

博士論文

食道扁平上皮癌における腫瘍微小環境の解析

小林 佑哉

論文のタイトル

食道扁平上皮癌における腫瘍微小環境の解析

所属

病因・病理学専攻

指導教員名

牛久 哲男 教授

申請者名

小林 佑哉

共同研究者

濱 奈津子、十時 泰、新井 康仁、中村 浩美、足立 美保子、柴田 龍弘

## 【略号一覧 Abbreviations】

5-FU	5-Fluorouracil
APC	antigen presenting cell
CDDP	cisplatin
DC	dendritic cell
DEG	differentially expressed gene
DTX	docetaxel
ES	enrichment score
ESCC	esophagus squamous cell carcinoma
FDR	false discovery rate
GSEA	gene set enrichment analysis
ICD	immunogenic cell death
MDSC	myeloid derived suppressor cell
NES	normalized enrichment score
NT	non-tumor tissue
RPKM	Reads Per Kilobase of exon per Million mapped reads
TAM	tumor-associated macrophage
TIL	tumor-infiltrating lymphocytes
TMB	tumor mutational burden
TME	tumor microenvironment
Treg	regulatory T cells

## 目次

1. 要旨 .....	4
2. 序文 .....	5
3. 方法 .....	12
4. 結果 .....	24
5. 考察 .....	77
6. 結語 .....	109
7. 参考文献 .....	111
8. 謝辞 .....	136

## 1. 要旨

我々は RNA sequencing による網羅的なトランスクリプトーム解析と、腫瘍微小環境を表現する遺伝子セットを定義して GSEA 解析を行い、食道扁平上皮癌の腫瘍微小環境を、低酸素環境を特徴とする群、CD8+T 細胞による抗腫瘍免疫が活発であるが同時に T 細胞の疲弊も認められる群、M2 型マクロファージや肥満細胞による抗腫瘍免疫の抑制が目立つ群、非同義変異が少なく抗原提示が生じていない群の 4 種類に分類した。また機械学習により腫瘍微小環境の特徴量を選択することで、IMMUGENO\_GRAM を作成した。患者の転帰を予測あるいは評価する際に、本研究の結果をふまえた患者背景の検討を行うことで、より効果的な個別化治療の適用が期待される。

## 2. 序文

### 食道扁平上皮癌の疫学について

食道がんは、がんの中で罹患数としては世界で 8 番目に多く、がん関連死亡者数としては 6 番目である<sup>1</sup>。2018 年に食道がんの新規罹患患者数は 572,034 人、死亡者数は 508,585 人であり、世界的な健康問題として注目されている。わが国は 2019 年の統計によると食道がん死亡者数<sup>2</sup>は 11,619 人であり、がん関連死としては肺、大腸、胃、膵臓、肝臓、胆嚢・胆管に次ぐ 7 番目となる約 3% に相当する。食道がんの年齢調整死亡率では男性 7.1 人、女性 1.2 人で、男女ともに横ばいからやや減少傾向となっている。年齢調整罹患率は 9.9 人であり、性別で分けると男性は 17.6 人で、大腸、胃、前立腺、肺、肝および肝内胆管に次いで 6 番目に多く、女性は 3.2 人で、10 番目以降である。わが国における食道がん患者の性別は男女比が約 6 : 1 と男性に多く、好発年齢は 60 代から 70 代であり全体の年代の約 74% を占めている。食道がんの罹患率は男性でゆるやかに増加傾向にあり、女性は横ばいである。

日本食道学会による全国調査<sup>3</sup>によれば、早期に発見された場合には 5 年生存率は 90% に近く良好である。しかしながら早期の食道がんは臨床症状が不

明瞭であるため、半数以上が進行期に発見され、進行がんの 5 年生存率は 15-20%程度まで急落する。食道扁平上皮癌 (Esophageal Squamous Cell Carcinoma: ESCC)の多くは高齢患者であり、アルコールやたばこの大量消費、食習慣の偏りによる栄養不良や、その他の併存疾患を含む臨床背景を有することが一般的である。その結果として、進行癌の患者は標準的な複合治療や手術に耐えることができず、また手術を行わずに化学放射線療法を選択した患者の全生存期間は、切除術を受けた患者に比べて有意に悪い。

発生部位は、胸部中部食道 (Mt)が 50%と最も多く、次いで胸部下部食道 (Lt)が 25%、胸部上部食道 (Ut) が 12%、腹部食道 (Ae) が 6%、頸部食道 (Ce)が 5%と続いている。食道がんの主な組織型は扁平上皮癌と腺癌であり、この組織型の発生率は地理的分布と密に関連している<sup>4</sup>。バレット食道腺癌が欧米で増加していることはよく知られているが、わが国でも食道がん全体における腺癌の発生割合は 1995 年には 1.7%であったのが、5%まで増加傾向にある。とはいえ世界的に食道がんの 80%は ESCC であり、東アジアやアフリカ東部・南部では発生率が高く増加傾向にある<sup>5</sup>。わが国でも ESCC が 90%を占めている。北欧、西欧、北米、オセアニアで食道腺癌全体の 46%が発生しているのに対して、アジアや南欧で ESCC 全体の 79%が発生している<sup>6</sup>。

## 食道がんの標準治療

JCOG9907 試験において<sup>7</sup>、シスプラチンと 5-FU を用いて術前に化学療法を行った患者の 5 年生存率は 55%である一方で、術後に化学療法を行った患者は 5 年生存率が 43%と統計学的有意差をもって術前化学療法の効果が示された (Hazard ratio 0.73, 95%CI 0.54-0.99, p=0.04)。また術後合併症に差を生じないことも報告されている。進行食道がんや手術後再発症例に対しては抗がん剤による治療が追加されるが、転移を有する ESCC は化学療法に対して抵抗性を示すことが多く予後が不良であると報告された。また食道がんに対しても大腸がんや乳がんなどに投与されるような分子標的薬が期待されており、様々な臨床試験が行なわれているが、現時点では ESCC に著効する分子標的薬は見出されていない。

## がん免疫サイクル Cancer-Immunity cycle

腫瘍微小環境 (Tumor MicroEnvironment)における免疫応答は Chen と Mellman によってがん免疫サイクル Cancer-Immunity Cycle<sup>8</sup>として評価された。抗腫瘍免疫ががん細胞を効果的に死滅させるためには、一連の段階的な免疫応答が開始され、それが反復的に進行拡大する必要がある。



1. 最初に樹状細胞 (Dendritic Cell: DC)などの抗原提示細胞 (Antigen Presenting Cell: APC)に腫瘍抗原が取り込まれる。
2. 樹状細胞は MHC-IあるいはMHC-IIに結合させた抗原を T細胞に提示しつつリンパ節へと遊走する。
3. リンパ節に到達した APCにより、抗原特異的な活性を有する T細胞のプライミングおよび活性化が生じる。エフェクターT細胞と Treg細胞の比率が免疫応答の方向性において重要な鍵となることが知られている。
4. T細胞が脈管を經由して腫瘍まで遊走する。
5. 血管内皮をこえて腫瘍内に T細胞が浸潤する。
6. T細胞受容体 TCR と MHC-Iに結合した抗原との相互作用を介してがん細胞を特異的に認識する。
7. 標的のがん細胞を障害する。

がん細胞が障害されると、さらに腫瘍関連抗原が放出され上記のサイクルを繰り返す。がん免疫サイクルは加速し続けるはずであるが、実際の担がん患者ではこのサイクルが適切に機能していない。例として腫瘍抗原が APCに認識されない、樹状細胞や T細胞が抗原を異物ではなく自己として認識してしまい細胞を障害する系ではなく免疫寛容が誘導される、T細胞が適切に腫瘍まで遊走浸

潤しない、など上記のどのステップが障害されても効果的な抗腫瘍免疫の誘導は困難となり、がん細胞は免疫機構から逃避する。

また一連のサイクルが維持されるためには炎症性サイトカインを含む適切な微小環境が整っている必要がある。PD-1 や CTLA-4 のような抑制性受容体の関与を介して T 細胞の機能が抑制されると、免疫からの逃避や腫瘍増殖が引き起こされる<sup>9</sup>。PD-L1 は通常 APC の表面上に発現しているが、がん細胞や TME に存在する非形質転換細胞の表面上にも強く発現していることが報告された<sup>10</sup>。がんの 20-50%に免疫調節因子である PD-L1 が発現していることは、PD-L1/PD-1, PD-L1/B7.1, PD-L2/PD-1 の相互作用を標的とする免疫療法の開発につながった<sup>11,12</sup>。活性化されたエフェクターT細胞の PD-1 に、がん細胞または免疫細胞の PD-L1 が結合すると、リン酸化酵素 SHP-2 のリクルートとそれに続く PI3K カスケードが不活化される<sup>13</sup>。このカスケードはがん細胞の障害に必要な細胞障害性メディエーターの分泌や産生を抑制するが、PD-L1/PD-1 相互作用の遮断によりこのカスケードが阻害されると、T 細胞の細胞障害活性が可逆的に取り戻される。また興味深いことに、抗 PD-L1 抗体や抗 PD-1 抗体が腫瘍に対して有意な奏効を示した場合、その多くで腫瘍縮小効果は比較的長期にわたり維持される。例えばメラノーマでは抗 PD-1 抗体ニボルマブによる 31%の全奏効率と 18.4~117.0 週間以上の奏効期間が報告された<sup>12,14</sup>。また別の抗 PD-1 抗

体ランブルロリズマブでも 38%の全奏効率と 1.9~10.8 か月の奏効期間が報告されている<sup>15</sup>。ESCC に対して行われた抗 PD-1 抗体ペンブルロリズマブの非盲検単剤試験である KEYNOTE180 試験では FDA の検査で PD-L1 の Combined Positive Score が 10 点以上とされた ESCC 患者 35 人の全奏効率は 20% (95%CI: 8~35%)であり、奏効期間は 4.2~25.1 か月以上で、71% (5 人)に 6 か月以上、57% (3 人)に 12 か月以上の長期にわたる効果が確認された<sup>16</sup>。

このようにがんに対する免疫療法は非常に注目されており、免疫チェックポイント分子を阻害する抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-1/PDL1 抗体などの分子標的薬が次々と開発され、臨床試験では様々ながん種に対する有効性が示されつつある。免疫応答の抑制は自己免疫による組織損傷を防ぐための生理的な機構であると考えられているが、PD-L1 発現を阻害することで引き起こされる自己免疫はすべての患者に引き起こされるわけではなく<sup>17</sup>、グレード 3~4 の治療関連有害事象は、治療を受けた患者の 13%~21%で発生したと報告された<sup>14,15</sup>。また自己免疫が引き起こされた患者も、その多くは支持療法やステロイド投与による免疫抑制によって容易に症状が制御された。この安全性も免疫治療が期待される理由の一つである。

さらに免疫チェックポイント阻害薬は、すでに複数の化学療法を受けた患者に対して 2nd line 以降として投与された場合においても、生存期間の延長

を可能にすることで注目された。その場合においても副作用は比較的軽微なものにとどまり、多くの患者に長期間にわたる治療継続を可能とすることが期待されている<sup>18</sup>。先に述べた KEYNOTE-180 は 2nd line 以上の全身治療を受けた進行・転移性の ESCC 患者を対象とした第 II 相臨床試験である<sup>16</sup>。

ただしがん免疫は単一遺伝子により制御されているわけではなく、微小環境を含んだ ecosystem として機能しており、その全体を免疫環境として評価しなければならない。腫瘍細胞における PD-L1 の発現の高い症例において、抗 PD-1 抗体の効果が高かったとする報告や<sup>19</sup>、腫瘍細胞だけでなく腫瘍内に浸潤する免疫細胞などを含む間質細胞上の PD-L1 発現の多寡が抗 PD-L1 抗体の効果と有意に関連していたとする報告<sup>20</sup>がある一方で、免疫染色等で PD-L1 発現量を推定することは必ずしも治療効果を明確に規定しないとする報告も存在する<sup>21</sup>。また免疫チェックポイント阻害薬は高額な治療薬であり、費用対効果の評価は社会的に重要である。治療の有効性を事前に予測するため、あるいは治療継続の是非を判定するためには TME を評価する新たな枠組みの探索が必要となる。患者ごとに異なる TME をより詳細に分析することで、治療効果のさらなる改善が期待される。本論文では ESCC を取りまく免疫環境を含めた TME を RNA sequencing を通して評価することにより、新たな ESCC の分類と有効性が期待される治療について考察する。

### 3. 方法

#### Material

本研究では 2001 年 6 月 22 日から 2016 年 8 月 19 日までに国立がん研究センター中央病院で行われた ESCC に対する手術検体 99 症例のうち、文書による同意が得られなかった 1 症例と、十分な量の研究用検体が採取できなかった 1 症例を除いた 97 症例に対して解析を行った (Table 1)。新鮮凍結検体は国立がん研究センターバイオバンクから提供され、すべての症例は日本人である。癌組織 ESCC と非癌部組織 NT は手術検体から採取され、すべての検体はヘマトキシリン・エオシン染色標本に基づいて、病理専門医により確定診断がなされた。検体番号は食道を意味する接頭辞「es」と、癌を意味する接尾辞「T」または非癌部を意味する接尾辞「N」を用いて表記する。うち 19 人に対して術前治療が行われ、化学療法として FP 療法 (5FU+CDDP) が 14 人、DCF 療法 (5FU+CDDP+DTX) が 1 人、ならびに化学療法 (5FU+CDDP)+放射線療法が 4 人である。

ESCC(n=97)		
性別	男性	82(85%)
	女性	15(15%)
年齢		64.6±8.7
飲酒習慣	あり	89(92%)
	なし	8(8%)
喫煙習慣	あり	81(84%)
	なし	16(16%)
術前治療	あり	19(20%)
	5FU+CDDP	14(14%)
	5FU+CDDP+rad	4(4%)
	5FU+CDDP+DTX	1(1%)
	なし	78(80%)
T分類	T1b	2(2%)
	T2	12(12%)
	T3	78(80%)
	T4	5(5%)
N分類	N0	24(25%)
	N1	24(25%)
	N2	28(30%)
	N3	21(22%)
リンパ節転移	あり	72(74%)
	なし	25(26%)
リンパ管浸襲	ly0	47(48%)
	ly1	36(37%)
	ly2	10(10%)
	ly3	4(4%)
血管浸襲	v0	45(46%)
	v1	40(41%)
	v2	12(12%)
脈管浸襲	TVI0	28(29%)
	TVI1	69(71%)
組織学的分化度	well	34(35%)
	moderate	32(33%)
	poor	31(32%)
再発期間(day)		525.1±701.1
生存期間(day)		1890.7±1804.7

**Table 1:** ESCC 97 症例の臨床情報。

男性と女性の比率は 5.5:1 で食道がんの罹患率に近い。男性であることと飲酒歴には OR26.6 ( $p=1e-5$ ), 男性であることと喫煙歴には OR7.1 ( $p=0.003$ )の偏りが存在する (フィッシャー正確検定)。術前治療は、化学療法 (5FU+CDDP あるいは 5FU+CDDP+DTX)、並びに化学療法 (5FU+CDDP)+放射線療法である。

5FU: 5 Fluorouracil, CDDP: cisplatin, DTX: docetaxel, rad: radiation therapy

## RNA sequencing

凍結検体からトータル RNA を抽出するために miRNeasy Mini (Qiagen, Hilden, Germany)を使用した。抽出した RNA の濃度は Qubit™ RNA BR Assay Kit (Life Technologies Corporation of Grand Island, NY, USA)のプロトコルに従い定量した。続いて SureSelect Strand-Specific RNA Library Prep for Illumina Multiplexed

Sequencing のプロトコルに従い cDNA ライブラリを調製し、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) で確認された良好な品質の cDNA ライブラリのみを対象として次世代シーケンサ HiSeq 1500 (Illumina, San Diego, CA) による RNA シークエンスを行った。

### edgeR による DEG の同定

Fastq paired end 形式で得られた RNA sequencing のリードデータを解析ソフトウェア Tophat2 (ver2.4.0) を用いて GRCh38 にマッピングして bam ファイルを得た。続いて subread-2.0.1 featureCounts で変換したカウントデータを転写産物長で補正して RPKM を計算した。R 統計パッケージにより群間のユークリッド距離をワード法により計測することで教師なし階層的クラスタリングを行った。発現変動遺伝子 (Differentially Expressed Genes: DEG) を同定するためには edgeR を用いて exact test を行った。exact test では正規化係数の計算と分散の推測を行い負の二項分布を推定してから、その分布において観測値よりも大きい値が出現する確率を p-value として発現変動を検出した。

## GSEAによるTMEの評価

RNA sequencingにより生成された mRNA 発現プロファイルに対して、群間の発現変動に応じた生物学的な意味を解釈する必要がある。遺伝子発現データから TME を評価するにあたり Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)<sup>22</sup> を用いた。GSEA を使用した理由として

1. 多変量解析を行うと個々の遺伝子が統計的有意性を満たさず、生物学的差異とノイズ差が分解できない。
2. あるいは統計的に有意な遺伝子のリストを生成した場合にも、そのリストが有する生物学的な意味を理解できない。
3. 同じ生物学的な系を対象とした場合においても、異なる研究から生成された統計的に有意な遺伝子のリストは重複しなかったと報告されている<sup>23</sup>。

GSEA は microarray や RNA sequencing のようなビッグデータにおける解析上の課題を克服するために開発された手法であり、生化学的経路や、過去の研究で明らかにされた生物学的知見に基づいて遺伝子セットを定義する。

具体的には ESCC 97 症例および NT 12 症例について、各遺伝子の発現量である RPKM を対数処理  $\log(\text{RPKM}+1)$  して遺伝子ごとに Z 標準化した。NT 12 症例を基準として ESCC 1 症例ごとの enrichment score (ES) を算出するために、各症例の Z score を用いて遺伝子を降順に並べ、下記に示す遺伝子セット<sup>24,25</sup> を



使用して解析ソフトウェア GSEA (v4.1.0)による解析を行った。続いて遺伝子をランダムに並び替えた場合の ES を 1000 回計算する。この数値を使用して実際の ES を補正することにより、各症例の各遺伝子群に対して normalized ES (NES), p-value, false discovery rate (FDR) を計算した。

### GSEA にあたり使用した遺伝子セットとその内訳

がん細胞を攻撃する エフェクター細胞の主役は CD8+ T 細胞である。免疫チェックポイント阻害剤は免疫の抑制を阻害する治療であるが、攻撃の主体である CD8+ T 細胞がそもそも存在しなければ効果は期待しにくい。実際にメラノーマでは腫瘍浸潤 CD8+ T 細胞の多寡が抗 PD-1 抗体の効果と関連していたと報告されている<sup>26</sup>。大腸がんにおいても Th1 細胞と細胞障害性 T 細胞浸潤が協調的に存在することが無病生存や全生存の点で良好な臨床転帰と関連したことが報告されている<sup>24</sup>。T 細胞は早期がんで高発現を示し、腫瘍の進行とともに減少するが、T 細胞の浸潤密度が低いことは予後不良<sup>27,28</sup>と関連するとされる。一方で生存期間の延長に正の相関を示した B 細胞は、好中球、マスト細胞、樹状細胞、マクロファージなどの自然免疫細胞の密度と同様に、腫瘍のステージに応じて増加した。また適応免疫細胞としては Tfh 細胞、Th1、CD8+ T 細胞、メモリーT細胞、B細胞に有意な相関が見出だされた<sup>24</sup>。また適応免疫細胞が記

憶表現型を獲得した場合には患者の長期生存が期待される。上記それぞれの免疫環境や微小環境を特徴とする遺伝子セットを構成するにあたり pan-cancer で報告されたシグネチャ<sup>25</sup>を参考とした。また T 細胞が疲弊したときに発現量が増加する遺伝子を exhausted CD8 として定義した。例えば活性化された T 細胞に発現する抑制性受容体である PD-1 は PD-L1 との結合により T 細胞の疲弊をもたらす、最終的には T 細胞の細胞障害性を阻害することが知られている<sup>29</sup>。癌上皮 ESCC と正常上皮 ESO に特徴的な遺伝子セットも定義した。低酸素環境の定義にはシステマティックレビュー<sup>30</sup>により同定された低酸素遺伝子発現シグネチャを参考とした。

### **Hypoxia**

NDRG1, P4HA1, BNIP3, BNIP3L, ADM, ALDOC, PLOD2, PGK1, P4HA2, DDIT4, MXI1, PLOD2, ERO1A, SLC2A1, ANGPTL4

### **ESCC**

PLA2G7, PRAME, MMP1, MMP3, MMP12, LILRB2, TREM2, CHST2, IGFBP2, IGFBP7, KCNJ8, EMILIN2, CTHRC1, ADGRE2, WDR72, LPCAT1, COL4A2, CCL4, SNX10

### **ESO**

KRT13, S100A9, KRT4, SPRR3, S100A8, KRT5, CRNN, KRT6A, RHCG, CSTB

### **Immature dendritic cell**

ACADM, AHCYL1, ALDH1A2, ALDH3A2, ALDH9A1, ALOX15, AMT, ARL1, ATIC, ATP5A1, CAPZA1, LILRA5, RDX, RRAGD, TACSTD2, INPP5F, RAB38, PLAU, CSF3R, SLC18A2, AMPD2, CLTB, C1orf162

### **Activated dendritic cell**

ABCD1, C1QC, CAPG, CCL3L3, CD207, CD302, ATP5B, ATP5L, ATP6V1A, BCL2L1, C1QB, SNURF, SPCS3, CCNA1, CEACAM8, NOS2, SRA1,

TNFRSF6B, TREM1, TREML1, RHOA, SLC25A37, TNFSF14, TREML4, VNN2, XPO6, CLEC4C, TNFAIP2, UBD, ACTR3, RAB1A, SLA, HLA-DQA2, SIGLEC5, SLAMF9

**Plasmacytoid dendritic cell**

CBX6, DAB2, DDX17, HIGD1A, IDH3A, IL3RA, MAGED1, NUCB2, OFD1, OGT, PDIA4, SERTAD2, SIRPA, TMED2, ENG, FCAR, IGF1, ITGA2B, GABARAP, GPX1, KRT23, PROK2, RALB, RETNLB, RNF141, SEC14L1, SEPX1, EMP3, CD300LF, ABTB1, KLHL21, PHRF1

**Natural killer cell**

AKT3, AXL, BST2, CDH2, CRTAM, CSF2RA, CTSZ, CXCL1, CYTH1, DAXX, DGKH, DLL4, DPYD, ERBB3, F11R, FAM27A, FAM49A, FASLG, FCGR1A, FN1, FSTL1, FUCA1, GBP3, GLS2, GRB2, LST1, BCL2, CDC5L, FGF18, FUT5, FZR1, GAGE2, IGFBP5, KANK2, LDB3

**Natural killer T cell**

BTN2A2, CD101, CD109, CNPY3, CNPY4, CREB1, CRTC2, CRTC3, CSF2, KLRC1, FUT4, ICAM2, IL32, LAMP2, LILRB5, KLRG1, HSPA4, HSPB6, ISM2, ITIH2, KDM4C, KIR2DS4, KIRREL3, SDCBP, NFATC2IP, MICB, KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2, NCR1, FOSL1, TSLP, SLC7A7, SPP1, TREM2, UBASH3A, YBX2, CCDC88A, CLEC1A, THBD, PDPN, VCAM1, EMR1

**CD56bright natural killer cell**

ABAT, C11orf75, C5orf15, CDHR1, DCAF12, DYNLL1, GPR137B, HCP5, HDGFRP2, KRT86, MLST8, ELMOD3, ENTPD5, FAM119A, FAM179A, CLIC2, COX7A2L, CREB3L4, CSF1, CSNK2A2, CSTA, CSTB, CTPS, CTSD, FST, GATA2, GMPR, HDC, HEY1, HOXA1, HS2ST1, HS3ST1, BCL11B, CDH3, MYL6B, NAA16, CIQA, CIQB, CYP27B1, EIF3M

**CD56dim natural killer cell**

CYP27A1, DDX55, DYRK2, RPL37A, NOTCH3, AKR7A3, GPRC5C, GRIN1, HLA-E, PORCN, PSMC4, UPP1, IL21R, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS5

**Neutrophil**

CREB5, CDA, CHST15, S100A12, APOBEC3A, CASP5, MMP25, HAL, C1orf183, FFAR2, MAK, CXCR1, STEAP4, MGAM, BTNL8, CXCR2, TNFRSF10C, VNN3

**Eosinophil**

GIPR, KRT18P50, LRMP, FOSB, RRP12, GPR183, NR4A3, ST3GAL6, DEPDC5, PDE6C, PKD2L2, GPR65, IL5RA, P2RY14, DACH1, DAPK2, EMR3

**Mast cell**

ADAMTS3, CPA3, CMA1, CTSG, ARHGAP15, CPM, FCN1, FTL, HSPA6, ITGA9, RNASE3, S100A4, SIGLEC8, SLC6A4, PTGS2, EGR3, PILRA

**MDSC**

CCR2, CD14, CD2, CD86, CXCR4, FCGR2A, FCGR2B, FCGR3A, FERMT3, GPSM3, IL18BP, IL4R, ITGAL, ITGAM, PARVG, PSAP, PTGER2, PTGES2, S100A8, S100A9

**Monocyte**

ASGR2, CFP, ASGR1, CD1D, UPK3A, ACTG1, ANXA5, ATP6V1B2, CFL1, DAZAP2, CTBS, EMR4P, HIVEP2, MARCKSL1, MBP, MMP15, PNPLA6, TMBIM6, PQBP1, TEX264, IKZF1

**Macrophage**

AIF1, CCL1, CCL14, CCL23, CCL26, CD300LB, CNR1, CNR2, EIF1, EIF4A1, FPR1, FPR2, FRAT2, GPR27, GPR77, RNASE2, MS4A2, BASP1, IGSF6, HK3, VNN1, FES, NPL, FZD2, FAM198B, HNMT, SLC15A3, CD4, TXNDC3, FRMD4A, CRYBB1, HRH1, WNT5B

**T follicular helper cell**

B3GAT1, CDK5R1, PDCD1, BCL6, CD200, CD83, CD84, FGF2, GPR18, CE-BPA, CECR1, CLEC10A, CLEC4A, CSF1R, CTSS, DMN, DPP4, LRRC32, MC5R, MICA, NCAM1, NCR2, NRP1, PDCD1LG2, PDCD6, PRDX1, RAE1, RAET1E, SIGLEC7, SIGLEC9, TYRO3, CHST12, CLIC3, IVNS1ABP, KIR2DL2, LGMN

**Type 1 T helper cell**

CD70, TBX21, ADAM8, AHCYL2, ALCAM, B3GALNT1, BBS12, BST1, CD151, CD47, CD48, CD52, CD53, CD59, CD6, CD68, CD7, CD96, CFHR3, CHRM3, CLEC7A, COL23A1, COL4A4, COL5A3, DAB1, DLEU7, DOC2B, EMP1, F12, FURIN, GAB3, GATM, GFPT2, GPR25, GREM2, HAVCR1, HSD11B1, HUNK, IGF2, RCSD1, RYR1, SAV1, SELE, SELP, SH3KBP1, SIT1, SLC35B3, SIGLEC10, SKAP1, THUMPD2, TIGIT, ZEB2, ENC1, FAM134B, FBXO30, FCGR2C, STAC, LTC4S, MAN1B1, MDH1, MMD, RGS16, IL12A, P2RX5, CD97, ITGB4, ICAM3, METRNL, TNFRSF1A, IRF1, HTR2B, CALD1, MOCOS, TRAF3IP2, TLR8, TRAF1, DUSP14

**Type 2 T helper cell**

ASB2, CSRP2, DAPK1, DLC1, DNAJC12, DUSP6, GNAI1, LAMP3, NRP2, OSBPL1A, PDE4B, PHLDA1, PLA2G4A, RAB27B, RBMS3, RNF125, TMPRSS3, GATA3, BIRC5, CDC25C, CDC7, CENPF, CXCR6, DHFR, EVI5, GSTA4, HELLS, IL26, LAIR2

**Type 17 T helper cell**

IL17A, IL17RA, C2CD4A, C2CD4B, CA2, CCDC65, CEACAM3, IL17C, IL17F, IL17RC, IL17RE, IL23A, ILDR1, LONRF3, SH2D6, TNIP2, ABCA1, ABCB1, ADAMTS12, ANK1, ANKRD22, B3GALT2, CAMTA1, CCR9, CD40, GPR44, IFT80

**Activated CD4 T cell**

AIM2, BIRC3, BRIP1, CCL20, CCL4, CCL5, CCNB1, CCR7, DUSP2, ESCO2, ETS1, EXO1, EXOC6, IARS, ITK, KIF11, KNTC1, NUF2, PRC1, PSAT1, RGS1, RTKN2, SAMSN1, SELL, TRAT1

**Effector memory CD4 T cell**

ATM, CASP3, CASQ1, CD300E, DARS, DOCK9, EXOSC9, EZH2, GDE1, IL34, NCOA4, NEFL, PDGFRL, PTGS1, REPS1, SCG2, SDPR, SIGLEC14, SIGLEC6, TAL1, TFEC, TIPIN, TPK1, UQCRB, USP9Y, WIPF1, ZCRB1

**Central memory CD4 T cell**

ABHD3, AHNAK, ANXA2P2, AQP3, ATHL1, BMI1, BZW2, CD63, COL4A1, CYLD, ELMO2, FYN, GLIPR1, GSS, IFITM2, ITGB1, ITGB2, KLF5, LSP1, NDUFB9, PKM2, SFXN3, SIRPG, SMAD4, STX4, TRADD, VIM, XRCC6

**Activated CD8 T cell**

ADRM1, AHS1, C1GALT1C1, CCT6B, CD37, CD3D, CD3E, CD3G, CD69, CD8A, CETN3, CSE1L, GEMIN6, GNLY, GPT2, GZMA, GZMH, GZMK, IL2RB, LCK, MPZL1, NKG7, PIK3IP1, PTRH2, TIMM13, ZAP70

**Effector memory CD8 T cell**

ACAP1, APOL3, ARHGAP10, ATP10D, C3AR1, CCR5, CD160, CD55, CFLAR, CMKLR1, DAPP1, FCRL6, FLT3LG, GZMM, HAPLN3, HLA-DMB, HLA-DPA1, HLA-DPB1, IFI16, LIME1, LTK, NFKBIA, SETD7, SIK1, TRIB2

**Central memory CD8 T cell**

ACTN4, ADAM12, ADCY9, F13A1, FCER1G, FCGR3B, FGF7, FKBP4, GLUD1, GM2A, GUSB, IL1RN, NOL11, NTRK1, RARA, RNF128, SIGLEC1, TNFRSF11A, TOX4, UBA52, ULBP1

**Exhausted CD8**

HAVCR2, PDCD1, ENTPD1, TNFRSF9, CCL3, PHLDA1, SIRPG, CTLA4, TIGIT, SNAP47, WARS, CD27, RGS1, TNFRSF1B, CD27-AS1, ACP5, AFAP1L2, MYO7A, AKAP5, ENTPD1-AS1, ADGRG1, TOX, LAYN, CD38, ITGAE, RGS2, CCND2, FKBP1A, MTHFD1, GALM, CSF1, SNX9, ICOS, LYST, MIR155HG, TPI1, SARDH, GZMB, CREM, HLA-DMA

**Gamma delta T cell**

ACP5, AQP9, BTN3A2, C1orf54, CARD8, CCL18, CD209, CD33, CD36, CDK5, IL10RB, KLRF1, LGALS1, MAPK7, KLHL7, KRT80, LAMC1, LCORL, LMNB1, MEIS3P1, MPL, FABP1, FABP5, FADD, MFAP3L, MINPP1, RPS24, RPS7, RPS9, ABP1, CCL13

**Regulatory T cell**

CCL3L1, CD72, CLEC5A, FOXP3, ITGA4, L1CAM, LIPA, LRP1, LRRC42, MARCO, MMP12, MNDA, MRC1, MS4A6A, PELO, PLEK, PRSS23, PTGIR, ST8SIA4, STAB1

**Immature B cell**

CD22, CYBB, FAM129C, FCRL1, FCRL3, FCRL5, FCRLA, HDAC9, HLA-DQA1, HVCN1, KIAA0226, NCF1, NCF1B, P2RY10, SP100, TXNIP, STAP1, TAGAP, ZCCHC2

**Activated B cell**

ADAM28, CD180, CD79B, BLK, CD19, MS4A1, TNFRSF17, IGHM, GNG7, MICAL3, SPIB, HLA-DOB, IGKC, PNOC, FCRL2, BACH2, CR2, TCL1A, AKNA, ARHGAP25, CCL21, CD27, CD38, CLEC17A, CLEC9A, CLECL1

**Memory B cell**

AICDA, CCNA2, CDKN3, CLCN5, ENPP1, FCER1A, FCRL4, MYC, RUNX2, SORL1, SOX5, STAT5A, STAT5B, TLR9

**Trafficking and infiltration of immune cells**

CXCL9, CXCL10, CCL5, CX3CL1, LFA1, ICAM1, SELE,

**Recognition of tumor cells by immune cells**

HLA-A, HLA-B, HLA-C, B2M, TAP1, TAP2

**Blood vessel**

CDH5, NM\_001795

**Lymph vessel**

PDPN, PIR-FIGF, VEGFC, NM\_006474, NR\_037859, NM\_005429

**Checkpoint inhibitor's target on T**

CTLA4, PDCD1, LAG3, HAVCR2, BTLA, C10orf54, TNFRSF14

**Checkpoint stimulator's target on T**

ICOS, CD28, TNFRSF9, TNFRSF4, TNFRSF18, CD40LGA

**Checkpoint inhibitor's target on APC**

IDO1, TNFRSF10C, CD274, PDCD1LG2, VTCN1, CD276, LGALS9, CD80, CD86, TNFSF14

**Checkpoint stimulator's target on APC**

ICOSLG, TNFSF4, TNFSF9, CD40, TNFSF18

## CIBERSORTx

腫瘍浸潤性白血球 TIL は腫瘍免疫環境の不可欠な構成要素であり、予後や治療に対する反応と相関するが、自然免疫および適応免疫の両方を含む免疫細胞の不均一な混合物である。CIBERSORTx<sup>31</sup> はサポートベクター回帰 SVR と呼ばれる機械学習アプローチを使用して、密接に関連した細胞サブセットや、未知の混合物との分解を可能とする。また全遺伝子の発現レベルの中央値を推定することで、各免疫細胞を定量的に測定するスコアを生成することができる。この定量結果は腫瘍内での免疫細胞量を HE 染色から計算推論した場合とよく相関することが報告されている<sup>32</sup>。

