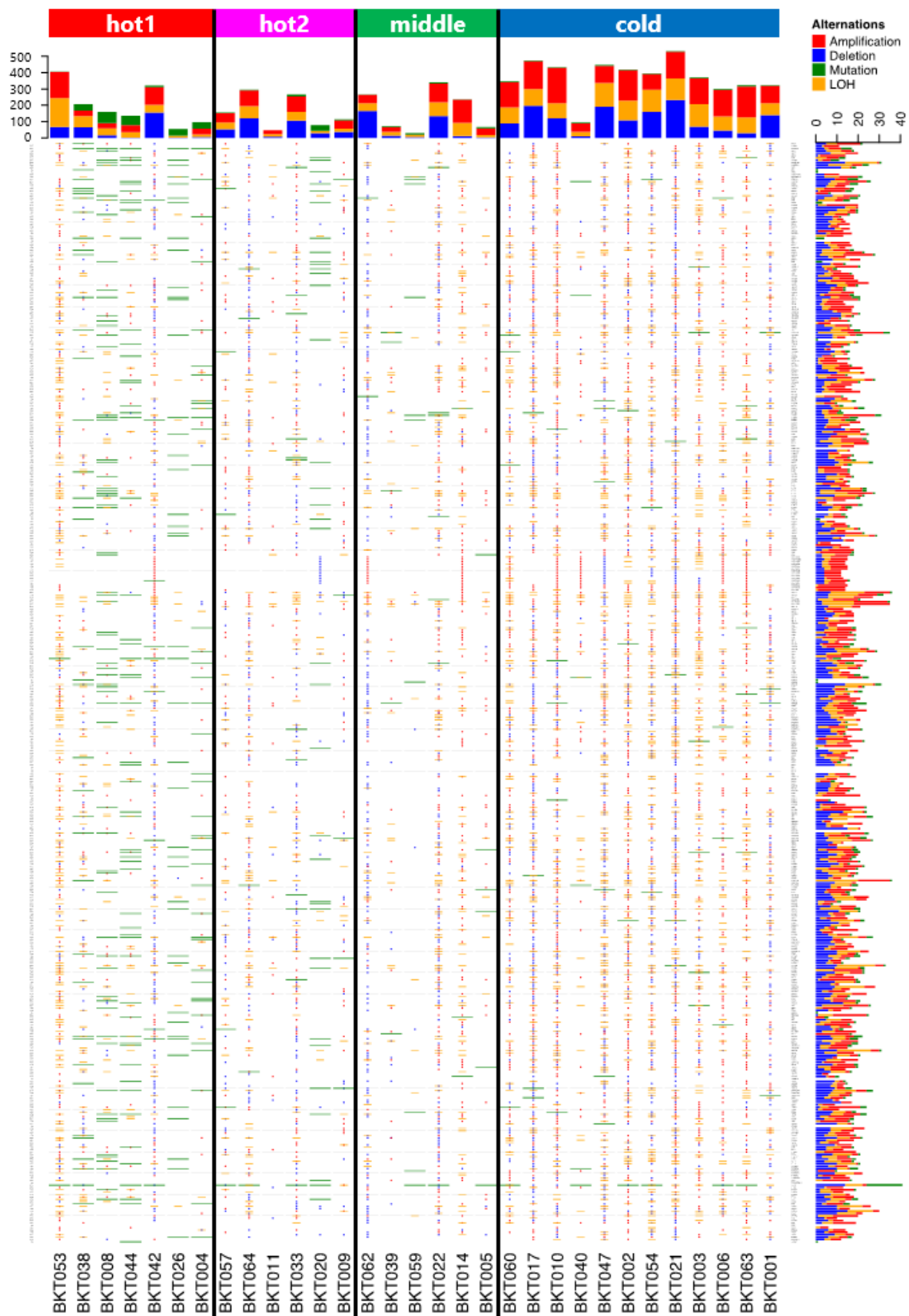


図14 Todai OncoPanelで対象とするDNA 465遺伝子の異常

遺伝子パネル検査 Todai OncoPanelで対象とするDNA 465遺伝子の遺伝子異常を症例毎に図示した。上段の棒グラフは症例毎の遺伝子異常の総数を、右列の棒グラフは遺伝子毎の変異数の合計を示した。

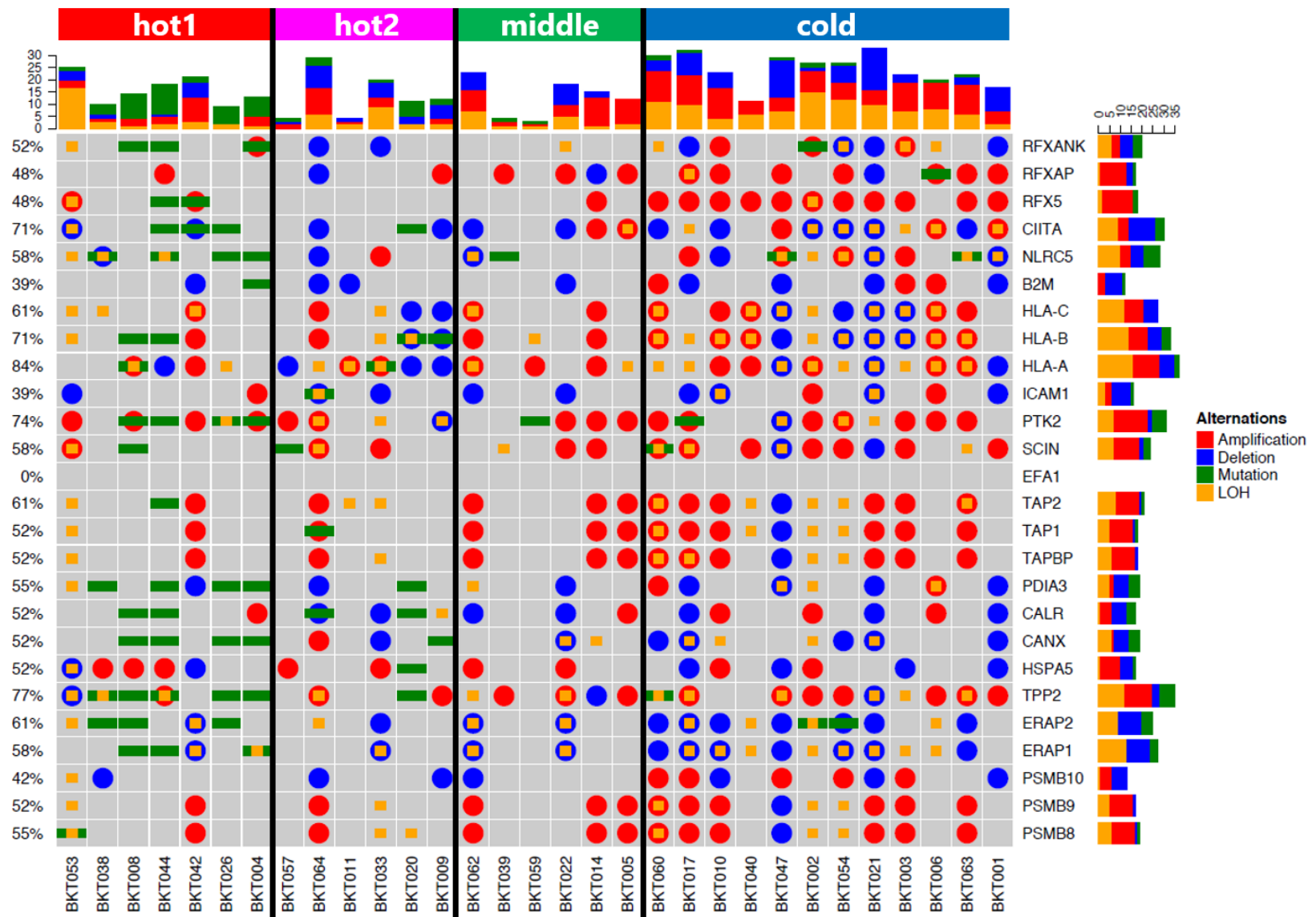


図 15 HLA プレゼンテーション経路の遺伝子異常

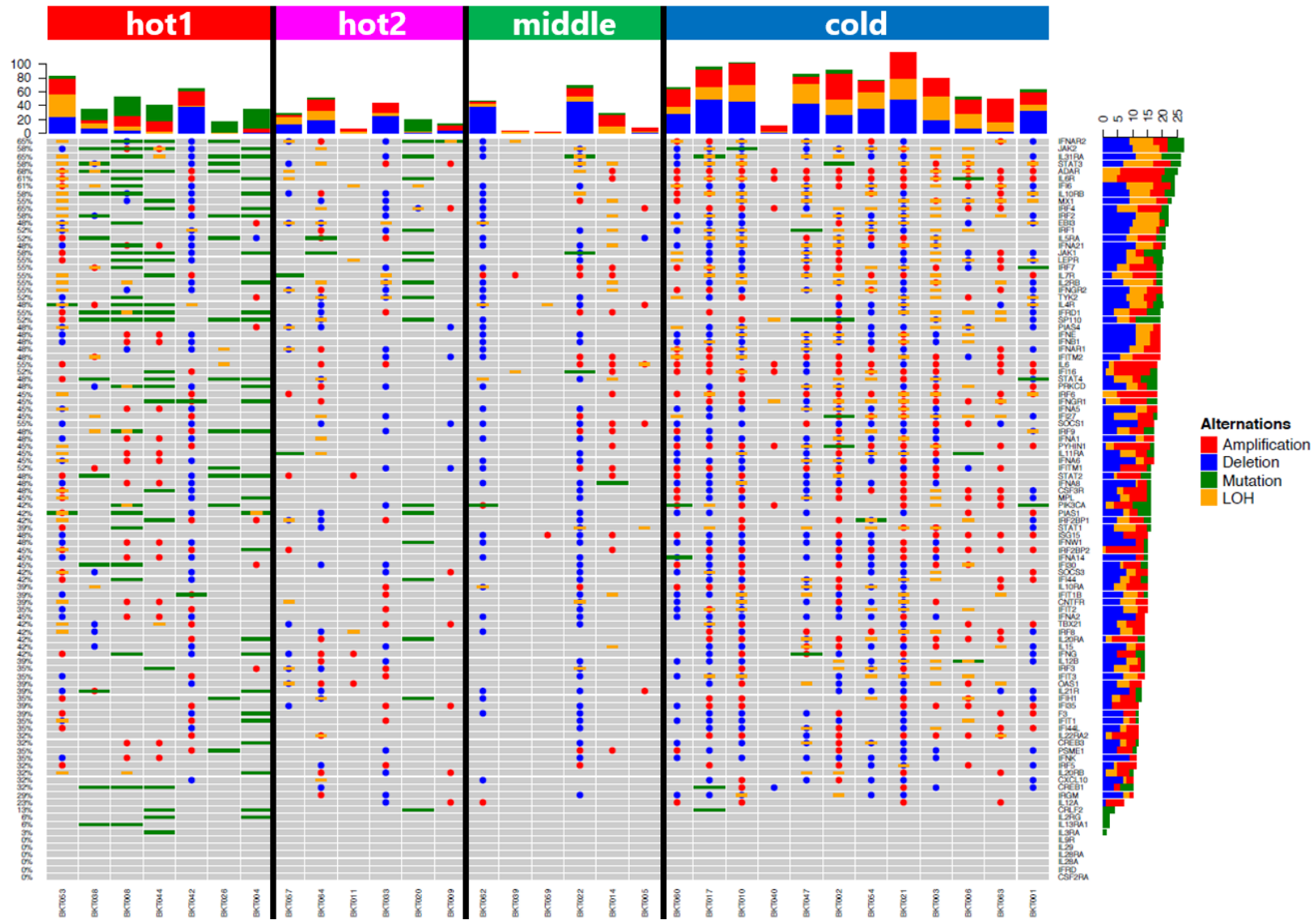


図 16 インターフェロン γ 経路の遺伝子異常

図 15 HLA プレゼンテーション経路の遺伝子異常

抗原提示に関する HLA 遺伝子や $\beta 2$ ミクログロブリン遺伝子の異常について解析した。上段の棒グラフは症例毎の遺伝子異常の総数を示す。右の棒グラフは全症例での遺伝子毎の遺伝子異常の総数を示す。

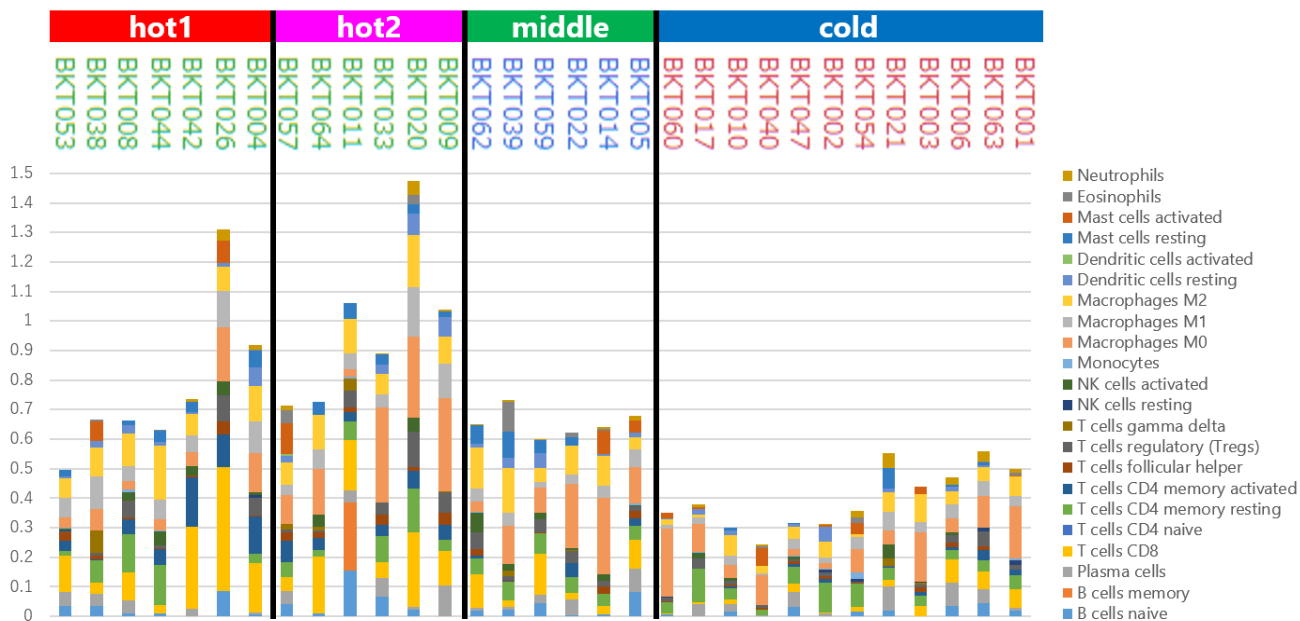
図 16 インターフェロン γ 経路の遺伝子異常

インターフェロン γ 経路に関わる遺伝子群の遺伝子異常について解析した。上段の棒グラフは症例毎の遺伝子異常の総数を示す。右の棒グラフは全症例での遺伝子毎の遺伝子異常の総数を示す。

トランスクリプトームによる腫瘍浸潤細胞 (TIC) の解析

31 症例の腫瘍浸潤細胞 (TIC, Tumor Infiltrating Cell) のプロファイルを明らかにするために、腫瘍組織の RNA シークエンス結果から、CIBERSORT 法[38]を用いて、31 症例の TIC の絶対数と種類を解析した。図 17 に示すように、CIBERSORT 法による TIC の絶対数は、“hot2”で多く、“hot1”, “middle”で中程度、“cold”で少なくなっており、Kruskal-Wallis 検定の結果、統計学的に有意であった ($P < 0.001$)。post hoc test としての Steel-Dwass 多重比較検定による各 cluster 間の比較では、“cold”で TIC の絶対数は、“middle”, “hot1”, “hot2”と比較して有意に低かった ($P = 0.0042$, $P = 0.0042$, $P = 0.0054$)。

A



B

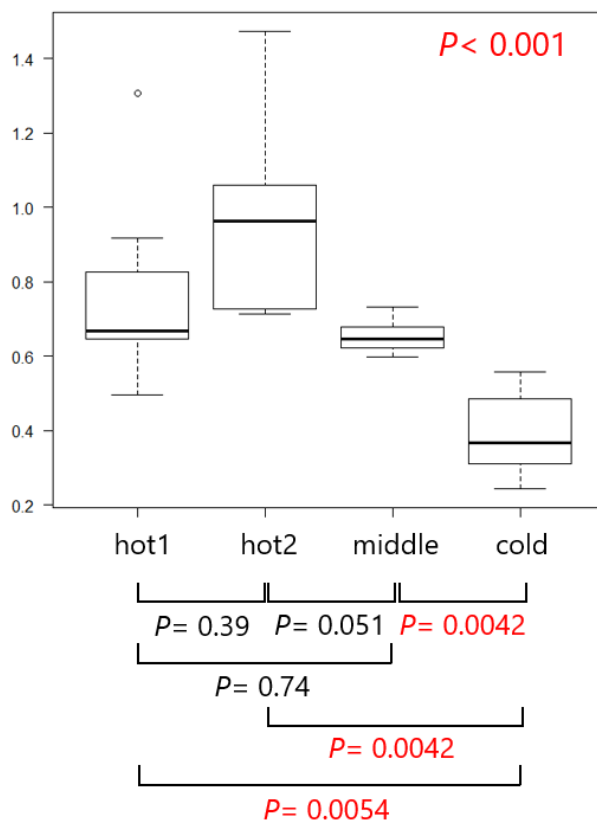


図 17 腫瘍浸潤細胞 (TIC, tumor infiltrating cell) の絶対数と種類

(A) 腫瘍組織の RNA シークエンス結果から、CIBERSORT 法[38]を用いて、31 症例の TIC の絶対数と種類を解析した。(B) cluster 毎の TIC の絶対数を、Kruskal-Wallis 検定により比較した。また、post hoc test として Steel-Dwass 多重比較検定を用いて各 cluster 間を比較した。

