

## 論文の内容の要旨

論文題目 食道扁平上皮癌における腫瘍微小環境の解析

氏名 小林 佑哉

腫瘍微小環境 (Tumor Micro Environment: TME)はがん細胞と複雑な相互作用を有しており、がんの形成や生存、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、TME 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 (Esophageal Squamous Cell Carcinoma: ESCC)97 症例に対して RNA sequencing を行い、その TME を CLS1~CLS4 の 4 群に分類した。群間の生物学的な差異を解釈するにあたり Gene Set Enrichment Analysis による解析を行った。

CLS1 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。がん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あわせもっており、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。

CLS2 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、CLS2 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。

CLS3 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示唆される。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り、M2 型マクロファージが E-カドヘリンを阻害し、MMP-2 の発現を増加させることが転移機序の一つとして考えられる。治療戦略としては 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考慮される。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く、抗 VEGF2 抗体により M2 型マクロファージから M1 型マクロファージへの分極を誘導する治療が期待される。また IL-6/STAT3 および STAT5 を同時に阻害することでも、M1 型マクロファージに分極を誘導すると同時に、腫瘍内において CD8+ T 細胞やメモリー細胞の長期生存および細胞障害活性が維持される可能性があることを示した。

CLS4 は非癌部上皮と近し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。ゲノム変異数が少なく免疫に認識される腫瘍抗原がわ

ずかであり、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。ゲノム変異が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でゲノム変異の多い腫瘍に転換させるような治療が提案されている。

CLS1 から CLS4 の TME を総括すると、免疫環境 (T 細胞炎型と非 T 細胞炎型) と腫瘍変異負荷 (Tumor Mutation Burden: TMB) によって大別されるモデルを構築することが、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。がんに対するオーダーメイド医療を展開するにあたり、患者ごとの免疫細胞を含む TME と腫瘍変異負荷を調べることで、効果の期待される治療法を事前選択することが可能となり、またその治療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。すなわち 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標的と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、その治療戦略を 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できる。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、まず腫瘍そのものを TMB の高い状態に転換させる必要がある。

しかしながら TME における免疫環境は単一遺伝子に規定されているわけではなく、複雑な相互作用を有する系 *ecosystem* として機能していることには注意が必要である。例えば低酸素に伴う 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も残る。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 に比べて予後が良い。すなわち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、TME の役割を客観的に評価し、TME 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。腫瘍の進行や、化学療法や化学療法、分子標的薬、免疫療法など種々の介入に伴い、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。

本研究の結果を実臨床に還元するにあたり、今回のような 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、実臨床においてはその詳細を解析することは実質的に不可能であり、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、ESCC において重要と考えられた特徴量を 0~100 までの点数で表現する IMMUGENO\_GRAM を作成した。恣意的に特徴量を選択することは情報量の大きな低下につながるため、ランダムフォレストを使用した機械学習により真に重要と考える特徴量を決定した。

IMMUGENO\_GRAM は 12 軸から構成されるレーダーチャートであり、0 時方向 (腫

瘍抗原の認識)、1時方向(免疫細胞の遊走と浸潤)、および2時方向(自然免疫およびIFN- $\gamma$ の産生)はがん免疫サイクルの開始を、3時方向(B細胞の活性)および4時方向(CD8+T細胞の活性)が抗腫瘍免疫の強さを、5時方向(低酸素環境により発現が増加する経路)および6時方向(血管形成)がCLS1に特徴とされる低酸素環境を、7時方向(T細胞の疲弊)および8時方向(Treg細胞の活性)がCLS2に特徴とされる免疫抑制環境を、9時方向(M2型に分化しているマクロファージ)および10時方向(肥満細胞の浸潤)がCLS3に特徴的な腫瘍関連マクロファージや炎症細胞の浸潤を、11時方向(非同義変異の多寡)がCLS4における抗原認識の乏しさを説明する軸として機能している。興味深いことに5~11時方向を観察するとCLS1~CLS4までの免疫抑制環境は相互排他的な傾向にあることが分かった。またTMEを構成する遺伝子による階層的クラスタリングを行ったにもかかわらず、属するクラスタの特徴量に乏しい症例や、他クラスタの特徴を有する症例も確認された。経時的なIMMUGENO\_GRAMの変化をフォローすることで、TMEを規定するために必要となる説明変数の存在や、症例のクラスタ間移行が確認される可能性がある。本研究の結果の結果をふまえたIMMUGENO\_GRAMによる患者背景の検討を行うことで、患者ごとに異なるTMEを視覚的に理解し、患者の転帰を予測あるいは評価することが可能となり、個別化治療を最適化するための貴重な指針が構成されることに期待したい。