本論文では Newman らによって提供されている遺伝子セット LM22<sup>33</sup> を用いて RPKM から 22 種類の白血球浸潤量を CIBERSORTx で計算した。LM22 は Affymetrix Human Genome U133A から定義された白血球遺伝子シグネチャーマトリックスであり、7 種類の T 細胞、ナイーブ B 細胞、メモリー B 細胞、血漿細胞、NK 細胞、骨髄細胞などを区別する 547 遺伝子から構成される。

## 特徴量の選択 Boruta\_py

特徴量選択 feature selection は機械学習において非常に重要である。サンプルごとに GSEA で計算した 40 種類の特徴量を選択するにあたり Boruta\_py を

使用した。Boruta\_py では判別に寄与しない偽の特徴量を作り、その特徴量を含んだ状態でランダムフォレストを訓練する。各特徴量の重要度を偽の特徴量と比較して複数回検定することで、真に重要な特徴量を選択することができる。

## 統計解析

すべての統計計算には R と Python を使用した。生存解析において、全生存期間は、手術日から死亡日または最終臨床フォローアップまでの期間と定義した。ESCC 以外を原因とする死亡は打ち切りとして計上した。患者サブグループの生存確率を推定するために Kaplan-Meier 法を用い、統計的比較のためにログランク検定を用いた。2 標本の比較には検定を繰り返し行うことによる多重性の問題を避けるため、等分散性を仮定せずにウェルチの t 検定を行った。分割表にはフィッシャーの正確検定を適用した。p 値は 0.05 未満のとき統計的に有意であるとした。

## 倫理

本研究は国立がん研究センターバイオバンク部門において署名付きの書面によるインフォームドコンセントを各患者から取得し、国立がん研究センター倫理審査委員会の承認を得て行われた (承認番号 2005-030)。

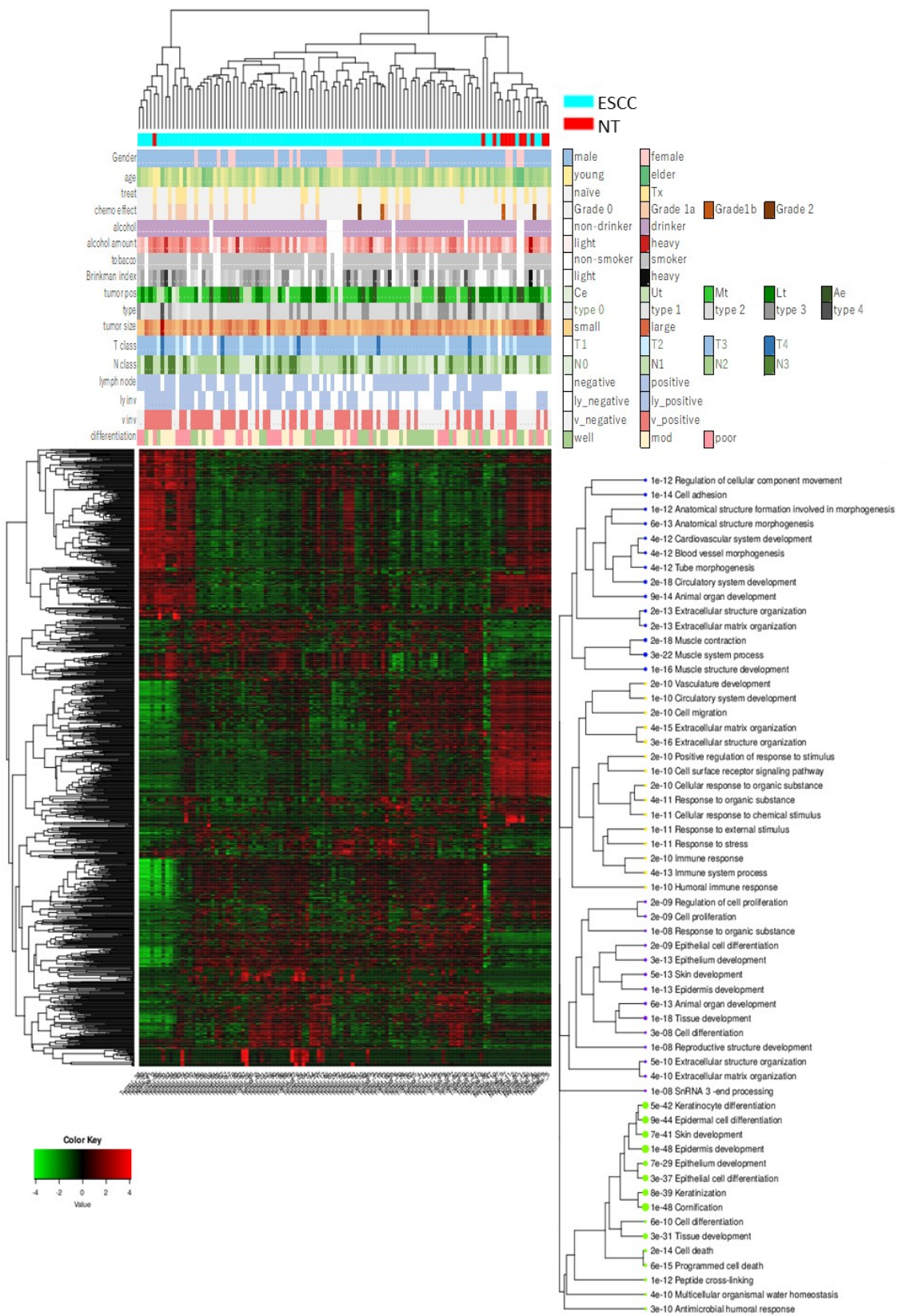


#### 4. 結果

ESCC 97 症例と NT 12 症例の全てにわたる標準偏差で遺伝子をランク付けして上位 1000 個の遺伝子を階層的クラスタリングに使用した。ESCC と NT はそれぞれ異なるクラスターに偏っており癌組織と非癌部組織は異なる発現プロファイルを有していることがわかる。上位 1000 個の遺伝子に対して階層的クラスタリングを行うと下記の機能を有する 4 つの遺伝子群に分類される(Fig. 1)。

- A. (青) 細胞接着や細胞の形態学的な変化、血管形成に関わる遺伝子群
- B. (黄) 免疫や細胞移動に関わる遺伝子群
- C. (紫) 細胞増殖や分化に関わる遺伝子群
- D. (緑) 角化やプログラム細胞死に関わる遺伝子群

A 群からは低酸素環境と転移に、B 群からは免疫微小環境と転移に何らかの相関が示唆される。C 群および D 群には ESCC の分化度に関わる遺伝子や、増殖あるいはアポトーシスに関わる遺伝子が確認される。



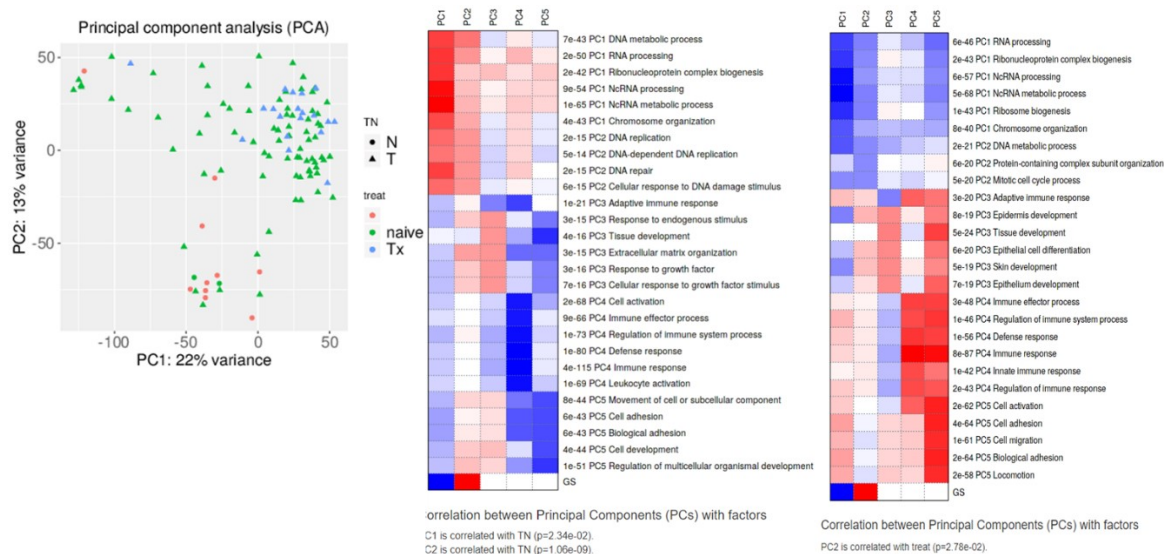
**Figure 1:** ESCC と NT に対する階層的クラスタリング。

横軸に症例を、縦軸に発現変動のみられた上位 1000 個の遺伝子を取り階層的クラスタリングを行った結果を示す。発現が低下している遺伝子を緑で、発現が上昇している遺伝子を赤で示した。

サンプル間で分散の大きかった遺伝子を分類すると低酸素環境と転移に関連する遺伝子群 (右、青で示す)、免疫環境と転移に関連する遺伝子群 (黄で示す)、ESCC の増殖やアポトーシスおよび分化度に関わる遺伝子群 (紫および緑で示す) が確認された。

症例の臨床情報はクラスタリング図の上方にカラーバーで示した。上から順に、ESCC (青) または NT (赤) の検体種別、性別 (男性は青、女性は赤)、年齢 (40 代を黄色、80 代を緑としてグラデーションで示した)、術前治療の有無 (naive は術前治療を行わなかった症例を、Tx は術前治療を行った症例を表す)、治療効果の病理学的評価 (Grade 評価)、飲酒習慣の有無、平均的なアルコール摂取量 (多飲者を濃赤としてグラデーションで示した)、喫煙習慣の有無、Brinkman Index (多量喫煙者を黒としてグラデーションで示した)、ESCC の占拠部位、ESCC の肉眼型分類、浸潤癌の大きさ (浸潤径が大きい癌を濃橙としてグラデーションで示した)、食道癌取扱い規約第 11 版による T 分類、および N 分類、リンパ管侵襲の有無、静脈侵襲の有無、分化度を表している。

続いて主成分分析において、各主成分を構成する変数の主成分係数を発現量として扱い、R 統計パッケージ Bioconductor3.12 PGSEA による経路分析を行ったところ、第 1 主成分には DNA や RNA の代謝に関わる系が、第 2 主成分には DNA 複製や DNA 損傷に関わる系が認められ、ESCC ではそのいずれかが亢進した状態にあり、いずれの主成分においても ESCC と NT で有意差が認められる。ESCC と NT を含めた場合においても、ESCC のみで計算を行った場合においても第 3 主成分は免疫応答に関わる系から構成され、サンプル間で免疫環境にばらつきがあることが示された (Fig. 2)。



**Figure 2:**

(左) 遺伝子発現に基づく主成分分析。

ESCC は△で、NT は赤色の○でプロットした。ESCC のうち術前治療を行っていない naive 症例を緑色で、術前治療を行った症例を青色で示している。

(中) Bioconductor3.12 PGSEA による主成分軸の経路分析。各主成分に対して正の因子負荷量を有する成分を赤で、負の因子負荷量を有する成分を青で示した。第1主成分には DNA や RNA の代謝に関わる系が、第2主成分には DNA 複製や DNA 損傷に関わる系が認められ ESCC と NT 間に有意差が示された。

(右) ESCC のみに対する主成分分析を行い、Bioconductor3.12 PGSEA による主成分軸の経路解析を行った。ESCC のみで計算を行った場合においても第3主成分に免疫応答に関わる系が確認され、ESCC サンプル間での免疫環境にばらつきがあることが示された。

次に edgeR により DEG の同定を行ったところ、ESCC で up regulation された遺伝子が 690 個、down regulation された遺伝子は 695 個存在した。同定された DEG に対して MsigDB 2020 を参照して経路分析を行ったところ、上皮間葉転換および細胞周期に関わる系や、IFN や TNF を含む炎症反応や血管新生に関わる系、低酸素環境や糖新生が亢進していることが明らかとなった (Table 2)。

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio
1	Epithelial Mesenchymal Transition	1.083e-38	5.415e-37	8.85
2	G2-M Checkpoint	3.158e-33	7.895e-32	8.09
3	E2F Targets	3.158e-33	5.263e-32	8.09
4	Interferon Alpha Response	1.537e-8	1.537e-7	5.35
5	TNF-alpha Signaling via NF-kB	4.582e-10	5.728e-9	4.12
6	Angiogenesis	0.00001703	0.00006550	6.79
7	Mitotic Spindle	1.669e-7	0.000001391	3.53
8	Inflammatory Response	1.829e-7	0.000001307	3.51
9	Glycolysis	1.829e-7	0.000001143	3.51
10	Hypoxia	0.000002749	0.00001527	3.21

**Table 2:** ESCC と NT 間で変動が見られた上位 10 個の分子経路 (Odds Ratio 順)。経路分析を行うにあたり edgeR により同定された DEG (up regulation 690 genes, down regulation 695 genes) を MsigDB2020 に参照した。p 値はフィッシャーの正確検定による。

同様の解析を、術前治療ありの Tx 群と術前治療なしの naive 群に対して行った。この解析に際して NT 検体は除外した。発現の変動がみられた上位 1000 遺伝子に対してクラスタリングを行うと、Tx 群の患者分布に弱い偏りが生じた。edgeR により DEG を同定したところ、Tx 群で up regulation された遺伝子

は 72 個、down regulation された遺伝子は 467 個存在した。同定された DEG に対して MsigDB2020 を参照して経路分析を行うと、先の解析と同様に上皮間葉転換および細胞周期に関わる系や、IFN や TNF を含む炎症反応や血管新生に関わる系、低酸素環境や糖新生が亢進していることが明らかとなった (Table 3)。

Index	Name	P-value	Adjusted p-value	Odds Ratio
1	Hypoxia	2.472e-8	0.000001236	13.24
2	Epithelial Mesenchymal Transition	0.000005209	0.0001302	10.29
3	TNF-alpha Signaling via NF-kB	0.0005950	0.009916	7.35
4	p53 Pathway	0.0005950	0.007437	7.35
5	mTORC1 Signaling	0.004799	0.04799	5.88
6	Inflammatory Response	0.004799	0.03999	5.88
7	Glycolysis	0.004799	0.03428	5.88
8	KRAS Signaling Up	0.004799	0.02999	5.88
9	Angiogenesis	0.1155	0.4442	8.17
10	PI3K/AKT/mTOR Signaling	0.04971	0.2485	5.60

**Table 3:** 術前治療ありの Tx 群と術前治療なしの naive 群間で変動が見られた上位 10 個の分子経路 (Odds Ratio 順)。経路分析を行うにあたり edgeR により同定された DEG (up regulation 72 genes, down regulation 467 genes) を MsigDB2020 に参照した。p 値はフィッシャーの正確検定による。

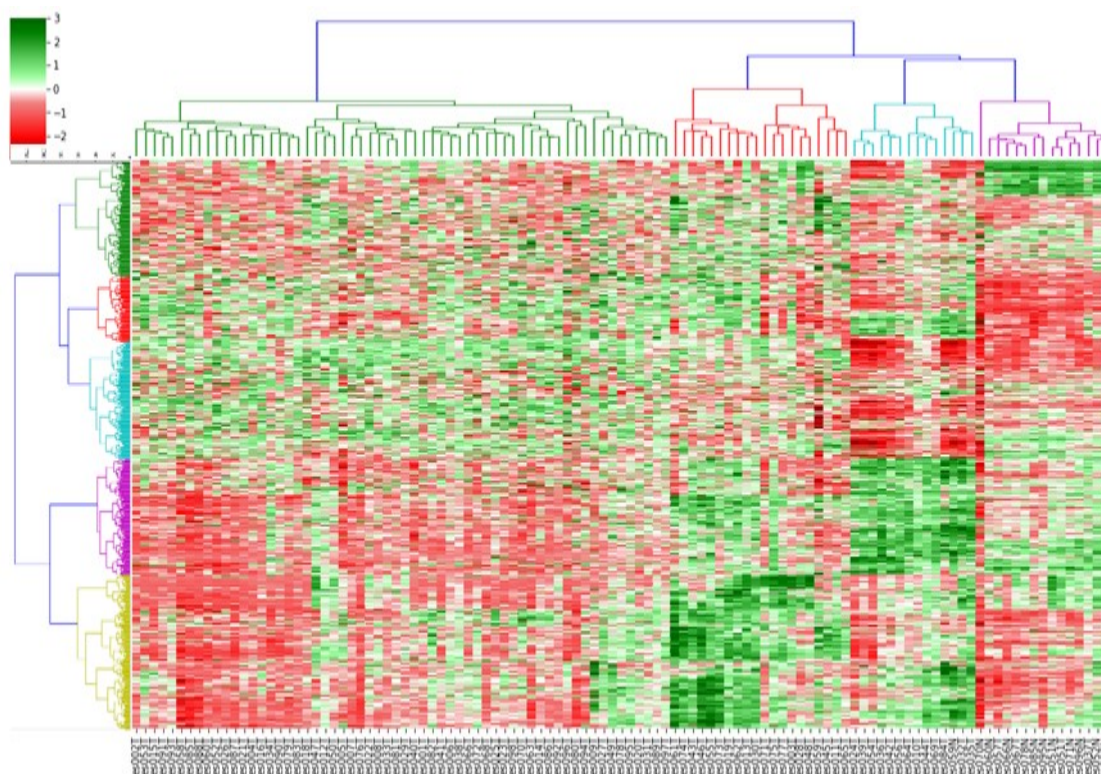
### TME を表現する遺伝子セットの設定

上記のクラスタリング、主成分分析、経路分析の結果として、ESCC はサンプルごとに免疫環境の分散が大きい癌であり、また術前治療を行うことによっても低酸素状態を含む TME に変動がみられることが明らかとなった。よって低酸素および免疫環境に関連する 886 個の遺伝子を上述の通り選び出し、その遺伝子のみを特徴量とした ESCC と NT のクラスタリングを行った (Fig. 3)。

クラスタリングにより生じた 4 分類を CLS1~CLS4 と呼称する。このクラスタリングによっても ESCC と NT の群間には大きな偏りがみられ、癌組織と非癌部組織の TME は大きく異なっていることがわかり、NT 12 症例のうち 11 症例 (92%)が CLS4 に分類された ( $p < 1e-15$ )。内訳は以下の通りである (Table 4)。

	ESCC	NT	total
CLS1(赤)	60		60 (55%)
CLS2(黄緑)	20		20 (18%)
CLS3(緑)	13	1	14 (13%)
CLS4(深緑)	4	11	15 (14%)

**Table 4:** 各クラスターに振り分けられた ESCC 検体数および NT 検体数。



**Figure 3:** 低酸素および免疫環境に関連する 886 個の遺伝子による階層的クラスタリングの結果を示す。症例を横軸に、遺伝子を縦軸にとり、発現量を赤 (低発現)~緑 (高発現)で表している。ESCC の微小環境は CLS1 (緑), CLS2 (赤), CLS3 (青), CLS4 (紫)の 4 つに分類された。



## 臨床情報とクラスタの関係

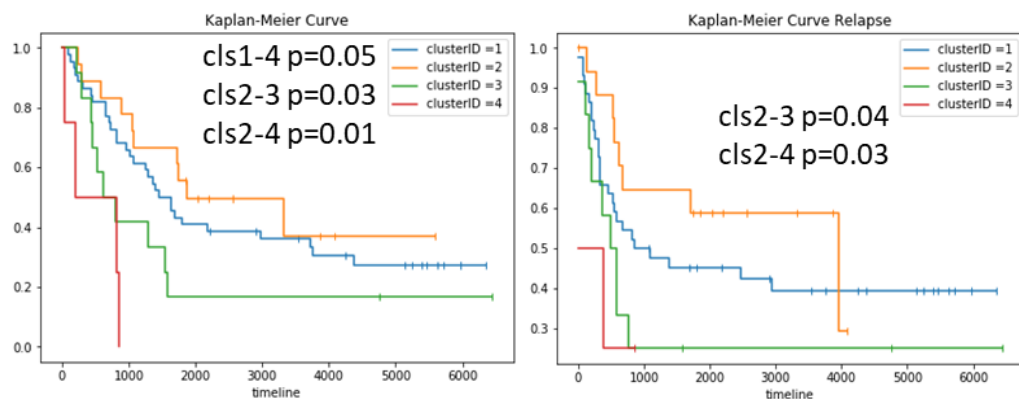
各クラスタに所属する ESCC 症例について、群間比較を行うことで食道扁平上皮癌の微小環境を分類および評価する。フィッシャーの正確検定によれば CLS1~CLS4 に特徴的な臨床情報および病理学的所見はそれぞれ以下の通りである (Table 5)。術前化学療法を行った患者 Tx 群は CLS1 に偏って分布している。また各クラスは肉眼型分類との相関が高く Type 2, 3, 4 の患者はそれぞれ CLS1, CLS2, CLS3 に偏っていた。食道がんの pN 分類は転移リンパ節の個数に規定されるが、pN3 (リンパ節転移の個数が 7 個以上)は CLS3 に偏っていた。

		Odds Ratio	p-value
CLS1	naïve	0.24	0.03
	Tx	4.12	0.03
	Type 2	4.25	0.002
	Type 3	0.33	0.03
CLS2	Type 2	0.33	0.04
	Type 3	4.03	0.01
CLS3	Type 4	15.09	0.04
	pN3	3.94	0.03

**Table5:** 群間に偏りが認められた臨床情報および病理学的所見。

術前化学療法を行った患者 Tx 群は CLS1 に偏って分布している。また各クラスタは肉眼型分類との相関が高く Type 2, 3, 4 の患者はそれぞれ CLS1, CLS2, CLS3 に偏っていた。食道癌の pN 分類は転移リンパ節の個数に規定されるが、pN3 (リンパ節転移の個数が 7 個以上)は CLS3 に偏っていた。

上記のクラスタについて生存解析を行うと CLS1 > CLS4 ( $p=0.05$ ), CLS2 > CLS3 ( $p=0.03$ ), CLS2 > CLS4 ( $p=0.01$ )にそれぞれ有意差が生じ (Fig. 4 左)、また無再発生存期間にも CLS2 > CLS3 ( $p=0.04$ ), CLS2 > CLS4 ( $p=0.03$ )に有意差が認められた (Fig. 4 右)。また群間で統計的に有意差を生じた臨床情報を説明変数に含めて Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析をした場合においても、クラスタ情報は生存期間に対して有意な影響をもつことが明らかとなった。その他に生存期間を有意に低下させる説明変数としてリンパ節転移 pN2 および pN3 が確認された (Table 6)。



**Figure 4:** クラスタごとの Kaplan-Meier 曲線 (左:疾患特異的生存率、右:無病生存率)。p 値はログランク検定による。

	coef	exp(coef)	se(coef)	z	Pr(> z )
clusterID	0.5617	1.7537	0.1934	2.904	0.003679 **
NclassN1	0.5867	1.7981	0.4065	1.443	0.148903
NclassN2	0.7970	2.2189	0.3851	2.069	0.038510 *
NclassN3	1.4515	4.2695	0.3951	3.674	0.000239 ***
TumorType	0.1156	1.1226	0.1911	0.605	0.545124
TreatTx	0.3356	1.3987	0.3507	0.957	0.338677

Signif. codes:

0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

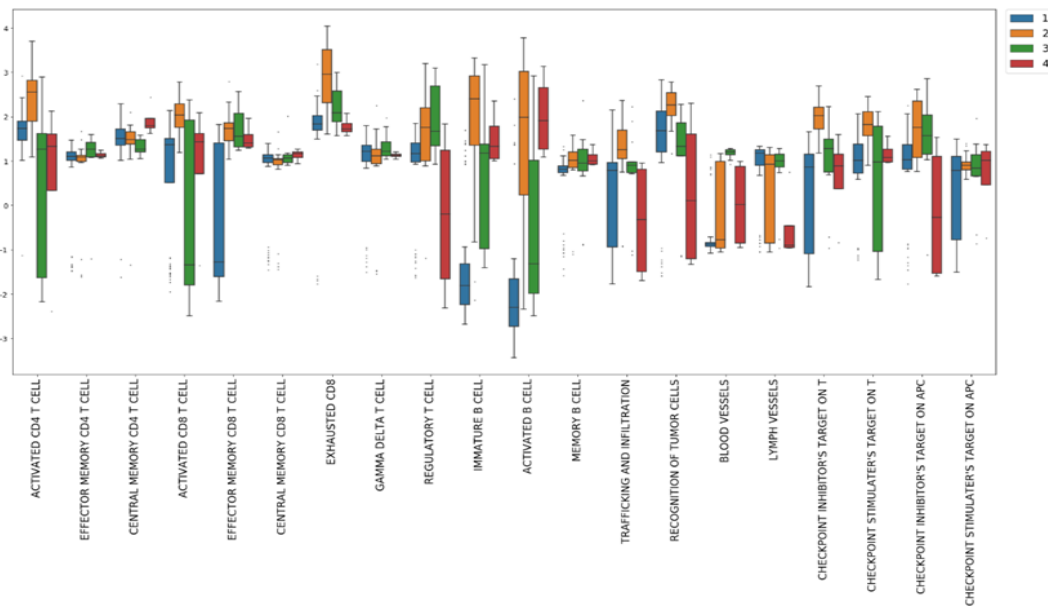
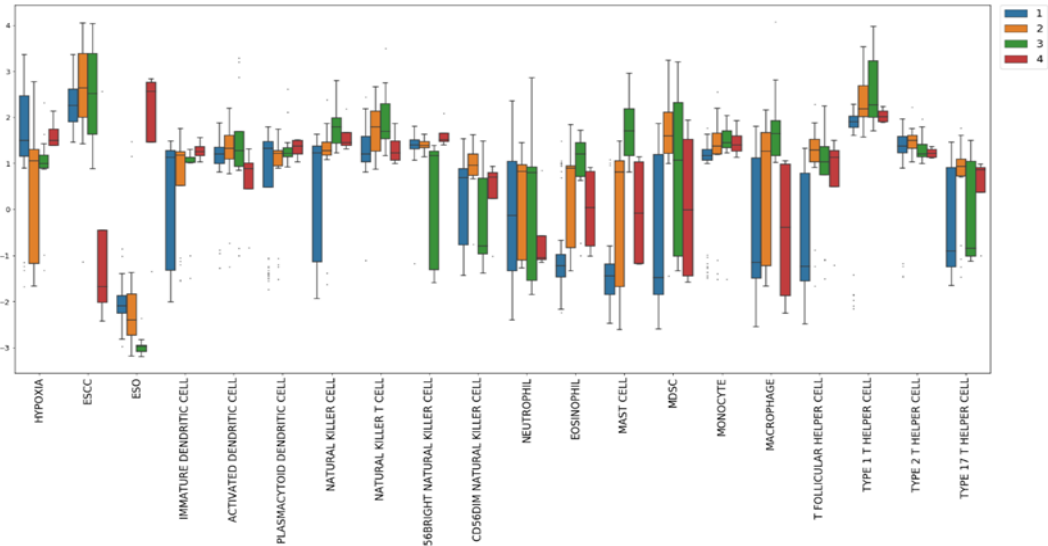
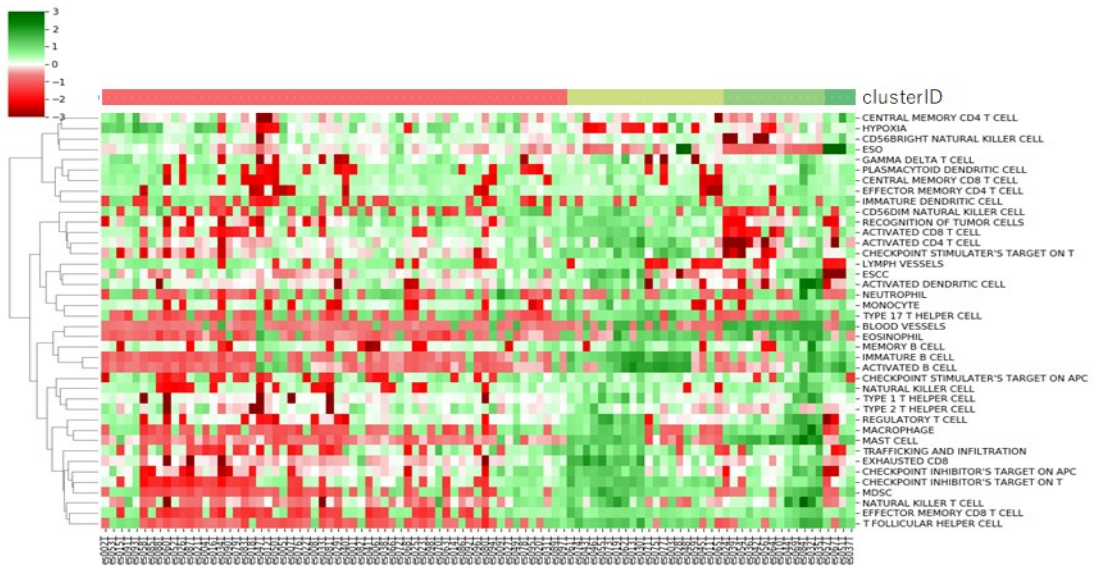
**Table 6:** Cox 比例ハザードモデルを利用した生存分析の多変量解析。

クラスタ分類 clusterID、pN 分類、肉眼型分類、および術前治療の有無を説明変数として、それぞれの対数ハザード比の推定値を coef、ハザード比の推定値を exp(coef)、対数ハザード比の標準誤差を se(coef)として算出した。それぞれの変数に対して Wald 検定を行い wald 統計量 z および p-value (Pr)を求めた。クラスタ分類 (p=0.0037)およびリンパ節転移 pN2 (p=0.039), pN3(p=2e-4)が生存期間に寄与していることが示された。

## GSEA 解析

各サンプルの TME を評価するため GSEA 解析を行った (Fig. 5)。NT12 症例をベースラインとして log<sub>2</sub>\_ratio による評価を行った。全サンプルをまとめた場合には ESCC が最も高く、ESO が最も低く評価されており、GSEA 解析は正しく機能していると考えられる。低酸素環境を表す HYPOXIA は 0 より大きくなり ESCC は NT と比較して低酸素環境に傾くことが確認された。また抗腫瘍免疫の主役は CD8+ T 細胞であるが、これも全体の傾向としては up regulation されており ESCC は抗腫瘍免疫が機能しうる腫瘍であることがわかる。さらにクラスタごとの傾向を以下に記載する。

CLS1 は血管形成に乏しく低酸素環境は群間で最も有意である。CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞に中等度の活性は認められるが、Effector Memory CD8+ T 細胞への分化傾向は乏しい。治療効果に必要な持続的な炎症の推進因子であるとされる B 細胞の活性が群間で最も低い。CLS2 は CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞の活性、および炎症の持続に必要な抗原認識や免疫細胞の遊走能も群間で最も高い。ただし同時に抑制性シグナルである PD-1, PD-L1, CTLA-4 の発現が目立ち T 細胞は疲弊している。低酸素環境は目立たない。CLS3 は CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞の活性が群間で最も低い。マクロファージやマスト細胞、好酸球浸潤が目立つ。血管が十分に形成され、低酸素環境は目立たない。CLS4 は非癌部組織と似た発現プロファイルを有する一群であり、正常上皮マーカー ESO の発現が高く、癌上皮マーカー ESCC の発現が低い。抗原認識が弱く、樹状細胞の活性が低い。



**Figure 5:** (上) GSEA による解析結果。

TME を規定する 884 遺伝子の階層的クラスタリングによって決定された症例の順列を維持して、縦軸に GSEA により計算された NES を配列した。NES が負となる遺伝子セット (すなわち ESCC より NT で発現量が高い遺伝子セット) を赤で、NES が正となる遺伝子セットを緑で示す。