腫瘍微小環境 (TME) の解析

腫瘍内免疫応答に関する外因性因子として、腫瘍微小環境 (TME, tumor microenvironment) [39]を解析した。

図 17 に示した CIBERSORT 法[38]による TIC のサブセット解析結果から、代表的な TME の抑制性因子である Treg について、TIC 中の CD8 陽性 T 細胞と Treg の絶対数を抜き出して散布図として図 18 に示す。IGScluster に関わらず、CD8 陽性 T 細胞と Treg には正の相関があった (相関係数: 全体 0.58, hot1 0.54, hot2 0.57, middle 0.50, cold 0.43)。

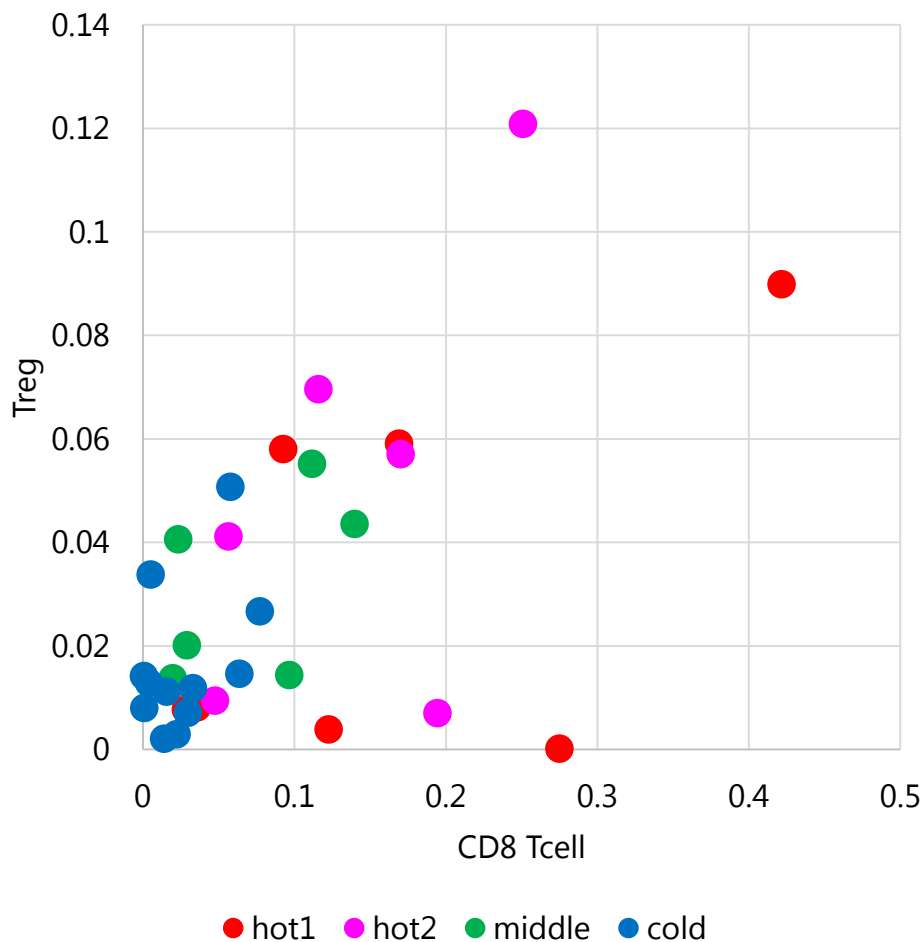
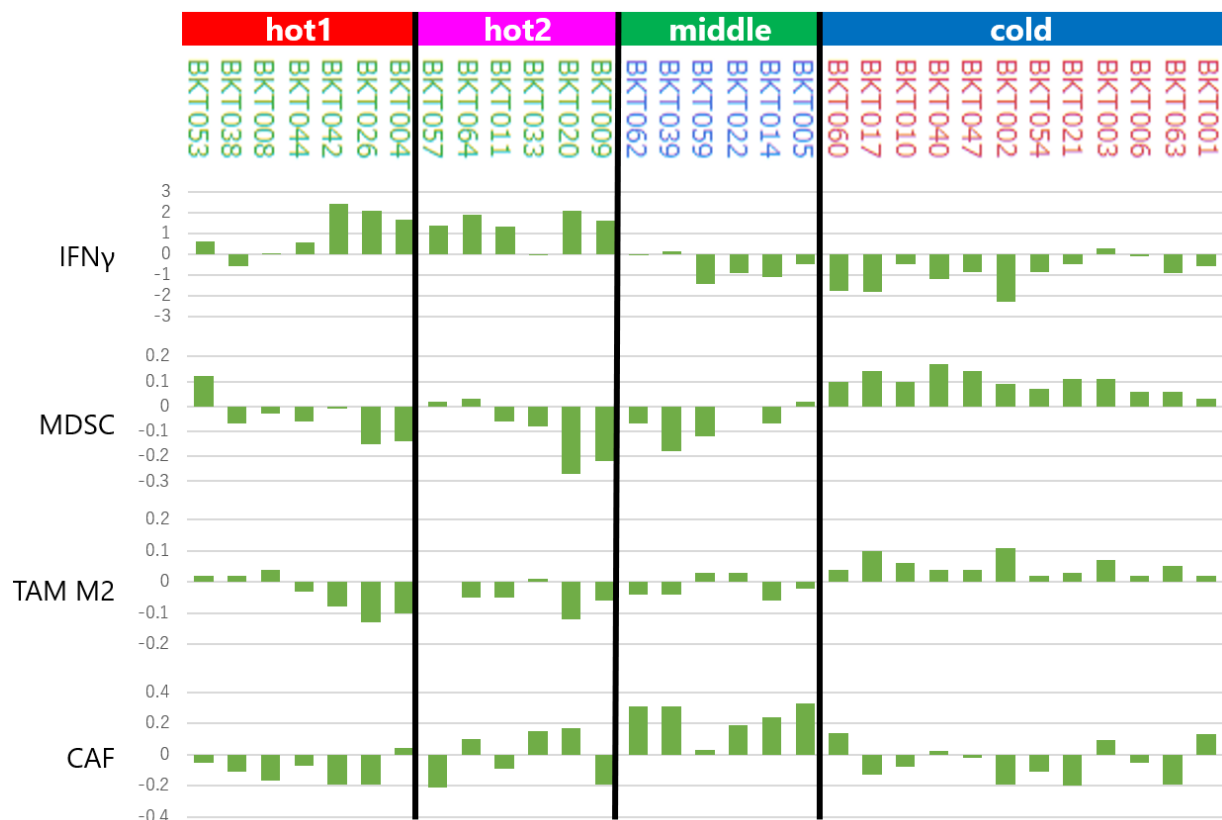


図 18 TIC 中の制御性 T 細胞 (Treg)

CIBERSORT 法[38]による TIC のサブセット解析結果から、TIC 中の CD8 陽性 T 細胞と Treg の absolute score を抜き出して散布図として示す。

次に、腫瘍組織の RNA シーケンス結果から、TIDE [40] を用いて、代表的な TME の抑制性因子として、MDSC、TAM M2、CAF の発現を IFN γ の発現とともに解析した。図 19 に示したように、腫瘍内に T 細胞が浸潤している “hot1” と “hot2” では IFN γ の発現が高く、腫瘍内 T 細胞が乏しい “middle” や “cold” で低かった。一方で、“cold” では、MDSC と TAM M2 の発現が、Kruskal-Wallis 検定で有意に高く ($P < 0.001$, $P < 0.001$)、post hoc test としての Steel-Dwass 多重比較検定による各 cluster 間の比較でも “hot1”, “hot2”, “middle” と比較して有意に高かった。“cold” の症例では腫瘍免疫抑制的な環境となっていることが示唆された。また、“middle” では CAF の発現が、Kruskal-Wallis 検定で有意に高く ($P = 0.0065$)、post hoc test としての Steel-Dwass 多重比較検定による各 cluster 間の比較でも “middle” と比較して有意に高く、“hot1”, “hot2” と比較して高い傾向にあった。

A



B

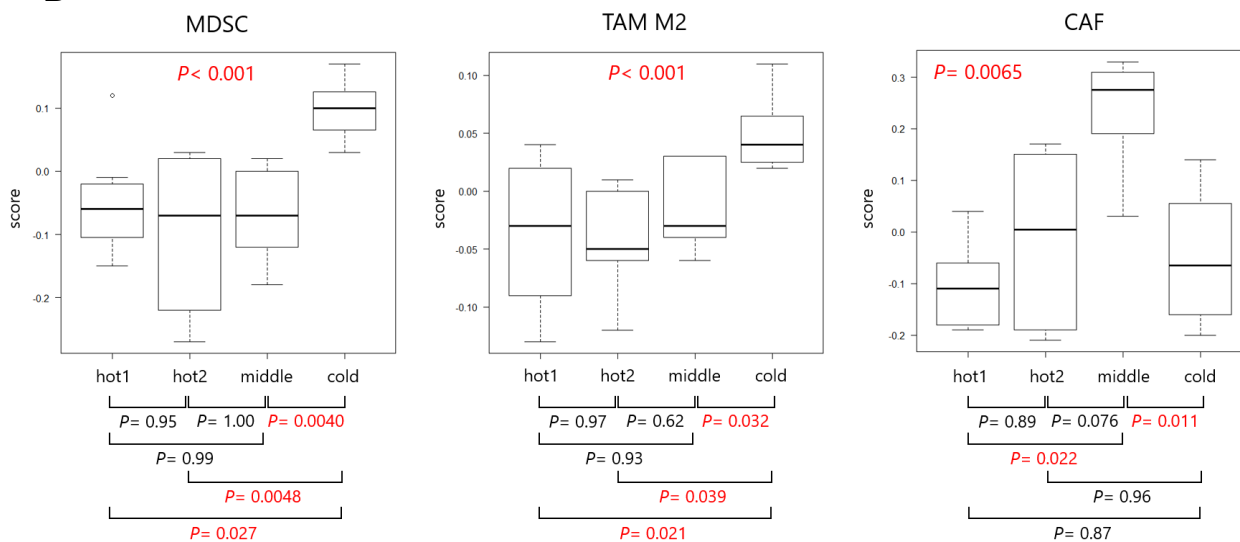


図 19 腫瘍微小環境 (TME) における抑制性因子の解析

腫瘍組織の RNA シークエンス結果から、TIDE (Tumor Immune Dysfunction and Exclusion) [40] を用いて、MDSC (myeloid-derived suppressor cell)、TAM (tumor-associated macrophage) M2、CAF (cancer associated fibroblast) の発現を $\text{IFN}\gamma$ の発現とともに解析した。

(A)発現の程度をスコア化して症例毎に図示した。(B)各 cluster 毎に発現スコアを、Kruskal-Wallis 検定により比較した。また、事後検定 (post hoc test) として Steel-Dwass 多重比較検定を用いて各 cluster 間を比較した。

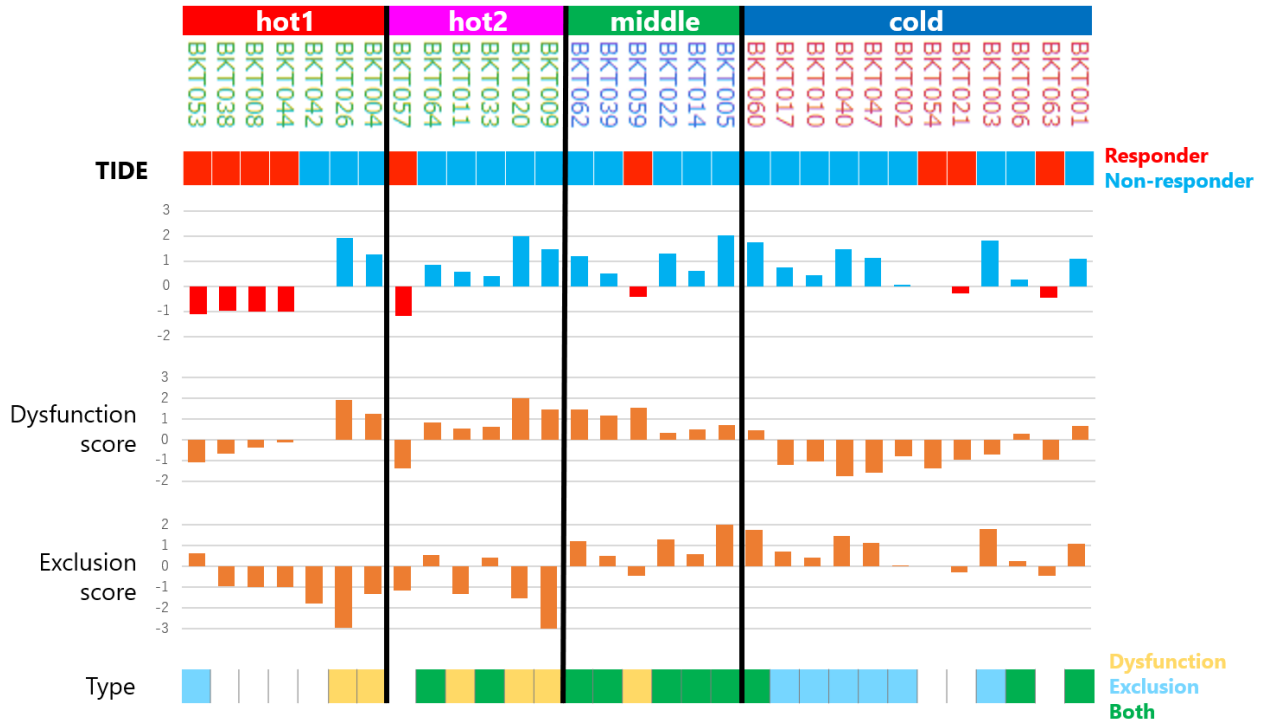
つづいて、TMEの影響を受けた結果として、腫瘍内にT細胞浸潤が認められるにもかかわらず機能不全に陥る状態を反映する遺伝子群（T細胞機能不全シグネチャー）と、T細胞浸潤を伴わない遺伝子群（T細胞排除シグネチャー）の発現から、TIDE [40] を用いて、「腫瘍内に浸潤したT細胞の機能不全（Dysfunction score）」と「腫瘍内T細胞浸潤の排除（Exclusion score）」の程度をそれぞれスコア化した。さらにDysfunction scoreとExclusion scoreから、免疫チェックポイント阻害薬への反応をスコア化して予測した（図20A）。

さらにDysfunction scoreとExclusion scoreをそれぞれX軸とY軸にとって散布図に示したところ（図20B）、腫瘍内に機能を保ったT細胞が浸潤している“hot1”（図20B左下）、腫瘍内に浸潤したT細胞の機能が損なわれた“hot2”（図20B右下）、腫瘍内T細胞浸潤及び機能ともに低下傾向にある“middle”（図20B右上）、の症例では腫瘍内T細胞浸潤が低下しているが、その機能は保たれている“cold”（図20B左上）の傾向が認められた。

図20 腫瘍内に浸潤したT細胞の機能不全と腫瘍内T細胞浸潤の排除

(A) 腫瘍内にT細胞浸潤が認められるにもかかわらず機能不全に陥る状態を反映する遺伝子群（T細胞機能不全シグネチャー）と、T細胞浸潤を伴わない遺伝子群（T細胞排除シグネチャー）の発現から、TIDE [40] を用いて、腫瘍内に浸潤したT細胞の機能不全（Dysfunction score）と腫瘍内T細胞浸潤の排除（Exclusion score）の程度をそれぞれスコア化した。さらにDysfunction scoreとExclusion scoreから、免疫チェックポイント阻害薬への反応をスコア化して予測した。(B) Dysfunction scoreとExclusion scoreをそれぞれX軸とY軸にとって散布図に示した。

A



B

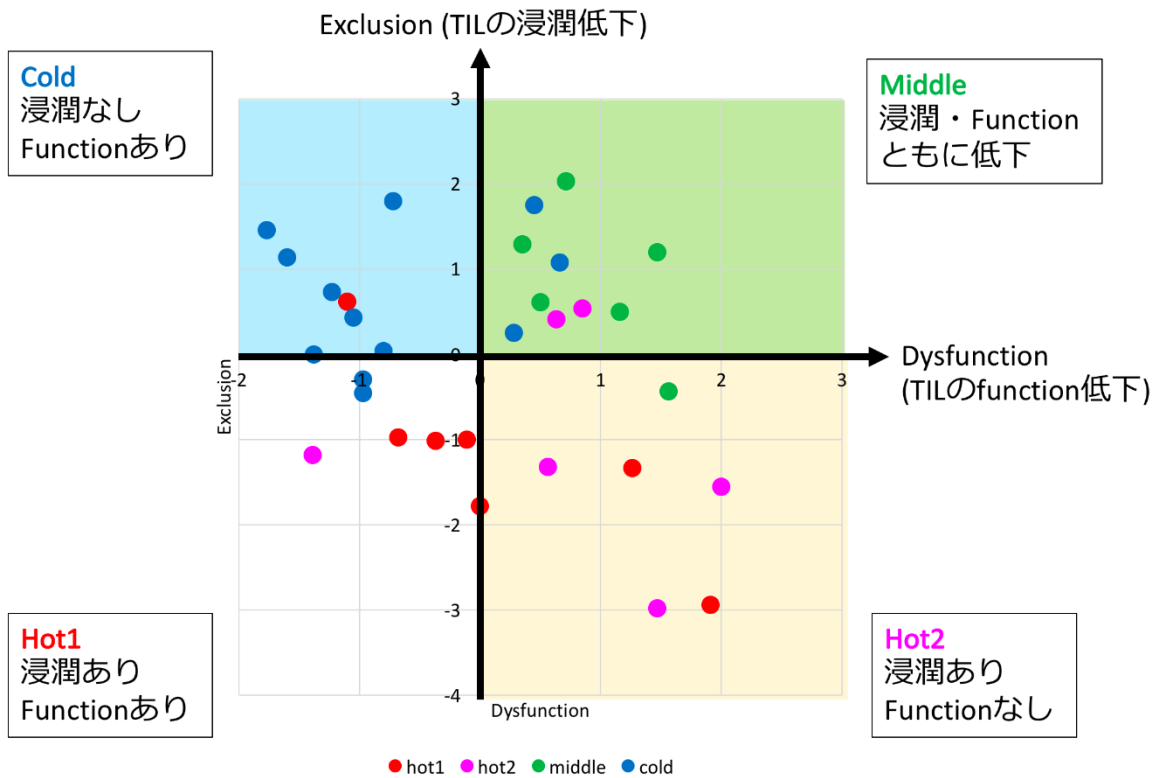


図 20 腫瘍内に浸潤した T 細胞の機能不全と腫瘍内 T 細胞浸潤の排除

フローサイトメトリーによる TIL と PBMC の比較

つづいて、31 症例の TIL の表現系 (phenotype) と機能 (function) を明らかにするために、腫瘍組織から酵素処理と機械的分解によって分離し、培養した TIL を、フローサイトメトリーを用いて解析した。

まず、同一患者の TIL と PBMC で、免疫の活性化マーカー (OX40, 4-1BB, CD69) および抑制性分子 (PD-1, Tim-3) の発現を比較した。Wilcoxon 符号付順位和検定の結果、図 21 に示すように、TIL は PBMC と比較すると、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞のいずれにおいても、抑制性分子だけでなく、活性化マーカーの発現も高かった。

次に、同一の患者の TIL と PBMC のサイトカイン産生能を比較した。T 細胞受容体 (TCR, T cell receptor) を介さずに直接細胞内 Ca^{++} 濃度を上昇させる PMA/イオノマイシンによるマイトジェン刺激を用いてリンパ球を刺激し、 $IFN\gamma$ 、IL-2、 $TNF\alpha$ の産生を比較した。図 22 に示すように、PBMC と比較して TIL では、CD8 陽性 T 細胞で $IFN\gamma$ と IL-2、CD3 陽性 CD8 陰性 T 細胞 (CD4 陽性 T 細胞) で $IFN\gamma$ と $TNF\alpha$ の陽性細胞の割合が有意に高値であり、PBMC と比較して TIL の方が細胞傷害性サイトカインの産生能が高いことが示された。

これは、図 21 の結果と矛盾せず、末梢血中のリンパ球には、抗原刺激の経験を受けたことがないナイーブ T 細胞が多いこと、一方、腫瘍内の T 細胞は既に腫瘍などの抗原刺激を受けたエフェクター細胞やメモリー T 細胞が多いことを反映している。

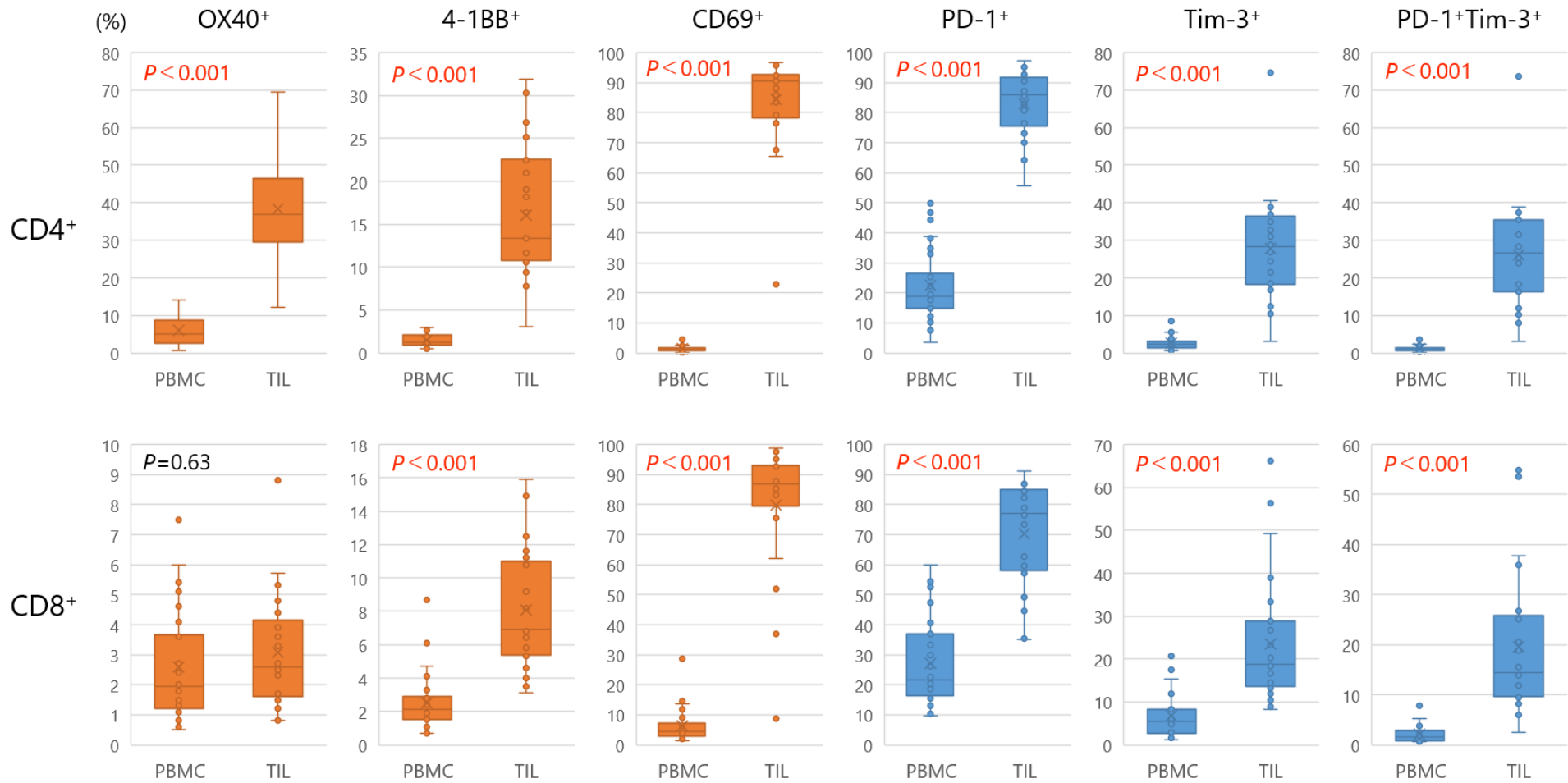
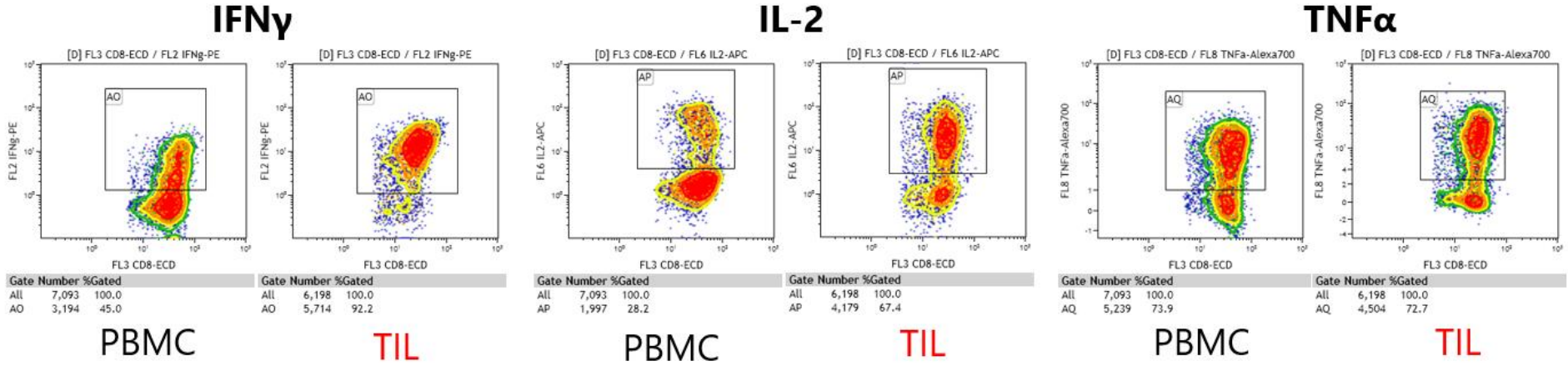


図 21 TIL と PBMC の免疫チェックポイント分子の発現の比較

TIL と PBMC で、免疫の活性化マーカー (OX40, 4-1BB, CD69) および抑制性分子 (PD-1, Tim-3) の発現割合を、Wilcoxon 符号付順位和検定を用いて比較した。

CD8⁺ T cell



CD8⁻ T cell

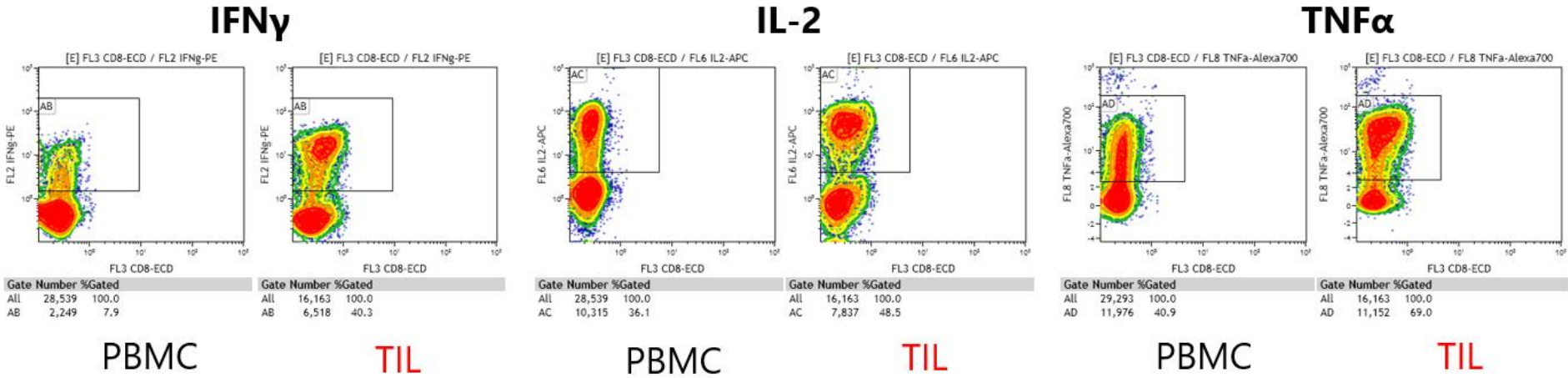


図 22B

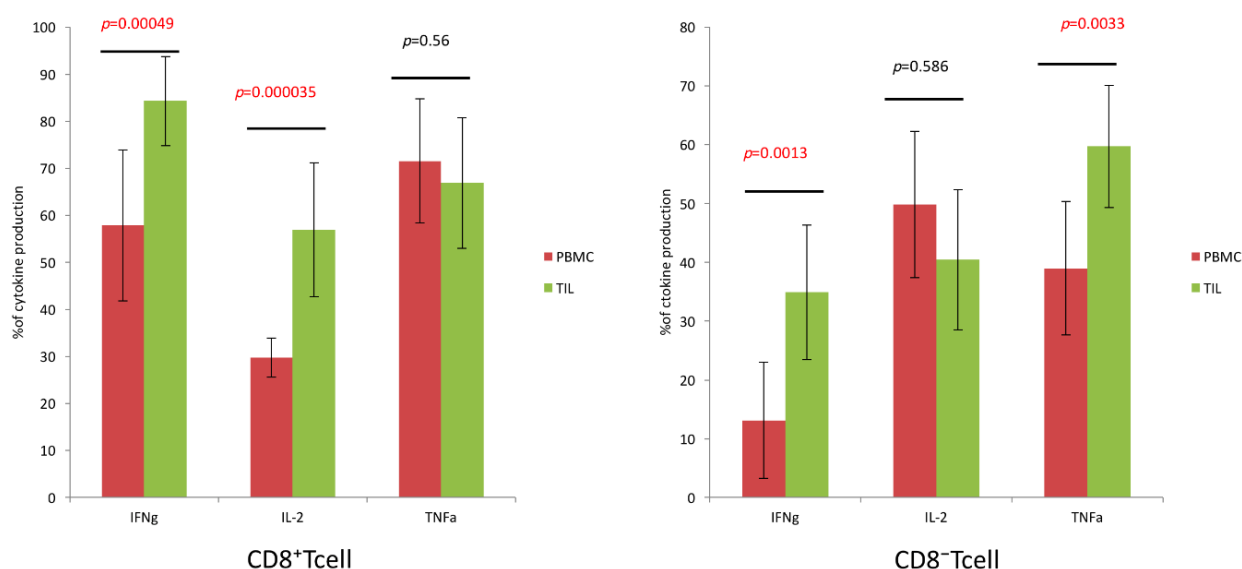


図 22 TIL と PBMC のサイトカイン産生能の比較

(A) T 細胞受容体 (TCR, T cell receptor) を介さずに直接細胞内 Ca^{++} 濃度を上昇させる PMA/イオノマイシンによるマイトジェン刺激を用いてリンパ球を刺激し、 $\text{IFN}\gamma$ 、IL-2、TNF α の産生をフローサイトメトリーにより比較した。
 (B) $\text{IFN}\gamma$ 、IL-2、TNF α を、Wilcoxon 符号付順位和検定を用いて比較した。

フローサイトメトリーによる患者個々の TIL の比較

31 症例の TIL における、CD8 陽性細胞中の、Tim-3、PD-1 など、免疫抑制性分子の発現を比較した (図 23)。抑制性の免疫チェックポイント分子である Tim-3、PD-1 の陽性細胞の発現割合について、Kruskal-Wallis 検定の結果、図 24 に示すように、Tim-3 陽性、PD-1 陽性、Tim-3 陽性かつ PD-1 陽性のいずれの発現割合も TIL 内の各 IGS cluster 間で統計学的有意差を認めず ($P=0.146$ 、 $P=0.996$ 、 $P=0.435$)。post hoc test としての Steel-Dwass 多重比較検定による各 cluster 間の比較でも、有意差を認めなかった。

次に、TIL のサイトカイン産生能を解析するため、TCR を介して刺激する試薬 Cytostim と、TCR を介さずに直接細胞内 Ca^{++} 濃度を上昇させる PMA/イオノマイシン

ンによるマイトジェン刺激を用いて TIL を刺激し、IFN γ 、TNF α 、IL-2 の産生についてフローサイトメトリーを用いて評価した。Cytostim による刺激では IFN γ 、TNF α 、IL-2 の陽性細胞の発現割合は、図 25 に示すように、Kruskal-Wallis 検定の結果、各 IGS cluster 間で統計学的有意差を認めず ($P=0.535$ 、 $P=0.509$ 、 $P=0.435$)、post hoc test としての Steel-Dwass 多重比較検定による各 cluster 間の比較でも、有意差を認めなかった。図 23 (最下段) に示すように、31 症例中 28 症例では、TCR 刺激を介さない PMA/イオノマイシンによるマイトジェン刺激によって、Cytostim 刺激時と比較して IFN γ 陽性細胞の発現割合が上昇した (図 26A に代表的な症例を示す)。腫瘍内では PD-1 や Tim-3 の発現により TCR シグナルが抑制されており、サイトカイン産生が低下しているが TCR 非依存的なシグナルに対してはサイトカイン産生能が保たれていることから、これらの細胞に適切な免疫治療を施すことにより、その機能を回復することが可能であると期待できる。

“cold” のうち、BKT006, BKT010, BKT040 の 3 症例では、Cytostim 刺激時の IFN γ 、TNF α 、IL-2 の陽性細胞の発現がとりわけ低下していた。この 3 例では PMA/イオノマイシン刺激でも IFN γ 陽性細胞の発現割合の上昇を認めなかった (図 26B に示す)。腫瘍内に存在する T 細胞が完全にサイトカイン産生能を喪失している患者が存在し、このような患者に対しては、おそらく免疫チェックポイント阻害剤などの免疫療法を実施しても、その機能を回復することが不可能であると予想された。