(中)(下) GSEA で計算された NES の群間比較。

微小環境として定義した遺伝子セットごとの NES を群間で比較し箱ひげ図に表した。CLS1 を青、CLS2 を橙、CLS3 を緑、CLS4 を赤で示す。

<b>Hypoxia</b>	<b>p-value</b>	<b>Monocyte</b>	<b>p-value</b>	<b>Gamma delta T cell</b>	<b>p-value</b>
CLS1 > 2	0.0004	CLS4 > 1	0.0113	CLS3 > 1	0.0050
CLS1 > 3	0.0296			CLS3 > 4	0.0297
CLS4 > 2	0.0006	<b>Macrophage</b>	<b>p-value</b>	<b>Regulatory T cell</b>	<b>p-value</b>
CLS4 > 3	0.0294	CLS2 > 1	0.0216	CLS2 > 1	0.0035
		CLS3 > 1	0.0000	CLS3 > 1	0.0001
		CLS3 > 2	0.0035		
<b>ESO</b>	<b>p-value</b>	<b>T follicular helper cell</b>	<b>p-value</b>	<b>Immature B cell</b>	<b>p-value</b>
CLS1 > 3	0.0000	CLS2 > 1	0.0000	CLS2 > 1	0.0000
CLS4 > 1	0.0344	CLS3 > 1	0.0009	CLS3 > 1	0.0002
CLS2 > 3	0.0023			CLS4 > 1	0.0006
CLS4 > 2	0.0313	<b>Type 1 T helper cell</b>	<b>p-value</b>	<b>Activated B cell</b>	<b>p-value</b>
CLS4 > 3	0.0191	CLS2 > 1	0.0001	CLS2 > 1	0.0000
		CLS3 > 1	0.0006	CLS3 > 1	0.0255
<b>Immature dendritic cell</b>	<b>p-value</b>	CLS4 > 1	0.0068	CLS4 > 1	0.0018
CLS4 > 1	0.0000	CLS2 > 4	0.0411	CLS2 > 3	0.0102
CLS4 > 2	0.0304	CLS3 > 4	0.0377	CLS4 > 3	0.0040
<b>Plasmacytoid dendritic cell</b>	<b>p-value</b>	<b>Type 2 T helper cell</b>	<b>p-value</b>	<b>Memory B cell</b>	<b>p-value</b>
CLS3 > 1	0.0028	CLS2 > 4	0.0182	CLS4 > 1	0.0032
CLS4 > 1	0.0040				
CLS3 > 2	0.0342	<b>Type 17 T helper cell</b>	<b>p-value</b>	<b>Trafficking and infiltration</b>	<b>p-value</b>
CLS4 > 2	0.0398	CLS2 > 1	0.0012	CLS2 > 1	0.0004
<b>Natural Killer cell</b>	<b>p-value</b>	<b>Activated CD4 T cell</b>	<b>p-value</b>	<b>Recognition of tumor cells</b>	<b>p-value</b>
CLS2 > 1	0.0467	CLS2 > 1	0.0001	CLS2 > 1	0.0000
CLS3 > 1	0.0000	CLS1 > 3	0.0385	CLS2 > 3	0.0031
CLS4 > 1	0.0042	CLS2 > 3	0.0028		
CLS3 > 2	0.0164			<b>Blood vessel</b>	<b>p-value</b>
		<b>Effector memory CD4 T cell</b>	<b>p-value</b>	CLS3 > 1	0.0000
<b>Natural Killer T cell</b>	<b>p-value</b>	CLS4 > 1	0.0037	CLS3 > 2	0.0000
CLS2 > 1	0.0014				
CLS3 > 1	0.0024	<b>Central memory CD4 T cell</b>	<b>p-value</b>	<b>Lymph vessel</b>	<b>p-value</b>
CLS3 > 4	0.0399	CLS4 > 3	0.0384	CLS1 > 2	0.0370
				CLS1 > 4	0.0456
<b>CD56bright Natural Killer cell</b>	<b>p-value</b>	<b>Activated CD8 T cell</b>	<b>p-value</b>	CLS3 > 4	0.0480
CLS1 > 3	0.0210	CLS2 > 1	0.0000		
CLS2 > 3	0.0188	CLS2 > 3	0.0026	<b>Checkpoint inhibitor's target on T</b>	<b>p-value</b>
CLS4 > 3	0.0080			CLS2 > 1	0.0000
		<b>Effector memory CD8 T cell</b>	<b>p-value</b>	CLS3 > 1	0.0119
<b>CD56dim Natural Killer cell</b>	<b>p-value</b>	CLS2 > 1	0.0000	CLS2 > 3	0.0028
CLS2 > 1	0.0000	CLS3 > 1	0.0000		
CLS2 > 3	0.0014	CLS4 > 1	0.0000	<b>Checkpoint stimulator's target on T</b>	<b>p-value</b>
				CLS2 > 1	0.0000
<b>Eosinophil</b>	<b>p-value</b>	<b>Central memory CD8 T cell</b>	<b>p-value</b>	CLS2 > 3	0.0074
CLS2 > 1	0.0000	CLS3 > 1	0.0019	CLS2 > 4	0.0089
CLS3 > 1	0.0000	CLS4 > 1	0.0015		
		CLS3 > 2	0.0388	<b>Checkpoint inhibitor's target on APC</b>	<b>p-value</b>
<b>Mast cell</b>	<b>p-value</b>	CLS4 > 2	0.0327	CLS2 > 1	0.0000
CLS2 > 1	0.0017			CLS3 > 1	0.0404
CLS3 > 1	0.0000	<b>Exhausted CD8</b>	<b>p-value</b>		
CLS3 > 2	0.0000	CLS2 > 1	0.0000	<b>Checkpoint stimulator's target on APC</b>	<b>p-value</b>
		CLS3 > 1	0.0045	CLS2 > 1	0.0001
<b>MDSC</b>	<b>p-value</b>	CLS2 > 3	0.0036		
CLS2 > 1	0.0000	CLS2 > 4	0.0000		
CLS3 > 1	0.0049	CLS3 > 4	0.0164		

**Table 7:** 群間に有意差を認めた微小環境。

GSEA40 項目に対してウェルチの t 検定を行い群間で統計学的に有意差が認められた微小環境をすべて示した。

## CIBERSORTx

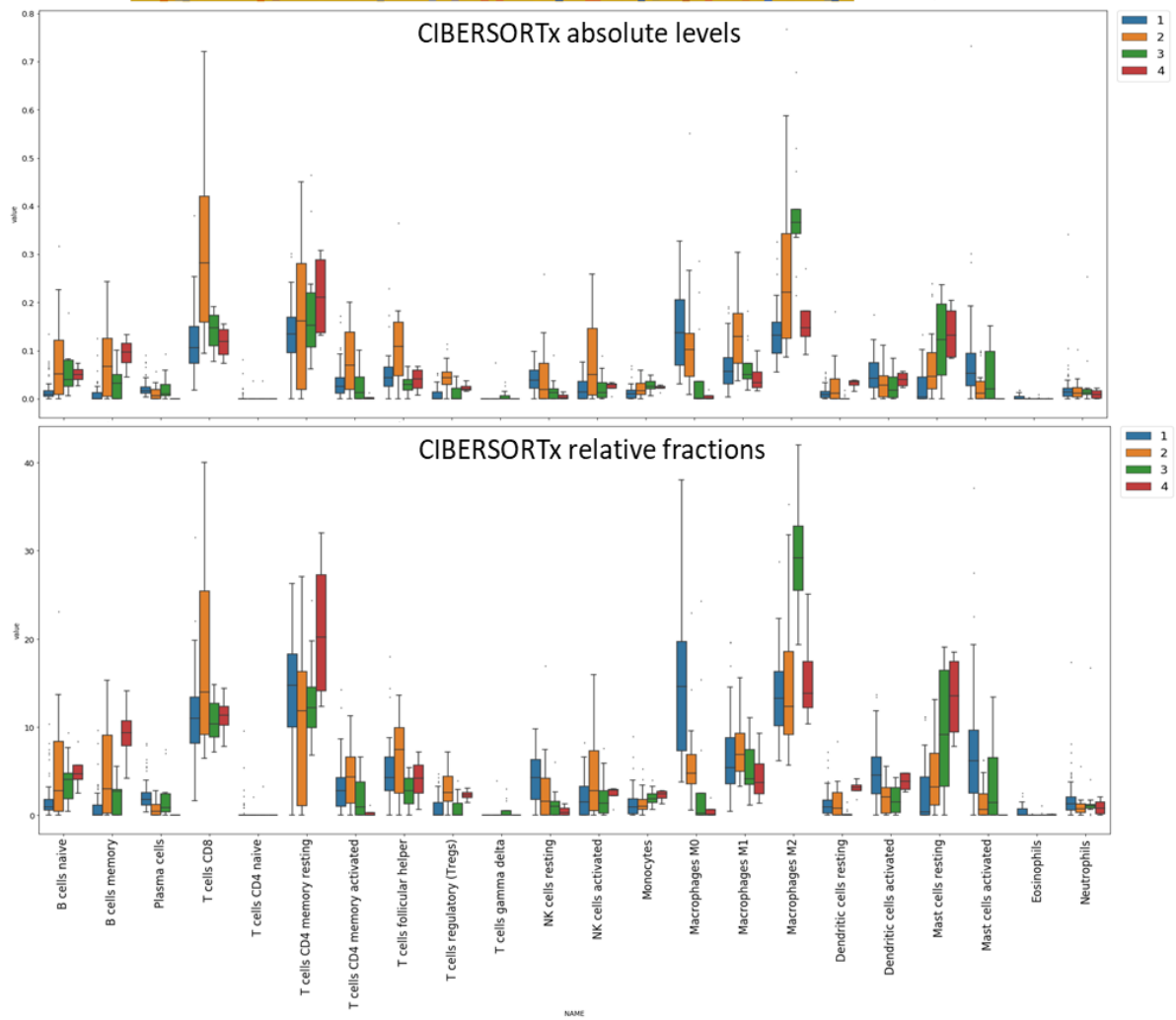
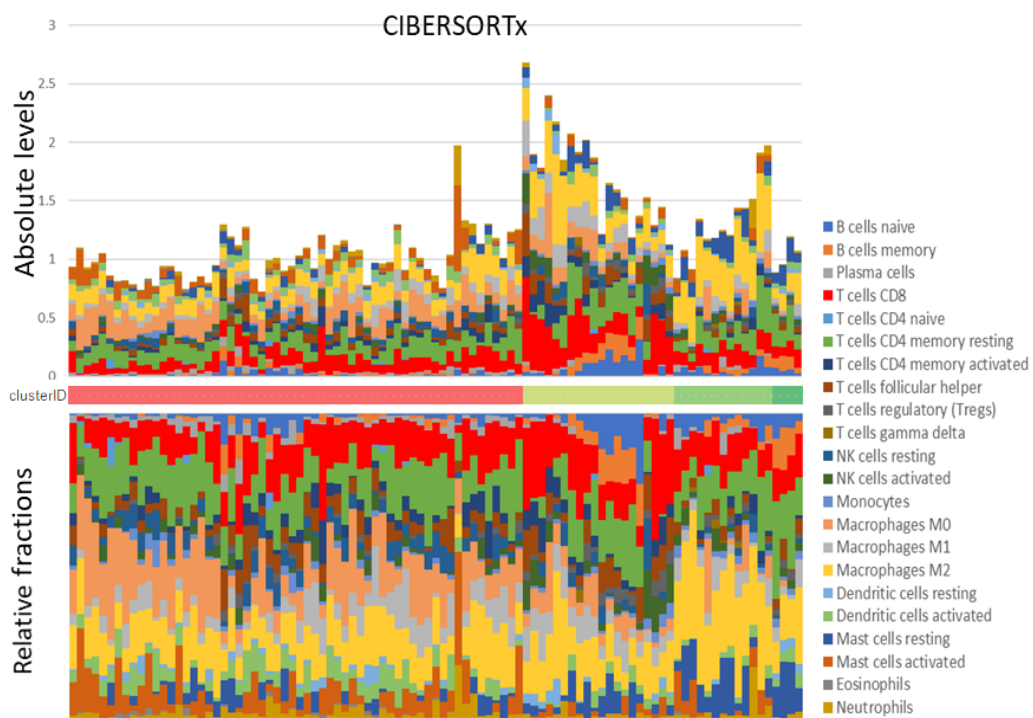
CIBERSORTx を利用して全遺伝子の発現レベルの中央値を推定することで、サンプル間で各免疫細胞を定量的に測定するスコアを生成した (Fig. 6)。計算行列である遺伝子セット LM22 においてマクロファージは M0 (naive), M1, M2 に分類される。

マクロファージはがんに対する免疫系の複雑な関係を調節する重要な細胞である。マクロファージには M1 型/M2 型という 2 つの主要なタイプがあり、互いに可塑性を有している。M1 型は病原体認識および殺傷のためのエフェクター分子として機能することができるマクロファージであり、活性酸素種 ROS と一酸化窒素 NO の発生、ならびに高レベルの IL-2 と低レベルの IL-10 発現によって特徴づけられる。逆に IL-4、IL-10 などのサイトカインは、M2 型マクロファージを誘導して抗炎症性効果を発揮する<sup>34</sup>。M2 型の性格を有する腫瘍関連マクロファージ (Tumor Associated Macrophage: TAM) は、免疫抑制、血管新生、転移、およびがん治療に対する反応不良に関与しており<sup>35</sup>、TAM の組織学的局在に関する臨床研究では、低酸素あるいは壊死性腫瘍への TAM の浸潤と予後の悪化との間に明確な相関関係があることが報告されている<sup>36</sup>。

CLS1 には M0 型マクロファージの浸潤が目立つ。低酸素環境で慢性的な炎症が継続して M0 型が M2 型に分極すると TME プロファイルが CLS3 に近づ

く可能性を有している。CLS2 は群間で最も免疫細胞の浸潤が目立ち、CD8+ T 細胞の絶対数および分画が高い。ただし同時に抑制性の Treg の絶対数および分画も高いことが確認される。CLS3 は M2 型マクロファージの絶対数および分画が群間で最も高い。また炎症細胞の総数は CLS1 をやや上回るが CD8+ T 細胞の分画は CLS1 と同程度である。CLS4 は非癌部組織と似た TME を有する一群であるが、食道の粘膜固有層には血管網と神経線維網が形成されており、T/B リンパ球、マクロファージ、樹状細胞などが散在性に分布している。特に MHC-II 抗原と CD1a 陽性の樹状細胞である Langerhans 細胞が扁平上皮細胞間に分布しており、これは非常に強い T 細胞活性化能を有していることが知られている。





**Figure 6:** CIBERSORTxによる解析結果。

(上) TME を規定する 884 遺伝子の階層的クラスタリングによって決定された症例の順列を維持して、LM22 に基づいて分類された 22 種類の白血球についてそれぞれの absolute levels と relative fractions を棒グラフで表示した。

(中) absolute levels を群間で比較し箱ひげ図に表した。

(下) relative fractions を群間で比較し箱ひげ図に表した。以降の箱ひげ図においては CLS1 を青、CLS2 を橙、CLS3 を緑、CLS4 を赤で示す。

<b>B cells naive</b>	<b>p-value</b>	<b>T cells follicular helper</b>	<b>p-value</b>	<b>Dendritic cells resting</b>	<b>p-value</b>
	CLS2 > 1 0.0039		CLS2 > 1 0.0093		CLS1 > 3 0.0001
	CLS3 > 1 0.0175		CLS2 > 3 0.0011		CLS4 > 1 0.0333
	CLS4 > 1 0.0431		CLS2 > 4 0.0107		CLS2 > 3 0.0137
			CLS1 > 3 0.0255		CLS4 > 3 0.0098
<b>B cells memory</b>	<b>p-value</b>	<b>T cells regulatory (Tregs)</b>	<b>p-value</b>	<b>Dendritic cells activated</b>	<b>p-value</b>
	CLS2 > 1 0.0014		CLS2 > 1 0.0000		CLS1 > 3 0.0109
	CLS4 > 1 0.0210		CLS2 > 3 0.0003		
	CLS2 > 3 0.0271		CLS2 > 4 0.0110	<b>Mast cells resting</b>	<b>p-value</b>
	CLS4 > 3 0.0340		CLS4 > 1 0.0468		CLS2 > 1 0.0091
<b>Plasma cells</b>	<b>p-value</b>	<b>NK cells resting</b>	<b>p-value</b>		CLS3 > 1 0.0013
	CLS1 > 2 0.0277		CLS1 > 3 0.0080		CLS4 > 1 0.0328
	CLS1 > 4 0.0000		CLS1 > 4 0.0000	<b>Mast cells activated</b>	<b>p-value</b>
	CLS2 > 4 0.0020		CLS2 > 4 0.0114		CLS1 > 2 0.0026
	CLS3 > 4 0.0163	<b>NK cells activated</b>	<b>p-value</b>		CLS1 > 4 0.0000
<b>T cells CD8</b>	<b>p-value</b>		CLS2 > 1 0.0060		CLS2 > 4 0.0030
	CLS2 > 1 0.0002		CLS2 > 3 0.0127		CLS3 > 4 0.0076
	CLS2 > 3 0.0008	<b>Monocytes</b>	CLS2 > 4 0.0137	<b>Eosinophils</b>	<b>p-value</b>
	CLS2 > 4 0.0004				CLS1 > 2 0.0000
<b>T cells CD4 naive</b>	<b>p-value</b>				CLS1 > 3 0.0132
	CLS1 > 4 0.0270				CLS1 > 4 0.0003
<b>T cells CD4 memory activated</b>	<b>p-value</b>	<b>Macrophages M0</b>	<b>p-value</b>	<b>Total immune cell</b>	<b>p-value</b>
	CLS2 > 1 0.0050		CLS1 > 3 0.0071		CLS2 > 1 0.0000
	CLS2 > 3 0.0053		CLS1 > 4 0.0000		CLS2 > 3 0.0047
	CLS2 > 4 0.0000		CLS2 > 4 0.0004		CLS2 > 4 0.0000
	CLS1 > 4 0.0000	<b>Macrophages M1</b>	<b>p-value</b>		CLS3 > 1 0.0058
	CLS3 > 4 0.0233		CLS2 > 1 0.0009		CLS3 > 4 0.0222
			CLS2 > 3 0.0048		
			CLS2 > 4 0.0064		
		<b>Macrophages M2</b>	<b>p-value</b>		
			CLS2 > 1 0.0038		
			CLS3 > 1 0.0000		
			CLS3 > 2 0.0256		
			CLS3 > 4 0.0021		

**Table 8a:** CIBERSORTx absolute levels において群間に有意差を認めた免疫細胞。Total immune cell では 22 種類すべての白血球を合計した免疫細胞の総数に対して検定を行っている。p 値はウェルチの t 検定による。

<b>B cells naive_relative</b>	<b>p-value</b>	<b>T cells follicular helper_relative</b>	<b>p-value</b>	<b>Dendritic cells resting_relative</b>	<b>p-value</b>
	CLS2 > 1 0.0183		CLS1 > 3 0.0017		CLS1 > 3 0.0000
	CLS3 > 1 0.0137		CLS2 > 3 0.0023		CLS2 > 3 0.0109
					CLS4 > 1 0.0302
					CLS4 > 3 0.0076
<b>B cells memory_relative</b>	<b>p-value</b>	<b>T cells regulatory (Tregs)_relative</b>	<b>p-value</b>	<b>Dendritic cells activated_relative</b>	<b>p-value</b>
	CLS2 > 1 0.0051		CLS2 > 1 0.0002		CLS1 > 2 0.0000
	CLS2 > 3 0.0442		CLS2 > 3 0.0022		CLS1 > 3 0.0000
	CLS4 > 1 0.0260		CLS4 > 1 0.0157		CLS4 > 3 0.0256
	CLS4 > 3 0.0330		CLS4 > 3 0.0277		
<b>Plasma cells_relative</b>	<b>p-value</b>	<b>NK cells resting_relative</b>	<b>p-value</b>	<b>Mast cells resting_relative</b>	<b>p-value</b>
	CLS1 > 2 0.0000		CLS1 > 3 0.0000		CLS3 > 1 0.0025
	CLS1 > 4 0.0000		CLS1 > 4 0.0000		CLS3 > 2 0.0223
	CLS2 > 4 0.0011		CLS2 > 4 0.0239		CLS4 > 1 0.0240
	CLS3 > 4 0.0214				CLS4 > 2 0.0349
<b>T cells CD8_relative</b>	<b>p-value</b>	<b>NK cells activated_relative</b>	<b>p-value</b>	<b>Mast cells activated_relative</b>	<b>p-value</b>
	CLS2 > 1 0.0152		CLS2 > 1 0.0284		CLS1 > 2 0.0000
	CLS2 > 3 0.0095				CLS1 > 3 0.0436
	CLS2 > 4 0.0279	<b>Macrophages M0_relative</b>	<b>p-value</b>		CLS1 > 4 0.0000
			CLS1 > 2 0.0000		CLS2 > 4 0.0027
			CLS1 > 3 0.0002		CLS3 > 4 0.0126
			CLS1 > 4 0.0000		
<b>T cells CD4 naive_relative</b>	<b>p-value</b>		CLS2 > 4 0.0001		
	CLS1 > 4 0.0293				
<b>T cells CD4 memory activated_relative</b>	<b>p-value</b>	<b>Macrophages M2_relative</b>	<b>p-value</b>	<b>Eosinophils_relative</b>	<b>p-value</b>
	CLS1 > 4 0.0000		CLS3 > 1 0.0000		CLS1 > 2 0.0000
	CLS2 > 3 0.0127		CLS3 > 2 0.0000		CLS1 > 3 0.0204
	CLS2 > 4 0.0000		CLS3 > 4 0.0136		CLS1 > 4 0.0005
	CLS3 > 4 0.0344				
				<b>Neutrophils_relative</b>	<b>p-value</b>
					CLS1 > 2 0.0198

**Table 8b:** CIBERSORTx relative fractions において群間に有意差を認めた免疫細胞。  
p 値はウェルチの t 検定による。

## 群間で発現変動の目立つ遺伝子について

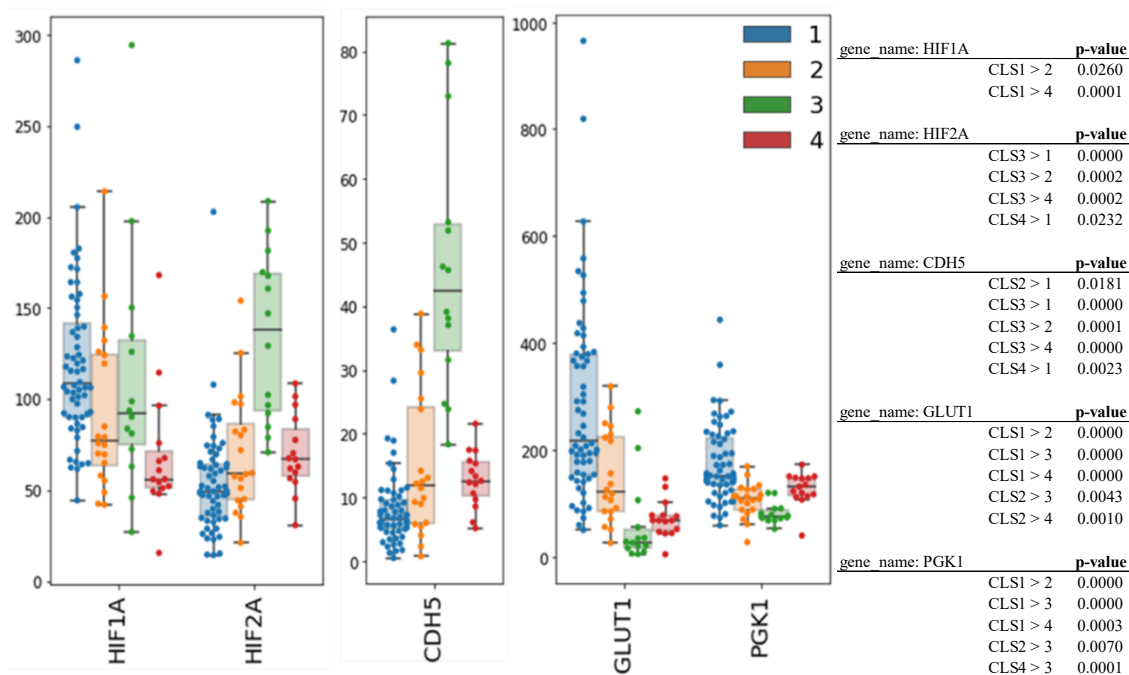
群間で発現変動の目立つ遺伝子が TME に及ぼす寄与を考察する。

## 低酸素環境による発現変動

低酸素適応の急性期には HIF-1 $\alpha$  が最も活性化し、慢性的な低酸素下では HIF-2 $\alpha$  が支配的になる。HIF-2 $\alpha$  は EPAS1 (Endothelial PAS domain-containing protein 1) として同定されており、血管内皮特異的な機能を有する。HIF-2 $\alpha$  は血管新生の開始や血管リモデリングの制御において重要な役割を果たしており<sup>37</sup>、HIF-2 $\alpha$  の発現レベルは酸素分圧によって制御される。CDH5 は血管新生に不可欠であることが報告されている<sup>38</sup>。CLS1~CLS2 では HIF1A の発現が、CLS3 では HIF2A の発現が増加しており、それに伴い CLS3 において CDH5 の有意な増加がみられ他群に比べて血管形成の差が明らかとなった (Fig. 7)。

HIF-1 $\alpha$  発現は低酸素下で急速に誘導されるが、GLUT1 や PGK1 の発現は低酸素環境が長期にわたることで誘導される<sup>39</sup>。PGK1 は、低酸素条件下で腫瘍細胞の代謝に ATP を供給する解糖のメディエーターであり、腎がん、胃がん、肺がんを含む多くのがん種の発生と進行に関与することが報告されている<sup>40</sup>。GLUT1 は解糖速度を上昇させるために細胞膜に発現し、肺、肝臓、腎臓、結腸、乳房、子宮内膜、頭頸部、口腔を含む様々な腫瘍でその増加が報告されている。

CLS1 で GLUT1 および PGK1 の発現が増加していることは、CLS1 の TME において低酸素環境が支配的であることを示唆している (Fig. 7)。

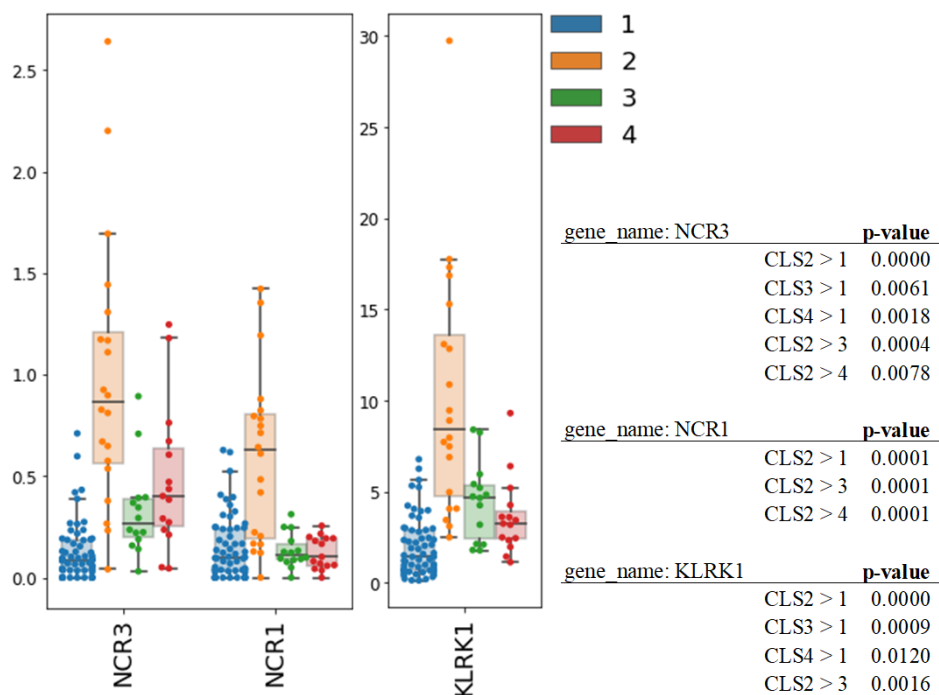


**Figure 7:** 各群における低酸素関連遺伝子の発現量 (左)、および群間の有意差 (右)。p 値はウェルチの t 検定による。

### NK 細胞の障害活性に抵抗する遺伝子の発現

NK 細胞は、強力な抗腫瘍活性を持つ細胞傷害性自然リンパ系細胞の一種であり、腫瘍形成、細胞ストレス、DNA 損傷によって誘導されるリガンドを認識できる幅広い受容体を有している。また多くの炎症性サイトカインやケモカインを放出し、抗腫瘍免疫応答の増幅を助けることができる。

低酸素による NK 細胞の細胞障害性の低下は、NK 細胞表面に発現する NCNR3 (NKp30)、NCNR1(NKp46)、KLRK1(NKG2D)などの活性化受容体の発現低下と相関すると報告されている<sup>41</sup>。CLS1 ではNCNR3、NCNR1、KLRK1いずれの発現量も低く、低酸素環境により NK 細胞の細胞障害活性が低下していることが示唆される (Fig. 8)。対して群間で最も NK 細胞の活性が高いのは CLS2 であると考えられるが、これは CIBERSORTx における NK cell activated の群間比較に矛盾しない。

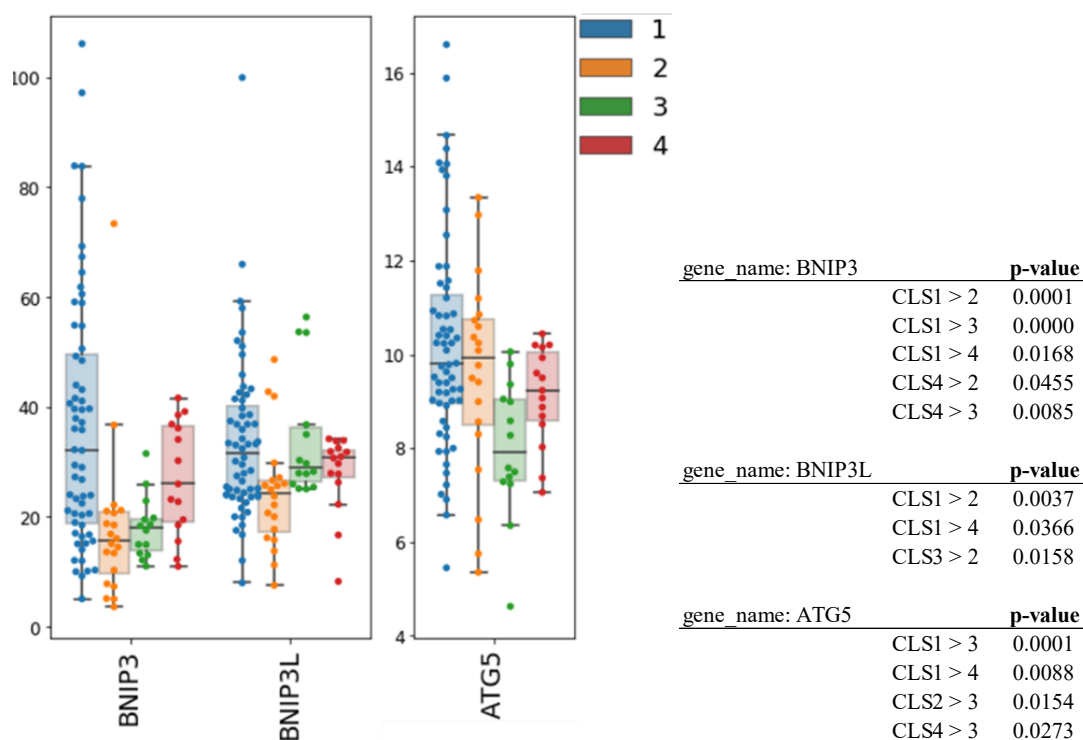


**Figure 8:** 各群における NK 細胞の障害活性に関する受容体の発現量 (左)、および群間の有意差 (右)。p 値はウェルチの t 検定による。

## オートファジー関連遺伝子

低酸素環境はがん細胞のオートファジーを活性化する。低酸素下で HIF-1 $\alpha$  が核内へ移行することで、下流の標的遺伝子である BNIP3 と BNIP3L の発現が誘導される。BNIP3 と BNIP3L の発現が up regulation されると、Bcl-2 から Beclin1 が解離することでオートファジーが活性化される<sup>42</sup>。

CLS1 では低酸素下で誘導された BNIP3 と BNIP3L およびオートファジーに重要な ATG5 の発現上昇がみられ (Fig. 9)、NK 細胞や細胞障害性 T 細胞が介する抗腫瘍免疫を打ち消している可能性がある。



**Figure 9:** 各群におけるオートファジー関連遺伝子の発現量 (左)、および群間の有意差 (右)。p 値はウェルチの t 検定による。

## 抗原提示に関わる MHC class I および MHC class II

樹状細胞、マクロファージ、および B 細胞などの抗原提示細胞はがん免疫サイクルの重要な構成要素であり、免疫原性細胞死 immunogenic cell death (ICD)を媒介とする抗腫瘍免疫応答の生成に不可欠な要素である。

免疫療法に対する一次抵抗性の最も顕著なメカニズムの一つは、抗原提示経路の変化である。実際に MHC-I の発現および他の抗原提示機構の down regulation は、免疫系による検出を回避するために悪性細胞が採択する一般的な戦略である<sup>43,44</sup>。樹状細胞の抗原取り込みが阻害されると<sup>45</sup>、CD40、CD80、MHC class II を含む分化・活性化マーカーが低下する<sup>46</sup>。

CLS2 と比較して他群では MHC-I, MHC-II の発現量が低く、CLS1 においては低酸素下において、CLS3 においては M2 型マクロファージにより、CLS4 では非同義変異の少なさのため、それぞれ抗原提示能が低下していることが示唆される (Fig. 10)。