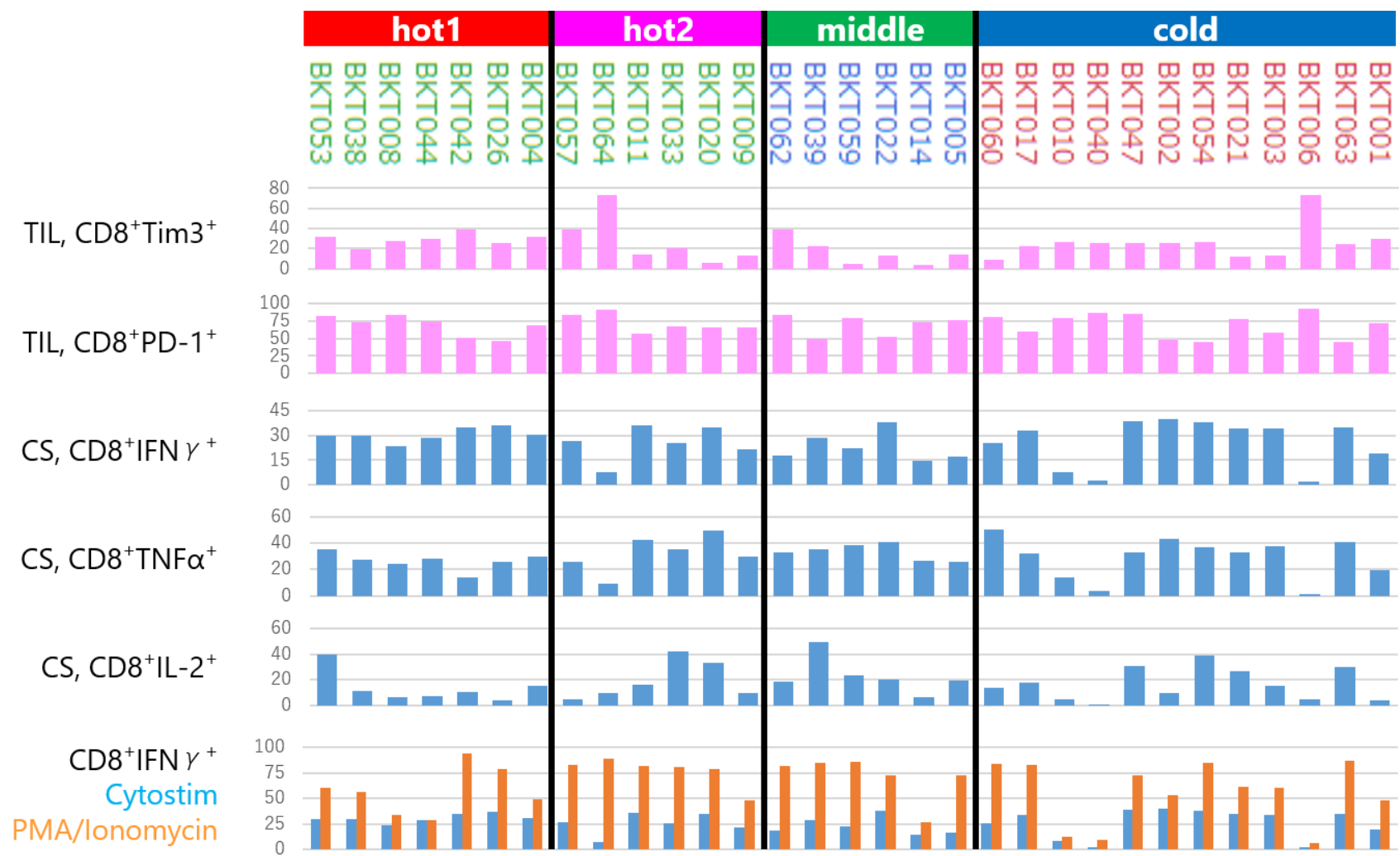


図 23 TIL の表現型 (phenotype) と機能 (function)

31 症例の TIL における、CD8 陽性細胞中の、Tim-3、PD-1 など、免疫抑制性分子の発現とサイトカイン産生割合を図示した。
TIL, 刺激なし; CS, Cytostim 刺激; PMA/Ionomycin, PMA/Ionomycin 刺激

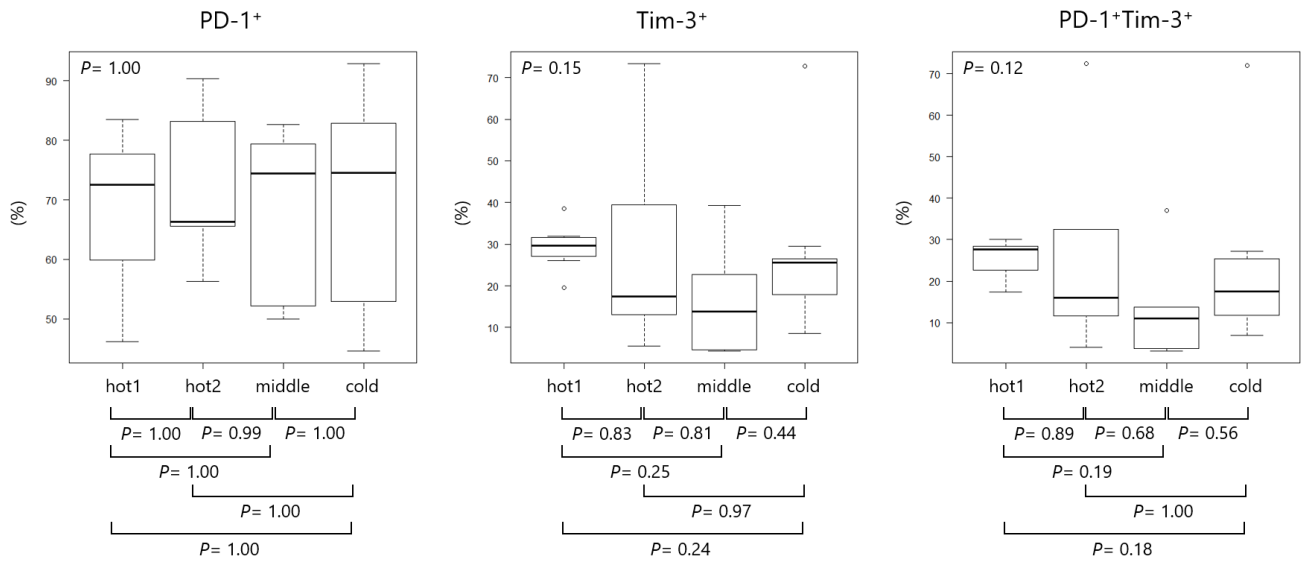


図 24 各 IGS cluster での TIL における CD8 陽性細胞中の免疫抑制性分子の発現
 各 IGS cluster での TIL における CD8 陽性細胞中の免疫抑制性分子の発現割合を、Kruskal-Wallis 検定により比較した。また、post hoc test として Steel-Dwass 多重比較検定を用いて各 cluster 間を比較した。

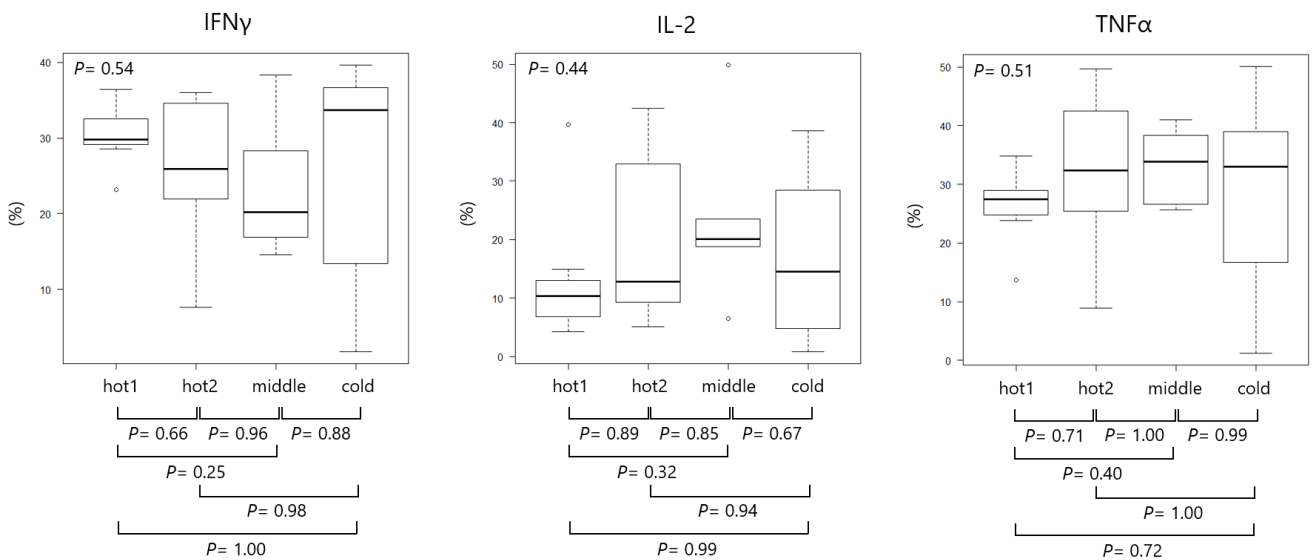


図 25 各 IGS cluster での TIL のサイトカイン産生能
 各 IGS cluster での TIL における Cytostim 刺激時のサイトカインの産生割合を、Kruskal-Wallis 検定により比較した。また、post hoc test として Steel-Dwass 多重比較検定を用いて各 cluster 間を比較した。

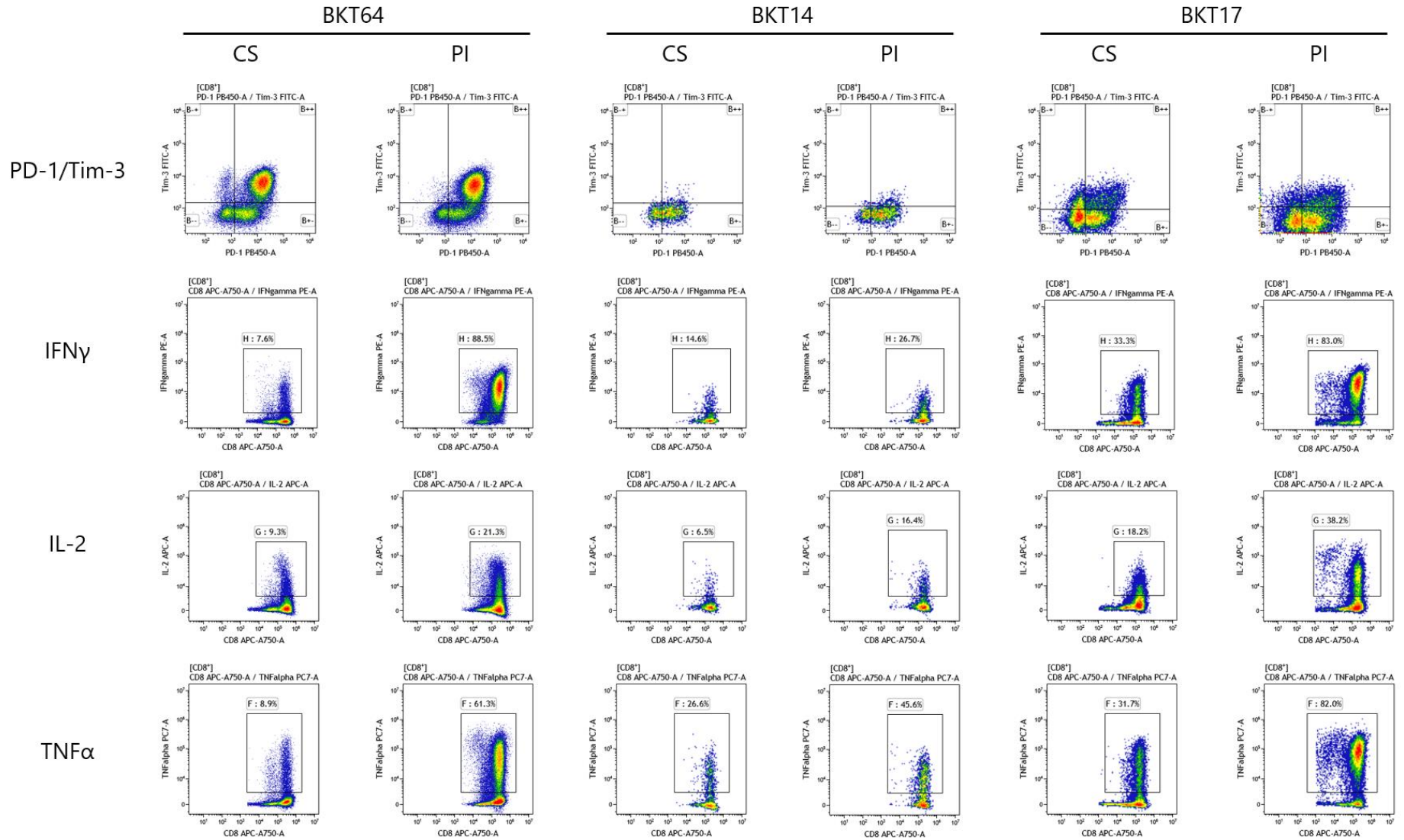


図 26A PMA/イオノマイシン刺激による IFN γ 陽性細胞の発現 (IFN γ 陽性細胞の発現が上昇した症例)

PMA/イオノマイシンによるマイトジェン刺激によって、Cytostim 刺激時と比較して IFN γ 陽性細胞の発現割合が上昇した症例 (代表的な 3 例) の CD8 陽性細胞のフローサイトメトリー結果を示す。

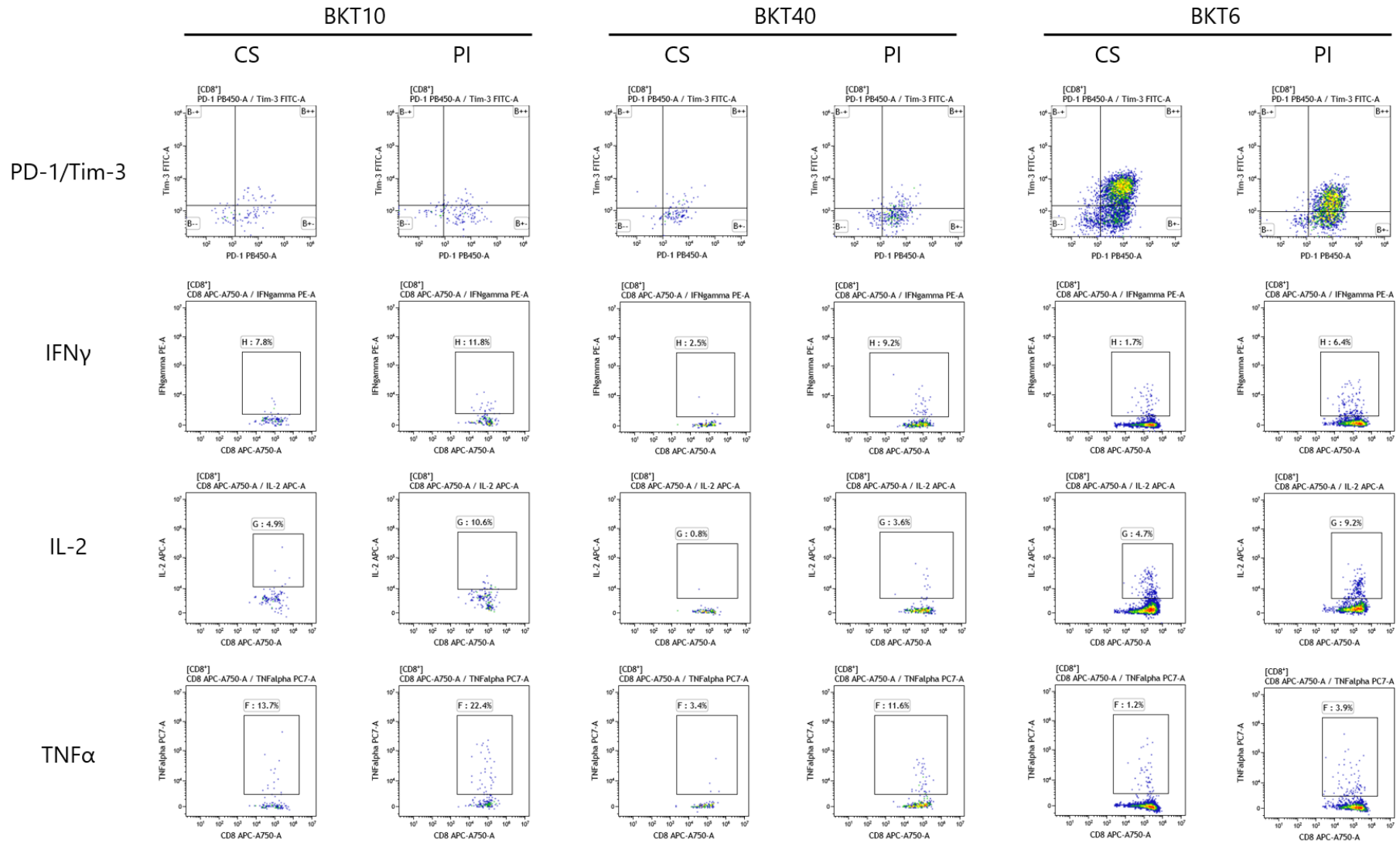


図 26B PMA/イオノマイシン刺激による IFN γ 陽性細胞の発現 (IFN γ 陽性細胞の発現が上昇しなかった症例)

PMA/イオノマイシンによるマイトジェン刺激によって、Cytostim 刺激時と比較して IFN γ 陽性細胞の発現割合が IFN γ 陽性細胞の発現割合が上昇しなかった 3 症例の CD8 陽性細胞のフローサイトメトリー結果を示す。

T細胞の機能不全を認めた3症例の検討

“cold”の中で、TCRを介さずに直接細胞内Ca⁺⁺濃度を上昇させる刺激を加えてもサイトカインを産生できない、T細胞が機能不全に陥ったBKT006、BKT010、BKT040の3症例について検討を行った。

“cold”の12症例を、T細胞がサイトカイン産生能を完全に喪失していた3症例（機能不全群）と、それ以外の9症例の2群に分けて、比較トランスクリプトーム解析を行った。“cold”の12症例のカウントデータを、G1群（T細胞が機能を完全に喪失していない9症例）とG2群（T細胞機能不全3症例）に分けて、TCC-GUI (Graphical User Interface for TCC package)を用いて、DESeqによる正規化、DESeq2による発現変動解析を行い[34]、FDRのカットオフ値はq値0.05として、発現変動遺伝子（DEG）405種を同定した（表8）。405種をq値の低い順に並べて示す。

さらに、M-Aプロット（Y軸, M: 発現変動の大きさの差、X軸, A: 発現変動の大きさの平均値：図27A）、Volcanoプロット（X軸, Fold change: 2群間における遺伝子発現の比、Y軸, p-value: 統計学的有意差：図27B）を描図して遺伝子の発現変動を可視化した。

DEG 405種のうち、q値の低い上位15位までの遺伝子には、GAGE1, MAGEA8, MAGEC1, GAGE2A, XAGE2, GAGE12JといったCT抗原が含まれていた。