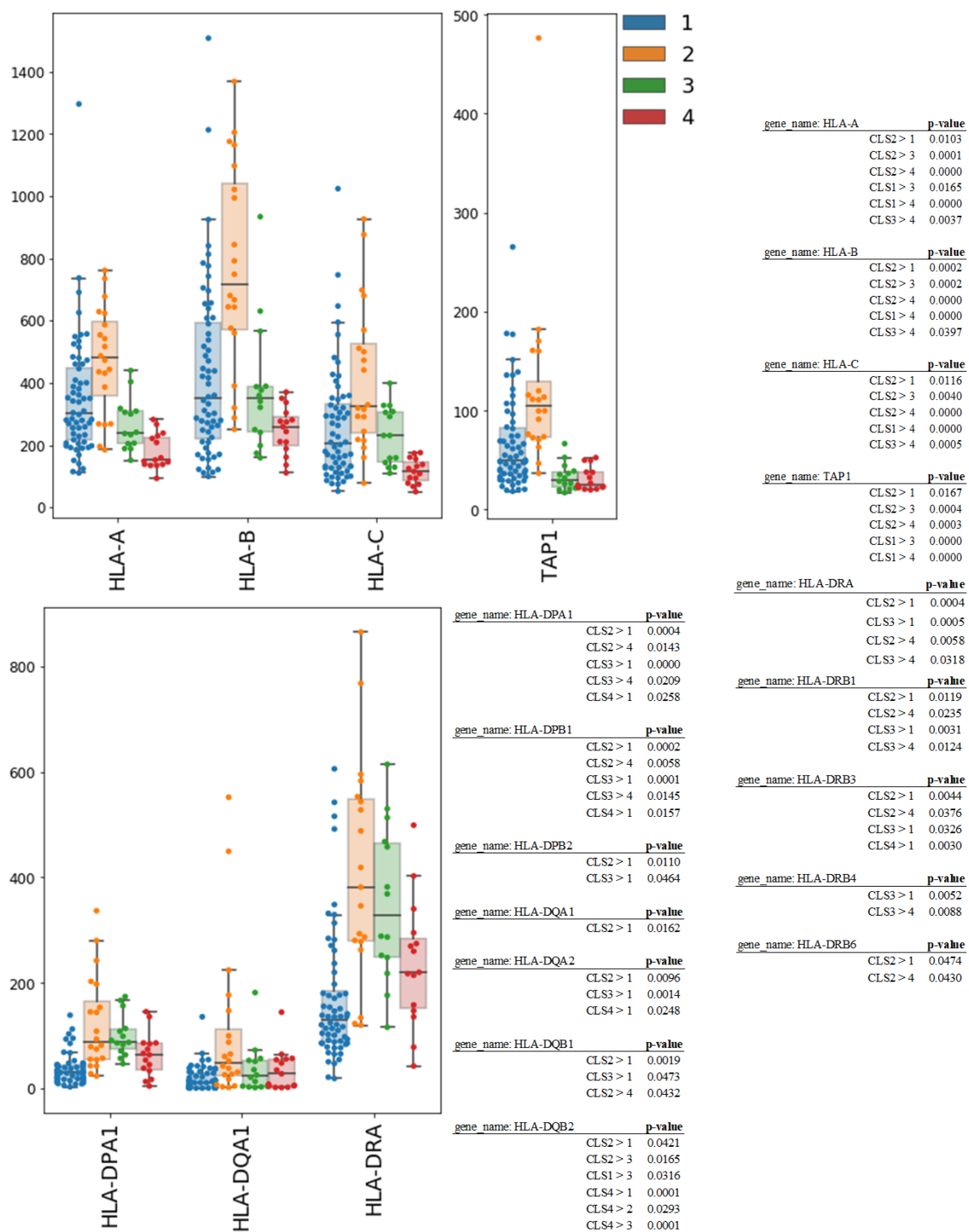
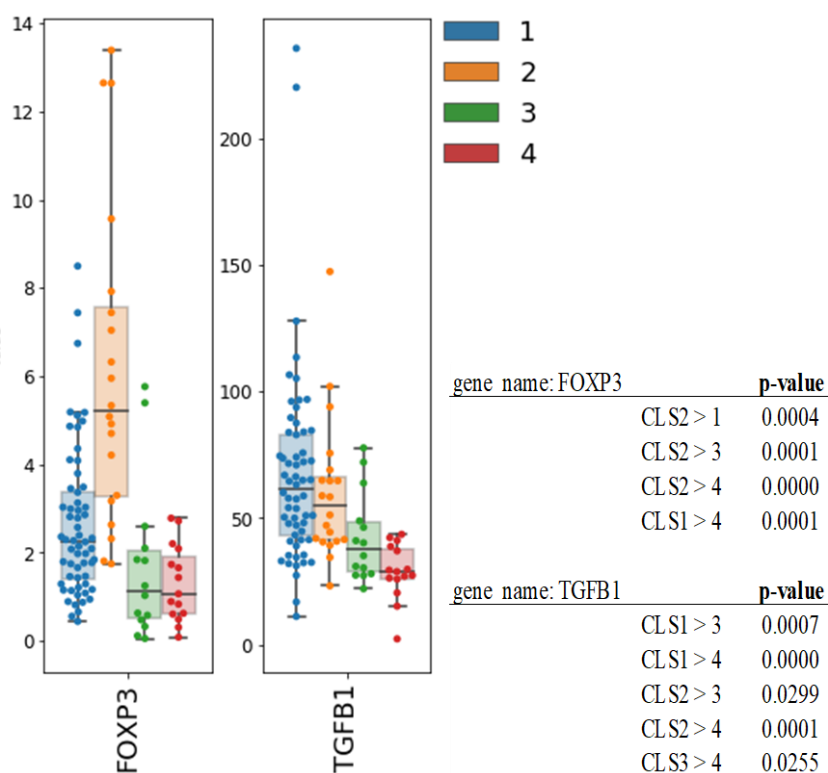


Figure 10: 各群における MHC class I および class II の発現量 (左)、および群間の有意差 (右)。p 値はウェルチの t 検定による。

## 制御性 T 細胞

低酸素環境において HIF-1 $\alpha$  は Treg と Th17 分化のバランスを制御しており、Treg 細胞の強力な調節因子である FOXP3 転写因子レベルを増加させる。低酸素はまた、TGF- $\beta$  の産生を促進するが、TGF- $\beta$  は Treg 細胞の up regulation に関与し、エフェクター T 細胞の応答抑制や、血管新生と腫瘍耐性の促進にも寄与する<sup>47</sup>。



**Figure 11:** 各群における制御性 T 細胞に影響を与える FOXP3 および TGF- $\beta$  の発現量 (左)、および群間の有意差 (右)。p 値はウェルチの t 検定による。

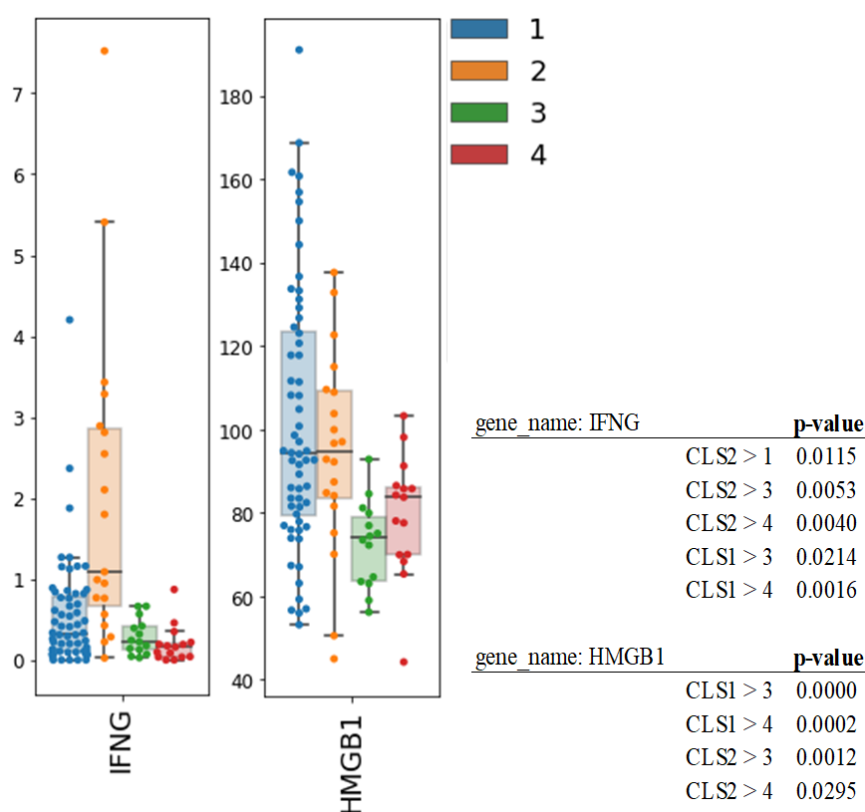
## 低酸素環境における T 細胞と免疫原性細胞死

低酸素は CD4+ T 細胞を Th2 の表現型に偏向させる<sup>48</sup>。cAMP アデノシン受容体 A2AR によって促進される cAMP の上昇に関連した細胞外アデノシンの蓄積が、T 細胞の抗腫瘍活性を阻害することが示されている<sup>49</sup>。低酸素は、CD4+および CD8+ T 細胞による IFN- $\gamma$  および IL-2 の産生に悪影響を及ぼし、MHC 抗原を認識する能力を低下させる。

これまでの報告では、主に低酸素駆動経路の免疫抑制性が取り上げられる傾向があるが、低酸素や壊死による結果として生じる炎症性微小環境が、免疫原性細胞死 (Immunogenic Cell Death: ICD) を介してがん細胞死を促進する可能性についてはあまり言及されていない。興味深いことに、低酸素は免疫賦活機能にも寄与することがあり、低酸素ニッチで生存する T 細胞は実際に細胞溶解活性の増加を示すことが示されている<sup>50</sup>。ICD は HMGB1 や ATP などの免疫調節分子の放出、および CR の表面発現を含む損傷関連分子パターン (Damage-Associated Molecular Pattern: DAMP) の慢性的な放出によって特徴づけられる細胞死の一形態である。微小環境における DAMP の量は、腫瘍の免疫原性と密接に関連している。

CLS1 における IFN- $\gamma$  産生は M2 型マクロファージに免疫を抑制された CLS3 と同程度であり、抗腫瘍免疫が活発に生じている CLS2 と比較して低値で

ある。また CLS1 では DAMP である HMGB1 の放出が T 細胞の浸潤が最も多い CLS2 と同程度認められる (Fig. 12)。



**Figure 12:** 各群における IFN- $\gamma$  の産生量と ICD に特徴的とされる HMGB1 の放出量 (左)、および群間の有意差 (右)。p 値はウェルチの t 検定による。

### 免疫抑制性受容体の発現と T 細胞の疲弊

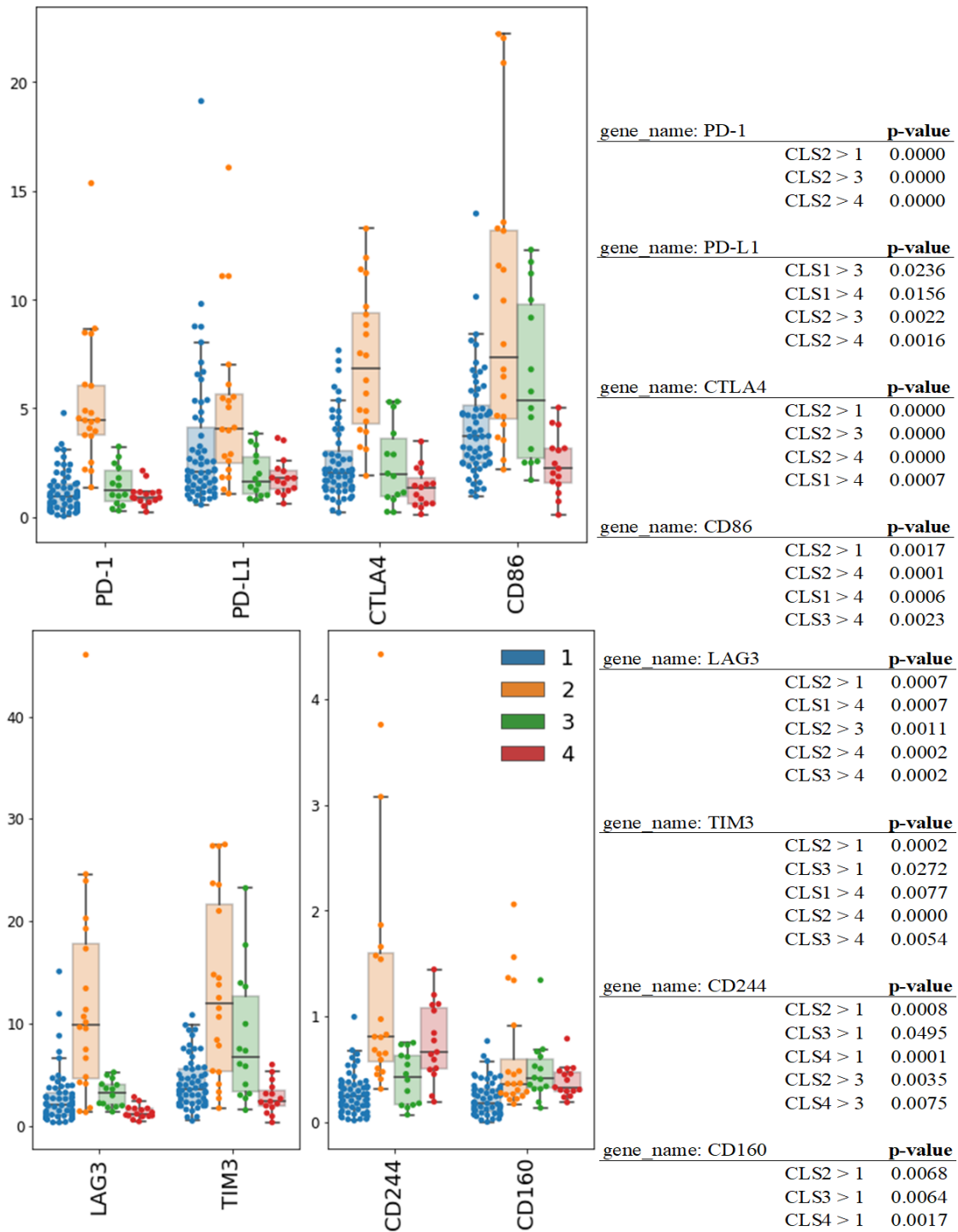
慢性感染やがんにおいて、抗原特異的 T 細胞は抗原への長期暴露および炎症にさらされることによりエフェクター機能を徐々に喪失する<sup>51</sup>。これは T 細胞の疲弊と呼ばれ、抗腫瘍免疫を妨げる。PD-1 経路を遮断すると、疲弊した CD8+ T 細胞応答が再活性化され、ウイルス制御が増強されるという観察は、T

細胞の疲弊が PD-1 のような抑制性受容体によって積極的に制御されていることを示している<sup>52</sup>。

疲弊した T 細胞は PD-1 の他にも抑制性受容体を共発現している<sup>53</sup>。典型的には、疲弊した T 細胞が共発現している抑制性受容体の数が多いほど、疲弊は深刻であると考えられる。複数の抑制性受容体経路を同時に遮断することで、T 細胞の疲弊を相乗的に逆転させることができるため、これらの共発現パターンは機能的に非常に重要である。

実際に単剤ではなく抗 PD-1 抗体と抗 CTLA4 抗体の併用療法は、メラノーマを有する患者の生存期間を有意に改善することが報告された<sup>54</sup>。他にも複数の設定で他の阻害性受容体の併用臨床試験が進行中である<sup>55</sup>。T 細胞の疲弊における抑制性受容体の共発現に関するこれらのデータは、T 細胞の機能および分化を制御する経路が非冗長であることを示唆している。

CLS2 は抗腫瘍免疫が活発に生じている一方で、T 細胞の疲弊や抑制性受容体の発現が目立つ (Fig. 13)。すなわち CLS2 に対しては単剤または併用の免疫チェックポイント阻害薬の効果が期待される。また HIF-1 $\alpha$  の発現は、T 細胞応答の抑制や MDSC における PD-L1 発現の促進にも関与するとされ、CLS1 においては CLS3 および CLS4 に比較して PD-L1 の発現が増加している。



**Figure 13:** 各群における免疫抑制性受容体とリガンドの発現量(左)、および群間の有意差(右)。p値はウェルチのt検定による。

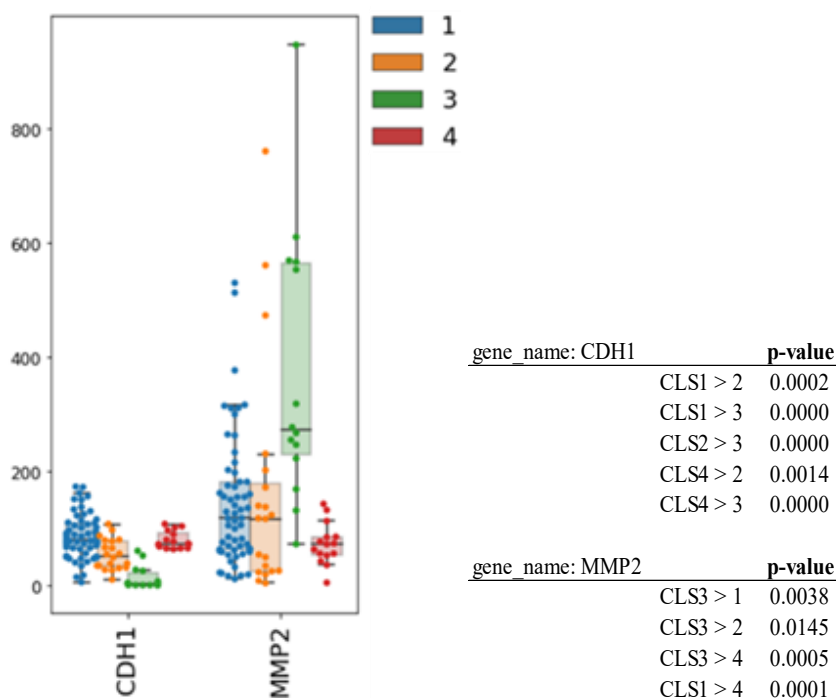
## M2型マクロファージ

マクロファージの主な機能は、微生物、細胞外マトリックス残基、腫瘍細胞を含む残骸や異物を吸収・消化することである。マクロファージは、腫瘍の微小環境に最も多く存在するミエロイド細胞の一つであり、免疫環境の主要な構成要素として、腫瘍の開始、進行、および転移における多くの役割を持っている。

M1型マクロファージは高レベルのMHC分子を発現しており高い抗腫瘍効果を有する一方で、M2型マクロファージは組織修復および免疫調節に指向している。M2型は抗腫瘍効果を有するM1型の効果を中和する。M2型はがんと双方向性の相互作用を有しており、血管新生と免疫抑制を引き起こし、がん細胞の生存、増殖、幹細胞化、および浸潤性を増加させる<sup>56</sup>。M2型はE-カドヘリンを阻害し、MMP-2の発現を up regulation することで転移を促進することが示されており<sup>57</sup>、膵がん、肝がん、大腸がん、肺がんなど様々ながん種で転移や予後不良と関連する<sup>58,59,60</sup>。CLS3は群間で最も転移が目立つが、M2型マクロファージがE-カドヘリンを阻害し、MMP-2の発現を up regulation することにより転移を促進していると推察される (Fig. 14)。

さらにM2型は、TGF- $\beta$ やIL-10などの自然シグナルを介して、細胞障害性T細胞やナチュラルキラー細胞を抑制し、またT細胞をTregに誘導して抗が

ん活性を低下させる<sup>61</sup>。PD-1 は M2 型で発現している重要なリガンドでありがん細胞の免疫回避の誘導に重要な役割を果たしている。

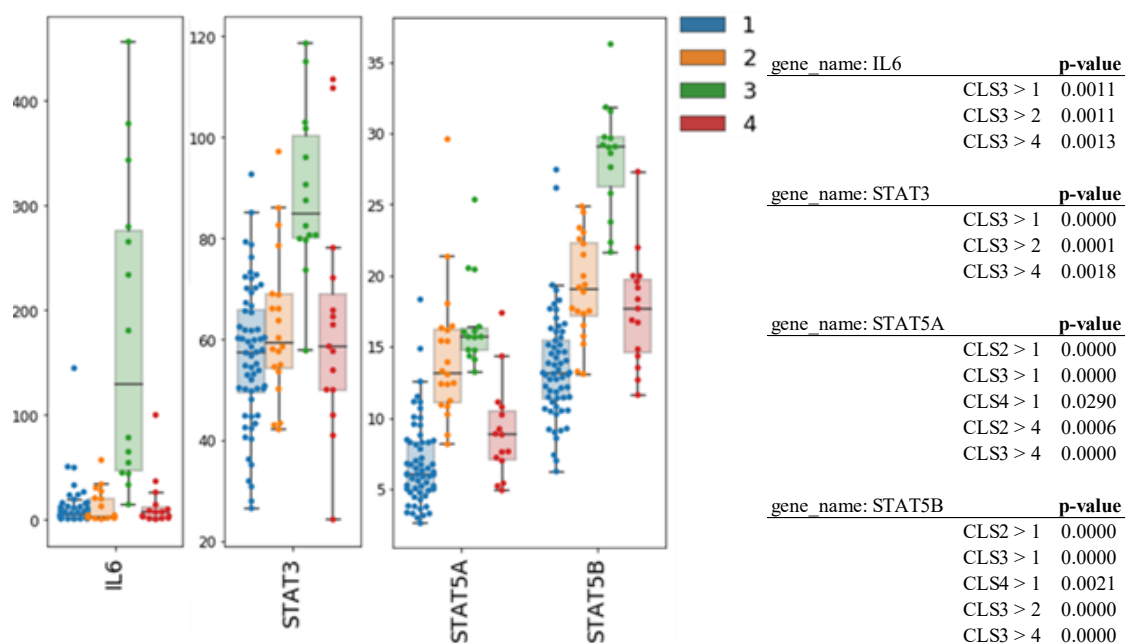


**Figure 14:** 各群における転移に関連する分子の発現量(左)、および群間の有意差(右)。p値はウェルチのt検定による。

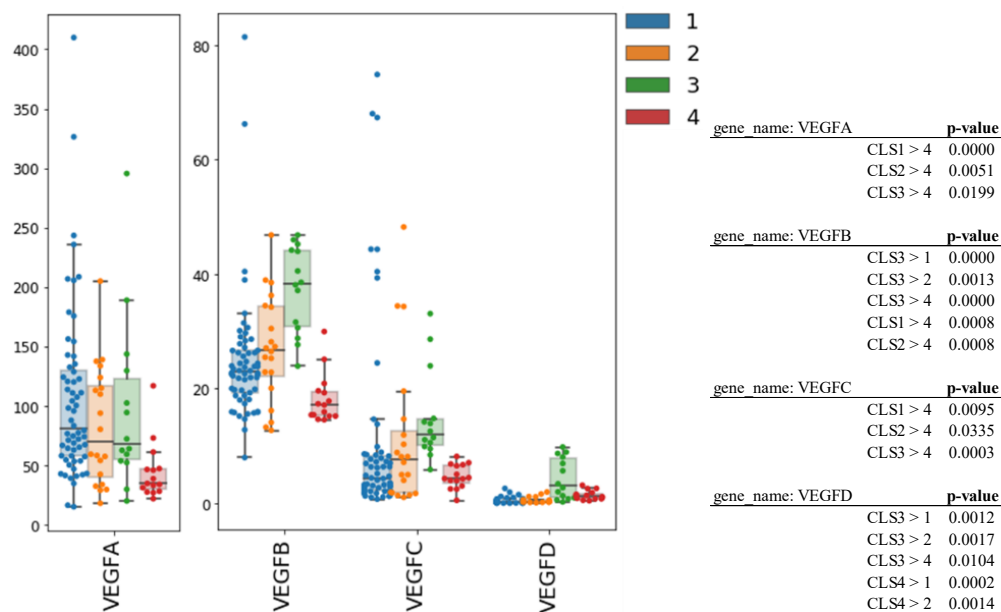
治療戦略としてマクロファージを標的としたとき、IL-6/STAT3 経路および STAT5 の阻害<sup>62</sup>による M2 型から M1 型への再分極誘導が有効である可能性がある(Fig. 15)。また低用量の抗 VEGF2 抗体が TAM を免疫抑制性の M2 型から免疫刺激性の M1 型に分極させることが実証され、この結果 CD8+および CD4+ T 細胞の腫瘍浸潤が改善されたとする報告がある<sup>63</sup>。CLS3 では VEGF-B および



VEGF-Dの発現量が有意に高い(Fig. 16)。ただし VEGF-Bの生物学的活性は弱いとされ、これは VEGF-Bがキナーゼ活性の低い VEGFR-1のみを受容体とするためである。VEGF-Dは VEGFR-2に作用することで内皮細胞の増殖や透過性を亢進させ、また VEGFR-3に作用することでリンパ管新生を誘導し、がんの増殖や、リンパ節転移および遠隔転移を促進させることが報告されている<sup>64</sup>。



**Figure 15:** 各群におけるマクロファージの分極に関わる分子の発現量(左)、および群間の有意差(右)。p値はウェルチのt検定による。

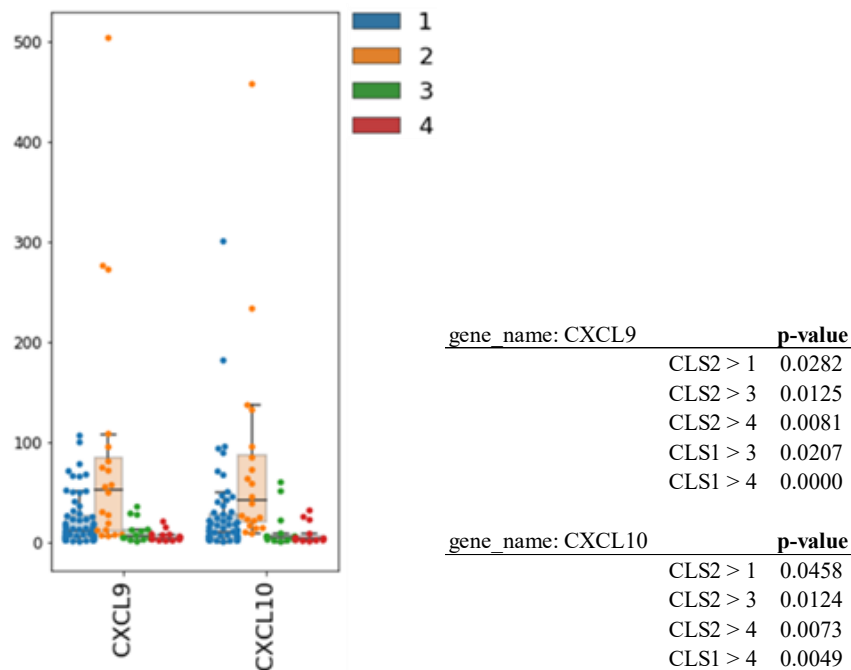


**Figure 16:** 各群における血管内皮増殖因子 VEGF の発現量(左)、および群間の有意差 (右)。p 値はウェルチの t 検定による。

## 肥満細胞

大腸がんを対象とした研究<sup>65,66</sup>で肥満細胞の密度が低いことは全生存期間を延長する独立した予後指標であると報告された。同研究では肥満細胞密度が CD8+ T 細胞と負の相関を示している。低肥満細胞腫瘍では Th1 型ケモカインである CXCL9 と CXCL10 が高発現しており、T 細胞や NK 細胞をリクルートすることで抗腫瘍免疫応答を高めるとされる。

他群と比べ肥満細胞の浸潤が目立つ CLS3 では CXCL9 と CXCL10 の発現が抑制されており (Fig. 17)、免疫細胞のリクルートが阻害されていることが示唆される。



**Figure 17:** 免疫細胞のリクルートに関わる CXCL9 と CXCL10 の発現量(左)、および群間の有意差 (右)。p 値はウェルチの t 検定による。

### 免疫療法に対する体細胞突然変異の寄与

CLS4 は非癌部組織に近いプロファイルを有するにもかかわらず最も予後が悪い。ただし本論文における非癌部組織は食道癌に罹患した患者から採取した検体であることに留意が必要である。CLS1 における低酸素や、CLS3 における M2 型マクロファージや肥満細胞の浸潤などのような CD8+T 細胞に抑制性にはたらく TME が乏しいにも関わらず免疫細胞の浸潤が乏しいことが明らかとなった。

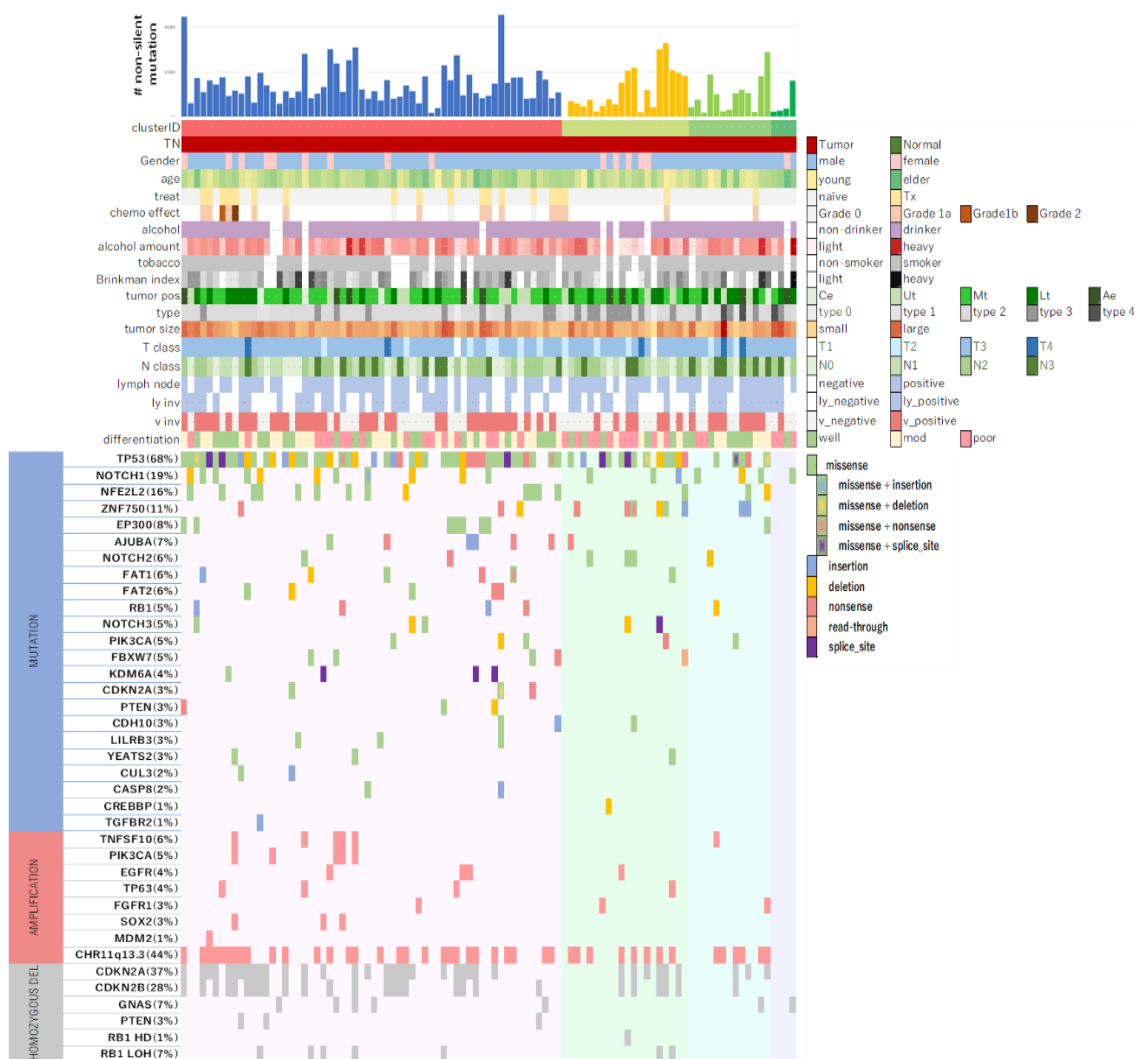
ナンセンス突然変異やミスセンス突然変異などを引き起こす体細胞突然変異は腫瘍細胞の表面にネオアンチゲンを出現させ、炎症性サイトカインの放

出や細胞障害性 T 細胞を誘導すると考えられる<sup>67</sup>。すなわち、高い腫瘍変異負荷 (Tumor Mutational Burden: TMB)を有する腫瘍では抗腫瘍免疫が生じる素地があり、免疫チェックポイント阻害薬に反応する可能性がある<sup>68</sup>。ESCC は特に *TP53*, *NFE2L2*, *ZNF750*, *NOTCH1*, *PIK3CA* などに変異を生じることが多いとされる<sup>69</sup>。RNA sequencing と同じ検体に対して WGS 解析を行い、コールされた mutation, amplification, homozygous deletion にフィッシャーの正確検定を行うことで以下のドライバー遺伝子に群間の偏りがあることが示された。

CLS1 には *TP53* 変異と *PIK3CA/PTEN* 変異が、CLS2 には *ZNF750* 変異が偏在しており、また術前治療群にも *TP53* 変異が目立つ。一方 CLS4 では *TP53* 変異を含めほとんどの遺伝子変異が検出されず非同義変異が少ない (Fig. 18)。CLS4 においてドライバー遺伝子変異が同定されたのは1症例のみで *NOTCH1* のミスセンス変異であり、CLS4 は TMB が低く、抗免疫腫瘍を惹起しにくい cold tumor である可能性がある。なお腫瘍含有率には群間で有意差を認めず、腫瘍含有率の平均は CLS1 が 53.8%、CLS2 が 52.9%、CLS3 が 50.3%、CLS4 が 51.8% であった。

		Odds Ratio	p-value
CLS1	TP53	4.22	0.0018
	ZNF750	0.19	0.0192
	PIK3CA or PTEN	5.33	0.0244
CLS2	ZNF750	6.17	0.0089
CLS3	TP53	0.24	0.0231
術前治療群	TP53	5.03	0.0289
TP53	CDKN2A_loss	9.33	0.0001
	CDKN2B_loss	5.33	0.0071
	Chr11q13.3 amp	4.11	0.0042
Chr11q13.3 amp	CDKN2A_loss	3.63	0.0034
	CDKN2B_loss	2.88	0.0250
PIK3CAorPTEN	CDKN2A_loss	3.53	0.0267

**Table 9:** 群間に有意差を生じたドライバー遺伝子。CLS1 には *TP53* 変異と *PIK3CA/PTEN* 変異が、CLS2 には *ZNF750* 変異が偏在しており、また術前治療群にも *TP53* 変異が偏っている。*CDKN2A* および *CDKN2B* のホモ接合性欠失、または Chr11q13.3 の増幅は、*TP53* 変異や *PIK3CA/PTEN* 変異と共存する傾向にある。p 値はフィッシャーの正確検定による。