表 8-1 T細胞の機能不全に陥った3症例とそれ以外の9症例の間の発現変動遺伝子

1-25 番目	26-50 番目	51-75 番目	76-100 番目	101-125 番目	126-150 番目	151-175 番目	176-200 番目	201-225 番目
<i>GAGE1</i>	<i>RAB11FIP1</i>	<i>ZAN</i>	<i>LTK</i>	<i>CHRD</i>	<i>C2orf70</i>	<i>PABPC1L</i>	<i>TEX14</i>	<i>ARHGAP40</i>
<i>MAGEA8</i>	<i>ZFP57</i>	<i>CA13</i>	<i>RBPJL</i>	<i>PEX5L</i>	<i>GOLGA8B</i>	<i>FFAR4</i>	<i>RAPSN</i>	<i>PANK1</i>
<i>PLG</i>	<i>THPO</i>	<i>PADI3</i>	<i>MICAL2</i>	<i>CREB3L1</i>	<i>TP53TG3D</i>	<i>EN2</i>	<i>PCDHA1</i>	<i>SAMD5</i>
<i>MAGEC1</i>	<i>PIWIL3</i>	<i>PLA2G2A</i>	<i>SLC39A3</i>	<i>SPATA31C2</i>	<i>LAT</i>	<i>KNG1</i>	<i>SQLE</i>	<i>HOXA10</i>
<i>NLRP4</i>	<i>IGFBP1</i>	<i>SCN11A</i>	<i>CLDN4</i>	<i>ARL17A</i>	<i>SSC4D</i>	<i>PTPRR</i>	<i>MFSD4B</i>	<i>OR13A1</i>
<i>GAGE2A</i>	<i>SMLR1</i>	<i>RFPL4B</i>	<i>EBLN2</i>	<i>CEP95</i>	<i>SPERT</i>	<i>FST</i>	<i>MBOAT4</i>	<i>ONECUT3</i>
<i>CRP</i>	<i>HRC</i>	<i>FOXD1</i>	<i>GOLGA8A</i>	<i>RAMP1</i>	<i>APCS</i>	<i>PYCR1</i>	<i>CRIPAK</i>	<i>PNISR</i>
<i>XAGE2</i>	<i>APOM</i>	<i>TRO</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>ZNF660</i>	<i>C6orf163</i>	<i>PRR3</i>	<i>SLC6A1</i>	<i>ATP6V1H</i>
<i>TTYH1</i>	<i>PANX2</i>	<i>ADAL</i>	<i>C1orf186</i>	<i>TFR2</i>	<i>FER1L5</i>	<i>ZP3</i>	<i>NPIP4</i>	<i>IL17RB</i>
<i>WDR87</i>	<i>PCDHB3</i>	<i>MYDGF</i>	<i>TNS4</i>	<i>C1orf168</i>	<i>HNRNPCL2</i>	<i>ZNF587</i>	<i>DDX39B</i>	<i>NR1I3</i>
<i>SLC25A18</i>	<i>MRPL54</i>	<i>NCLN</i>	<i>NOX1</i>	<i>ZNF548</i>	<i>ZNF638</i>	<i>NFATC2IP</i>	<i>NRDE2</i>	<i>KIN</i>
<i>PRORY</i>	<i>APOH</i>	<i>CLDN7</i>	<i>CCDC150</i>	<i>TRIM50</i>	<i>THEM6</i>	<i>TBL2</i>	<i>TXLNB</i>	<i>MYEOV</i>
<i>IRX5</i>	<i>ZSCAN23</i>	<i>C1QTNF1</i>	<i>CRTAP</i>	<i>DLGAP1</i>	<i>RHOXF2</i>	<i>CLPP</i>	<i>HELZ</i>	<i>COG1</i>
<i>GATA2</i>	<i>PROC</i>	<i>GPT2</i>	<i>TAT</i>	<i>ZNF44</i>	<i>ATAT1</i>	<i>NKTR</i>	<i>LFNG</i>	<i>MYH3</i>
<i>GAGE12J</i>	<i>UBL4A</i>	<i>PLGLB2</i>	<i>SAP30</i>	<i>AES</i>	<i>FAM105A</i>	<i>FAM218A</i>	<i>LRR37A2</i>	<i>DOHH</i>
<i>ZSCAN5B</i>	<i>CRNDE</i>	<i>ATP6V0C</i>	<i>PLEKHJ1</i>	<i>KANSL1</i>	<i>C8orf46</i>	<i>RPLP2</i>	<i>TRPM2</i>	<i>TRAF7</i>
<i>GSPT2</i>	<i>OAZ1</i>	<i>RYR3</i>	<i>TNRC6A</i>	<i>HOXA11</i>	<i>POLG2</i>	<i>SEPT14</i>	<i>OSR2</i>	<i>EGFL8</i>
<i>APOC2</i>	<i>CCDC39</i>	<i>SERPINA11</i>	<i>ALKBH7</i>	<i>RECQL5</i>	<i>CADM1</i>	<i>CCDC73</i>	<i>LMNTD1</i>	<i>GOLGA6L4</i>
<i>ATP2B2</i>	<i>EEF2</i>	<i>FAM186B</i>	<i>STAT4</i>	<i>ZNF154</i>	<i>FXVD5</i>	<i>GOLGA8M</i>	<i>LMNB2</i>	<i>FOXF2</i>
<i>SVOP</i>	<i>BPTF</i>	<i>ARFGEF3</i>	<i>TBX19</i>	<i>SLCO4A1</i>	<i>PRRT2</i>	<i>MYCBPAP</i>	<i>ATP6AP1</i>	<i>TRIM52</i>
<i>MPZ</i>	<i>HFE2</i>	<i>LCTL</i>	<i>MRPL17</i>	<i>MSH5</i>	<i>FRMPD1</i>	<i>PITX2</i>	<i>CCNB3</i>	<i>ARTN</i>
<i>DGKK</i>	<i>CCL16</i>	<i>SGTA</i>	<i>ZNF793</i>	<i>CXCL16</i>	<i>LIN28A</i>	<i>EML6</i>	<i>CD81</i>	<i>STK36</i>
<i>SLC6A13</i>	<i>PRSS33</i>	<i>HPX</i>	<i>CTCFL</i>	<i>YJEFN3</i>	<i>PRR5-ARHGAP8</i>	<i>CYP24A1</i>	<i>CCDC85B</i>	<i>ARMC12</i>
<i>KIF25</i>	<i>COL11A2</i>	<i>HOXA13</i>	<i>SEC61A2</i>	<i>DUSP4</i>	<i>NR2C2</i>	<i>PLP2</i>	<i>RHBG</i>	<i>SOX2</i>
<i>EVX1</i>	<i>GPRC5D</i>	<i>FEZF1</i>	<i>USP6</i>	<i>VAMP1</i>	<i>UBE2V2</i>	<i>GRIN2D</i>	<i>ZMYND15</i>	<i>MYT1L</i>

表 8-2 T細胞の機能不全に陥った3症例とそれ以外の9症例の間の発現変動遺伝子

226-250 番目	251-275 番目	276-300 番目	301-325 番目	326-350 番目	351-375 番目	376-400 番目	401-405 番目
<i>FLG</i>	<i>MYL7</i>	<i>CABLES1</i>	<i>NPIP3</i>	<i>HPS6</i>	<i>IQCA1</i>	<i>S100A11</i>	<i>STK39</i>
<i>FOXG1</i>	<i>PSCA</i>	<i>CSAD</i>	<i>STK32A</i>	<i>ASB1</i>	<i>AHSA2</i>	<i>TPSD1</i>	<i>ZKSCAN7</i>
<i>BPIFA1</i>	<i>A2ML1</i>	<i>AQP5</i>	<i>RBM34</i>	<i>TPH1</i>	<i>KCNJ4</i>	<i>ACTN2</i>	<i>GULP1</i>
<i>LIPH</i>	<i>FTSJ3</i>	<i>TRPV1</i>	<i>TTL9</i>	<i>PDE6B</i>	<i>ARHGAP11B</i>	<i>ABHD11</i>	<i>C1GALT1C1L</i>
<i>CDK3</i>	<i>HPCAL4</i>	<i>LY6G5B</i>	<i>PIF1</i>	<i>RGS10</i>	<i>EMX1</i>	<i>SPATA25</i>	<i>ANKRD61</i>
<i>DCX</i>	<i>KLB</i>	<i>IFT81</i>	<i>HPR</i>	<i>SLC38A11</i>	<i>SPESP1</i>	<i>PCDHGA2</i>	
<i>TMEM144</i>	<i>AOC2</i>	<i>PPRC1</i>	<i>PHLDA2</i>	<i>DCAF4L1</i>	<i>BNIPL</i>	<i>TEKT2</i>	
<i>TPSB2</i>	<i>SSX2</i>	<i>SGK494</i>	<i>ARHGAP8</i>	<i>RTL1</i>	<i>BRSK2</i>	<i>TSPAN15</i>	
<i>ATXN2</i>	<i>PGM1</i>	<i>TRABD2A</i>	<i>PPARG</i>	<i>ZG16B</i>	<i>HCAR3</i>	<i>PAQR4</i>	
<i>CFAP61</i>	<i>CIT</i>	<i>GGTLC1</i>	<i>MROH2A</i>	<i>NPY1R</i>	<i>SLC9A2</i>	<i>LGALS9</i>	
<i>STAMBPL1</i>	<i>MIEN1</i>	<i>NDUFS7</i>	<i>PCDHA5</i>	<i>XKR9</i>	<i>RORA</i>	<i>SEC14L6</i>	
<i>SPAG17</i>	<i>LYZ</i>	<i>MFSD12</i>	<i>MYO16</i>	<i>CCL3L3</i>	<i>AP3B2</i>	<i>FOXI2</i>	
<i>TP53I13</i>	<i>LRRC37A</i>	<i>C16orf90</i>	<i>ZNF334</i>	<i>POR</i>	<i>TIGD7</i>	<i>GNPTG</i>	
<i>EEF1AKMT1</i>	<i>KCTD5</i>	<i>COX4I1</i>	<i>RAB2A</i>	<i>CLDN2</i>	<i>U2AF1</i>	<i>CEP152</i>	
<i>CYP51A1</i>	<i>ZNF594</i>	<i>MARVELD1</i>	<i>LSR</i>	<i>YPEL4</i>	<i>SERPINA12</i>	<i>SPDYE1</i>	
<i>RBM6</i>	<i>FAM118A</i>	<i>DUSP8</i>	<i>GOLGA6L9</i>	<i>SULT1C4</i>	<i>RAD54L2</i>	<i>IQCG</i>	
<i>FAHD2A</i>	<i>CRB3</i>	<i>RPL13</i>	<i>PIN1</i>	<i>STXBP2</i>	<i>SLC23A2</i>	<i>ITGAD</i>	
<i>VCX2</i>	<i>IRX3</i>	<i>TRIM45</i>	<i>C1orf147</i>	<i>AMDHD1</i>	<i>INTS2</i>	<i>RNH1</i>	
<i>SERPINA3</i>	<i>NAALAD2</i>	<i>CYB5B</i>	<i>COTL1</i>	<i>SLFN1</i>	<i>METRN</i>	<i>STX19</i>	
<i>KCNQ1</i>	<i>PNMT</i>	<i>ARHGEF18</i>	<i>NPIP5</i>	<i>TACSTD2</i>	<i>FZR1</i>	<i>FBP1</i>	
<i>TIMM13</i>	<i>FBXW12</i>	<i>TNFRSF11A</i>	<i>ZKSCAN8</i>	<i>TNF</i>	<i>ITLN1</i>	<i>EPN3</i>	
<i>TAF7L</i>	<i>PAX9</i>	<i>ALB</i>	<i>MRNIP</i>	<i>DNAJC12</i>	<i>ZNF160</i>	<i>KCNE3</i>	
<i>GJA10</i>	<i>NCOA3</i>	<i>KCNC3</i>	<i>ABCA13</i>	<i>MTRNR2L4</i>	<i>SCN5A</i>	<i>TMEM70</i>	
<i>CHRM5</i>	<i>PLIN3</i>	<i>UBXN6</i>	<i>PRR15</i>	<i>C17orf80</i>	<i>C1orf216</i>	<i>BET1L</i>	
<i>ASPH</i>	<i>TEKT3</i>	<i>GALNT5</i>	<i>CDK5RAP3</i>	<i>PTPRT</i>	<i>TALDO1</i>	<i>PKP3</i>	

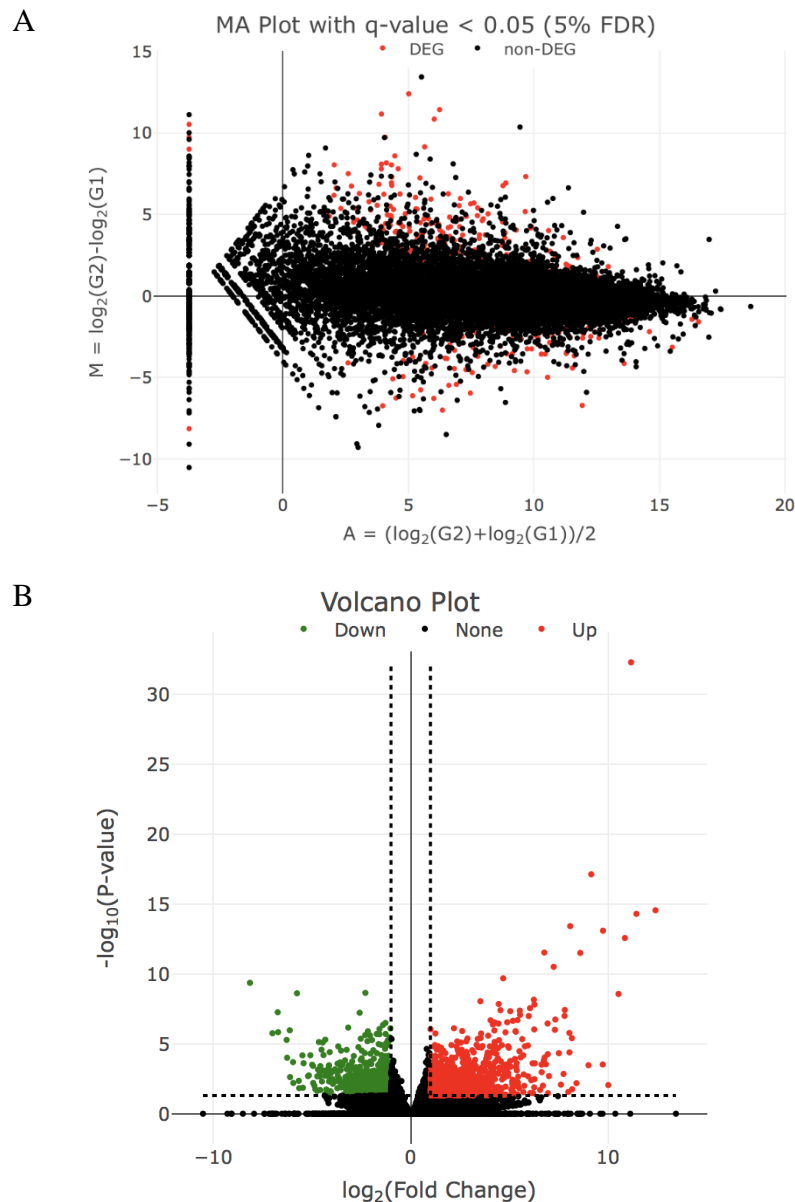


図 27 T細胞の機能不全に陥った3症例とそれ以外の9症例の関係

“cold”の12症例を、G1群：T細胞が機能を完全には喪失していない9症例、G2群：T細胞機能不全に陥った3症例、の2群に分けて、TCC-GUI (Graphical User Interface for TCC package)を用いて比較トランスクリプトーム解析を行い、同定された発現変動遺伝子 (DEG) 405種について、(A) M-Aプロット (Y軸, M: 発現変動の大きさの差、X軸, A: 発現変動の大きさの平均値)、(B) Volcanoプロット (X軸, Fold change: 2群間における遺伝子発現の比、Y軸, $p\text{-value}$: 統計学的有意差) を描図して遺伝子の発現変動を可視化した。

T細胞の機能不全が、腫瘍抗原によるT細胞刺激の持続による免疫疲弊と関連しているのか検討した。“cold”の12症例について、機能不全に陥った3症例と、それ以外の9症例の2群間で、ネオアンチゲン頻度 (neoantigen frequency) を比較した。

図 28 に示すように、ネオアンチゲン頻度の値は、中央値 0.16 対 0.18、 $P=0.049$ と、T 細胞機能不全症例で低下していた。これらの 3 症例では、まず免疫応答が存在して、免疫編集によってネオアンチゲンを発現しているがん細胞のクローンが除外されたのではないかと推測される。抗腫瘍免疫応答によるがん細胞における免疫編集の形跡が残っていることから、これらの症例で認められた T 細胞の機能不全は、一度誘導された免疫応答が疲弊したもの（免疫疲弊）と考えられる。

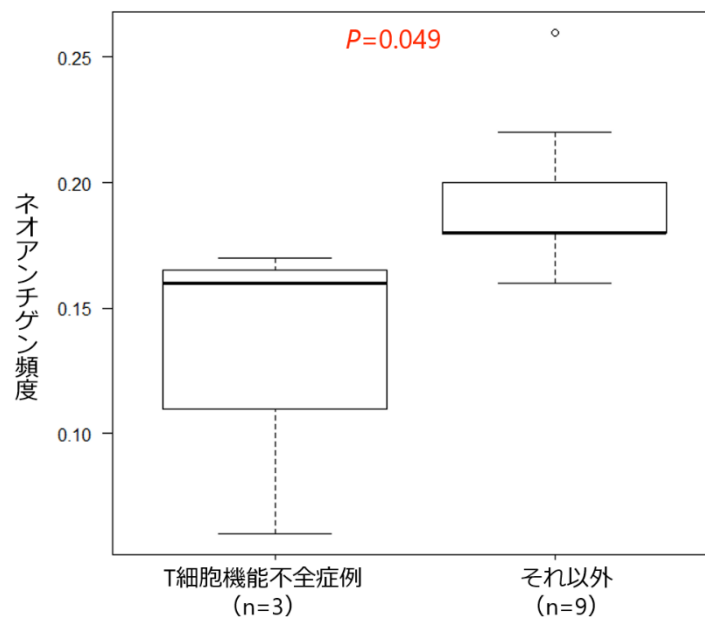


図 28 “cold”での T 細胞機能不全症例とそれ以外の症例でのネオアンチゲン頻度 “cold”の 12 症例について、T 細胞の機能不全に陥った 3 症例と、それ以外の 9 症例の 2 群間で、ネオアンチゲン頻度（neoantigen frequency）を、Wilcoxon 符号付順位和検定を用いて比較した。

また、“cold”の 12 症例を、IGS クラスターのバリデーションに使用した免疫関連遺伝子のパネル Immunoduct を用いてクラスター解析を行った（図 29）。その結果、T 細胞機能不全を認めた 3 症例と、それ以外の 9 症例でヒートマップに差異が認められ、T 細胞機能不全の 3 症例では、B 細胞系の遺伝子の発現が高い傾向であった。この結果から、B 細胞系の遺伝子の発現も T 細胞の機能不全に関与している可能性が考えられる。

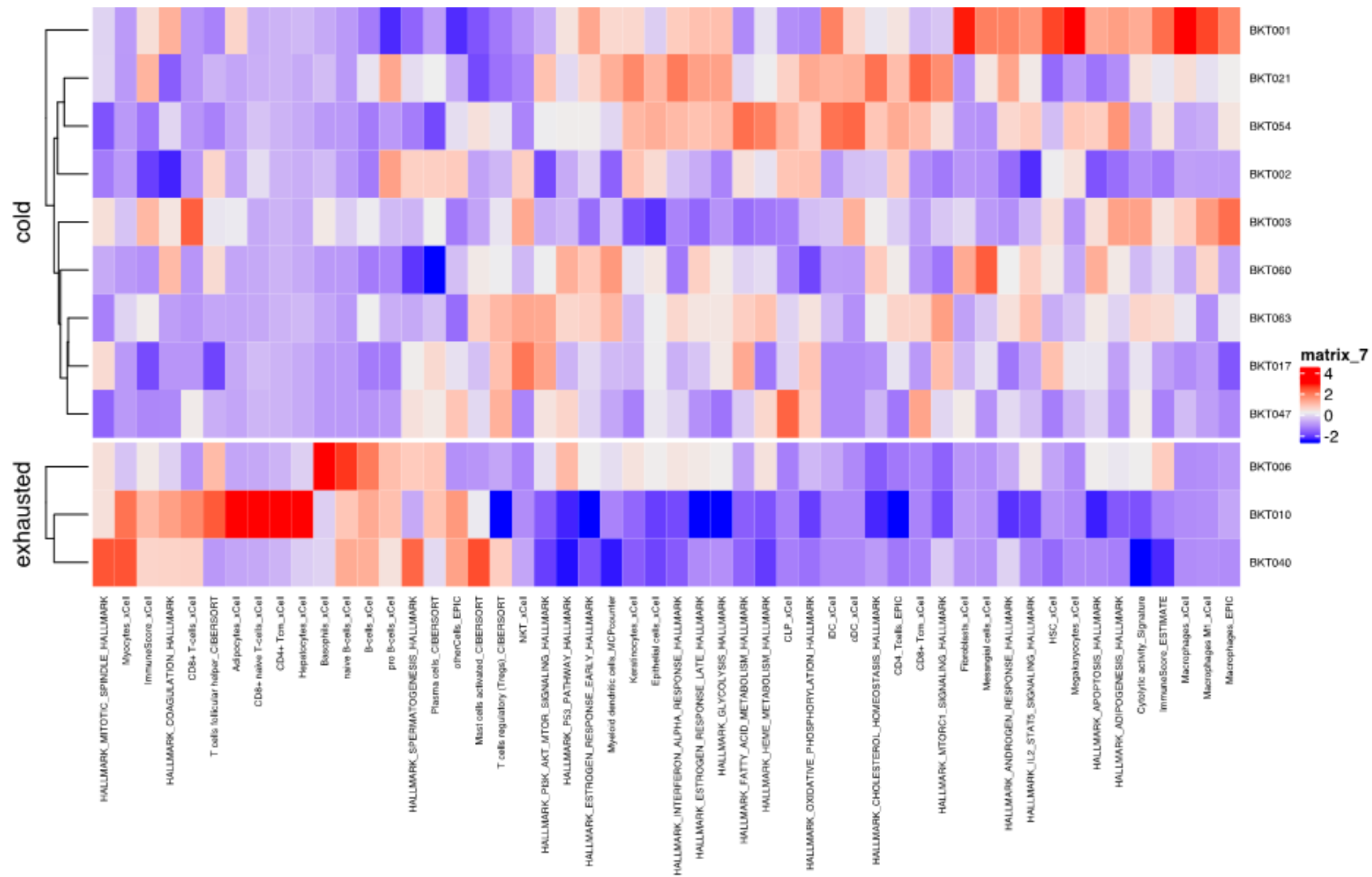


図 29 “cold”12 症例の Immunoduct によるクラスター解析

“cold”の 12 症例のトランスクリプトームデータを、IGS cluster のバリデーションに使用した免疫関連遺伝子のパネル Immunoduct を用いてクラスター解析を行った。

液性因子の解析

腫瘍内免疫応答の状態を末梢血検体から予測が可能かどうかを検討するため、31症例の末梢血検体を用いて、サイトカイン・ケモカインや抗体産生などの液性因子を解析した。

末梢血検体から血漿を分離し、Bio-Plex ヒトサイトカイン GI 27-Plex アッセイパネルを用いて、蛍光ビーズイムノアッセイ法で、代表的な 27 種類のサイトカインを測定した。図 30 に示すように、各 IGS cluster 間で特徴的な相違は認めなかった。

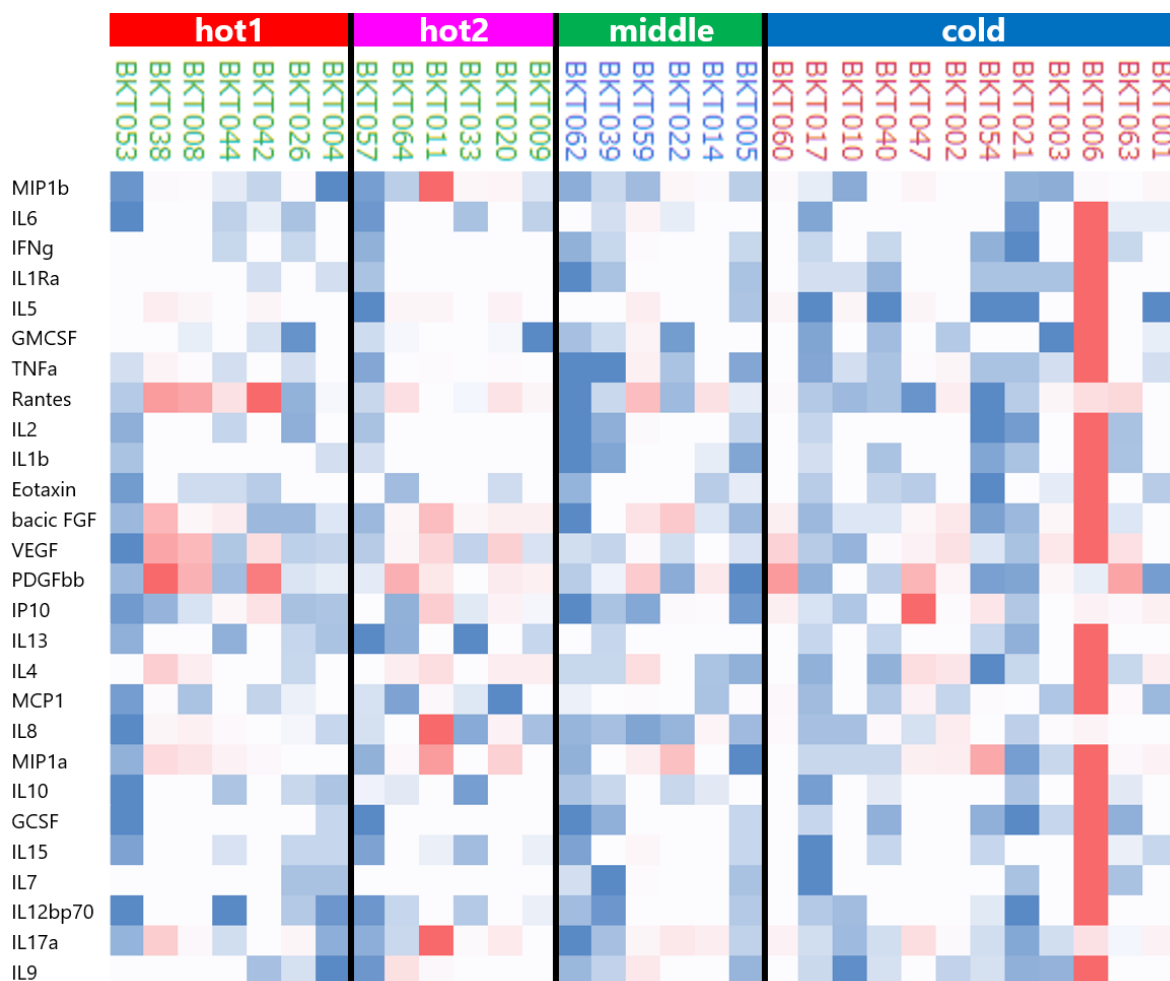


図 30 末梢血中のサイトカイン

末梢血検体から血漿を分離し、Bio-Plex ヒトサイトカイン GI 27-Plex アッセイパネル(Bio-Rad, Hercules, CA)を用いて、蛍光ビーズイムノアッセイ法で、代表的な 27 種類のサイトカインを測定した。

次に、59種の腫瘍関連抗原（TAAs）またはがん精巣抗原（CT抗原）のパネル[32]を用いて、ビーズイムノアッセイ法で分離した血漿中の各抗原に対する抗体産生を測定した。図31に示すように、各IGS cluster間で特徴的な相違は認めなかった。

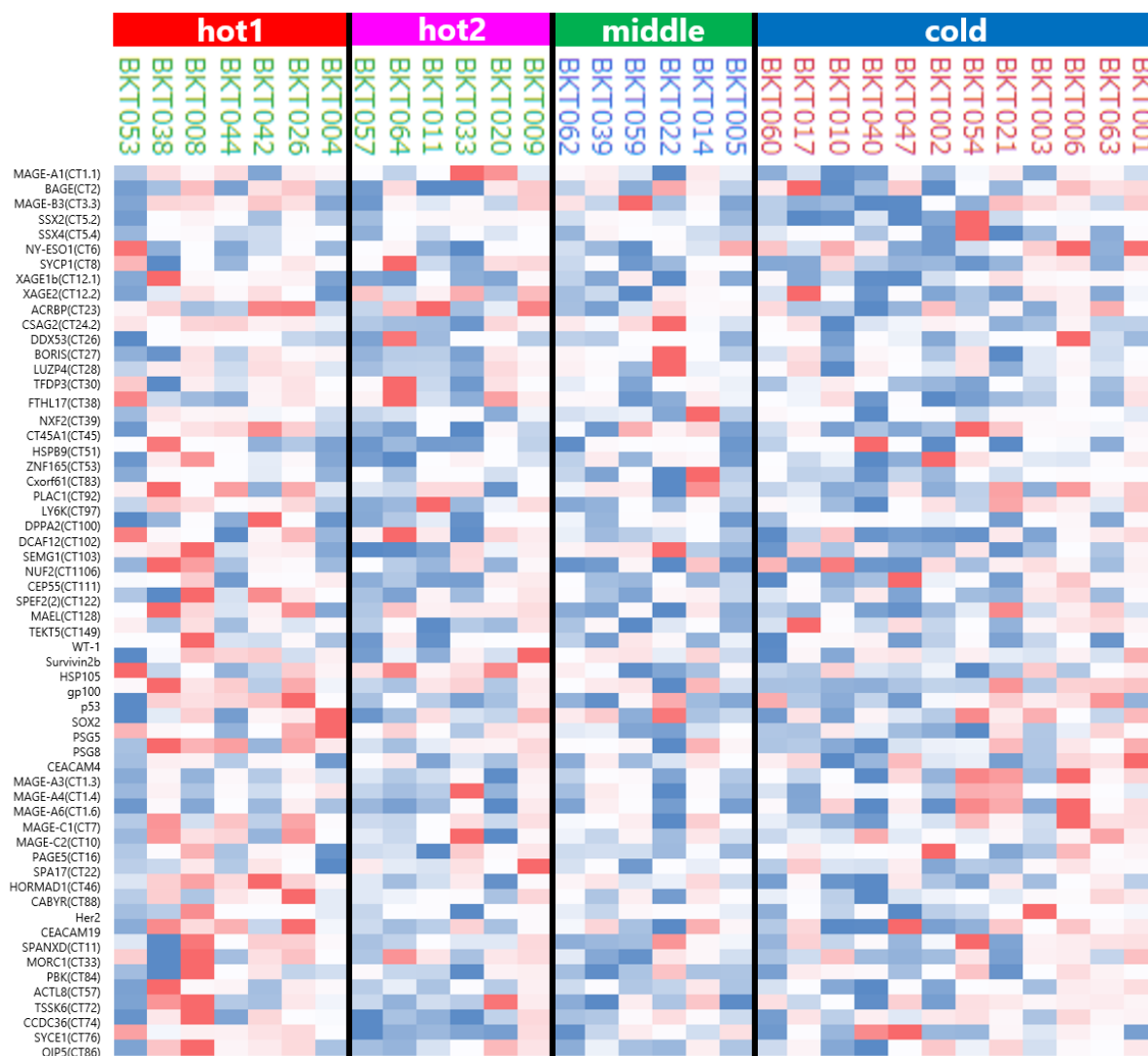


図31 末梢血中のがん抗原に対する抗原抗体反応

59種の腫瘍関連抗原（TAAs）またはがん精巣抗原（CT抗原）のパネル[32]を用いて、ビーズイムノアッセイ法で分離した血漿中の各抗原に対する抗体産生を測定した。

また、図22で示したように、末梢血から分離したPBMCでは、TILと比較してCD8陽性細胞でのサイトカインの産生が少なかった。

これらの結果からは、末梢血のアッセイによって腫瘍内免疫応答を評価するのは困難であることが示唆された。

IGS cluster と予後との関係

本研究の IGS cluster が予後と相関するのかを解析した。”hot1”, “hot2”, “middle”, “cold”の4群間で、Kaplan-Meier 法により全生存期間（OS）、無増悪生存期間（PFS, progression-free survival）について生存解析を行った。図 32 に示すように、OS、PFS ともに、“hot2”, “middle”, “hot1”, “cold”の順に低下していく傾向が示されたが、統計学的有意差は示されなかった（ $P=0.125$, $P=0.388$ ）。

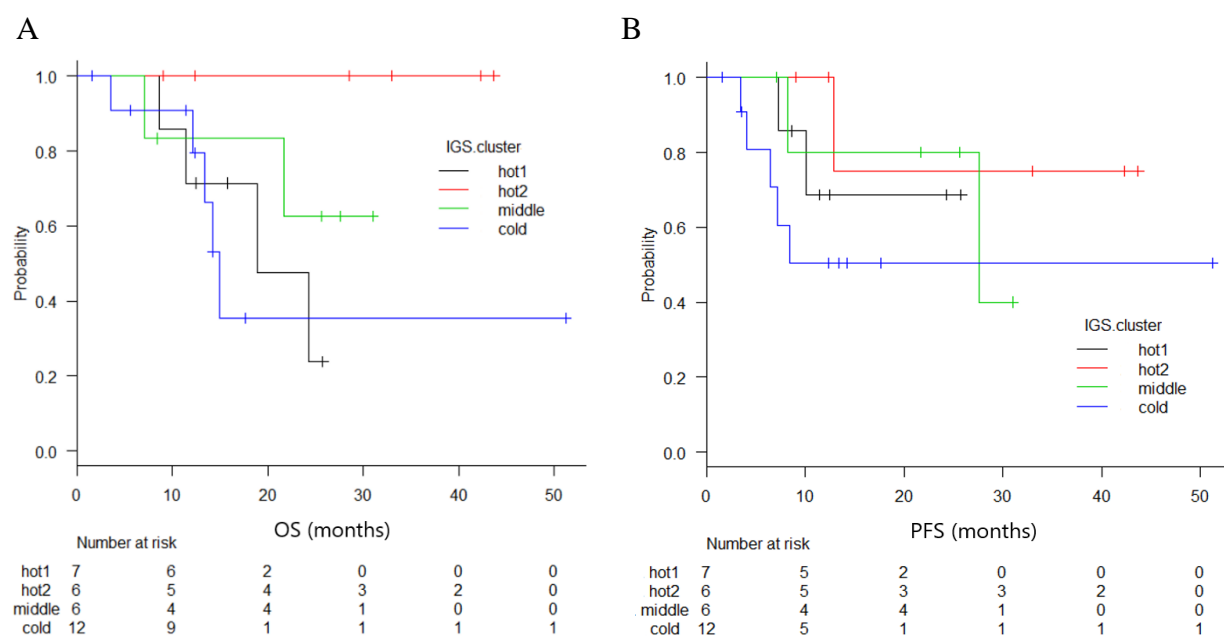


図 32 IGS cluster で群別化した生存曲線

”hot1”, “hot2”, “middle”, “cold”の4群間で、Kaplan-Meier 法により、全生存期間（OS）、無増悪生存期間（PFS）について生存解析を行った。