**Figure 18:** 各症例が有するドライバー遺伝子変異。

既報 508 症例に対する WGS<sup>70</sup> により *TP53*, *NOTCH1*, *NFE2L2*, *ZNF750*, *EP300*, *AJUBA*, *FAT1*, *FAT2*, *RB1*, *PIK3CA*, *FBXW7*, *KDM6A*, *CDKN2A*, *CDH10*, *LILRB3*, *YEATS2*, *CASP8*, *CREBBP*, *TGFBR2* が ESCC の drive gene として同定された。さらに別の報告<sup>71</sup>で driver gene として報告された *NOTCH2*, *NOTCH3*, *PTEN*, *CUL3* を追加して各症例におけるドライバー異常の有無を記載した。

異常の種類はミスセンス変異を緑、挿入を青、欠失を黄、終止変異を赤、リードスルーを橙、スプライス部位変異を紫とした。各症例における非同義変異の総数はカラーバー上にヒストグラムで示した。

症例の臨床情報をカラーバーで示した。上から順に、ESCC か NT かの検体種別 (ESCC 症例のみ)、性別 (男性は青、女性は赤)、年齢 (40 代を黄色、80 代を緑としてグラデーションで示した)、術前治療の有無 (naive は術前治療を行わ

なかった症例を、Tx は術前治療を行った症例を表す)、治療効果の病理学的評価 (Grade 評価)、飲酒習慣の有無、平均的なアルコール摂取量 (多飲者を濃赤としてグラデーションで示した)、喫煙習慣の有無、Brinkman Index (多量喫煙者を黒としてグラデーションで示した)、ESCC の占拠部位、ESCC の肉眼型分類、浸潤癌の大きさ (浸潤径が大きい癌を濃橙としてグラデーションで示した)、食道癌取扱い規約第 11 版の T 分類、および N 分類、リンパ管侵襲の有無、静脈侵襲の有無、分化度を表している。

### ESCC の免疫 TME を評価するツール: IMMUGENO\_GRAM の作成

上記 CLS1~CLS4 を総括すると TMB と免疫環境 (T 細胞炎型と非 T 細胞炎型)によって大別されるモデルを構築することは、免疫療法を組み合わせた臨床試験の設計や治療効果の評価において有益であると期待される。がんにおけるオーダーメイド医療への展開において、患者ごとの突然変異と免疫細胞を含む微小環境を調べることで、効果の期待される免疫療法を選ぶことが可能となり、またその効果をフィードバックすることで層別化・個別化された治療戦略の最適な構築が可能になると考えられる。

上記を分類することで患者ごとに適切な免疫療法の選択をし、TME の類型により治療効果を判定することが期待される。最近メラノーマ患者を対象としたペムブロリズマブとエピカドスタット (IDO 阻害剤)の第 III 相併用試験が失敗に終わったことは、このような臨床試験のために TME を評価しうる優れたバイオマーカーの開発が喫緊の課題であることを示している<sup>72</sup>。

RNA sequencing によるオミックスデータは情報量が多く有用である一方で、実臨床においてその詳細を解析することは実質的に不可能である。情報量をできる限り保ちながら免疫環境を評価するために、Blank らにより患者の免疫状態を可視化するための IMMUNOGRAM<sup>73</sup> が提起されたが、ここでは ESCC において重要と考えられた変数を 0-100 までの点数で表現する IMMUGENO\_GRAM を提示したい。

GSEA 解析にて計算された 40 項目から、統計学的に有意でかつ臨床的に意義の強い特徴量を選ぶ。Boruta\_py random forest による機械学習では以下に示す 24 個が  $p < 0.05$  となる統計学的に有意な特徴量として選択された。

0	HYPOXIA	19	CHECKPOINT STIMULATOR'S TARGET ON T
1	EXHAUSTED CD8	21	CHECKPOINT INHIBITOR'S TARGET ON APC
2	RECOGNITION OF TUMOR CELLS	22	MACROPHAGE
4	ESCC	24	TRAFFICKING AND INFILTRATION
7	NATURAL KILLER T CELL	25	CHECKPOINT INHIBITOR'S TARGET ON T
8	ACTIVATED CD8 T CELL	29	ACTIVATED B CELL
9	ACTIVATED CD4 T CELL	30	IMMATURE B CELL
10	EFFECTOR MEMORY CD8 T CELL	31	ESO
11	NATURAL KILLER CELL	32	MAST CELL
13	REGULATORY T CELL	34	T FOLLICULAR HELPER CELL
14	CD56BRIGHT NATURAL KILLER CELL	37	EOSINOPHIL
17	LYMPH VESSELS	38	BLOOD VESSELS

この 24 個の特徴量に対して PCA を行うと各クラスタが線形的な境界をもって分類されることが分かり、特徴量の減少に伴う分解能の低下は目立たない (Fig. 19)。さらに議論された考察とがん免疫サイクルに沿って選び出した 12 個の特徴量を軸として IMMUGENO\_GRAM を作成した (Fig. 20)。



特徴量の視覚化を行うため各変数に対して変数方向の Z 標準化を行い、  
抗腫瘍免疫に正の影響を与える第 0, 1, 2, 3, 4, 6, 11 軸の特徴量については

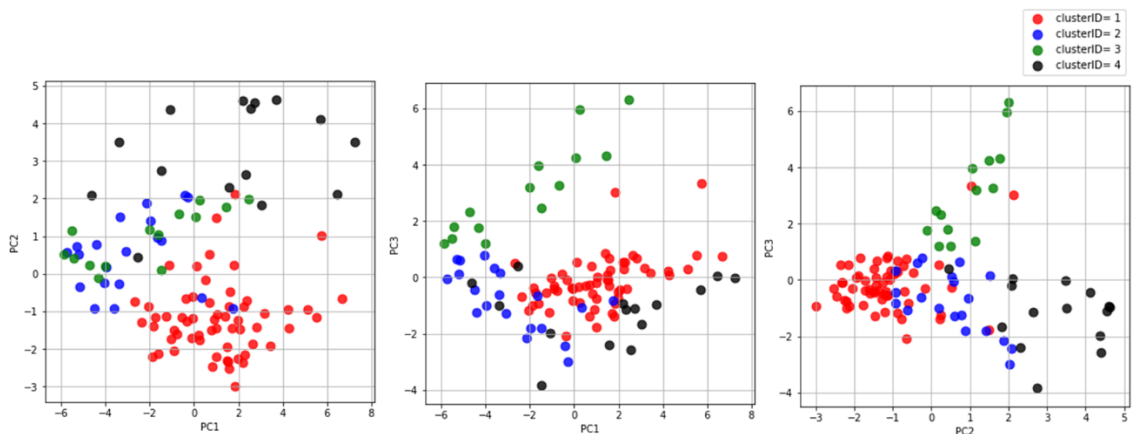
$$50 + Z_{\text{score}} * 20$$

で補正し、負の影響を与える第 5, 7, 8, 9, 10 軸の特徴量については

$$50 - Z_{\text{score}} * 20$$

で補正した。最大値および最小値はそれぞれ 100 と 0 とした。

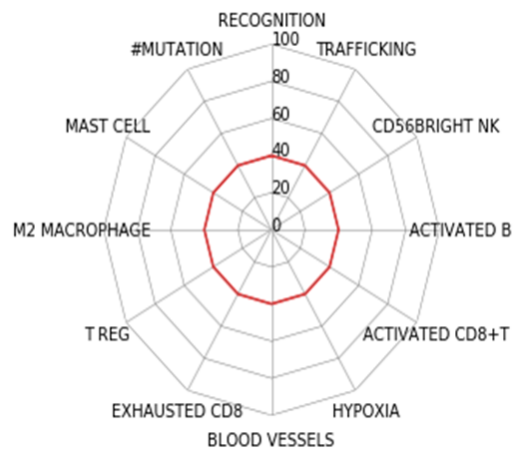
ESCC97 症例について IMMUGENO\_GRAM を描画することで、免疫環境  
における変化を視覚的に捉えることができ、臨床の治療方針を決定することが  
可能となる。



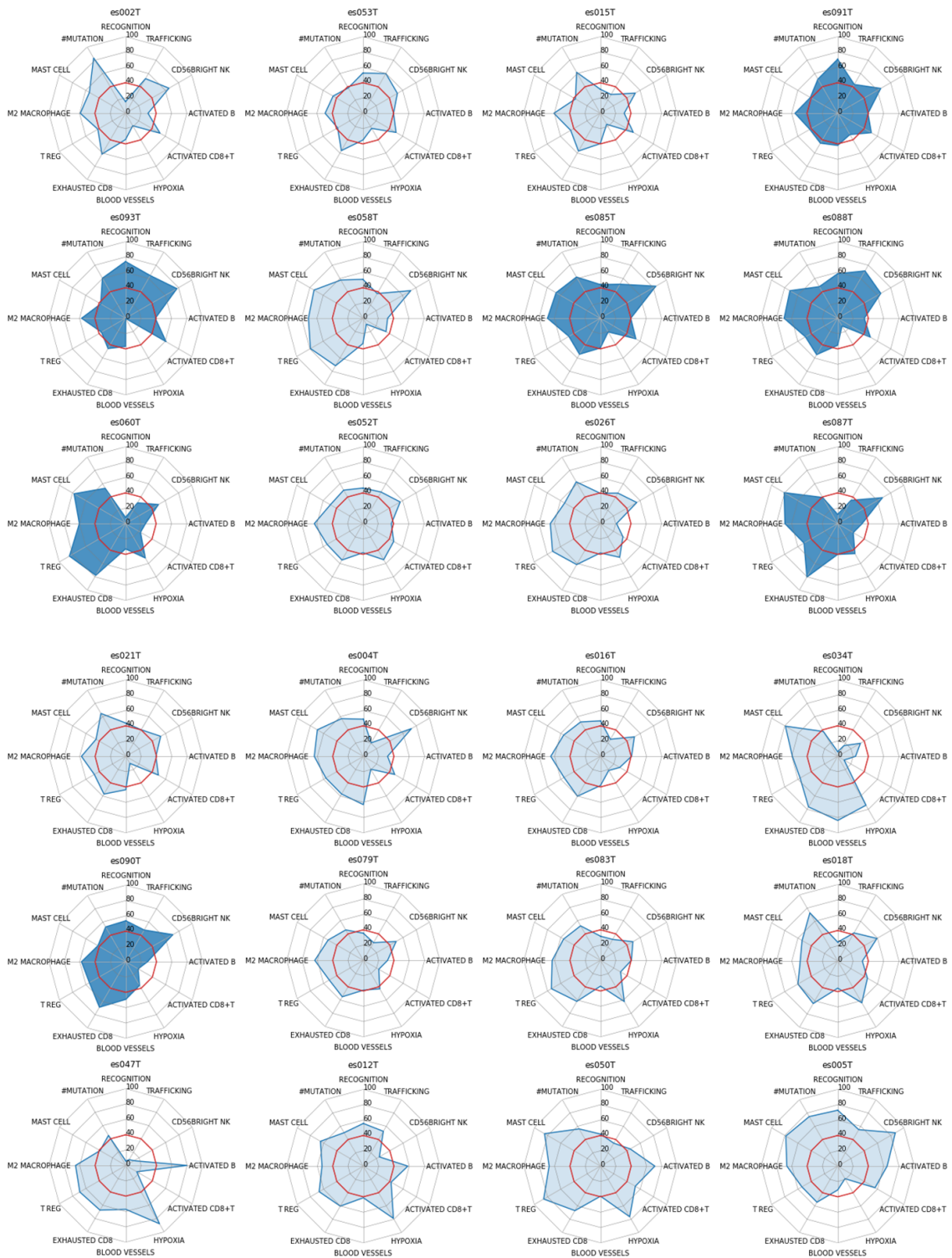
**Figure 19:** Boruta\_pyによる特徴量選択後のPCA。

CLS1を赤、CLS2を青、CLS3を緑、CLS4を黒とした。PC1、PC2、PC3の寄与率はそれぞれ31%、18%、12%となる。PC1~PC3までの主成分によりクラスタが分類されることが視覚的にも確認された。

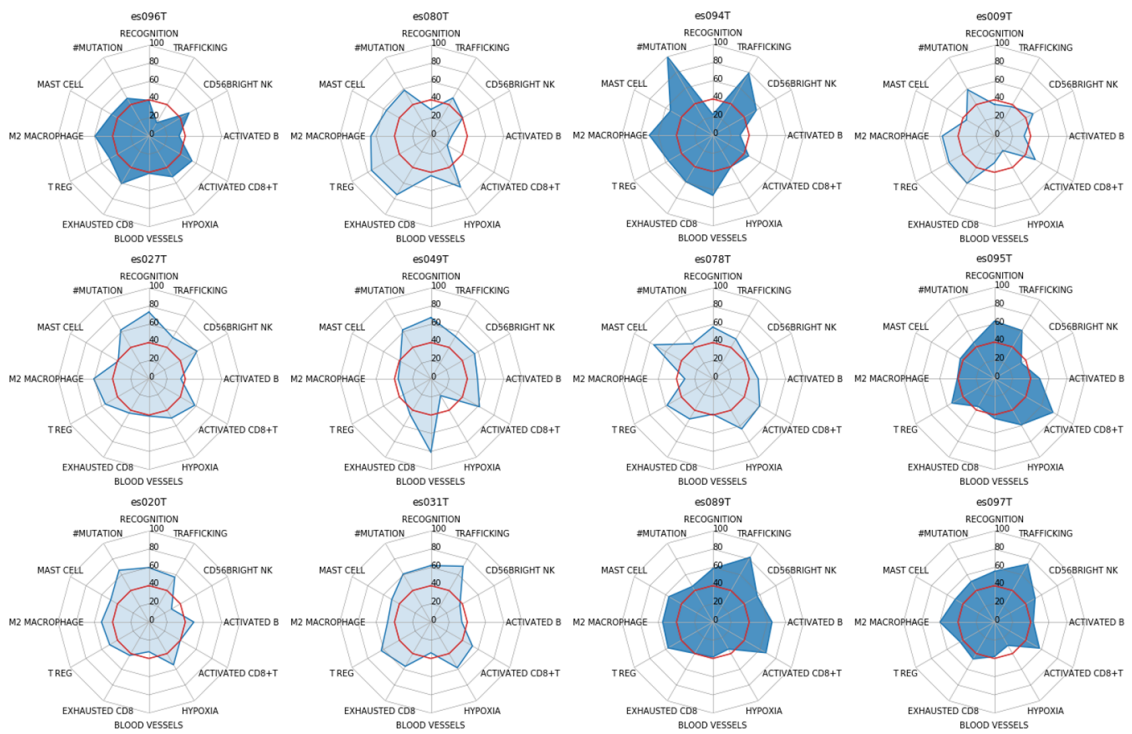
第0軸	Recognition of tumor cells	抗原提示細胞による腫瘍抗原の認識
第1軸	Trafficking and infiltration	免疫細胞の遊走と浸潤
第2軸	CD56 Bright NK cell	自然免疫による炎症とIFN- $\gamma$ の産生
第3軸	Activated B cell	獲得免疫による抗原提示
第4軸	Activated CD8+ T cell	抗腫瘍免疫の主役
第5軸	Hypoxia	CLS1の免疫抑制環境として
第6軸	Blood vessels	CLS1の免疫抑制環境として
第7軸	Exhausted CD8+ T cell	CLS2の免疫抑制環境として
第8軸	Regulatory T cell	CLS2の免疫抑制環境として
第9軸	M2 Macrophage	CLS3の免疫抑制環境として
第10軸	Mast cell	CLS3の免疫抑制環境として
第11軸	# Non silent gene mutation	CLS4の免疫抑制環境として



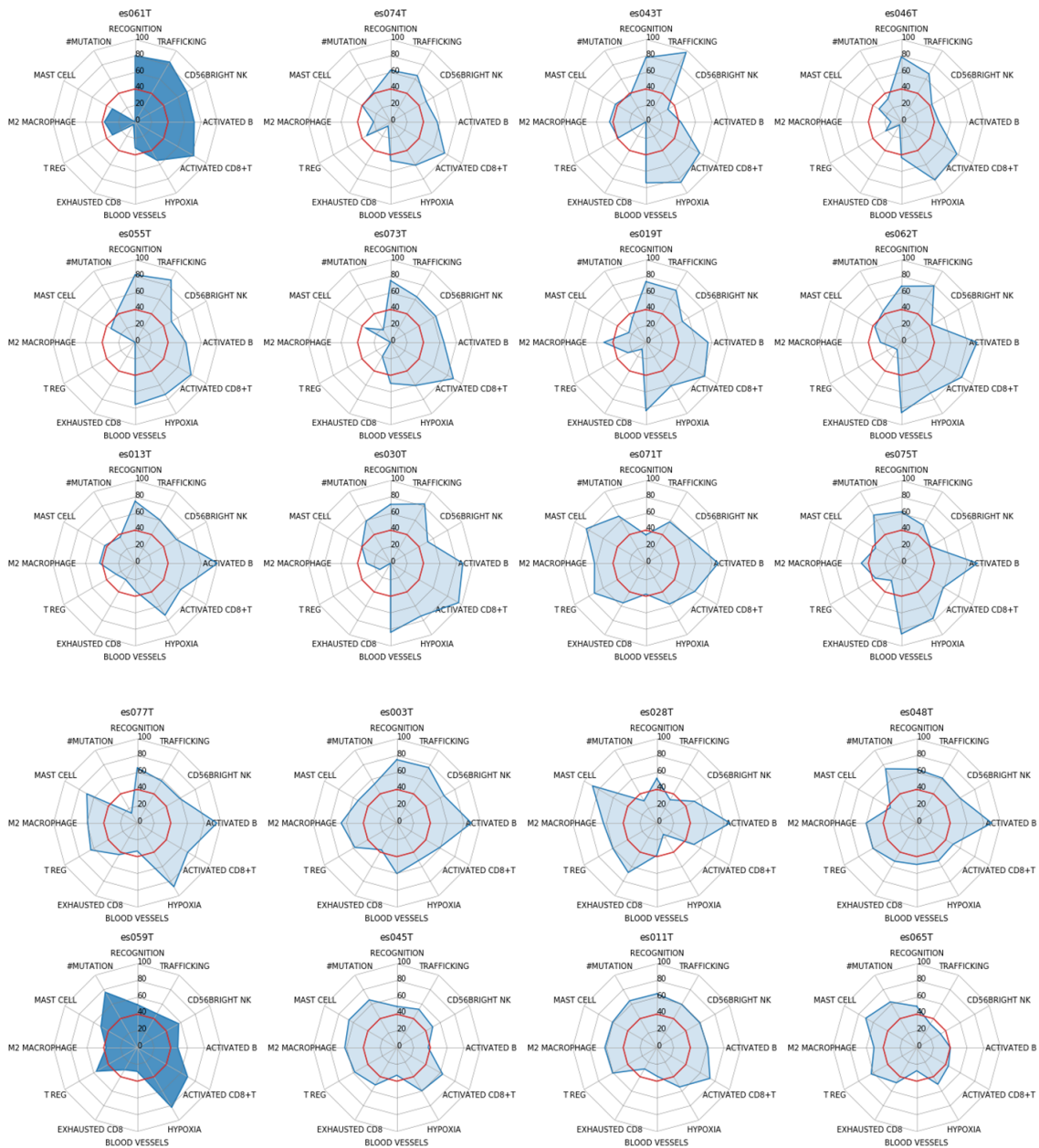
**Figure 20:** IMMUGENO\_GRAMの各軸。がん免疫サイクルとクラスタごとの免疫抑制環境に従って統計学的に有意とされた特徴量から12軸を選んだ。免疫抑制性の環境に対する視認性を上げるために、マイナス0.5SDの位置に赤の補助線を入れた。





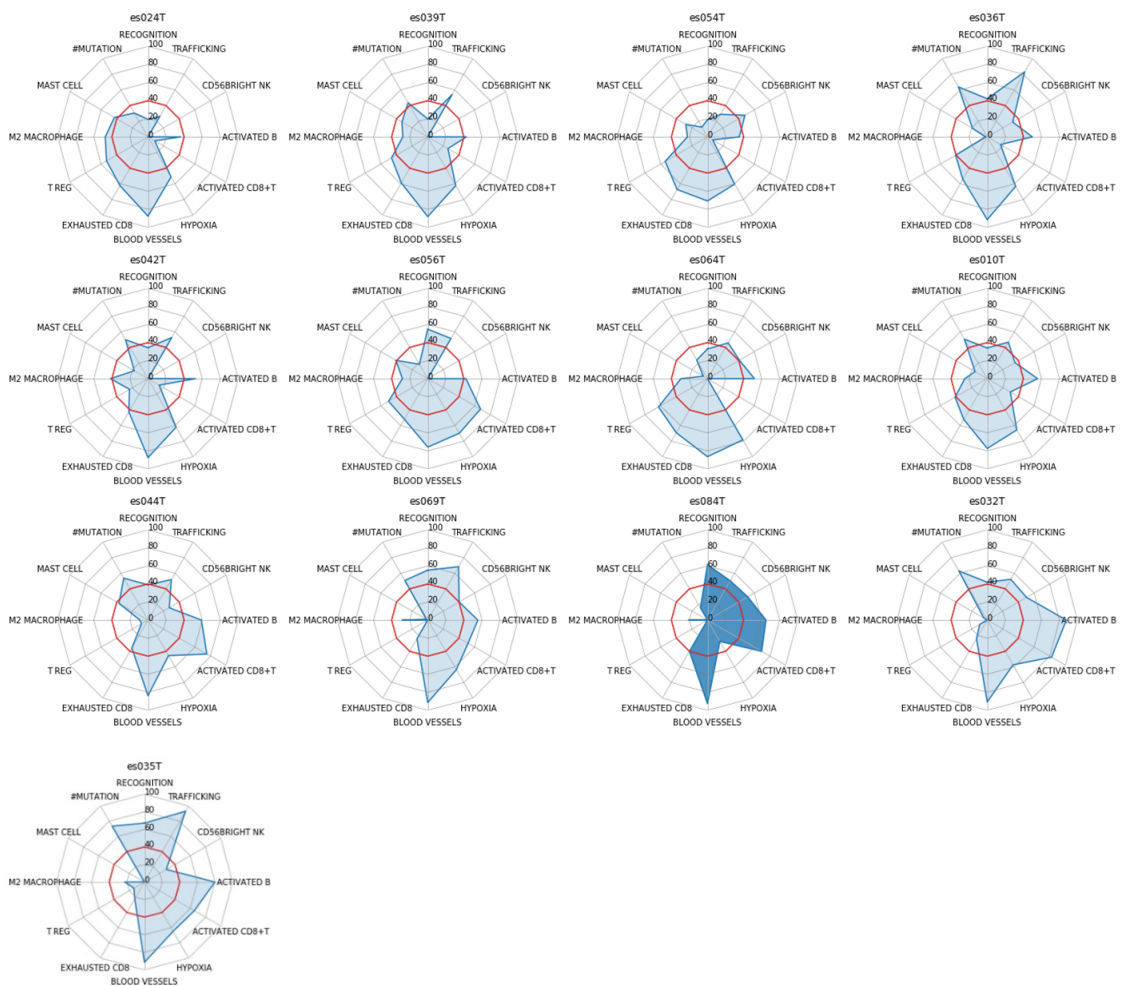


**Figure 21a:** CLS1 に属する症例すべての IMMUGENO\_GRAM。CLS1 は低酸素環境を特徴とするクラスターであり第 5 軸の HYPOXIA および第 6 軸の BLOOD VESSELS (血管形成)が他群と比べて低値をとる。術前治療を行った症例は濃青で示した。他群に比較して術前治療が行われた症例が多い。

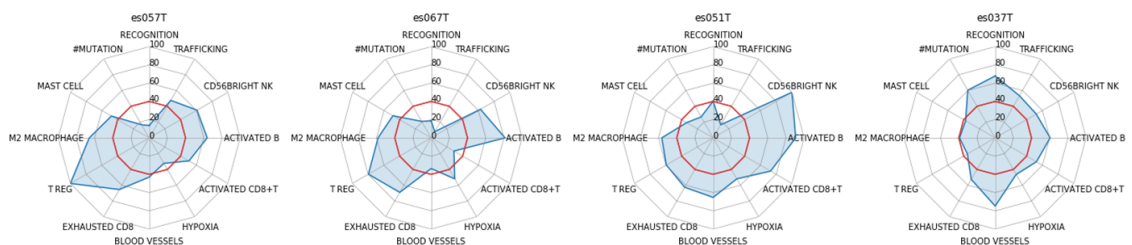


**Figure 21b:** CLS2 に属する症例すべての IMMUGENO\_GRAM。

CLS2 は群間で最も CD8+ T 細胞の活性が高いが、同時に免疫チェックポイント分子の発現が目立ち、T 細胞には疲弊が認められる。術前治療を行った症例は濃青で示した。



**Figure 21c:** CLS3 に属する症例すべての IMMUGENO\_GRAM。CLS3 ではマクロファージや肥満細胞による免疫抑制環境が目立つ。術前治療を行った症例は濃青で示した。



**Figure 21d:** CLS4 に属する症例すべての IMMUGENO\_GRAM。CLS4 では非同義変異が少なく抗原認識が乏しい。術前治療を行った症例は濃青で示した。

## 各 CLS の病理像と TIL 評価

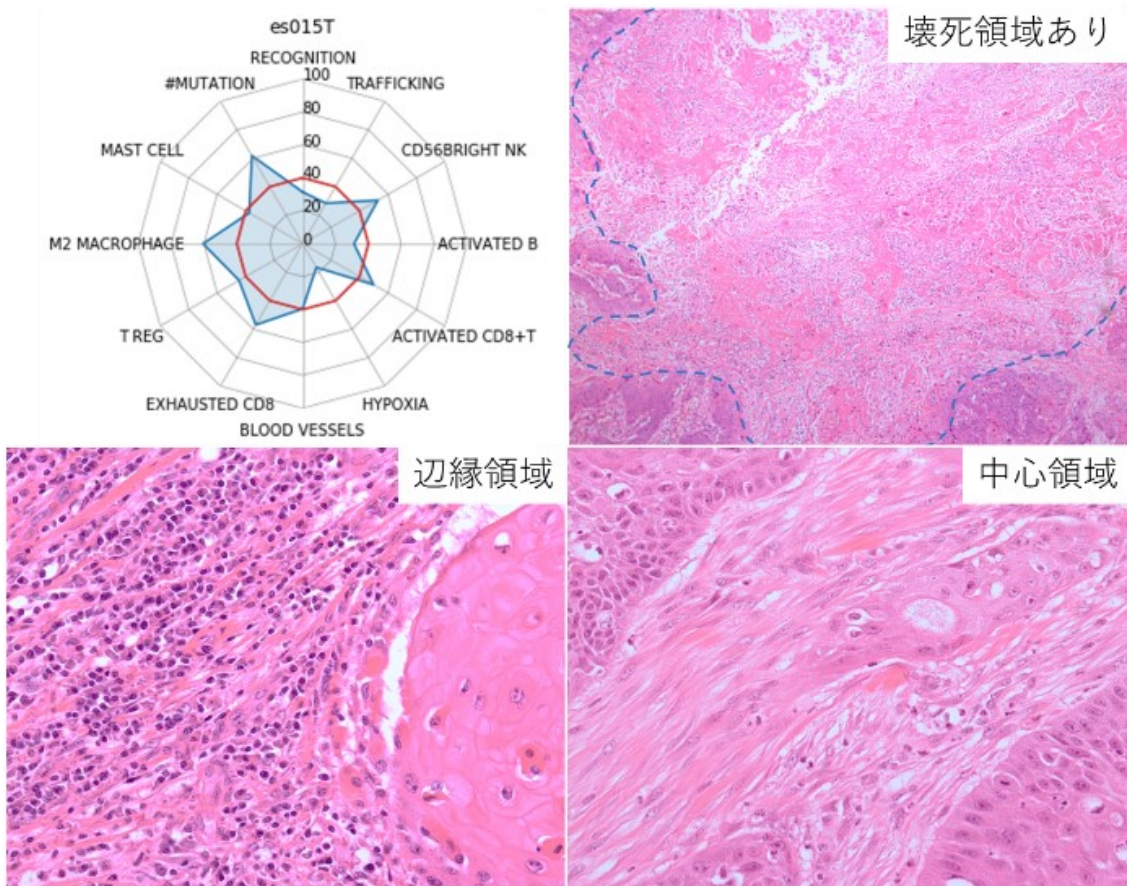
RNA-seq による免疫遺伝子シグネチャは炎症細胞浸潤の分布に関する情報を提供しない。病理組織学的に腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を評価することにより、重要な予後予測情報を得られ、また治療に対する反応を予測する上でも有用であると考えられる。免疫チェックポイント阻害剤や他の免疫療法の使用が現実のものとなるにつれ、広く適用可能で、アクセスしやすく、信頼性の高い免疫腫瘍学的評価法が必要となるが、HE 標本による TIL の評価は日常の病理学的診断に適応可能であり、手頃な価格でアクセス可能である。この費用対効果は免疫療法の時代において重要な考慮事項である。ただし HE 標本による半定量的なスコアリングは病理医間での再現性がやや低いことが問題点となる。

ここでは各クラスタに代表的な腫瘍中心と浸潤縁における特徴的な病理像を供覧したい。なお腫瘍辺縁は腫瘍と正常組織の境界を中心とした 1mm の領域であり、腫瘍中心はそれ以外の腫瘍領域を指す。なお上部消化管がんでは、胃がんに対する間質性 TIL 評価が有用であると報告されているが<sup>74</sup>、ESCC に対する TIL 評価は議論が待たれている。

CLS1 は低酸素環境を特徴とする群であるが、es015T には低酸素環境におちいった領域が認められる。辺縁領域には軽度～中等度のリンパ球や形質細胞浸潤を伴うが、中心領域に血管形成は乏しく、また炎症細胞浸潤も疎らであ

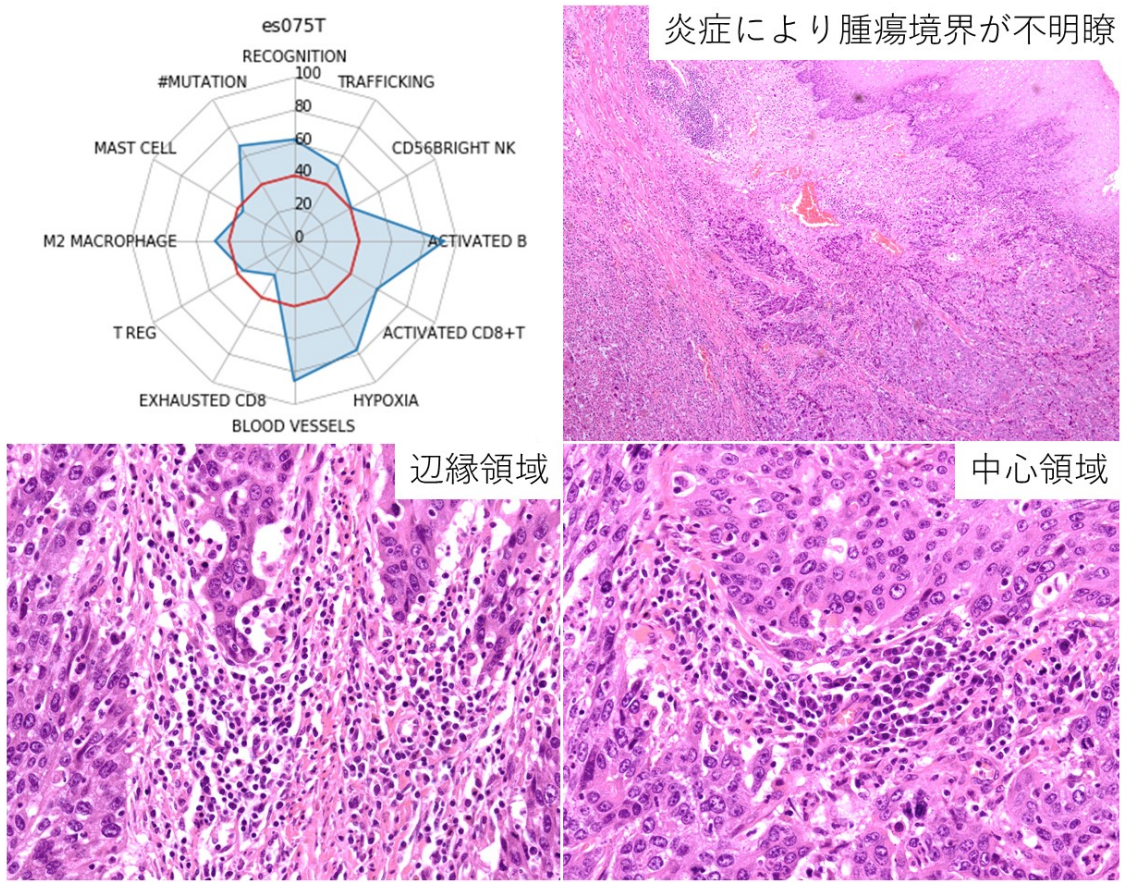


る (Fig. 22a)。CLS2 は群間で最も腫瘍免疫の活発な群であるが、es075T では辺縁領域・中心領域ともにリンパ球や形質細胞浸潤が目立ち、腫瘍胞巣の境界は炎症細胞浸潤により不明瞭となっている (Fig. 22b)。CLS3 は腫瘍免疫に乏しい群とされるが、es064T では間質に炎症細胞浸潤が認められる。しかしながら腫瘍周囲にはマクロファージや多核巨細胞がみられ、また腫瘍中心にも他群に比べてマクロファージ浸潤が散見される (Fig. 22c)。CLS4 に属する es067T では辺縁領域・中心領域、および血管周囲に炎症細胞浸潤が概して乏しい。ただし辺縁領域の一部には炎症細胞浸潤がみられる (Fig. 22d)。