考察

生体内のがん免疫応答は、ダイナミックなシステムとして成り立っており、単一の因子で評価するのは困難である。本研究では、がん免疫応答を一連のサイクルとして評価するために「がん免疫サイクル (Cancer-Immunity Cycle)」の概念に基づき、胃癌に対する抗腫瘍免疫応答を解析した。次世代シーケンサー解析を用いた DNA レベル、mRNA レベルから、フローサイトメトリーを用いた細胞レベル、血中の液性因子まで、胃癌患者における抗腫瘍免疫応答に関する情報を多層的に統合して、免疫病態を検討した。免疫側の因子と腫瘍側の因子の両者でがん免疫応答が規定される。今回我々は7つの免疫側の因子に腫瘍側の因子として Glycolysis (解糖系) と Proliferation (細胞増殖) を加え、9つの軸で腫瘍内免疫応答を評価した。

その結果から、胃癌を大きく2つの群 (“Immune Hot”と“Immune Cold”)、さらに詳細に4つの群 (IGS cluster; “hot1”, “hot2”, “middle”, “cold”) に分類した。その特徴をまとめると、表9であった。

4つの群のそれぞれの外科手術後の予後は、症例数が少なく統計学的有意差は認めなかったものの、OS、PFSは“hot2”, “middle”, “hot1”, “cold”の順に低下していく傾向が示めされた (図32)。腫瘍内免疫応答が活性化されている“hot1”の予後が不良な傾向であったが、“hot1”では予後良好な“hot2”と比較して免疫グラムでの Glycolysis (解糖系) のスコアが高く、腫瘍の解糖系が亢進しているために腫瘍増殖が免疫を凌駕しているためと考えられた。

表9 各 IGS cluster の特徴

	hot1	hot2	middle	cold
TCGA 分類	MSI 型が多い	EBV 型が多い		
ヌクレオチド変異数 ネオアンチゲン数	多い	少ない	少ない	少ない
遺伝子変異	多い	中程度	中程度	少ない
ネオアンチゲン頻度	高い	低い	中程度	高い
CT 抗原数	低い	低い	低い	高い
上皮間葉転換	非間葉系	非間葉系	間葉系	非間葉系
腫瘍浸潤細胞 (CIBERSORT)	多い	多い	中程度	少ない
抑制性分子の発現	PBMC より TIL で高発現			
サイトカイン産生能	PBMC より TIL で高発現			疲弊 T 細胞症例あり
がん遺伝子・がん抑制遺伝子	ミスセンス変異が多い			増幅が多い
抗原提示経路に関する遺伝子群	ミスセンス変異が多い			増幅が多い 全例で LOF あり
IFN γ 経路に関わる遺伝子群	ミスセンス変異が多い			増幅が多い 全例で LOF あり
Treg の発現 (CIBERSORT)	差はなし			
MDSC, TAM M2 の発現				高い
CAF の発現			高い	
TIL の機能不全と浸潤排除	正常	機能不全 (dysfunction)	機能不全かつ浸潤排除	浸潤排除 (exclusion)
サイトカイン (液性因子)	差はなし			
CT 抗原に対する抗体 (液性因子)	差はなし			
手術予後	不良	良好	中程度	不良
提案される治療	ICI (周術期も含む)	手術 より早期の ICI	手術 ICI+TGF- β 阻害	CAR-T/TCR-T/ネオアンチゲンワクチン+ICI

“hot1”群は、手術予後が不良な一方で、TCGAでの分子生物学的分類のMSI型が多く、ヌクレオチド変異数およびネオアンチゲン数が高値であった。こうした症例は先行研究でも免疫チェックポイント阻害薬の奏効が期待されており[41][42][43]、“hot1”群では、周術期での免疫チェックポイント阻害薬治療などが選択肢となる可能性がある。

“hot2”群は、手術予後が良好なだけでなく、先行研究で免疫チェックポイント阻害薬の奏効が期待されるTCGA分類のEBV型[41]が多く含まれていた。また、TILの機能不全(dysfunction)症例が多いことから免疫チェックポイント阻害薬の効果が期待される。一方で、抗腫瘍免疫応答の存在下での、immunoeditingによるがん細胞の選択が認められている。“hot2”群では、切除不能進行例や再発例には、immunoeditingが生じる前のより早期での免疫チェックポイント阻害薬治療が選択肢として推奨される可能性がある。

腫瘍へのT細胞の浸潤が多い“hot1”群と“hot2”群ではGlycolysis(解糖系)のIGSが異なる。両群ではT-cells(T細胞の多寡)のIGSは同程度であるので、Glycolysis(解糖系)の差は周囲浸潤細胞によるものではなく、胃癌細胞によるものと考えられる。免疫応答が強いhot群が、腫瘍側の代謝因子であるGlycolysis(解糖系)により“hot1”群と“hot2”群に分類された点は、本研究で得られた新知見である。

“middle”群は、上皮間葉転換をきたしたMesenchymal型が多く集まっていた。またCAFの発現が高く、上皮間葉転換によってCAFが増殖している可能性が考えられる。TILは機能不全(dysfunction)かつ浸潤排除(exclusion)されており、免疫チェックポイント阻害薬の奏効は期待できない。CAFが産生するTGF- β は、腫瘍内へのT細胞浸潤を妨げるバリアを形成することが知られており[44]、“middle”群では

TGF- β の阻害と免疫チェックポイント阻害薬とを併用することにより奏効が得られる可能性もある。

“cold” 群は、抗原提示経路およびインターフェロン γ 経路の LOF を認め、MDSC, TAM M2 などの抑制性因子の発現が亢進し、TIL は浸潤排除 (exclusion) されている。さらに高発現の CT 抗原が免疫抑制性に作用している可能性もあり、免疫チェックポイント阻害薬単独では奏効が期待できない。手術予後も不良である。そのため“cold” 群では、患者毎に Cancer-Immunity Cycle で障害されてステップを明らかにし、複数のステップを同時に制御することが必要と考えられる。

また“cold” 群には、T 細胞が疲弊して、Cytostim 刺激でも PMA/イオノマイシン刺激でもインターフェロン γ 産生が認められない T 細胞機能不全に陥った症例が 12 例中 3 例 (BKT006, BKT010, BKT040) 含まれていた (図 23 最下段)。“cold” 群では、“hot1”, “hot2”, “middle” 群より、CT 抗原の高発現が認められていたが (図 12,19)、これら T 細胞が機能喪失した 3 症例では、その他 9 症例との比較トランスクリプトーム解析で、発現変動遺伝子の上位に GAGE1, MAGEA8, MAGEC1, GAGE2A, XAGE2, GAGE12J といった CT 抗原が並んでいた (表 7)。さらに B 細胞系の遺伝子が高発現していた (図 29)。CT 抗原や B 細胞が何らかの免疫抑制作用をもつ可能性が示唆された。

図 11 で示すように、腫瘍内免疫応答が存在する“hot2”, “middle” では“cold” 群よりネオアンチゲン頻度が低下しており、腫瘍免疫応答による immunoediting が認められた。図 28 で示すように、“cold” 群を T 細胞が機能喪失した 3 症例 (T 細胞機能不全症例; BKT006, BKT010, BKT040) のとそれ以外の 9 症例 (それ以外) で比較した

ところ、前者 3 例ではネオアンチゲン頻度が低下しており、immunoediting を認めることから、一度誘導された免疫応答が疲弊した結果と考えられた。

T 細胞が機能喪失した 3 症例をより詳細に見ると、イムノグラムの各評価軸の IGS が、BKT010, BKT040 は Proliferation（細胞増殖）以外で著しく低値であり、BKT006 は低値ではあるが、まだわずかに保たれている点が異なっていた（図 33）。

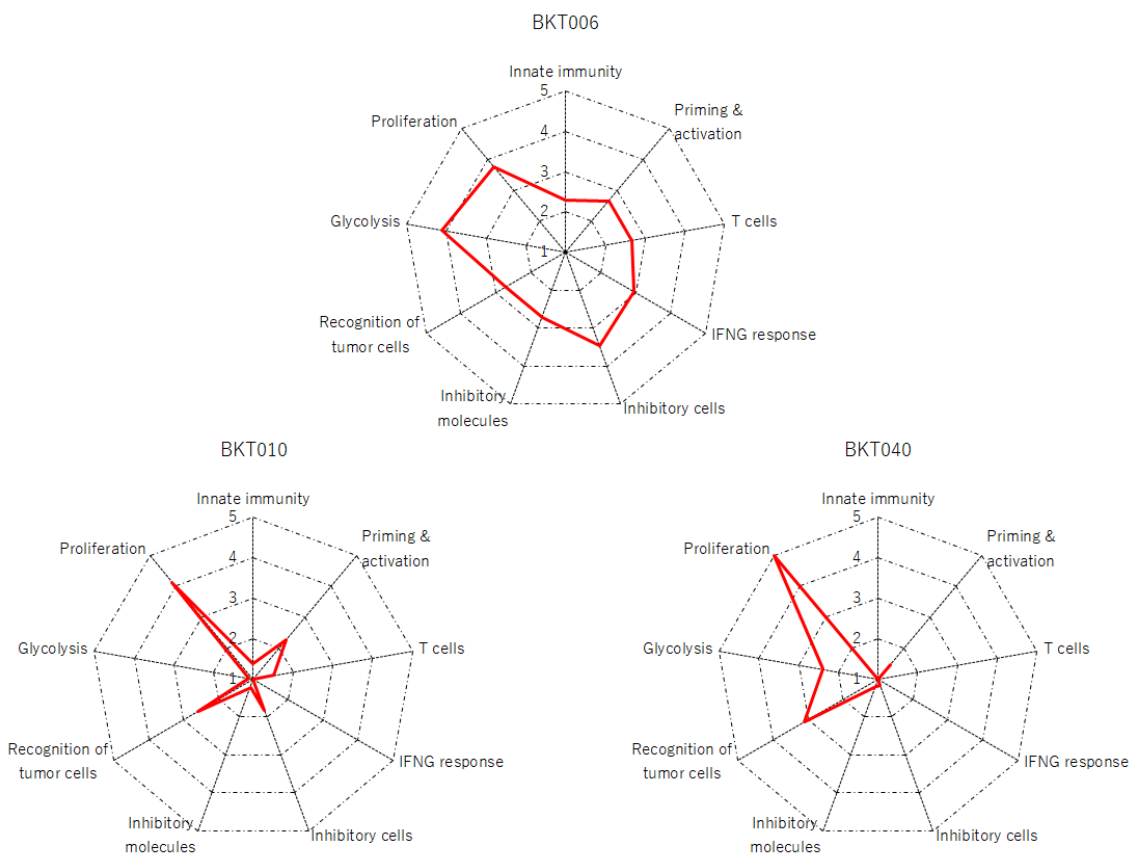


図 33 T 細胞が疲弊した 3 例のイムノグラム

T 細胞が機能喪失した 3 症例（BKT006, BKT010, BKT040）のイムノグラムを抜粋して示す。イムノグラムの各評価軸の IGS が、BKT010, BKT040 は Proliferation（細胞増殖）以外で著しく低値であり、BKT006 は低値ではあるがまだわずかに保たれている点が異なっていた。

BKT006 は、液性因子での抗原抗体反応（図 31）や血中のサイトカイン・ケモカイン値（図 30）が非特異的に亢進していることから、患者が非特異的な慢性炎症の

状態であると考えられる。BKT010, BKT040 では、腫瘍の増殖に関わる Proliferation (細胞増殖) 以外のほとんどすべての評価軸で IGS が低下しきっており、より一層、免疫疲弊状態が強いことが認められる。このうち BKT40 は、術前化学療法が施行された症例であり、術前化学療法が免疫応答の疲弊に何らかの関与をしている可能性も否定はできない。

これらの症例は、T 細胞が疲弊しきっているため、免疫チェックポイント阻害剤のように、T 細胞上の免疫抑制分子を介したシグナルを制御する治療だけでは、免疫応答を再活性化することは不可能である。Cancer-Immunity Cycle の上流のメカニズムに着目し、新しい抗腫瘍免疫応答を誘導する必要がある。CT 抗原やネオアンチゲンを認識できる TCR 遺伝子やキメラ抗原受容体 (CAR, Chimeric antigen receptor) を T 細胞に遺伝子導入した TCR 遺伝子 (TCR-T) 療法[45] [46]や CAR-T 療法 [47][46]、ネオアンチゲンワクチン療法[48]などの抗腫瘍エフェクター細胞を直接増やす治療と免疫チェックポイント阻害薬の併用療法などが選択肢となる可能性がある。

ダイナミックな抗腫瘍免疫応答は、図 34 に示すように、がんと免疫の相互作用で複雑に規定される。

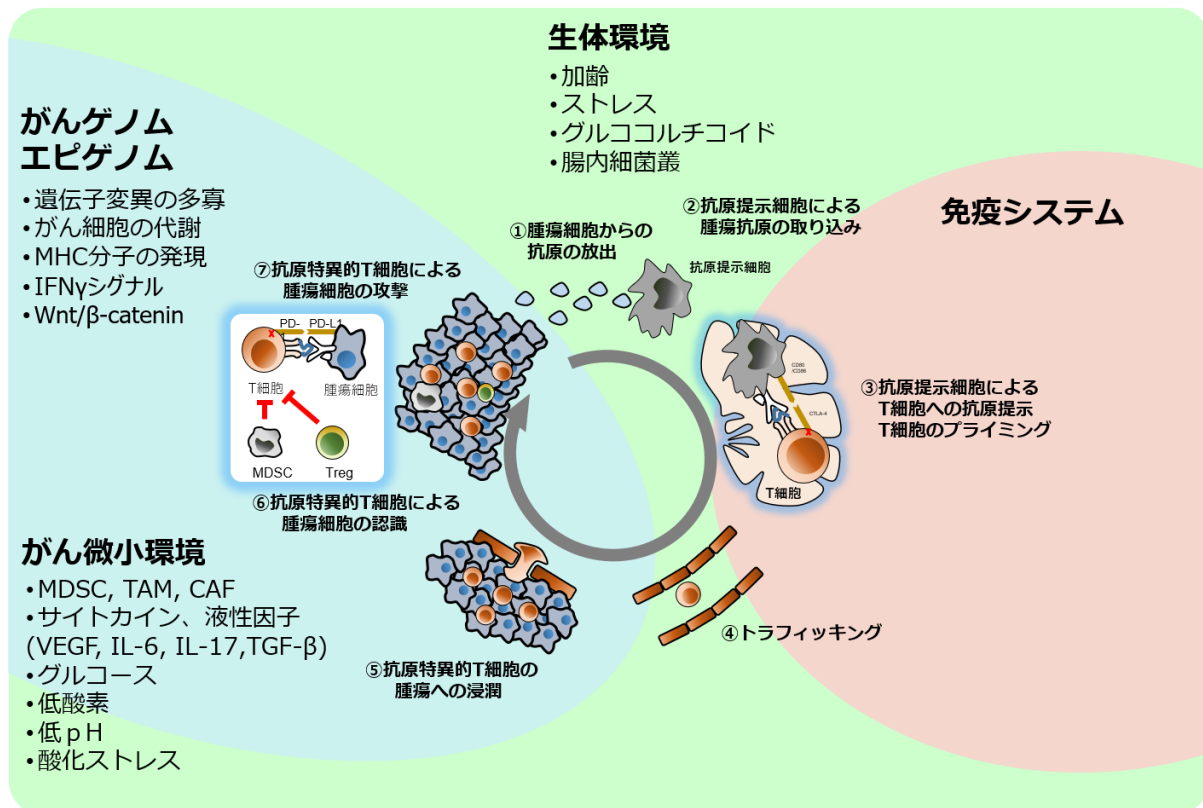


図 34 Cancer-Immunity Cycle を中心に捉えたがん免疫の全体像

抗腫瘍免疫応答は、がんと免疫の相互作用で複雑に規定される。がん側の内因性因子として「がんゲノム」や「エピゲノム」、がん側の外因性の因子として「がん微小環境」、さらに「生体環境」が大きく関与している。これらのいずれも Cancer-Immunity Cycle のみでは捉えることが難しく、Cancer-Immunity Cycle もこうした全体像の中で捉える必要がある。

がん側の内因性因子としては、がんゲノムやエピゲノムの影響が挙げられる。

遺伝子変異数が多い腫瘍は免疫チェックポイント阻害薬の効果が高いと報告されている[42][43]。これは遺伝子変異産物がネオアンチゲンとして免疫の標的分子として認識されることから理解される。本研究の胃癌でも、免疫応答が活性化されている“hot1”群で遺伝子変異数およびネオアンチゲン数が多かった。

がん細胞におけるドライバーオンコジーン (driver oncogene) の存在や、それに伴う遺伝子発現の変化も、積極的に免疫反応に強い影響を与えることが知られている。例えば、βカテニンによる Wnt シグナルの活性化は、CCL4 の産生低下をきたし、CD103⁺DC による腫瘍特異的 CD8⁺T 細胞のプライミングが妨げられることが報告さ

れている[49]。NF- κ B シグナルを抑制する PTEN の喪失は、サイトカインや増殖因子の産生につながり、腫瘍内へのマクロファージや好中球、Treg の浸潤を誘導し、腫瘍免疫を抑制する[50]。しかし本研究では、各 IGS cluster を特徴づけるようなドライバーオンコジーン (driver oncogene) は認められず、胃癌においてはその影響は限定的である可能性がある。

一方、免疫反応は強いセレクションプレッシャーとしてがん細胞に作用している。免疫チェックポイント阻害薬への耐性に関する研究成果から、 β 2 ミクログロブリンの欠損による MHC クラス I 分子の消失[51]や、インターフェロン γ シグナル経路の異常[52]による反応性の低下をきたしたがん細胞の出現が、治療抵抗性の原因となることが知られている。本研究でも、免疫応答の低下している“cold”群でこれらの LOF が存在していた。

がん側の外因性の因子として、がん微小環境 (TME) [39]においては代謝も深く関与している。腫瘍と T 細胞の代謝面での競合が免疫抑制性環境の形成に寄与している。T 細胞は TCR に刺激を受けると、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、カルシニューリンが活性化され、脱リン酸化された転写因子 NFAT が核内へ移行することで、IL-2 遺伝子などの転写を促進して活性化する。腫瘍細胞はグルコースを大量に消費して枯渇させるが、T 細胞はグルコースをエネルギー源として必要とするため、腫瘍に浸潤すると TCR に刺激を受けても、細胞の Ca^{2+} 濃度は低下し、NFAT の核内への移行が減少する。このため TIL は機能不全 (dysfunction) に陥り、細胞増殖とサイトカイン産生が抑制される。グルコースに加えて、アミノ酸や脂肪酸などの栄養素も腫瘍細胞に大量に消費されると、それを競合する TIL は機能不全 (dysfunction) に陥る。このように、腫瘍細胞の増殖に伴う代謝が、TIL のエフェクター作用を阻害してい

る[53]。本研究では、特に“hot2”や“middle”群でT細胞が機能不全(dysfunction)に陥った症例を認めており、こうした症例では、腫瘍細胞を兵糧攻めにする血管新生阻害薬や殺細胞性抗がん剤による化学療法との併用で、腫瘍増殖を抑制することで免疫応答を増強することが効果的な可能性がある。

またT細胞は、腫瘍内で、腫瘍細胞だけでなく多くの免疫抑制性細胞との間でも代謝面で競合している。TAMやMDSCでは、トリプトファン代謝にかかわる indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)の発現誘導とアルギニン代謝にかかわるアルギナーゼの活性化が起こり、トリプトファンとアルギニンが分解され、腫瘍内はアミノ酸が枯渇する。加えて、低酸素状態ではMDSCなどにおいて誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)が活性化され、反応性窒素種(Reactive Nitrogen Species: RNOS)が産生される。ペルオキシ亜硝酸(ONOO⁻)によりTCRがニトロ化されると、その反応性が抑制される[53]。本研究でも、免疫応答の低下している“cold”群でTAMやMDSCが増加していた。こうした症例では、IDO阻害薬[54]やコロニー刺激因子1受容体(CSF1R)阻害薬[55]を併用して、免疫抑制性細胞を抑制することで免疫応答を増強することが効果的な可能性がある。

またT細胞の代謝を介した免疫制御や抑制は、メタボリックチェックポイントとして注目されている。TCRとその共刺激分子CD28を介したT細胞の活性化シグナルには、PI3K/AKT/mTOR経路が深く関与している。mTORはその中心的な制御分子であり、転写因子のc-MycとHIF-1 α を増加させる。c-Mycはグルコーストランスポーター(GLUT)の発現を増強し、グルコースの流入を促進してT細胞の増殖と分化を可能にする。また、グルタミントランスポーター(ASCT2)を誘導し、グルタミンオリシスを促進する。HIF-1 α は解糖系の酵素の発現を上昇させるとともに、ミ

トコンドリアの酸素消費を低下させ、TCA 回路を抑制する。mTOR を抑制する AMPK も重要である[56]。今後、メタボリックチェックポイントをイムノグラムの評価軸に加えることで、患者個々の腫瘍内免疫応答をさらに踏み込んで解明し、新規免疫治療につなげることができる可能性がある。

がん-免疫相互作用には、生体環境が大きく関与している。加齢やストレスは免疫全体に影響を及ぼし、自己免疫疾患を発症する人とそうでない人がいるように、がんに対する免疫反応が生じやすい人とそうでない人の遺伝的素因が存在すると予測される。生体環境の因子として、腸内細菌叢と腫瘍免疫の関連が報告されてきている[57]。本研究は、主に腫瘍組織と末梢血からの解析であるため、腸内細菌叢などの解析は行えなかった。

これらはいずれも Cancer-Immunity Cycle のいずれかのステップに作用し影響を与えることから、Cancer-Immunity Cycle もこうした全体像の中で捉える必要がある。本研究では、Cancer-Immunity Cycle の各ステップに関わる因子に加え、腫瘍の代謝や増殖に関する因子を統合し、がん-免疫相互作用にも着目したイムノグラムを作成した。しかし、未評価の項目がまだ複数あり、これらをイムノグラムの評価軸に統合し、胃癌のがん免疫の全体像を解明していくことが今後の課題である。

本研究ではいくつかの制約が存在する。第一に、本研究は単施設からの手術検体を用いた後ろ向き研究であり、選択バイアスが存在している可能性がある。第二に、本研究は対象患者が 31 症例と比較的少数である。症例数を増やすことも検討したが、次世代シーケンサーやフローサイトメトリーによる解析を含んだ多層的な

解析という本研究の性質から実現しなかった。そのため、第三に、本研究の対象患者には1症例の手術関連死亡（BKT063）を含む。生存期間は本研究の主要なアウトカムでないこともあり、生存期間解析から該当症例の除外は行わなかった。第四に、本研究の対象は手術治療を受けた患者であり、免疫チェックポイント阻害薬などの免疫治療を受けた患者ではない。そのため、本研究での腫瘍内免疫応答に基づく分類が予後に本当に影響しているのかを検討するためには、今後免疫チェックポイント阻害薬などの免疫治療を受けた患者での検討が必要と考えられる。第五に、本研究では対象患者の病理組織標本での免疫染色などを行っておらず、遺伝子学的検索と病理組織との対応については評価できなかった。今後、追加の検討が望ましいと考えられる。第六に、本研究では、腫瘍組織から抽出したDNAとRNAには、胃癌細胞と周囲浸潤細胞の両者の由来のものが混在している可能性がある。またTILの培養の過程では一部の細胞のみが選択された可能性や、培養過程で細胞の生物学的特徴になんらかの変化が生じた可能性も否定できない。これらは実験手法からの制約と考えられる。

結語

胃癌の腫瘍内免疫応答の評価法として、「がん免疫サイクル (Cancer-Immunity Cycle)」の概念に基づき、がん-免疫相互作用にも着目した「免疫グラム (Immunogram)」および免疫グラムスコアによる免疫学的分類 (IGS cluster) は、腫瘍内免疫応答の特徴をよく反映し有用であると考えられた。今後、評価軸を柔軟に増やししながら、胃癌に対する個別化複合的免疫療法の開発に応用されることが期待される。

謝辞

本研究を遂行する機会ならびにご指導を賜りました、東京大学大学院医学系研究科消化管外科学・瀬戸泰之教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、実験計画から論文作成まで多岐にわたる直接的な指導を賜りました、東京大学医学部附属病院免疫細胞治療学・垣見和宏特任教授に深く感謝申し上げます。

臨床検体ならびに臨床データの収集において多大なるご尽力を賜りました、東京都立墨東病院上部消化管外科・和田郁雄先生に深く感謝申し上げます。

研究データの解析において多大なるご尽力を賜りました、東京医科歯科大学肝胆膵外科・渡邊秀一先生、研究データの解析手法や解釈について貴重なご意見や建設的なディスカッションを賜りました、東京医科歯科大学医科学数理分野・角田達彦教授、宮冬樹先生、鎌谷高志先生、理化学研究所生命医科学研究センター・中川英刀先生、藤田征志先生に深く感謝申し上げます。

また、がん抗原パネルを提供くださった、岡山大学・二見淳一郎先生に深く感謝申し上げます。

最後に、様々な点で本研究の遂行にご尽力を賜りました、東京大学医学部附属病院免疫細胞治療学のみなさまに深く感謝申し上げます。

引用文献

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-tieulent J, Jemal A. Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J Clin.* 2015;65:87–108. doi:10.3322/caac.21262.
2. The Editorial Board of the Cancer Statistics in Japan. *CANCER STATISTICS IN JAPAN* 2017. Foundation for Promotion of Cancer Research (FPCR); 2017.
3. Kang YK, Boku N, Satoh T, Ryu MH, Chao Y, Kato K, et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2017;390:2461–71.
4. 日本胃癌学会. 胃癌治療ガイドライン 医師用 2018年1月改訂 第5版. 金原出版; 2018.
5. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity.* 2013;39:1–10.
6. Zhao X, Subramanian S. Intrinsic resistance of solid tumors to immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Res.* 2017;77:817–22.
7. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med.* 2016;375:1856–67. doi:10.1056/NEJMoa1602252.
8. Robert C, Long G V., Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without *BRAF* Mutation. *N Engl J Med.* 2015;372:320–30. doi:10.1056/NEJMoa1412082.
9. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WEE, Poddubskaya E, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015;373:123–35. doi:10.1056/NEJMoa1504627.

10. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, George S, Hammers HJ, Srinivas S, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2015;373:1803–13. doi:10.1056/NEJMoa1510665.
11. Blank CU, Haanen JB, Ribas A, Schumacher TN. The “cancer immunogram.” *Science* (80-). 2016;352:658–60. doi:10.1126/science.aaf2834.
12. Karasaki T, Nagayama K, Kuwano H, Nitadori J ichi, Sato M, Anraku M, Hosoi A, Matsushita H, Morishita Y, Kashiwabara K, Takazawa M, Ohara O, Kakimi K, Nakajima J. An Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle: Towards Personalized Immunotherapy of Lung Cancer. *J Thorac Oncol.* 2017;12:791–803. doi:10.1016/j.jtho.2017.01.005.
13. 日本胃癌学会. 胃癌取扱い規約（2010年3月改訂 [第14版]）. 金原出版; 2010.
14. Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2010;26:589–95.
15. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20:1297–303. doi:10.1101/gr.107524.110.
16. Wilson RK, Mardis ER, McLellan MD, Koboldt DC, Shen D, Zhang Q, Ding L, Larson DE, Lin L, Miller CA. VarScan 2: Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Res.* 2012;22:568–76.
17. Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C, Gabriel S, Meyerson M, Lander ES, Getz G. Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol.* 2013;31:213–9. doi:10.1038/nbt.2514.

18. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29:15–21.
19. Anders S, Pyl PT, Huber W. HTSeq-A Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*. 2015;31:166–9.
20. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci*. 2005;102:15545–50. doi:10.1073/pnas.0506580102.
21. Matey-Hernandez ML, Brunak S, Izarzugaza JMG. Benchmarking the HLA typing performance of Polysolver and Optitype in 50 Danish parental trios. *BMC Bioinformatics*. 2018;19:1–12.
22. Matsushita H, Sato Y, Karasaki T, Nakagawa T, Kume H, Ogawa S, Homma Y, Kakimi K. Neoantigen Load, Antigen Presentation Machinery, and Immune Signatures Determine Prognosis in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunol Res*. 2016;4:463–71. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0225.
23. Hoof I, Peters B, Sidney J, Pedersen LE, Sette A, Lund O, Buus S, Nielsen M. NetMHCpan, a method for MHC class I binding prediction beyond humans. *Immunogenetics*. 2009;61:1–13.
24. Matsushita H, Hasegawa K, Oda K, Yamamoto S, Nishijima A, Imai Y, Asada K, Ikeda Y, Karasaki T, Fujiwara K, Aburatani H, Kakimi K. The frequency of neoantigens per somatic mutation rather than overall mutational load or number of predicted neoantigens per se is a prognostic factor in ovarian clear cell carcinoma. *Oncoimmunology*. 2017;6:e1338996. doi:10.1080/2162402X.2017.1338996.

25. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:1–7.
26. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics.* 2010;26:841–2.
27. Bass AJ, Thorsson V, Shmulevich I, Reynolds SM, Miller M, Bernard B, et al. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 2014;513:202–9. doi:10.1038/nature13480.
28. Chu J, Sadeghi S, Raymond A, Jackman SD, Nip KM, Mar R, Mohamadi H, Butterfield YS, Robertson AG, Birol I. BioBloom tools: Fast, accurate and memory-efficient host species sequence screening using bloom filters. *Bioinformatics.* 2014;30:3402–4.
29. Ni Huang M, McPherson JR, Cutcutache I, Teh BT, Tan P, Rozen SG. MSIseq: Software for assessing microsatellite instability from catalogs of somatic mutations. *Sci Rep.* 2015;5:1–10. doi:10.1038/srep13321.
30. Oh SC, Sohn BH, Cheong JH, Kim SSYSSBC, Lee JHJEJJS, Park KC, et al. Clinical and genomic landscape of gastric cancer with a mesenchymal phenotype. *Nat Commun.* 2018;9. doi:10.1038/s41467-018-04179-8.
31. Lee J, Cristescu R, Kim KK-MK, Kim KK-MK, Kim ST, Park SH, Kang WK. Development of mesenchymal subtype gene signature for clinical application in gastric cancer. *Oncotarget.* 2017;8:66305–15.
32. Futami J, Nonomura H, Kido M, Niidoi N, Fujieda N, Hosoi A, Fujita K, Mandai K, Atago Y, Kinoshita R, Honjo T, Matsushita H, Uenaka A, Nakayama E, Kakimi K. Sensitive Multiplexed Quantitative Analysis of Autoantibodies to Cancer Antigens with Chemically S-Cationized Full-Length and Water-Soluble Denatured Proteins. *Bioconjug Chem.* 2015;26:2076–84.

33. Sun J, Nishiyama T, Shimizu K, Kadota K. TCC: An R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinformatics*. 2013;14:1. doi:10.1186/1471-2105-14-219.
34. Lamarre S, Frasse P, Zouine M, Labourdette D, Sainderichin E, Hu G, Le Berre-Anton V, Bouzayen M, Maza E. Optimization of an RNA-Seq Differential Gene Expression Analysis Depending on Biological Replicate Number and Library Size. *Front Plant Sci*. 2018;9 February. doi:10.3389/fpls.2018.00108.
35. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software “EZR” for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*. 2013;48:452–8.
36. Comprehensive Molecular Characterization of Gastric Adenocarcinoma Supplementary Materials.
37. Shukla SA, Bachireddy P, Schilling B, Galonska C, Zhan Q, Bango C, et al. Cancer-Germline Antigen Expression Discriminates Clinical Outcome to CTLA-4 Blockade. *Cell*. 2018;173:624–633.e8. doi:10.1016/j.cell.2018.03.026.
38. Newman AM, Liu CL, Green MR, Gentles AJ, Feng W, Xu Y, Hoang CD, Diehn M, Alizadeh AA. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods*. 2015;12:453–7.
39. Munn DH, Bronte V. Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol*. 2016;39:1–6. doi:10.1016/j.coi.2015.10.009.
40. Jiang P, Gu S, Pan D, Fu J, Sahu A, Hu X, Li Z, Traugh N, Bu X, Li B, Liu J, Freeman GJ, Brown MA, Wucherpfennig KW, Liu XS. Signatures of T cell dysfunction and exclusion predict cancer immunotherapy response. *Nat Med*. 2018;24 October.
41. Kim ST, Cristescu R, Bass AJ, Kim K-MMK, Odegaard JI, Kim K-MMK, et al. Comprehensive molecular characterization of clinical responses to PD-1 inhibition in metastatic gastric cancer. *Nat Med*. 2018;24:1449–58. doi:10.1038/s41591-018-0101-z.

42. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, et al. Genetic Basis for Clinical Response to CTLA-4 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med*. 2014;371:2189–99. doi:10.1056/NEJMoa1406498.
43. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non – small cell lung cancer. *Science* (80-). 2016;348:124.
44. Ganesh K, Massagué J. TGF- β Inhibition and Immunotherapy: Checkmate. *Immunity*. 2018;48:626–8.
45. Rapoport AP, Stadtmauer EA, Binder-Scholl GK, Goloubeva O, Vogl DT, Lacey SF, et al. NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med*. 2015;21:914–21. doi:10.1038/nm.3910.
46. Fesnak AD, June CH, Levine BL. Engineered T cells : the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nat Publ Gr*. 2016;16:566–81. doi:10.1038/nrc.2016.97.
47. Garfall AL, Maus M V., Hwang W-T, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, Zheng Z, Vogl DT, Cohen AD, Weiss BM, Dengel K, Kerr NDS, Bagg A, Levine BL, June CH, Stadtmauer EA. Chimeric Antigen Receptor T Cells against CD19 for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2015;373:1040–7. doi:10.1056/NEJMoa1504542.
48. Li L, Goedegebuure SP, Gillanders WE. Preclinical and clinical development of neoantigen vaccines. *Ann Oncol*. 2017;28 March:xii11-xii17.
49. Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature*. 2015;523:231–5.
50. Ying H, Elpek KG, Vinjamoori A, Zimmerman SM, Chu GC, Yan H, et al. PTEN is a major tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma and regulates an NF- κ B-cytokine network. *Cancer Discov*. 2011;1:158–69.

51. Sade-Feldman M, Jiao YJ, Chen JH, Rooney MS, Barzily-Rokni M, Eliane J-PP, et al. Resistance to checkpoint blockade therapy through inactivation of antigen presentation. *Nat Commun.* 2017;8:1136. doi:10.1038/s41467-017-01062-w.
52. Gao J, Shi LZ, Zhao H, Chen J, Xiong L, He Q, Chen T, Roszik J, Bernatchez C, Woodman SE, Chen PL, Hwu P, Allison JP, Futreal A, Wargo JA, Sharma P. Loss of IFN- γ Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy. *Cell.* 2016;167:397–404.e9. doi:10.1016/j.cell.2016.08.069.
53. Kouidhi S, Elgaaied AB, Chouaib S. Impact of metabolism on T-cell differentiation and function and cross talk with tumor microenvironment. *Front Immunol.* 2017;8 MAR:1–13.
54. Platten M, Wick W, Van Den Eynde BJ. Tryptophan catabolism in cancer: Beyond IDO and tryptophan depletion. *Cancer Res.* 2012;72:5435–40.
55. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, Gallagher WM, Wadhvani N, Keil SD, Junaid SA, Rugo HS, Shelley Hwang E, Jirström K, West BL, Coussens LM. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discov.* 2011;1:54–67.
56. Scharping N, Delgoffe G. Tumor Microenvironment Metabolism: A New Checkpoint for Anti-Tumor Immunity. *Vaccines.* 2016;4:46. doi:10.3390/vaccines4040046.
57. Pitt JM, Vétizou M, Daillère R, Roberti MP, Yamazaki T, Routy B, Lepage P, Boneca IG, Chamailard M, Kroemer G, Zitvogel L. Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity.* 2016;44:1255–69.