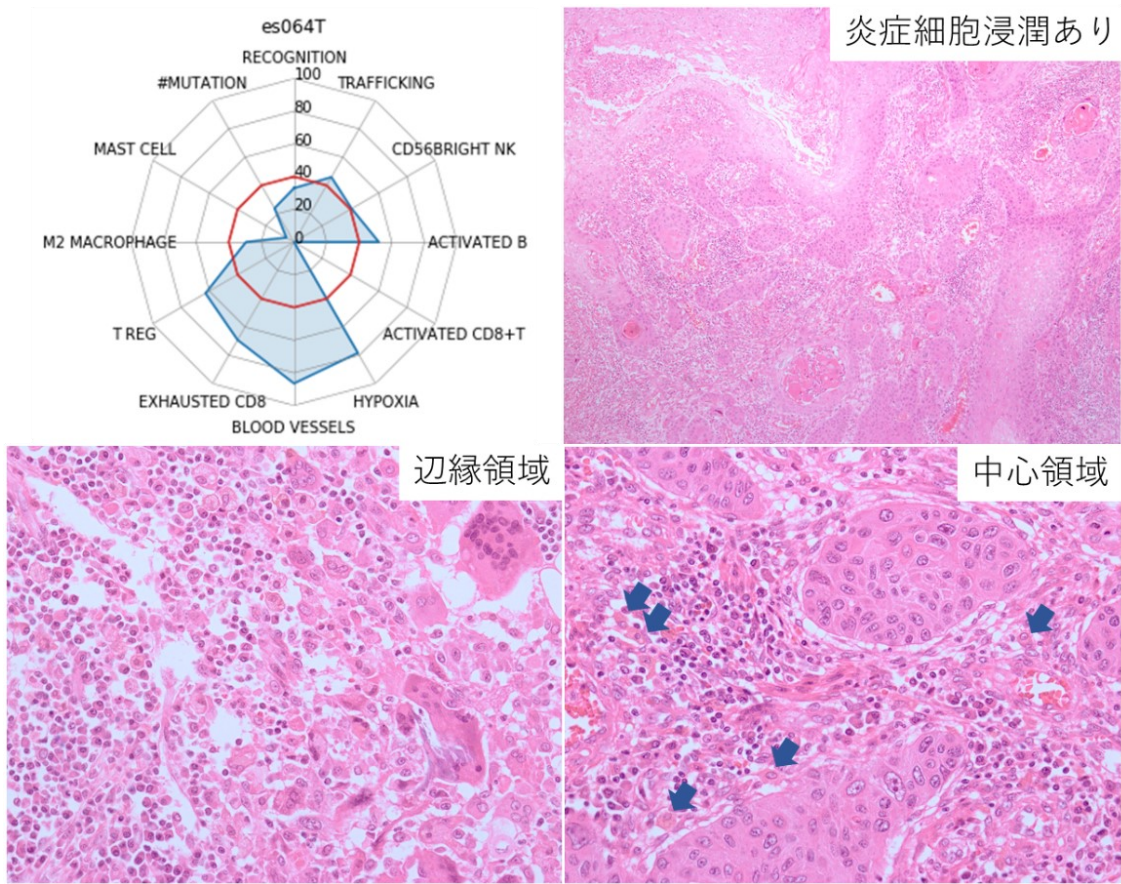
**Figure 22a:** CLS1 (es015T)の HE 標本所見。

写真中央に広範な壊死領域 (点線内)が広がっているが、これは低酸素下における組織変化として矛盾しない。辺縁領域にはリンパ球や形質細胞の浸潤がみられる一方で、中心領域に血管形成や炎症細胞浸潤は乏しい。右上の病理標本は40倍で、左下と右下は200倍で撮影された。



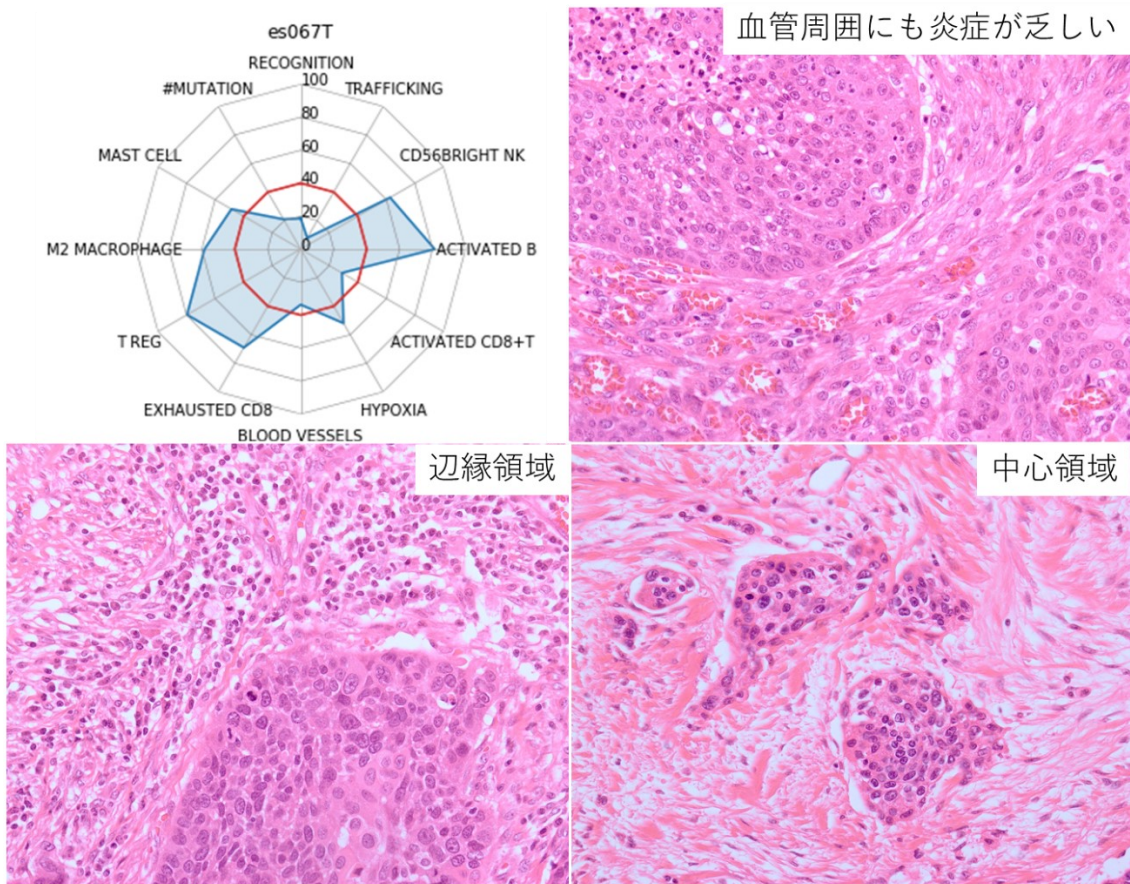
**Figure 22b:** CLS2 (es075T)の HE 標本所見

辺縁領域・中心領域ともにリンパ球や形質細胞浸潤が目立ち、腫瘍胞巣の境界は炎症細胞浸潤により不明瞭となっている。右上の病理標本は40倍で、左下と右下は200倍で撮影された。



**Figure 22c:** CLS3 (es064T)の HE 標本所見

腫瘍免疫の乏しい群ではあるが間質に炎症細胞浸潤はみられる。しかしながら腫瘍周囲にマクロファージや多核巨細胞が目立ち、腫瘍中心にも他群に比べてマクロファージ浸潤が散見される (右下青矢印)。右上の病理標本は 40 倍で、左下と右下は 200 倍で撮影された。



**Figure 22d:** CLS4 (es067T) の HE 標本所見

辺縁領域・中心領域、および血管周囲に炎症細胞浸潤は概して乏しい。ただし辺縁領域の一部には炎症細胞浸潤がみられる (左下)。病理標本はいずれも 200 倍で撮影された。

## 5. 考察

がんと TME の複雑な相互作用を明らかにすることは、がんに対する有効な治療法を開発する上で非常に重要である<sup>75</sup>。現在ではがんは TME が大きく寄与する疾患であると考えられるようになってきた<sup>76</sup>。また免疫療法を含む様々な抗がん剤治療に対してどのような TME を有するがんが反応するかを理解するために、さらなる理解と進展が期待されている。本論文では ESCC 97 症例に対して行った RNA sequencing のデータに対して、TME に関わる遺伝子を説明変数とした階層的クラスタリングを行うことで腫瘍を 4 つの特性に分類して、ESCC に対する治療戦略を提起する。

### CLS1：低酸素環境に特徴づけられたクラスター

腫瘍の低酸素環境は、細胞増殖により酸素需要が増し、新生血管が腫瘍細胞に十分な酸素を供給することができないことに起因する<sup>30,77</sup>。腫瘍における低酸素状態とは、酸素分圧が 5-10mmHg より低い状態をさす。低酸素状態を有する腫瘍は、不均一性の増大、転移の進行、遺伝的不安定性、血管新生に関連しており、臨床転帰が不良であるとされる。また化学療法や放射線療法および近年期待されている免疫療法の効果が乏しく<sup>78,79</sup>、治療抵抗性や浸潤性の高

い腫瘍を形成する傾向にあり、治療標的としても広く研究されている<sup>80,81</sup>。実際に病理標本においても腫瘍中心の低酸素領域は辺縁領域に比較して炎症細胞浸潤に乏しいことがよく知られている。

低酸素を標的とした治療を臨床応用するためには、腫瘍の低酸素環境を評価するバイオマーカーの開発が必要となる。低酸素または HIF 依存性経路を直接標的とする薬剤はいまだ承認されておらず、治験結果はいずれも芳しくない<sup>82</sup>。これは TME において複雑なネットワーク制御が行われていることに起因していると考えられ、低酸素下における免疫応答を明らかにすることで、治療介入のための新たな戦略を確立することが期待される。

### **CLS1 で低酸素環境が維持されている原因**

本研究から CLS1 において低酸素環境が維持されている要因として以下の可能性が考えられた。

#### **1. 酸素需要を満たす血管新生がみられない**

CLS1 では低酸素適応の急性期に最も活性化するとされる HIF-1 $\alpha$  の発現が増加している一方で、血管新生の開始や血管リモデリングの制御を担うとされる HIF-2 $\alpha$  は増加に乏しく、血管新生に不可欠な CDH5 の発現が十分に認められていない。

## 2. TP53 変異による Warburg 効果

がん抑制遺伝子 *p53* は ESCC において最も頻繁に変異が観察されるドライバー遺伝子である。腫瘍関連変異 *mutp53* は、野生型 *wtp53* とは独立した新たな発がん性機能を獲得し、*mutp53* GOF と定義される。がん細胞の多くは、通常の酸素濃度下においてもエネルギーを解糖系に依存しており、これはワールブルグ効果<sup>83</sup>と呼ばれる現象である。*wtp53* が解糖とワールブルグ効果を抑制する一方で<sup>84</sup>、*mutp53* は低酸素環境下で発現量が増加している GLUT1 の細胞膜への移動を促進することで細胞内へのグルコース取り込み、解糖速度および乳酸産生を大幅に増加させることが明らかとなった<sup>85</sup>。CLS1 では TP53 変異を有する症例が統計的な有意差をもって多く、HIF-1 $\alpha$  に誘導された GLUT1 発現と *mutp* GOF によるワールブルグ効果が腫瘍の生存に寄与している可能性がある。

## 3. 化学療法と放射線療法

化学療法と放射線療法に対する抵抗性はがん細胞が治療前から耐性を有していた場合と、がん細胞が抗がん剤に暴露され後天的に発生する場合がある。前者はがん細胞の幹細胞性として知られており、化学療法と放射線療法の両方に抵抗性を示す<sup>86</sup>。後者においては治療抵抗性を獲得する上で TME が極めて重要な役割を果たしている。がん細胞は低酸素に対する生理学的適応である免疫環境の変化を利用して治療抵抗性となることが知られている<sup>87</sup>。また低酸素状



態にあるがん細胞の寿命は本来限られているが、逆に術前治療を行うことで死滅するはずであった低酸素状態のがん細胞が生存・増殖しやすい環境がもたらされるといった報告もある<sup>88</sup>。

CLS1には術前治療として化学療法±放射線療法を受けた ESCC 症例が偏っている。術前治療を受けたにもかかわらず術後に研究検体が採取できたことはすなわち癌細胞が十分残っていることを意味しており、病理学的にも治療効果は Grade 0 あるいは 1a の症例がほとんどである。術前治療により低酸素環境が誘導され、また低酸素やそれに伴う免疫環境を標的とすることで術前治療の効果が高まる可能性がある。

#### 4. PI3K-Akt シグナル経路の活性化

PI3K-Akt シグナル経路はタンパク合成、細胞増殖、アポトーシス制御など、腫瘍の増殖・生存における様々なシグナルに関わっている増殖シグナル経路の 1 つであり、様々ながん種において活性化していることが知られている。低酸素環境下で生存するために必要な低酸素応答因子である HIF-1 $\alpha$  は PI3K-Akt シグナル伝達経路によって誘導されており<sup>89</sup>、PI3K 阻害剤や mTOR 阻害剤は HIF-1 $\alpha$  と VEGF の発現を抑制する<sup>90,91</sup>。CLS1 においては PI3K-Akt シグナル経路に関係する変異が有意に多く、すなわち PI3K の触媒サブユニットである

p110 $\alpha$  をコードする遺伝子である *PIK3CA* 変異や、PI3K を抑制的に制御する *PTEN* 変異が認められる。

なおチロシンキナーゼ受容体 (Receptor Tyrosine Kinases: RTK)の阻害剤としては、抗 HER2 ヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブや EGFR を抑制する低分子化合物であるゲフィチニブなど広く臨床応用が進んでいるが、RTK の下流シグナルの一つである PI3K-Akt 経路においては Akt の下流にあたる mTOR 阻害剤が腎細胞癌で使用されているにとどまっている。

## 低酸素が免疫環境に及ぼす制御性の影響

### 1. NK 細胞

CLS1 では低酸素に誘導されたオートファジーにより、細胞傷害性 T 細胞とナチュラルキラー細胞の顆粒中に含まれるグランザイム B の分解が引き起こされる。また NK 細胞表面に発現する NCNR3、NCNR1、KLRK1 などの活性化受容体の発現はいずれも **down regulation** されており、NK 細胞の細胞障害性は低下していると考えられる。

## 2. 抗原提示細胞

CLS1 では MHC-I と MHC-II がともに down regulation されており、低酸素下において樹状細胞、マクロファージ、および B 細胞などの抗原提示能が低下していることが示唆される。また腫瘍関連 B 細胞は治療効果に必要な持続的な炎症の主要な推進因子であるとされ<sup>92</sup>、B 細胞浸潤に乏しいことが抗腫瘍免疫をさらに阻害している可能性がある。

## 3. Treg 細胞

低酸素環境において HIF-1 $\alpha$  は Treg 細胞と Th17 分化のバランスを制御しており、Treg 細胞の強力な調節因子である FOXP3 転写因子レベルを増加させる。実際に CLS1 は低酸素下で TGF $\beta$  の産生が上昇しており、免疫抑制性の環境にある CLS3 より有意に FOXP3 の発現が多い。ただし FOXP3 が最も発現しているのは CLS2 であり Treg の誘導には T 細胞の疲弊が大きく関与していると考えられる。

## 4. マクロファージ

一般的に M1 型は正常酸素区域で優勢であるのに対し、M2 型は低酸素区域で優勢である<sup>93</sup>。また HIF-1 $\alpha$  は M1 型に産生された Th1 サイトカインにより

誘導されるが、HIF-2 $\alpha$  は M2 型に産生された Th2 サイトカインにより誘導される<sup>94</sup>。CLS1 は低酸素環境にありながら M2 型は優勢ではなく、M0 型の分画が目立っている (Fig. 6)。低酸素環境が遷延して M0 型から M2 型に分極することで、HIF-2 $\alpha$  による血管形成が進むと同時に CLS3 に近い TME を形成する可能性がある。

## 5. T 細胞

低酸素は腫瘍内の代謝状態をシフトさせる。がん細胞は低酸素条件下で代謝を適応させて増殖し、がん細胞と腫瘍浸潤性 T 細胞がグルコース代謝において競合した結果 T 細胞の活性が阻害され、がんの進行が加速することが示されている<sup>95</sup>。さらに TME における高乳酸値は mTOR 経路を抑制することで解糖を阻害し、T 細胞機能の低下をもたらすことが示されている<sup>96</sup>。

CLS1 における IFN- $\gamma$  産生は M2 型マクロファージに免疫環境を抑制された CLS3 と同程度であり、抗腫瘍免疫が活発に生じている CLS2 と比較して有意に低い。IFN- $\gamma$  の産生低下は CD8+ T 細胞の増殖能や分化を阻害し、CLS1 は Effector memory T 細胞の活性が群間で最も低い。

免疫療法に対する一次抵抗性のもう一つのよく知られたメカニズムは、腫瘍細胞上の免疫チェックポイント分子の up regulation である。PD-L1 は HIF-

1 $\alpha$  の標的遺伝子であると考えられており、この免疫抑制性リガンドの制御において、低酸素が重要な役割を果たしていることが示されている<sup>97</sup>。

また CTLA-4 も活性化された T 細胞上に発現し、樹状細胞などの抗原提示細胞上でそのリガンドである CD86 と結合すると T 細胞の活性化を阻害するが、PD-L1 と同様に、低酸素は HIF-1 $\alpha$  依存性の方法で DC 上の CD86 の発現を up regulation させることが示されている<sup>98</sup>。さらに低酸素かつ酸性条件下における代謝において解糖が阻害されると PD-1 の発現が増加し、これは T 細胞の非応答性や疲弊と相関することで、がん細胞の免疫逃避を促してしまうことも報告されている<sup>99</sup>。

しかしながら CLS1 においてはいずれの免疫チェックポイント分子の発現上昇傾向も認められず、低酸素に誘導されるとされる T 細胞の疲弊は目立たない。すなわち ESCC では低酸素に誘導される免疫賦活的な役割にも注目しなければならぬことが示唆される。

## 低酸素の免疫賦活的な役割

### 1. オートファジー

CLS1 では HIF-1 $\alpha$  存在下での BNIP3 と BNIP3L の発現上昇がみられ、低酸素環境におけるオートファジー活性を意味している。オートファジーは NK

細胞や細胞障害性 T 細胞が介する抗腫瘍免疫を打ち消すことが知られており、腫瘍の重要な生存メカニズムであるオートファジーを選択的に阻害する新薬の開発に大きな関心が寄せられている。

しかしながら一方でオートファジーは MHC-I や MHC-II に腫瘍抗原を提示する処理や<sup>100</sup>、樹状細胞および T リンパ球を腫瘍に遊走させる役割も有することが明らかになっている。オートファジーを阻害すると ATP の免疫原性放出が障害され、ATP 依存性の免疫細胞のリクルートがブロックされた<sup>101</sup>。すなわち低酸素下でオートファジーを阻害することが免疫治療に及ぼす影響についてはさらなる研究が望まれる。

## 2. 免疫原性細胞死

低酸素環境においてすでに活性化された CD8+ T 細胞は低酸素介在性炎症を介して ICD によりがん細胞を排除しており、ICD に特徴的とされる DAMP が増加している。すなわち CLS1 においては低酸素による Treg や免疫チェックポイント阻害薬などの誘導を介した免疫抑制性の側面は目立たない一方で、低酸素環境が有する免疫賦活性の側面が認められる。

低酸素に伴う TME を標的とする治療アプローチは、一般的に低酸素を介した化学療法や免疫療法への抵抗性を防ぐことができる魅力的なものであると

されるが、ESCCにおいてその効果を期待するには疑問が残る。CLS1では低酸素による免疫抑制が示された一方で、生存解析ではCLS2と統計的有意差をもたず、むしろ血管が形成され低酸素環境には乏しいCLS3に比べて良いように思われる。低酸素ががん化を促進する経路とがん化を阻害する経路の両方において、低酸素の役割を客観的に評価し、低酸素を介した治療抵抗性を克服する方法を考えなければならない。

## **CLS2：抗腫瘍免疫が最も活発な群**

CLS2ではCD8+ T細胞による抗腫瘍免疫が目立ち、その予後は群間で最も良い。肉眼型分類としてはType 3が有意である。

がん免疫療法の大部分は主にTリンパ球を介した抗腫瘍免疫の増強に焦点を当てている。初期にはIL-2<sup>102</sup>や自家Tリンパ球<sup>103</sup>の注入を用いた戦略が試みられたが、治療上の成功率は低いか、あるいは全く得られず、高い毒性を伴うものであった。免疫チェックポイント阻害薬を用いたアプローチは様々ながん（乳がん、肺がん、腎がん、膀胱がん、前立腺がん、リンパ腫、悪性黒色腫など）に対して顕著な臨床効果を示している<sup>104,105</sup>。腫瘍細胞を標的とするのではなく、細胞障害性Tリンパ球に対する抑制シグナルを除去することで、長期にわたる臨床的な奏功が得られた。2011年にFDAは悪性黒色腫の治療薬として

抗 CTLA-4 剤（イピリムマブ）を、2014年には抗 PD-1 剤（ペムブロリズマブとニボルマブ）を承認した。

先行研究では、PD-L1 の過剰発現が ESCC の 14.5-63.3%に認められたことが示されている<sup>106</sup>。したがって ESCC は免疫チェックポイント阻害薬が期待される腫瘍の一つである。CLS2 においては活性化した CD4+ T 細胞や CD8+ T 細胞が群間で最も多く認められる一方で、疲弊した T 細胞である exhausted CD8 も目立ち、免疫チェックポイント分子である PD-1 や CTLA-4 の発現は群間で最も高い。治療耐性を誘導するような低酸素環境もみられず、免疫チェックポイント阻害薬が最も期待される群であると言える。また PD-1 以外にも CTLA-4、LAG-3、CD244、CD160、TIM-3 など多くの抑制性受容体の発現上昇が認められ、併用療法の適用とその効果も期待される。

しかし PD-1 や PD-L1 の過剰発現があっても、免疫チェックポイント阻害薬に短期的な効果しか得られない患者や、全く効果が得られない患者もいることが報告されつつある<sup>107</sup>。すなわち PD-1 や PD-L1 の多寡のみでは治療に反応する患者と代替療法を提供すべき患者を区別するには不十分である。例えば乳がんにおいて抗 PD-1 および抗 PD-L1 治療は、前治療を受けた化学療法抵抗性でかつ PD-L1 陽性のトリプルネガティブ乳がんに対して 19%の奏効率にとどまる。裏を返せば PD-L1 陽性のトリプルネガティブ乳がんの大多数 81%が免疫



療法に対して不応であることが報告されている。CLS2に属するESCCに対しては抑制性受容体の組み合わせを確認して対応する免疫チェックポイント阻害薬を投与しつつ、TMEを経時的に評価することで、治療に反応する患者の選択性をより高めることが必要である。

### **CLS3 : M2型マクロファージに抗腫瘍免疫を抑制された群**

低酸素環境による免疫抑制が目立ったCLS1と同程度の予後を示すが、CLS3の酸素分圧はCLS2と同程度である。M2型マクロファージや肥満細胞が適切な免疫応答を阻害していると示唆される。肉眼型分類としてType 4が有意である。

臨床的には外科的切除の前に、正確な病期分類情報、特にリンパ節の状態を病理医や放射線科医が把握することはできない。したがって、治療戦略は臨床病期 **clinical stage** によって導かれるが、術前の臨床診断で **cN0** と診断された食道がんのうち33-78%が最終的な転移を有する<sup>108</sup>。CLS3ではM2/M1型マクロファージの割合がリンパ節転移やOSの不良と強く関連していることが明らかとなり、M2型マクロファージの相対的な増加が、リンパ節転移を予測するための臨床的なマーカーである可能性が示唆された。

治療戦略としてはM2型をM1型にリプログラミング誘導するようなアプローチと、化学放射線療法や免疫療法の併用が期待される。CLS3ではVEGF-BおよびVEGF-Dの発現量が他群と比較して有意に高いが、低用量の抗VEGF2抗体がTAMを免疫抑制性のM2型から免疫刺激性のM1型に分極させることが実証され、この結果CD8+およびCD4+ T細胞の腫瘍浸潤が改善されたとする報告がある<sup>63</sup>。

またIL-6/STAT-3シグナル伝達経路が肝細胞癌においてM2型で活性化されており、抗IL-6治療を行ったところ、M2型からM1型への誘導が確認され、また共培養したHCC細胞の腫瘍異種移植片を移植したヌードマウスではHCC細胞の腫瘍形成および肺転移が抑制された<sup>62</sup>。STAT3活性化は、がん細胞の増殖性および免疫抑制因子の発現を促進することにより、腫瘍の進行の中心的な役割を果たしている。またSTAT3およびSTAT5を同時に阻害することでCD8+ Tエフェクターおよびメモリー細胞の腫瘍内における長期生存を可能とし、細胞障害活性を高め、および腫瘍による免疫抑制に対する耐性が与えられることも示されている<sup>109</sup>。

### CLS3 における肥満細胞について

CLS3 では CXCL9 と CXCL10 の発現抑制が認められ、T 細胞や NK 細胞のリクルートが阻害されていると考えられる。ただし肥満細胞の浸潤が生存に有利であるとする報告<sup>110</sup>もみられ、肥満細胞を標的とする治療がどのような臨床転帰や TME の変化をもたらすのか、さらなる研究が必要である。

### CLS4 : 正常上皮とプロファイルの近い群

免疫チェックポイント阻害薬に対する反応のバイオマーカーとして腫瘍突然変異負荷 (Tumor Mutational Burden: TMB)<sup>111</sup>が提案されている。例えば前立腺がんと膀胱がんはいずれも TMB が低く、抗免疫腫瘍を惹起しにくい cold tumor であり、よって免疫チェックポイント阻害薬には反応しにくい。

すなわちがんは、TMB が高く免疫チェックポイント阻害薬の奏功が期待されるか、または TMB が低く免疫チェックポイント阻害薬に反応する確率が低いかのいずれかに分類される。高 TMB の腫瘍は抗腫瘍免疫に関与する過程で認識されうるネオアンチゲンを多く有している確率が高いと推定される。

抗 PD-1/PD-L1 抗体は、一般的に腫瘍反応性 T 細胞を再活性化するが、腫瘍反応性 T 細胞の形成を誘導するわけではないことに留意しなければならない。PD-L1 などの免疫抑制分子を発現する腫瘍を有する一部の患者が、これらの分

子を欠く腫瘍と比較して免疫チェックポイント阻害薬に反応する可能性が高いと期待される理由はここにあり、すなわち免疫調節分子の発現は、抗腫瘍 T 細胞および IFN- $\gamma$  などの免疫エフェクターサイトカインの存在に二次的に依存している<sup>112</sup>。

しかしながらこの治療戦略は、どの患者が薬剤に反応し、どの患者が反応しないかという普遍的な定義には至らない。例えばメラノーマや NSCLC 患者の大多数は、高 TMB の腫瘍であるにもかかわらず、免疫チェックポイント阻害薬に反応しないことが多い。逆に TMB が少ないがんである腎細胞癌では、免疫チェックポイント阻害薬に反応する患者もいることが分かり、転移性 RCC 患者の治療薬として抗 PD-1 抗体であるニボルマブが承認された。

CLS4 はドライバー遺伝子変異や非サイレント変異が他群より有意に少なく TMB の少ない cold tumor である可能性がある。TMB の少ない腫瘍に対しては、ミスマッチ修復遺伝子を欠損させることにより、TMB の多い腫瘍に転換する戦略が提案されている<sup>113</sup>。さらに oncolytic virus 法<sup>114</sup>との併用など、T 細胞免疫が活発な状態を誘導しうる方法と組み合わせることで、多くのがん種を免疫チェックポイント阻害薬に応答性のものに変化させることができる可能性がある。

## IMMUGENO\_GRAM の活用

本研究においては低酸素微小環境に対する腫瘍の分子反応を推定するために遺伝子発現プロファイリングを行った。RNA sequencing のようなオミックスデータは俯瞰的な視点を形成するために有用であるが、実臨床で活用するためには情報量をできる限り保ちながら構成要素を分解する必要がある。我々は抗腫瘍免疫応答を修飾する主要な因子である低酸素環境を含めた考察を行い、ESCC における TME を 4 つに分類して、そのそれぞれにおいて免疫療法の治療効果を向上させる治療戦略を考察したが、がん免疫サイクルを基盤としてどの過程が障害されているかを視覚的に判断することを可能にするツールとして IMMUGENO\_GRAM を作成した (Fig. 23)。IMMUGENO\_GRAM では 0~2 時方向ががん免疫サイクルの開始を、3~4 時方向が抗腫瘍免疫の強さを、5~11 時方向が免疫を抑制する因子を表現している。

2016 年 Science において the “cancer immunogram”として下記 7 つの要素を評価および視覚化することが提唱された<sup>73</sup>が、IMMUGENO\_GRAM がその要件を満たすことを記述する。

### 1. Tumor foreignness

免疫に認識される腫瘍の外来性 foreignness は大部分がネオアンチゲンの発現によって決定される。特に、腫瘍のネオアンチゲン負荷のサロゲートマ

ーカーである TMB と、チェックポイント阻害薬の転帰には相関関係があることがメラノーマおよび非小細胞肺癌で認められている。IMMUGENO\_GRAM では第 11 軸に相当する。

## 2. General immune status

免疫療法は CD8+ T 細胞活性が腫瘍に対するエフェクター機構であることを前提としている。リンパ球浸潤に乏しい腫瘍に対してチェックポイント阻害薬の奏功は期待されない。IMMUGENO\_GRAM の第 3~4 軸に相当する。

## 3. Immune cell infiltration

T 細胞が腫瘍に浸潤することは腫瘍免疫が機能するための明白な要件である。CXCL9 と CXCL10 の発現は、チェックポイント阻害薬の転帰を改善することが報告されている。IMMUGENO\_GRAM の第 2 軸に相当する。

## 4. Absence of checkpoints

チェックポイント分子およびそのリガンドの発現プロファイルは免疫環境の重要なバイオマーカーである。IMMUGENO\_GRAM の第 7 軸に相当する。

## 5. Absence of soluble inhibitors

VEGF, CSF, IL-1/6/17, CXCL1 など分泌する好中球、 $\gamma$   $\delta$  細胞、腫瘍関連マクロファージの存在を評価する。IL-1/6 は炎症の臨床マーカーである CRP

を誘導するが、CRP の上昇は抗 CTLA-4 抗体治療の予後不良と関連すると報告されている。IMMUGENO\_GRAM の第 9 軸に相当する。

#### 6. Absence of inhibitory tumor metabolism

低酸素状態においてピルビン酸は乳酸へ変換され、細胞外に送り出される。乳酸と局所的な低 pH は、サイトカイン産生 (IL-2、IFN- $\gamma$ )、増殖、細胞分裂活性などの重要な T 細胞機能を損なう可能性がある。IMMUGENO\_GRAM の第 6 軸に相当する。

#### 7. Tumor sensitivity to immune effectors

抗原提示機構が不活性化されると、免疫系に対する視認性 visibility が低下して腫瘍は免疫を回避する。MHC 発現と免疫チェックポイント阻害薬の感受性を解析することで、T 細胞活性化療法に反応しにくい患者を特定することができるだろう。IMMUGENO\_GRAM の第 0 軸に相当する。

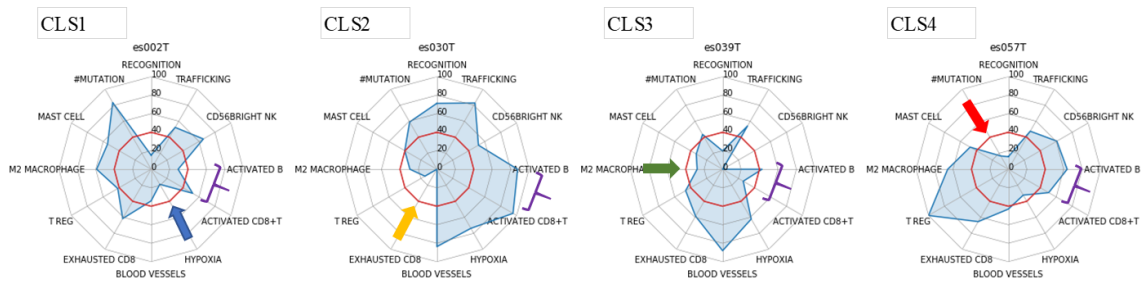
CLS1 は抗腫瘍免疫の活性が乏しく第 3~4 軸が低い。その理由として低酸素環境を表現する第 5 軸が欠けており、血管形成を表現する第 6 軸も低値をとる傾向がある。CLS2 では CD8+ T 細胞による抗腫瘍免疫を意味する第 4 軸が群間で最も高値となり、持続的な炎症の推進因子であるとされる B 細胞を表す第 3 軸もまた高値である。しかしながら炎症と同時に T 細胞の疲弊や Treg の誘導

が目立ち、第 7~8 軸に凹みが目立つ症例も多く確認される。CLS3 も第 3~4 軸が低い、その理由としてマクロファージや肥満細胞の浸潤が目立ち第 9~10 軸が低値となる。CLS4 では非同義変異が少なく結果としてがん免疫サイクルの開始起点である第 0 軸が小さい。

興味深いことに免疫抑制を表現する 5~11 時方向において、CLS1 を意味する第 5~6 軸、CLS2 を意味する第 7~8 軸、CLS3 を意味する第 9~10 軸、CLS4 を意味する第 11(~0)軸の凹みは相互排他的な傾向にあり、第 5~11 軸の全てが赤線で表した $-0.5SD$ を下回る症例は存在しない。

CLS1 や CLS3 のように免疫学的に cold な ESCC に対しては、免疫抑制性の環境を考慮した治療法を選択した上で、化学療法や放射線療法などを組み合わせ、免疫学的に hot な状態を作り出すことで、治療戦略を CLS2 に合流させることができるだろう。CLS2 のように免疫学的に hot な ESCC に対しては T 細胞の疲弊においてどの抑制性受容体が共発現しているかを確認し、免疫チェックポイント阻害薬を単剤あるいは併用することで抗腫瘍免疫の活性を維持することが期待される。CLS4 のように TMB が低いことを理由として免疫環境が惹起されていない患者に対しては、まず TMB の高い腫瘍に転換させる必要がある。





**Figure 23:** CLS1~CLS4 それぞれにみられる IMMUGENO\_GRAM の特徴。それぞれのクラスタから典型的なチャートを示す症例を選んだ。紫括弧で示した第3~4軸をみることで抗腫瘍免疫の活性が確認される。CLS2は抗腫瘍免疫の鍵となる CD8+ T 細胞の活性が群間で最も高い。

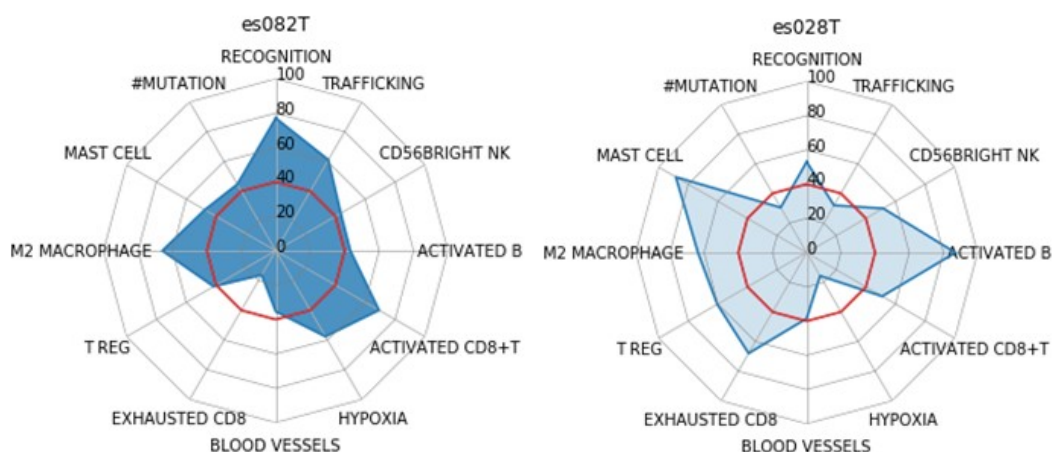
免疫抑制性の環境として、第5~6軸の低酸素環境で CLS1 を (青矢印で示した)、第7~8軸の T 細胞の疲弊や Treg 細胞で CLS2 を (黄矢印で示した)、第9~10軸のマクロファージや肥満細胞で CLS3 を (緑矢印で示した)、第11~0軸の非同義変異で CLS4 を (赤矢印で示した)、それぞれ分類することができる。

ところが IMMUGENO\_GRAM を詳細に観察すると、あるクラスタに分類されたにもかかわらず、そのクラスタの特徴に乏しい症例や、他クラスタの特徴を有する症例も観察される。

例えば es082T は化学療法後の症例である。第3~4軸の抗腫瘍免疫が目立ち、第7軸に T 細胞の疲弊がみられるチャートは CLS2 の特徴に一致するが、実際にはこの症例は第5軸の HYPOXIA が低くないにもかかわらず CLS1 に分類されている (Fig. 24 左)。発現プロファイルが低酸素環境の TME を有する患者と近いにもかかわらず、GSEA によるスコアリングで形状が大きく異なる症例は TME を規定するために異なる説明変数が必要となる可能性を示唆している。ま

た化学療法による変化をみている可能性もあるが、化学療法前の検体採取は行っておらず、残念ながら経時的な TME 変化を追うことはできない。

別の症例である es028T は CLS2 に属するが、確かに CD8+ T 細胞や B 細胞による炎症活性は高い (Fig. 24 右)。しかしながら免疫抑制性の因子を観察した場合に、CLS1 に特徴的とされる低酸素環境が  $-0.5SD$  を大きく下回ることが明らかとなる。低酸素環境が長く続いた場合には CLS1 への経時的な移行が確認される可能性がある。



**Figure 24:**

(左) CLS1 に分類される es082T の IMMUGENO\_GRAM。免疫抑制環境として最も目立つのは T 細胞の疲弊であるがこれは CLS2 の特徴である。

(右) CLS2 に分類される es028T の IMMUGENO\_GRAM。CD8+ T 細胞や B 細胞の免疫活性は保たれているが、免疫抑制環境として CLS1 の特徴とされる低酸素環境が基準値を大きく下回っている。

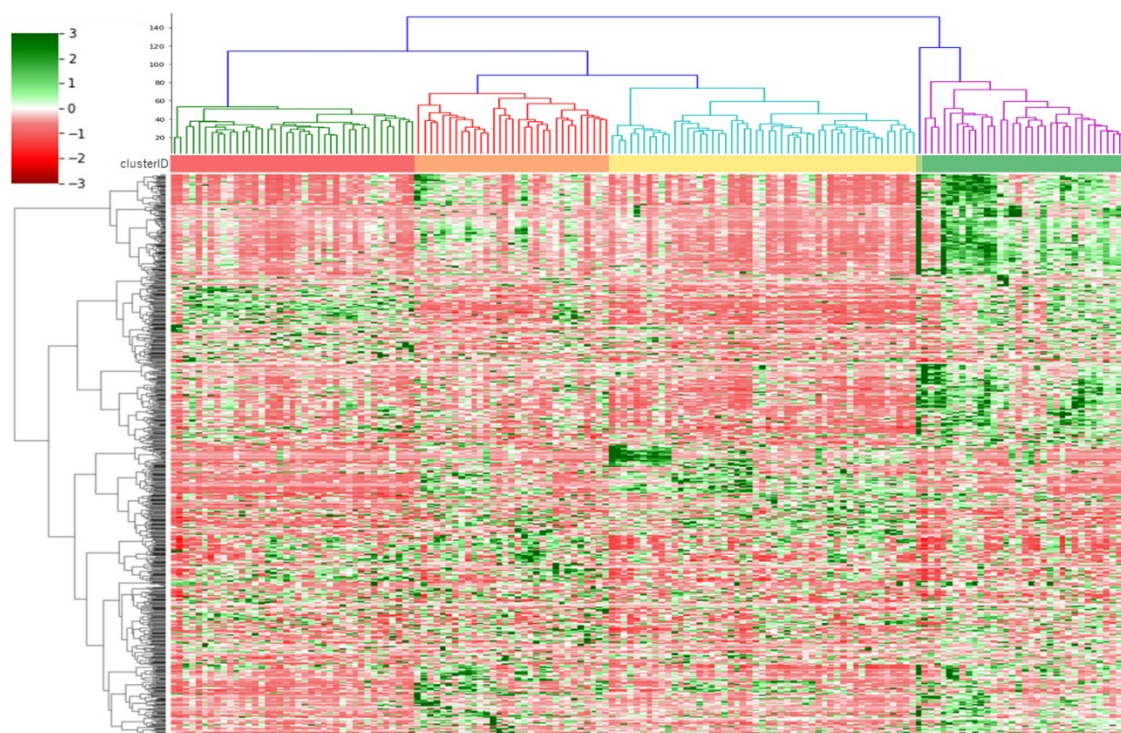
腫瘍の進行や、化学療法や放射線療法、分子標的薬、免疫療法など種々な介入に伴い、TME がどのようなパターンで変化するのかを実臨床で大規模にフォローすることは新たな治療戦略につながりうる。その評価として IMMUGENO\_GRAM を指標とすることで、患者ごとに異なる ESCC の微小環境を視覚的に理解することが可能となり、最適な個別化免疫療法のための貴重な指針が構成されることに期待したい。

## 【外部データによる validation】

低酸素および免疫環境に関連する 886 遺伝子 (上述)の発現量を特徴量として TCGA に登録されている ESCC 154 症例のクラスタリングを行った。154 症例は Caucasian 93 症例, Afro-American 4 症例, Asian 38 症例, 人種未報告 18 症例から構成されている。下記に (i)人種を区別せずに、(ii)Asian 症例のみ、(iii)Caucasian 症例のみをクラスタリングした場合に生じた TME 分類を示す。

### 人種を区別せずにクラスタリングした場合

階層的クラスタリングにより生じた 5 分類を CLS-A,B,C,D,E と呼称する (Fig. 25)。CLS-A に 39 症例、CLS-B に 31 症例、CLS-C に 49 症例、CLS-D に 1 症例、CLS-E に 33 症例が分類された。群間に有意な人種差が認められ、免疫療法に対する TME 分類を議論するときには人種差を考慮する必要性が示唆された。本論文中に議論した ESCC 97 症例はすべて日本人であり比較を容易にするため、人種ごとに階層的クラスタリングを再試行した。



**Figure 25:** TCGA に登録されている ESCC154 症例に対して低酸素および免疫環境に関連する 886 個の遺伝子による階層的クラスタリングを行った。症例を横軸に、遺伝子を縦軸にとり、発現量を赤 (低発現)~緑 (高発現)で表している。クラスタリングにより生じた 5 分類を CLS-A,B,C,D,E と呼称し、カラーバーにおいて CLS-A を赤色、CLS-B を橙色、CLS-C を黄色、CLS-D を黄緑色、CLS-E を緑色で示した。

	white	black	asian	not reported			Odds ratio	p-value
CLS-A	28	0	1	10	CLS-A	asian	0.0540	0.0001
CLS-B	16	1	12	2		not reported	4.6000	0.0037
CLS-C	22	3	22	2	CLS-C	white	0.3800	0.0077
CLS-D	1	0	0	0		asian	4.5000	0.0002
CLS-E	26	0	3	4	CLS-E	white	2.9000	0.0260
						asian	0.2400	0.0220

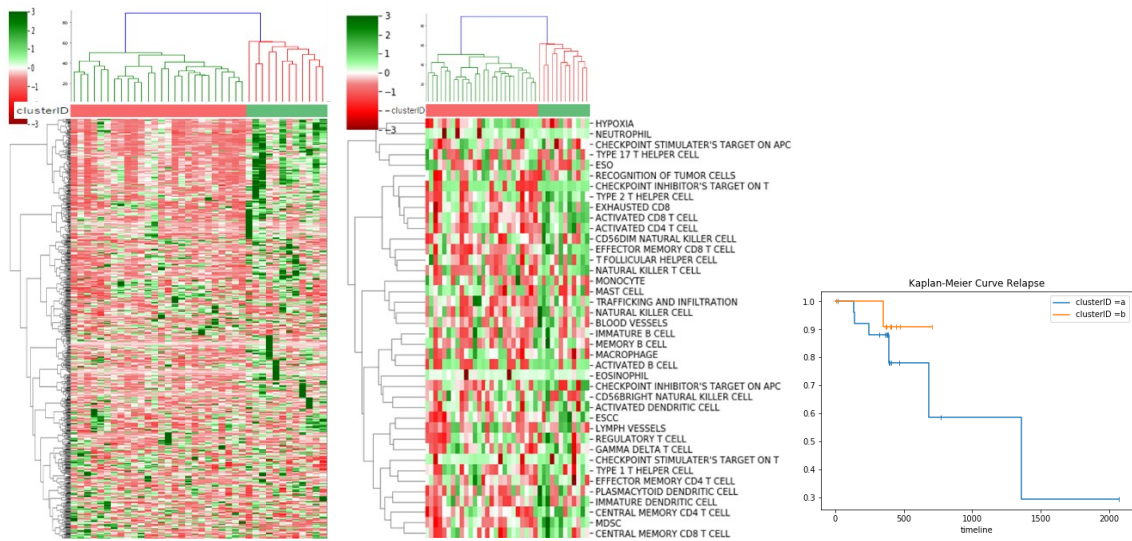
**Table 10:** CLS-A から CLS-E に分類された症例の人種差を示す。CLS-C には asian が、CLS-E には Caucasian が有意な偏りをもって分布している。

## Asian 症例のみをクラスタリングした場合

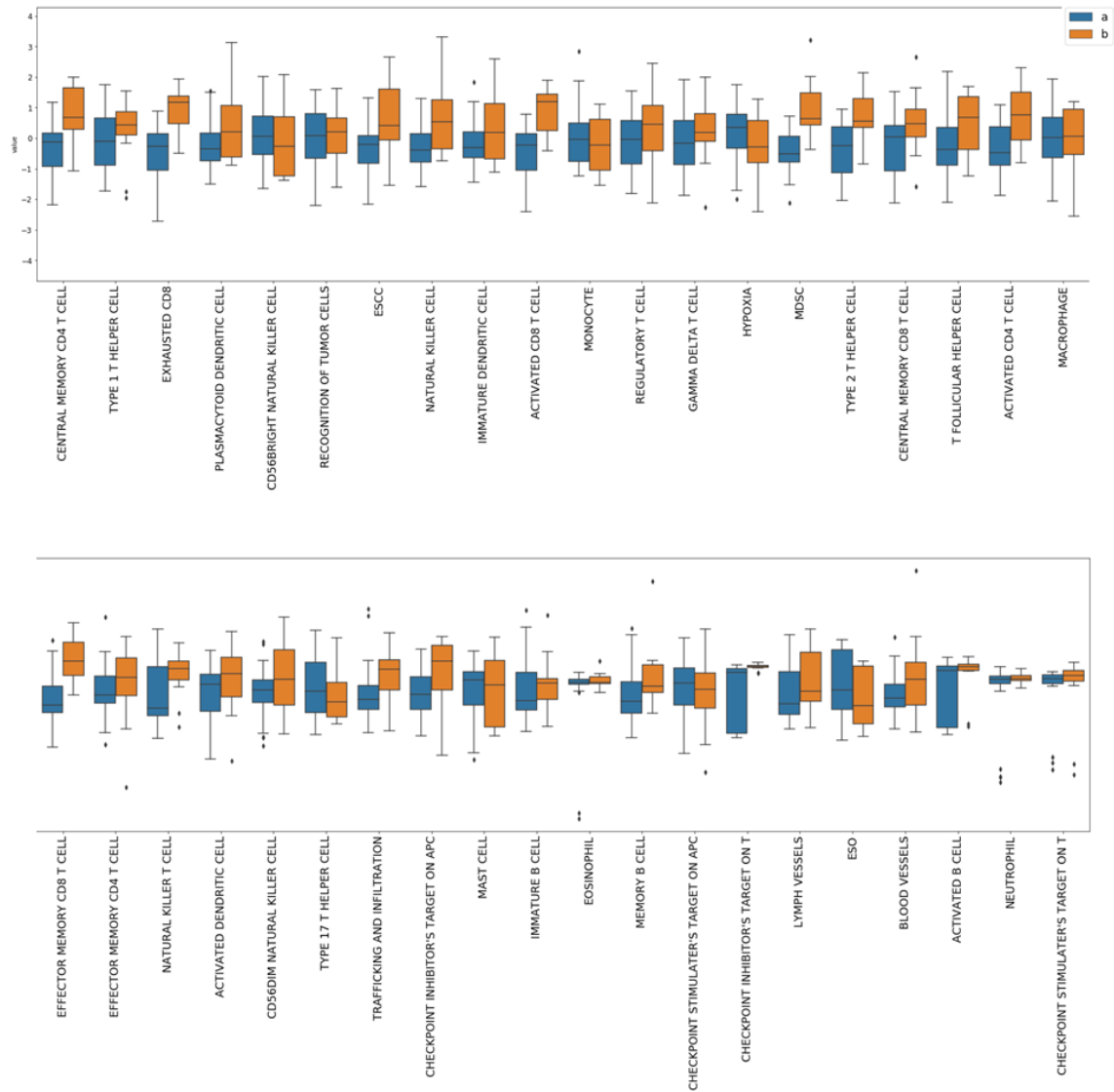
TCGA に登録されている Asian 38 症例に対する階層的クラスタリングを行い、クラスタリングにより生じた 2 分類を CLS-a,b と呼称する (Fig. 26)。日本人は Asian に属するが、38 症例のうち日本人が何症例含まれているかは明らかでない。

血管形成の乏しさや低酸素環境が CLS-a における免疫抑制性因子である可能性はあるが、統計学的有意差は明らかでない。また群間におけるマクロファージ浸潤および肥満細胞浸潤にも有意差は生じない。

CLS-b では有意な CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞、B 細胞の浸潤が認められ、かつ T 細胞に疲弊が示されたが (Fig. 27)。CLS-b は免疫チェックポイント阻害薬が期待される群であると考えられる。これは CLS2 における解析結果と矛盾しない。



**Figure 26:** TCGAに登録されている Asian 38 症例に対して低酸素および免疫環境に関連する 886 個の遺伝子による階層的クラスタリングおよび GSEA 解析を行った。症例を横軸に、遺伝子または遺伝子セットを縦軸にとり、発現量を赤 (低発現)~緑 (高発現)で表している。クラスタリングにより生じた 2 分類を CLS-a,b と呼称し、カラーバーにおいて CLS-a を赤色、CLS-b を緑色で示した。CLS-b の生存曲線は CLS-a よりも上側に描画されているが、生存解析で群間に有意差は生じない ( $p=0.43$ )。



**Figure 27:** Asian 症例に対する GSEA 解析結果。微小環境として定義した遺伝子セットごとの NES を群間で比較し箱ひげ図に表した。CLS-a を青色、CLS-b を橙色で示す。



Central memory CD4 T cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.0014	Hypoxia	<b>p-value</b> CLS-a > b 0.3034	Trafficking and infiltration	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.0448
Type 1 T helper cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.3863	MDC5	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.0003	Checkpoint inhibitor's target on APC	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.1906
Exhausted CD8	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.0001	Type 2 T helper cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.0011	Mast cell	<b>p-value</b> CLS-a > b 0.9801
Plasmacytoid dendritic cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.1029	Central memory CD8 T cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.0530	Immature B cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.5464
CD56bright natural killer cell	<b>p-value</b> CLS-a > b 0.7590	T follicular helper cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.0655	Eosinophil	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.1116
Recognition of tumor cells	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.6964	Activated CD4 T cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.0061	Memory B cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.1098
ESCC	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.0167	Macrophage	<b>p-value</b> CLS-a > b 0.8776	Checkpoint stimulator's target on APC	<b>p-value</b> CLS-a > b 0.5796
Natural Killer cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.0230	Effector memory CD8 T cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.0001	Checkpoint inhibitor's target on T	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.0000
Immature dendritic cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.1554	Effector memory CD4 T cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.7230	Lymph vessels	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.2286
Activated CD8 T cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.0000	Natural killer T cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.0322	ESO	<b>p-value</b> CLS-a > b 0.1312
Monocyte	<b>p-value</b> CLS-a > b 0.3778	Activated dendritic cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.2030	Blood vessels	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.2073
Regulatory T cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.3690	CD56dim natural killer cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.2112	Activated B cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.0430
Gamma delta T cell	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.3087	Type 17 T helper cell	<b>p-value</b> CLS-a > b 0.4190	Neutrophil	<b>p-value</b> CLS-b > a 0.0518
				Checkpoint stimulator's target on T	<b>p-value</b> CLS-a > b 0.9184

**Table 11:** Asian 症例に対する GSEA 解析結果。GSEA40 項目に対してウェルチの t 検定を行い、その p 値を統計的有意差に関わらず記載した。

## Caucasian 症例のみをクラスタリングした場合

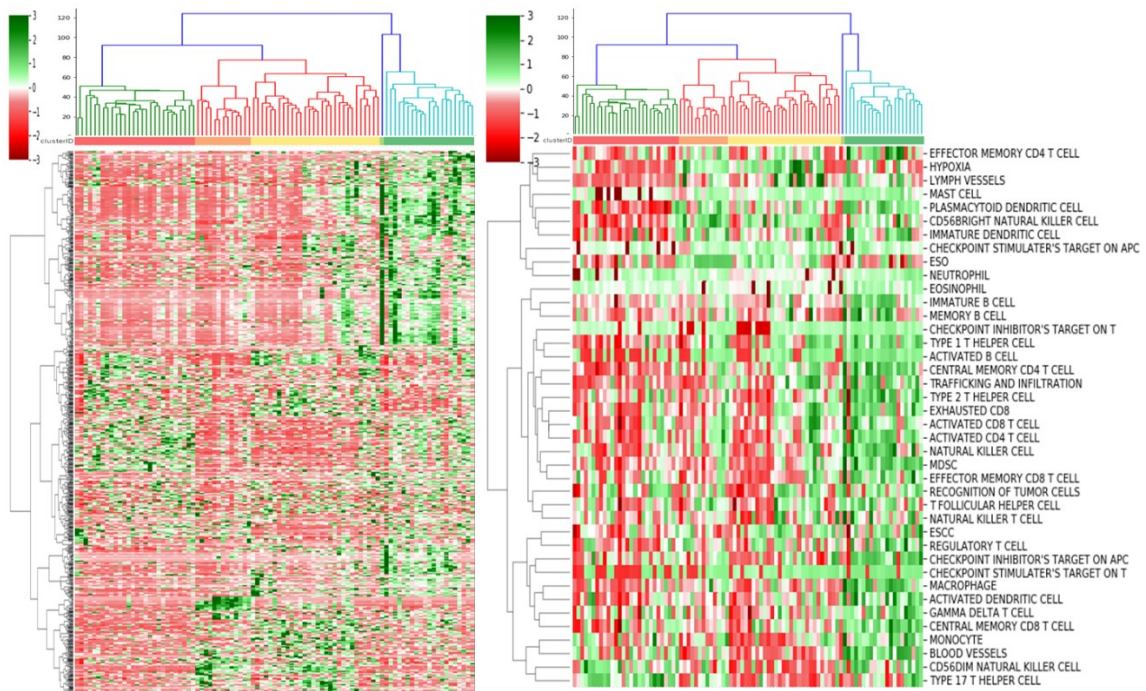
TCGA に登録されている人種のうち最多となる Caucasian 93 症例に対する階層的クラスタリングを行い、その結果として生じた 5 分類を CLS- $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$  と呼称する (Fig. 28)。生存解析において群間に有意差は生じない (Fig. 29)。

CLS- $\alpha$  は群間でもっとも CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞、B 細胞の浸潤が乏しく抗腫瘍免疫が弱いことが明らかとなったが、低酸素環境や腫瘍関連マクロファージの浸潤などの免疫抑制性の環境が目立たず、CLS4 に相当する TMB が低い cold tumor である可能性がある。

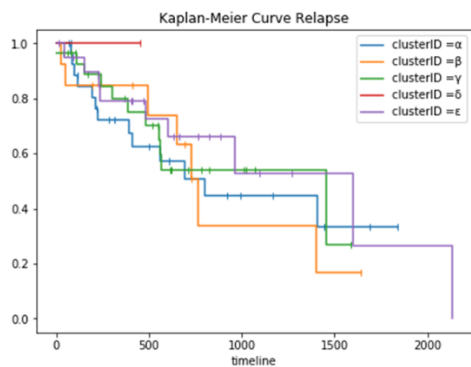
CLS- $\beta, \gamma$  はともに低酸素環境を示しかつ血管形成に乏しい群であり、CLS1 に相当すると考える。

最も抗腫瘍免疫が活発であるのは CLS- $\epsilon$  であり、有意な CD4+ T 細胞、CD8+ T 細胞、B 細胞の浸潤が認められる一方で、T 細胞に疲弊が示された (Fig. 30)。これは CLS2 や CLS-b における解析結果と一致した傾向であり、CLS- $\epsilon$  は免疫チェックポイント阻害薬が期待される群であると考えられる。

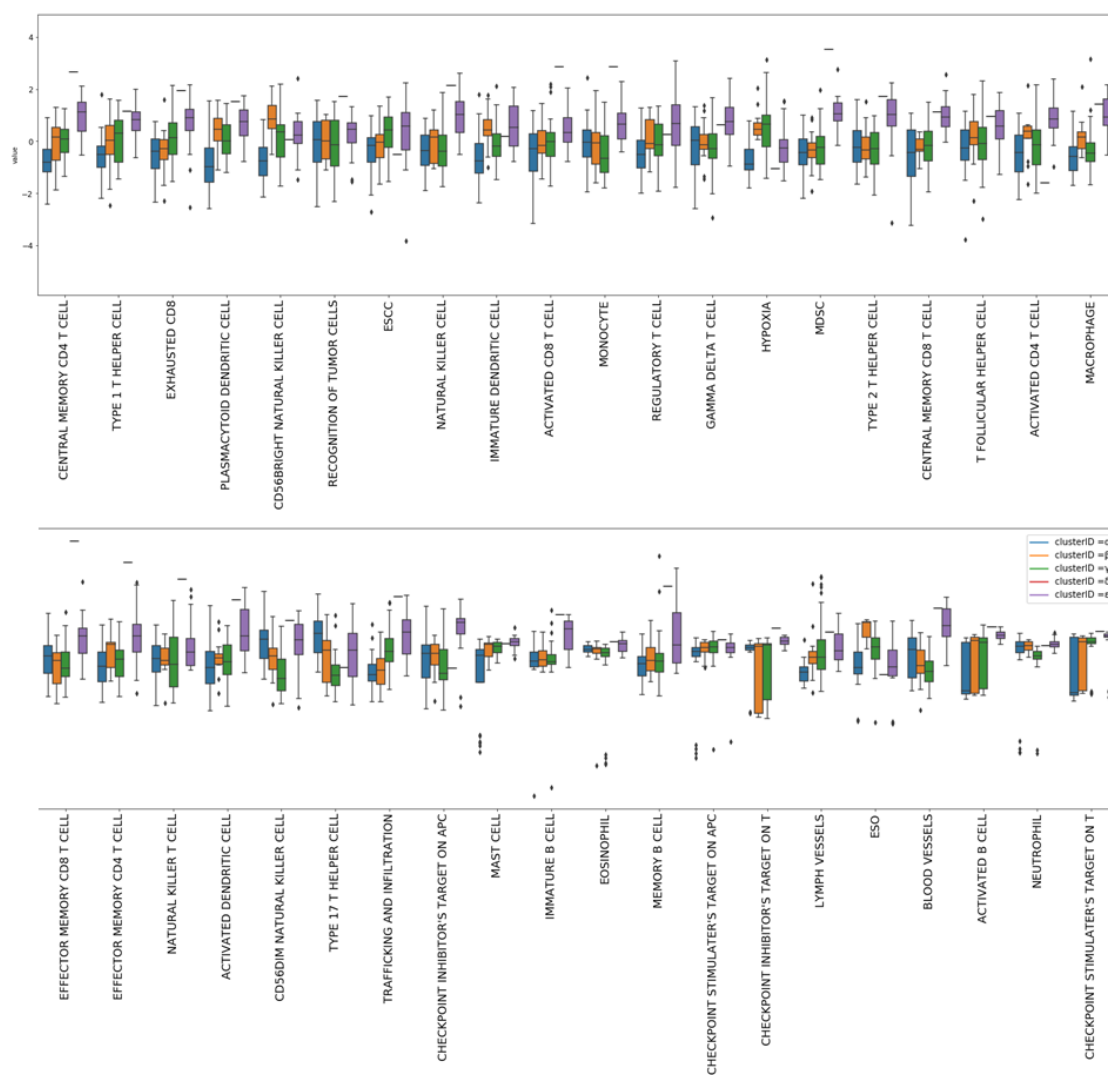
本論文と異なる点として、免疫抑制性の環境として M2 型マクロファージを特徴とする群は同定されず、CLS- $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$  いずれの群においても M2 型マクロファージ/M1 型マクロファージ比に有意差がないことが CIBERSORTx により計算された。



**Figure 28:** TCGA に登録されている Caucasian 93 症例に対して低酸素および免疫環境に関連する 886 個の遺伝子による階層的クラスタリングおよび GSEA 解析を行った。症例を横軸に、遺伝子または遺伝子セットを縦軸にとり、発現量を赤 (低発現)~緑 (高発現)で表している。クラスタリングにより生じた 5 分類を CLS- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  と呼称し、CLS- $\alpha$  を赤色、CLS- $\beta$  を橙色、CLS- $\gamma$  を黄色、CLS- $\delta$  を黄緑色、CLS- $\epsilon$  を緑色で示した。



**Figure 29:** CLS- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  の生存解析において群間に有意差は生じない。



**Figure 30:** TCGA に登録されている Caucasian 93 症例に対する GSEA 解析。

微小環境として定義した遺伝子セットごとの NES を群間で比較し箱ひげ図に表した。CLS- $\alpha$  を青色、CLS- $\beta$  を橙色、CLS- $\gamma$  を緑色、CLS- $\delta$  を赤色、CLS- $\epsilon$  を紫色で示す。

<b>Central memory CD4 T cell</b>	<b>p-value</b>	<b>Gamma delta T cell</b>	<b>p-value</b>	<b>Trafficking and infiltration</b>	<b>p-value</b>
CLS-β > α	0.0246	CLS-ε > α	0.002	CLS-γ > α	0.0002
CLS-γ > α	0.0001	CLS-ε > β	0.0185	CLS-ε > α	0
CLS-ε > α	0	CLS-ε > γ	0.0002	CLS-γ > β	0.0236
CLS-ε > β	0.0019			CLS-ε > β	0.0007
CLS-ε > γ	0.0002	<b>Hypoxia</b>	<b>p-value</b>	<b>Checkpoint inhibitor's target on APC</b>	<b>p-value</b>
		CLS-β > α	0	CLS-ε > α	0.0004
<b>Type 1 T helper cell</b>	<b>p-value</b>	CLS-γ > α	0	CLS-ε > β	0.0028
CLS-γ > α	0.0062	CLS-β > ε	0.0025	CLS-ε > γ	0.0001
CLS-ε > α	0	CLS-γ > ε	0.025		
CLS-ε > β	0.0194			<b>Mast cell</b>	<b>p-value</b>
CLS-ε > γ	0.0006	<b>MDSC</b>	<b>p-value</b>	CLS-β > α	0.0057
		CLS-ε > α	0	CLS-γ > α	0.0024
<b>Exhausted CD8</b>	<b>p-value</b>	CLS-ε > β	0	CLS-ε > α	0.0004
CLS-γ > α	0.0073	CLS-ε > γ	0	CLS-ε > γ	0.018
CLS-ε > α	0.0005			<b>Immature B cell</b>	<b>p-value</b>
CLS-ε > β	0.0114	<b>Type 2 T helper cell</b>	<b>p-value</b>	CLS-ε > α	0.0001
		CLS-ε > α	0.0024	CLS-ε > β	0.0005
<b>Plasmacytoid dendritic cell</b>	<b>p-value</b>	CLS-ε > β	0.0039	CLS-ε > γ	0.0002
CLS-β > α	0.0002	CLS-ε > γ	0.0004		
CLS-γ > α	0.0012	<b>Central memory CD8 T cell</b>	<b>p-value</b>	<b>Eosinophil</b>	<b>p-value</b>
CLS-ε > α	0	CLS-ε > α	0	CLS-α > γ	0.0206
CLS-ε > γ	0.0008	CLS-ε > β	0	CLS-ε > α	0.0264
		CLS-ε > γ	0	CLS-ε > γ	0.0056
<b>CD56bright natural killer cell</b>	<b>p-value</b>	<b>T follicular helper cell</b>	<b>p-value</b>	<b>Memory B cell</b>	<b>p-value</b>
CLS-β > α	0	CLS-ε > α	0.0048	CLS-ε > α	0.0008
CLS-γ > α	0.0004	CLS-ε > γ	0.0141	CLS-ε > β	0.0325
CLS-ε > α	0.0002	<b>Macrophage</b>	<b>p-value</b>	CLS-ε > γ	0.0216
CLS-β > γ	0.0042	CLS-β > α	0.0066	<b>Checkpoint inhibitor's target on T</b>	<b>p-value</b>
CLS-β > ε	0.0228	<b>Effector memory CD8 T cell</b>	<b>p-value</b>	CLS-ε > α	0.004
		CLS-ε > α	0.0042	CLS-ε > β	0.0206
<b>ESCC</b>	<b>p-value</b>	CLS-ε > β	0.0008	CLS-ε > γ	0.0008
CLS-γ > α	0.0046	CLS-ε > γ	0.0001	<b>Lymph vessels</b>	<b>p-value</b>
<b>Natural killer cell</b>	<b>p-value</b>	<b>Effector memory CD4 T cell</b>	<b>p-value</b>	CLS-β > α	0.0313
CLS-ε > α	0	CLS-β > α	0.0137	CLS-γ > α	0.0002
CLS-ε > β	0.0028	<b>Activated dendritic cell</b>	<b>p-value</b>	CLS-ε > α	0
CLS-ε > γ	0	CLS-ε > α	0	<b>ESO</b>	<b>p-value</b>
		CLS-ε > β	0.0021	CLS-β > α	0
<b>Immature dendritic cell</b>	<b>p-value</b>	CLS-ε > γ	0.0001	CLS-γ > α	0.0185
CLS-β > α	0.0007	<b>CD56dim natural killer cell</b>	<b>p-value</b>	CLS-β > γ	0.0001
CLS-γ > α	0.0374	CLS-α > γ	0	CLS-β > ε	0
CLS-ε > α	0.0001	CLS-β > γ	0.049	CLS-γ > ε	0.0264
CLS-β > γ	0.0352	CLS-ε > γ	0.0002	<b>Blood vessels</b>	<b>p-value</b>
CLS-ε > γ	0.0119	<b>Type 17 T helper cell</b>	<b>p-value</b>	CLS-α > γ	0.0054
		CLS-α > β	0.0195	CLS-ε > α	0
<b>Activated CD8 T cell</b>	<b>p-value</b>	CLS-α > γ	0	CLS-ε > β	0
CLS-ε > α	0.0016	CLS-α > ε	0.0202	CLS-ε > γ	0
<b>Monocyte</b>	<b>p-value</b>	CLS-β > γ	0.0397	<b>Activated B cell</b>	<b>p-value</b>
CLS-α > γ	0.0406	CLS-ε > γ	0.0064	CLS-γ > α	0.0353
CLS-ε > α	0.0055			CLS-ε > α	0
CLS-ε > β	0.0208	<b>Neutrophil</b>	<b>p-value</b>	CLS-ε > β	0.0209
CLS-ε > γ	0	CLS-ε > α	0.033	CLS-ε > γ	0.0002
<b>Regulatory T cell</b>	<b>p-value</b>	CLS-β > γ	0.0048	<b>Checkpoint stimulator's target on T</b>	<b>p-value</b>
CLS-β > α	0.0434	CLS-ε > γ	0.0007	CLS-γ > α	0.0009
CLS-ε > α	0.0007			CLS-ε > α	0.0008
CLS-ε > γ	0.0196				

**Table 12:** Caucasian 症例に対する GSEA 解析結果。GSEA40 項目に対してウェルチの t 検定を行い、統計的有意差を生じた比較をすべて記載した。

## 6. 結語

腫瘍微小環境はがん細胞と複雑な相互作用を有しており、がんの形成、生存そして転移に大きく関わっている。がん細胞そのものではなく、微小環境をターゲットとした治療法の開発も進んでいる。我々は食道扁平上皮癌 97 症例に対して RNA sequencing を行い、その微小環境を 4 種類に分類した。

第 1 群は低酸素環境を特徴とする群である。97 症例のうち 60 症例 (62%) が該当する。癌細胞の増殖は酸素需要を増加させ、また食道扁平上皮癌に頻度の高い遺伝子変異である *TP53* 変異はワールブルグ効果により解糖速度と乳酸産生を増加させることで低酸素環境を助長する。低酸素環境は一般的に抗腫瘍免疫を抑制して、また化学療法や放射線療法に対する耐性を獲得させ、臨床転帰の不良につながると考えられてきた。しかしながら低酸素環境は免疫抑制性に寄与する他に、免疫賦活的な役割を併せもっており、低酸素により活性化された細胞障害性 T 細胞が免疫原性細胞死に寄与している可能性も明らかとなった。

第 2 群は抗腫瘍免疫が活発に生じている予後良好な群である。97 症例のうち 20 症例 (21%) が該当する。免疫が活発に生じている一方で CD8+ T 細胞の疲弊や免疫チェックポイント分子による抑制も目立ち、第 2 群に対しては免疫チェックポイント阻害薬の有効性が期待される。

第 3 群では M2 型マクロファージや肥満細胞による抗腫瘍免疫の抑制が目立つ。97 症例のうち 13 症例 (13%) が該当する。リンパ節転移が最も多く予後は不良である。M1 型マクロファージへの再分極や肥満細胞浸潤の抑制が治療戦略として考慮される。

第 4 群は非腫瘍上皮と近い微小環境を有するが、予後の最も不良な群である。97 症例のうち 4 症例 (4%) が該当する。腫瘍抗原として免疫に認識されるゲノム変異数が少なく、適切な抗原提示や引き続く免疫応答が生じていない可能性がある。

また RNA sequencing から得られた情報量をできる限り保ちながら、ESCC において重要と考えられた TME を視覚的に表示する IMMUGENO\_GRAM を作成した。

我々の研究は食道扁平上皮癌の微小環境に対して RNA sequencing による俯瞰的な知見を提供している。個別化治療を受ける患者の転帰を予測あるいは評価する際に、本研究の結果をふまえた患者背景の検討を行うことで、より効果的な治療の適用が期待される。

## 7. 参考文献

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **68**, 394–424 (2018).
2. Cancer Registry and Statistics. Cancer Information Service, National Cancer Center, Japan (Ministry of Health, Labour and Welfare, National Cancer Registry).
3. Tachimori Y, Ozawa S, Numasaki H, Ishihara R, Matsubara H, Muro K, Oyama T, Toh Y, Udagawa H, Uno T; Registration Committee for Esophageal Cancer of the Japan Esophageal Society. Comprehensive registry of esophageal cancer in Japan, 2012. *Esophagus* **16**, 221–245 (2019).
4. Domper Arnal MJ, Ferrández Arenas Á, Lanas Arbeloa Á. Esophageal cancer: Risk factors, screening and endoscopic treatment in Western and Eastern countries. *World J Gastroenterol* **21**, 7933–7943 (2015).
5. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* **65**, 87–108 (2015).
6. Arnold M, Soerjomataram I, Ferlay J, Forman D. Global incidence of oesophageal cancer by histological subtype in 2012. *Gut* **64**, 381–387 (2015).



7. Ando N, Kato H, Igaki H, Shinoda M, Ozawa S, Shimizu H, Nakamura T, Yabusaki H, Aoyama N, Kurita A, Ikeda K, Kanda T, Tsujinaka T, Nakamura K, Fukuda H. A Randomized Trial Comparing Postoperative Adjuvant Chemotherapy with Cisplatin and 5-Fluorouracil Versus Preoperative Chemotherapy for Localized Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Thoracic Esophagus (JCOG9907). *Ann Surg Oncol* **19**, 68–74 (2012).
8. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
9. Horton BL, Fessenden TB, Spranger S. Tissue Site and the Cancer Immunity Cycle. *Trends Cancer* **5**, 593–603 (2019).
10. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* **12**, 252–264 (2012).
11. Hiniker SM, Chen DS, Reddy S, Chang DT, Jones JC, Mollick JA, Swetter SM, Knox SJ. A Systemic Complete Response of Metastatic Melanoma to Local Radiation and Immunotherapy. *Translational Oncology* **5**, 404–407 (2012).
12. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol* **24**, 207–212 (2012).

13. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *The Journal of Immunology* **173**, 945–954 (2004).
14. Sznol M, Kluger HM, Hodi FS, McDermott DF, Carvajal RD, Topalian DP, Atkins MB, Powderly JD, Sharfman WH, Puzanov I, Smith DC, Wigginton JM, Kollia G, Gupta AK, Sosman JA. Survival and long-term follow-up of safety and response in patients (pts) with advanced melanoma (MEL) in a phase I trial of nivolumab (anti-PD-1; BMS-936558; ONO-4538). *JCO* **31**, CRA9006–CRA9006 (2013).
15. Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, Wolchok JD, Hersey P, Joseph RW, Weber JS, Dronca R, Gangadhar TC, Patnaik A, Zarour H, Joshua AM, Gergich K, Ellassaiss-Schaap J, Algazi A, Mateus C, Boasberg P, Tumei PC, Chmielowski B, Ebbinghaus SW, Li XN, Kang SP, Ribas A. Safety and Tumor Responses with LAMBROLIZUMAB (Anti-PD-1) in Melanoma. *New England Journal of Medicine* **369**, 134–144 (2013).
16. Shah MA, Kojima T, Hochhauser D, Enzinger P, Raimbourg J, Hollebecque A, Lordick F, Kim SB, Tajika M, Kim HT, Lockhart AC, Arkenau HT, El-Hajbi F, Gupta M, Pfeiffer P, Liu Q, Luceford J, Kang SP, Bhagia P, Kato K. Efficacy and Safety of

- Pembrolizumab for Heavily Pretreated Patients With Advanced, Metastatic Adenocarcinoma or Squamous Cell Carcinoma of the Esophagus: The Phase 2 KEYNOTE-180 Study. *JAMA Oncol* **5**, 546–550 (2019).
17. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* **236**, 219–242 (2010).
18. Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, Antonia S, Pluzanski A, Vokes EE, Holgado E, Waterhouse D, Ready N, Gainor J, Arén Frontera O, Havel L, Steins M, Garassino MC, Aerts JG, Domine M, Paz-Ares L, Reck M, Baudelet C, Harbison CT, Lestini B, Spigel DR. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **373**, 123–135 (2015).
19. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* **366**, 2443–2454 (2012).

20. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Horn L, Lawrence DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatrín A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* **515**, 563–567 (2014).
21. Tsao MS, Le Teuff G, Shepherd FA, Landais C, Hainaut P, Filipits M, Pirker R, Le Chevalier T, Graziano S, Kratze R, Soria JC, Pignon JP, Seymour L, Brambilla E. PD-L1 protein expression assessed by immunohistochemistry is neither prognostic nor predictive of benefit from adjuvant chemotherapy in resected non-small cell lung cancer. *Annals of Oncology* **28**, 882–889 (2017).
22. 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. USA* **102**, 15545–15550 (2005).
23. Evsikov AV, Solter D. Comment on ‘ “Stemness”: Transcriptional Profiling of Embryonic and Adult Stem Cells’ and ‘A Stem Cell Molecular Signature’ (II). *Science* **302**, 393–393 (2003).

24. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, Angell H, Fredriksen T, Lafontaine L, Berger A, Bruneval P, Fridman WH, Becker C, Pagès F, Speicher MR, Trajanoski Z, Galon J. Spatiotemporal Dynamics of Intratumoral Immune Cells Reveal the Immune Landscape in Human Cancer. *Immunity* **39**, 782–795 (2013).
25. Charoentong P, Finotello F, Angelova M, Mayer C, Efremova M, Rieder D, Hackl H, Trajanoski Z. Pan-cancer Immunogenomic Analyses Reveal Genotype-Immunophenotype Relationships and Predictors of Response to Checkpoint Blockade. *Cell Reports* **18**, 248–262 (2017).
26. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, Kivork C, Seja E, Cherry G, Gutierrez AJ, Grogan TR, Mateus C, Tomasic G, Glaspy JA, Emerson RO, Robins H, Pierce RH, Elashoff DA, Robert C, Ribas A. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**, 568–571 (2014).
27. Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman WH, Galon J. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* **27**, 5944–5951 (2009).

28. Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH, Pagès F, Galon J. Natural immunity to cancer in humans. *Current Opinion in Immunology* **22**, 215–222 (2010).
29. Sharma P, Allison JP. The future of immune checkpoint therapy. *Science* **348**, 56–61 (2015).
30. Harris BH, Barberis A, West CM, Buffa FM. Gene Expression Signatures as Biomarkers of Tumour Hypoxia. *Clinical Oncology* **27**, 547–560 (2015).
31. Chen B, Khodadoust MS, Liu CL, Newman AM, Alizadeh AA. Profiling tumor infiltrating immune cells with CIBERSORT. *Methods Mol Biol* **1711**, 243–259 (2018).
32. Yoshihara K, Shahmoradgoli M, Martínez E, Vegesna R, Kim H, Torres-Garcia W, Treviño V, Shen H, Laird PW, Levine DA, Carter SL, Getz G, Stemke-Hale K, Mills GB, Verhaak RG. Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data. *Nat Commun* **4**, 2612 (2013).
33. 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* **12**, 453–457 (2015).
34. Henze AT, Mazzone M. The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages. *J Clin Invest* **126**, 3672–3679 (2016).

35. Ostuni R, Kratochvill F, Murray PJ, Natoli G. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends Immunol* **36**, 229–239 (2015).
36. Ohno S, Ohno Y, Suzuki N, Kamei T, Koike K, Inagawa H, Kohchi C, Soma G, Inoue M. Correlation of histological localization of tumor-associated macrophages with clinicopathological features in endometrial cancer. *Anticancer Res* **24**, 3335–3342 (2004).
37. Peng J, Zhang L, Drysdale L, Fong GH. The transcription factor EPAS-1/hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  plays an important role in vascular remodeling. *PNAS* **97**, 8386–8391 (2000).
38. CDH5 cadherin 5 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=1003>.
39. Rademakers SE, Lok J, van der Kogel AJ, Bussink J, Kaanders JH. Metabolic markers in relation to hypoxia; staining patterns and colocalization of pimonidazole, HIF-1 $\alpha$ , CAIX, LDH-5, GLUT-1, MCT1 and MCT4. *BMC Cancer* **11**, 167 (2011).
40. Shao F, Yang X, Wang W, Wang J, Guo W, Feng X, Shi S, Xue Q, Gao S, Gao Y, Lu Z, He J. Associations of PGK1 promoter hypomethylation and PGK1-mediated

- PDHK1 phosphorylation with cancer stage and prognosis: a TCGA pan-cancer analysis. *Cancer Commun* **39**, 54 (2019).
41. Teng R, Wang Y, Lv N, Zhang D, Williamson RA, Lei L, Chen P, Lei L, Wang B, Fu J, Liu X, He A, O'Dwyer M, Hu J. Hypoxia Impairs NK Cell Cytotoxicity through SHP-1-Mediated Attenuation of STAT3 and ERK Signaling Pathways. *J Immunol Res* **2020**, 4598476 (2020).
42. Mazure NM, Pouyssegur J. Atypical BH3-domains of BNIP3 and BNIP3L lead to autophagy in hypoxia. *Autophagy* **5**, 868–869 (2009).
43. Sethumadhavan S, Silva M, Philbrook P, Nguyen T, Hatfield SM, Ohta A, Sitkovsky MV. Hypoxia and hypoxia-inducible factor (HIF) downregulate antigen-presenting MHC class I molecules limiting tumor cell recognition by T cells. *PLoS One* **12**, e0187314 (2017).
44. Murthy A, Gerber SA, Koch CJ, Lord EM. Intratumoral Hypoxia Reduces IFN- $\gamma$ -Mediated Immunity and MHC Class I Induction in a Preclinical Tumor Model. *Immunohorizons* **3**, 149–160 (2019).
45. Elia AR, Cappello P, Puppo M, Fraone T, Vanni C, Eva A, Musso T, Novelli F, Varesio L, Giovarelli M. Human dendritic cells differentiated in hypoxia down-



- modulate antigen uptake and change their chemokine expression profile. *J Leukoc Biol* **84**, 1472–1482 (2008).
46. Mancino A, Schioppa T, Larghi P, Pasqualini F, Nebuloni M, Chen IH, Sozzani S, Austyn JM, Mantovani A, Sica A. Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions. *Blood* **112**, 3723–3734 (2008).
47. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang LP, Gimotty PA, Gilks CB, Lal P, Zhang L, Coukos G. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* **475**, 226–230 (2011).
48. Yang M, Ma C, Liu S, Sun J, Shao Q, Gao W, Zhang Y, Li Z, Xie Q, Dong Z, Qu X. Hypoxia skews dendritic cells to a T helper type 2-stimulating phenotype and promotes tumour cell migration by dendritic cell-derived osteopontin. *Immunology* **128**, e237-249 (2009).
49. Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MK, Huang X, Caldwell S, Liu K, Smith P, Chen JF, Jackson EK, Apasov S, Abrams S, Sitkovsky M. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13132–13137 (2006).
50. Caldwell CC, Kojima H, Lukashev D, Armstrong J, Farber M, Apasov SG, Sitkovsky MV. Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on

- T lymphocyte development and effector functions. *J Immunol* **167**, 6140–6149 (2001).
51. Kurachi M. CD8<sup>+</sup> T cell exhaustion. *Semin Immunopathol* **41**, 327–337 (2019).
52. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).
53. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* **15**, 486–499 (2015).
54. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Wagstaff J, Schadendorf D, Ferrucci PF, Smylie M, Dummer R, Hill A, Hogg D, Haanen J, Carlino MS, Bechter O, Maio M, Marquez-Rodas I, Guidoboni M, McArthur G, Lebbé C, Ascierto PA, Long GV, Cebon J, Sosman J, Postow MA, Callahan MK, Walker D, Rollin L, Bhore R, Hodi FS, Larkin J. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* **377**, 1345–1356 (2017).
55. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, Segal NH, Ariyan CE, Gordon RA, Reed K, Burke MM, Caldwell A, Kronenberg SA, Agunwamba BU, Zhang X, Lowy I, Inzunza HD, Feely W, Horak CE, Hong Q,

- Korman AJ, Wigginton JM, Gupta A, Sznol M. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med* **369**, 122–133 (2013).
56. Najafi M, Hashemi Goradel N, Farhood B, Salehi E, Nashtaei MS, Khanlarkhani N, Khezri Z, Majidpoor J, Abouzaripour M, Habibi M, Kashani IR, Mortezaee K. Macrophage polarity in cancer: A review. *Journal of Cellular Biochemistry* **120**, 2756–2765 (2019).
57. Liu J, Li C, Zhang L, Liu K, Jiang X, Wang X, Yang L, Liang W, Liu K, Hu J, Li F. Association of tumour-associated macrophages with cancer cell EMT, invasion, and metastasis of Kazakh oesophageal squamous cell cancer. *Diagn Pathol* **14**, 55 (2019).
58. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39–51 (2010).
59. Cao W, Peters JH, Nieman D, Sharma M, Watson T, Yu J. Macrophage subtype predicts lymph node metastasis in oesophageal adenocarcinoma and promotes cancer cell invasion in vitro. *British Journal of Cancer* **113**, 738–746 (2015).
60. Shigeoka M, Urakawa N, Nakamura T, Nishio M, Watajima T, Kuroda D, Komori T, Kakeji Y, Semba S, Yokozaki H. Tumor associated macrophage expressing

- CD204 is associated with tumor aggressiveness of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Science* **104**, 1112–1119 (2013).
61. Ruffell B, Coussens LM. Macrophages and therapeutic resistance in cancer. *Cancer Cell* **27**, 462–472 (2015).
62. Yin Z, Ma T, Lin Y, Lu X, Zhang C, Chen S, Jian Z. IL-6/STAT3 pathway intermediates M1/M2 macrophage polarization during the development of hepatocellular carcinoma. *J Cell Biochem* **119**, 9419–9432 (2018).
63. Huang Y, Yuan J, Righi E, Kamoun WS, Ancukiewicz M, Nezivar J, Santosuosso M, Martin JD, Martin MR, Vianello F, Leblanc P, Munn LL, Huang P, Duda DG, Fukumura D, Jain RK, Poznansky MC. Vascular normalizing doses of antiangiogenic treatment reprogram the immunosuppressive tumor microenvironment and enhance immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 17561–17566 (2012).
64. Honkanen HK, Izzi V, Petäistö T, Holopainen T, Harjunen V, Pihlajaniemi T, Alitalo K, Heljasvaara R. Elevated VEGF-D Modulates Tumor Inflammation and Reduces the Growth of Carcinogen-Induced Skin Tumors. *Neoplasia* **18**, 436–446 (2016).

65. Mao Y, Feng Q, Zheng P, Yang L, Zhu D, Chang W, Ji M, He G, Xu J. Low tumor infiltrating mast cell density confers prognostic benefit and reflects immunooactivation in colorectal cancer. *Int J Cancer* **143**, 2271–2280 (2018).
66. Malfettone A, Silvestris N, Saponaro C, Ranieri G, Russo A, Caruso S, Popescu O, Simone G, Paradiso A, Mangia A. High density of tryptase-positive mast cells in human colorectal cancer: a poor prognostic factor related to protease-activated receptor 2 expression. *J Cell Mol Med* **17**, 1025–1037 (2013).
67. Saeterdal I, Bjørheim J, Lislud K, Gjertsen MK, Bukholm IK, Olsen OC, Nesland JM, Eriksen JA, Møller M, Lindblom A, Gaudernack G. Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13255–13260 (2001).
68. Colli LM, Machiela MJ, Myers TA, Jessop L, Yu K, Chanock SJ. Burden of Nonsynonymous Mutations among TCGA Cancers and Candidate Immune Checkpoint Inhibitor Responses. *Cancer Res* **76**, 3767–3772 (2016).
69. Cancer Genome Atlas Research Network; Analysis Working Group: Asan University; BC Cancer Agency; Brigham and Women’s Hospital; Broad Institute; Brown University; Case Western Reserve University; Dana-Farber Cancer Institute; Duke University; Greater Poland Cancer Centre; Harvard Medical School; Institute for

Systems Biology; KU Leuven; Mayo Clinic; Memorial Sloan Kettering Cancer Center; National Cancer Institute; Nationwide Children's Hospital; Stanford University; University of Alabama; University of Michigan; University of North Carolina; University of Pittsburgh; University of Rochester; University of Southern California; University of Texas MD Anderson Cancer Center; University of Washington; Van Andel Research Institute; Vanderbilt University; Washington University; Genome Sequencing Center: Broad Institute; Washington University in St. Louis; Genome Characterization Centers: BC Cancer Agency; Broad Institute; Harvard Medical School; Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins University; University of North Carolina; University of Southern California Epigenome Center; University of Texas MD Anderson Cancer Center; Van Andel Research Institute; Genome Data Analysis Centers: Broad Institute; Brown University; Harvard Medical School; Institute for Systems Biology; Memorial Sloan Kettering Cancer Center; University of California Santa Cruz; University of Texas MD Anderson Cancer Center; Biospecimen Core Resource: International Genomics Consortium; Research Institute at Nationwide Children's Hospital; Tissue Source Sites: Analytic Biologic Services; Asan Medical Center; Asterand Bioscience; Barretos Cancer Hospital; BioreclamationIVT; Botkin Municipal Clinic; Chonnam National University Medical School; Christiana

Care Health System; Cureline; Duke University; Emory University; Erasmus University; Indiana University School of Medicine; Institute of Oncology of Moldova; International Genomics Consortium; Invidumed; Israelitisches Krankenhaus Hamburg; Keimyung University School of Medicine; Memorial Sloan Kettering Cancer Center; National Cancer Center Goyang; Ontario Tumour Bank; Peter MacCallum Cancer Centre; Pusan National University Medical School; Ribeirão Preto Medical School; St. Joseph's Hospital & Medical Center; St. Petersburg Academic University; Tayside Tissue Bank; University of Dundee; University of Kansas Medical Center; University of Michigan; University of North Carolina at Chapel Hill; University of Pittsburgh School of Medicine; University of Texas MD Anderson Cancer Center; Disease Working Group: Duke University; Memorial Sloan Kettering Cancer Center; National Cancer Institute; University of Texas MD Anderson Cancer Center; Yonsei University College of Medicine; Data Coordination Center: CSRA Inc.; Project Team: National Institutes of Health. Integrated genomic characterization of oesophageal carcinoma. *Nature* **541**, 169–175 (2017).

70. Cui Y, Chen H, Xi R, Cui H, Zhao Y, Xu E, Yan T, Lu X, Huang F, Kong P, Li Y, Zhu X, Wang J, Zhu W, Wang J, Ma Y, Zhou Y, Guo S, Zhang L, Liu Y, Wang B, Xi Y, Sun R, Yu X, Zhai Y, Wang F, Yang J, Yang B, Cheng C, Liu J, Song B, Li H,

- Wang Y, Zhang Y, Cheng X, Zhan Q, Li Y, Liu Z. Whole-genome sequencing of 508 patients identifies key molecular features associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cell Res* **30**, 902–913 (2020).
71. Du P, Huang P, Huang X, Li X, Feng Z, Li F, Liang S, Song Y, Stenvang J, Brünner N, Yang H, Ou Y, Gao Q, Li L. Comprehensive genomic analysis of Oesophageal Squamous Cell Carcinoma reveals clinical relevance. *Scientific Reports* **7**, 15324 (2017).
72. Maleki Vareki S. High and low mutational burden tumors versus immunologically hot and cold tumors and response to immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer* **6**, (2018).
73. Blank CU, Haanen JB, Ribas A, Schumacher TN. CANCER IMMUNOLOGY. The ‘cancer immunogram’. *Science* **352**, 658–660 (2016).
74. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, Christie M, van de Vijver K, Estrada MV, Gonzalez-Ericsson PI, Sanders M, Solomon B, Solinas C, Van den Eynden GGGM, Allory Y, Preusser M, Hainfellner J, Pruneri G, Vingiani A, Demaria S, Symmans F, Nuciforo P, Comerma L, Thompson EA, Lakhani S, Kim SR, Schnitt S, Colpaert C, Sotiriou C, Scherer SJ, Ignatiadis M, Badve S, Pierce RH, Viale G, Sirtaine N, Penault-Llorca F, Sugie T, Fineberg S, Paik S, Srinivasan A,



- Richardson A, Wang Y, Chmielik E, Brock J, Johnson DB, Balko J, Wienert S, Bossuyt V, Michiels S, Ternes N, Burchardi N, Luen SJ, Savas P, Klauschen F, Watson PH, Nelson BH, Criscitiello C, O'Toole S, Larsimont D, de Wind R, Curigliano G, André F, Lacroix-Triki M, van de Vijver M, Rojo F, Floris G, Bedri S, Sparano J, Rimm D, Nielsen T, Kos Z, Hewitt S, Singh B, Farshid G, Loibl S, Allison KH, Tung N, Adams S, Willard-Gallo K, Horlings HM, Gandhi L, Moreira A, Hirsch F, Dieci MV, Urbanowicz M, Brcic I, Korski K, Gaire F, Koeppen H, Lo A, Giltmane J, Rebellato MC, Steele KE, Zha J, Emancipator K, Juco JW, Denkert C, Reis-Filho J, Loi S, Fox SB. Assessing tumor infiltrating lymphocytes in solid tumors: a practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group. *Adv Anat Pathol* **24**, 235–251 (2017).
75. Galon J, Angell HK, Bedognetti D, Marincola FM. The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity* **39**, 11–26 (2013).
76. Finn OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med* **358**, 2704–2715 (2008).
77. Noman MZ, Hasmim M, Lequeux A, Xiao M, Duhem C, Chouaib S, Berchem G, Janji B. Improving Cancer Immunotherapy by Targeting the Hypoxic Tumor Microenvironment: New Opportunities and Challenges. *Cells* **8**, (2019).

78. Lequeux A, Noman MZ, Xiao M, Sauvage D, Van Moer K, Viry E, Bocci I, Hasmim M, Bosseler M, Berchem G, Janji B. Impact of hypoxic tumor microenvironment and tumor cell plasticity on the expression of immune checkpoints. *Cancer Letters* **458**, 13–20 (2019).
79. Daniel SK, Sullivan KM, Labadie KP, Pillarisetty VG. Hypoxia as a barrier to immunotherapy in pancreatic adenocarcinoma. *Clin Transl Med* **8**, (2019).
80. Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condron CM, Toomey D. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. *Cancer Treatment Reviews* **29**, 297–307 (2003).
81. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer* **2**, 38–47 (2002).
82. Yu T, Tang B, Sun X. Development of Inhibitors Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 and 2 for Cancer Therapy. *Yonsei Med J* **58**, 489–496 (2017).
83. WARBURG O. On the Origin of Cancer Cells. *Science* **123**, 309–314 (1956).
84. Hu W, Zhang C, Wu R, Sun Y, Levine A, Feng Z. Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 7455–7460 (2010).

85. Zhang C, Liu J, Liang Y, Wu R, Zhao Y, Hong X, Lin M, Yu H, Liu L, Levine AJ, Hu W, Feng Z. Tumour-associated mutant p53 drives the Warburg effect. *Nature Communications* **4**, 2935 (2013).
86. Elyer CE, Rich JN. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *J Clin Oncol* **26**, 2839–2845 (2008).
87. Minassian LM, Cotechini T, Huitema E, Graham CH. Hypoxia-Induced Resistance to Chemotherapy in Cancer. *Adv Exp Med Biol* **1136**, 123–139 (2019).
88. Saggar JK, Tannock IF. Chemotherapy Rescues Hypoxic Tumor Cells and Induces Their Reoxygenation and Repopulation—An Effect That Is Inhibited by the Hypoxia-Activated Prodrug TH-302. *Clin Cancer Res* **21**, 2107–2114 (2015).
89. Li L, Qu Y, Mao M, Xiong Y, Mu D. The involvement of phosphoinositid 3-kinase/Akt pathway in the activation of hypoxia-inducible factor-1alpha in the developing rat brain after hypoxia-ischemia. *Brain Res* **1197**, 152–158 (2008).
90. Yang XM, Wang YS, Zhang J, Li Y, Xu JF, Zhu J, Zhao W, Chu DK, Wiedemann P. Role of PI3K/Akt and MEK/ERK in mediating hypoxia-induced expression of HIF-1alpha and VEGF in laser-induced rat choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**, 1873–1879 (2009).

91. Karar J, Cerniglia GJ, Lindsten T, Koumenis C, Maity A. Dual PI3K/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 suppresses hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  expression by blocking protein translation and increases cell death under hypoxia. *Cancer Biol Ther* **13**, 1102–1111 (2012).
92. Griss J, Bauer W, Wagner C, Simon M, Chen M, Grabmeier-Pfistershammer K, Maurer-Granofszky M, Roka F, Penz T, Bock C, Zhang G, Herlyn M, Glatz K, Läubli H, Mertz KD, Petzelbauer P, Wiesner T, Hartl M, Pickl WF, Somasundaram R, Steinberger P, Wagner SN. B cells sustain inflammation and predict response to immune checkpoint blockade in human melanoma. *Nature Communications* **10**, 4186 (2019).
93. Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stangé G, Van den Bossche J, Mack M, Pipeleers D, In't Veld P, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res* **70**, 5728–5739 (2010).
94. Takeda N, O'Dea EL, Doedens A, Kim JW, Weidemann A, Stockmann C, Asagiri M, Simon MC, Hoffmann A, Johnson RS. Differential activation and antagonistic function of HIF- $\alpha$  isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev* **24**, 491–501 (2010).

95. Chang CH, Qiu J, O'Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, Chen Q, Gindin M, Gubin MM, van der Windt GJ, Tonc E, Schreiber RD, Pearce EJ, Pearce EL. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* **162**, 1229–1241 (2015).
96. Chen JL, Lucas JE, Schroeder T, Mori S, Wu J, Nevins J, Dewhirst M, West M, Chi JT. The genomic analysis of lactic acidosis and acidosis response in human cancers. *PLoS Genet* **4**, e1000293 (2008).
97. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, Dessen P, Bronte V, Chouaib S. PD-L1 is a novel direct target of HIF-1 $\alpha$ , and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. *J Exp Med* **211**, 781–790 (2014).
98. Köhler T, Reizis B, Johnson RS, Weighardt H, Förster I. Influence of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  on dendritic cell differentiation and migration. *Eur J Immunol* **42**, 1226–1236 (2012).
99. Pauken KE, Wherry EJ. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends Immunol* **36**, 265–276 (2015).
100. Münz C. Autophagy Beyond Intracellular MHC Class II Antigen Presentation. *Trends Immunol* **37**, 755–763 (2016).

101. Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, Shen S, Kepp O, Scoazec M, Mignot G, Rello-Varona S, Tailler M, Menger L, Vacchelli E, Galluzzi L, Ghiringhelli F, di Virgilio F, Zitvogel L, Kroemer G. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* **334**, 1573–1577 (2011).
102. Skrombolas D, Frelinger JG. Challenges and developing solutions for increasing the benefits of IL-2 treatment in tumor therapy. *Expert Rev Clin Immunol* **10**, 207–217 (2014).
103. June CH. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J Clin Invest* **117**, 1466–1476 (2007).
104. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol* **33**, 1974–1982 (2015).
105. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* **27**, 450–461 (2015).
106. Qu HX, Zhao LP, Zhan SH, Geng CX, Xu L, Xin YN, Jiang XJ. Clinicopathological and prognostic significance of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *J Thorac Dis* **8**, 3197–3204 (2016).

107. Smyth MJ, Ngiow SF, Ribas A, Teng MW. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. *Nat Rev Clin Oncol* **13**, 143–158 (2016).
108. Zhang JQ, Hooker CM, Brock MV, Shin J, Lee S, How R, Franco N, Prevas H, Hulbert A, Yang SC. Neoadjuvant chemoradiation therapy is beneficial for clinical stage T2 N0 esophageal cancer patients due to inaccurate preoperative staging. *Ann Thorac Surg* **93**, 429–435; discussion 436-437 (2012).
109. Verdeil G, Lawrence T, Schmitt-Verhulst AM, Auphan-Anezin N. Targeting STAT3 and STAT5 in Tumor-Associated Immune Cells to Improve Immunotherapy. *Cancers (Basel)* **11**, (2019).
110. Gulubova M, Vlaykova T. Prognostic significance of mast cell number and microvascular density for the survival of patients with primary colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* **24**, 1265–1275 (2009).
111. Goodman AM, Kato S, Bazhenova L, Patel SP, Frampton GM, Miller V, Stephens PJ, Daniels GA, Kurzrock R. Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers. *Mol Cancer Ther* **16**, 2598–2608 (2017).

112. Gajewski TF, Corrales L, Williams J, Horton B, Sivan A, Spranger S. Cancer Immunotherapy Targets Based on Understanding the T Cell-Inflamed Versus Non-T Cell-Inflamed Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* **1036**, 19–31 (2017).
113. Germano G, Lamba S, Rospo G, Barault L, Magrì A, Maione F, Russo M, Crisafulli G, Bartolini A, Lerda G, Siravegna G, Mussolin B, Frapolli R, Montone M, Morano F, de Braud F, Amirouchene-Angelozzi N, Marsoni S, D'Incalci M, Orlandi A, Giraudo E, Sartore-Bianchi A, Siena S, Pietrantonio F, Di Nicolantonio F, Bardelli A. Inactivation of DNA repair triggers neoantigen generation and impairs tumour growth. *Nature* **552**, 116–120 (2017).
114. Chiocca EA, Rabkin SD. Oncolytic viruses and their application to cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Res* **2**, 295–300 (2014).



## 8. 謝辞

本研究を進めるにあたり、国立がん研究センター がんゲノミクス分野 柴田龍弘先生にはひとかたならぬ御指導御鞭撻を賜りました。謹んで御礼申し上げます。同分野の濱奈津子先生には、本研究の遂行にあたり多岐に渡る直接的な御指導を頂きました。十時泰先生、中村浩美先生、足立美保子先生にはWGS解析をご指導いただきました。新井康仁先生には検体採取からシーケンスに至るまでの実験手技をご指導いただきました。また様々な点で本研究の遂行に御尽力下さったがんゲノミクス分野の皆様に深謝致します。

国立がん研究センター中央病院 病理診断科 谷口浩和先生と関根茂樹先生には検体使用にあたり御指導を頂きました。深く感謝申し上げます。