

## 論文の内容の要旨

論文題目 肺癌に対する腫瘍内免疫応答の解析

氏名 唐崎 隆弘

### 1 背景

腫瘍に対する免疫応答を、いくつかのステップからなる一連のサイクル（癌免疫サイクル；Cancer-Immunity Cycle）と捉える概念が提唱されている。腫瘍抗原が腫瘍細胞から放出され、腫瘍抗原を樹状細胞などの抗原提示細胞が取り込み、MHC 分子に結合させて細胞表面へ提示しつつリンパ節へと遊走する。リンパ節に到達した抗原提示細胞は T 細胞に抗原を提示し、抗原特異的な T 細胞が活性化する。活性化した T 細胞が腫瘍組織へと遊走し、浸潤する。腫瘍抗原を発現する腫瘍細胞を T 細胞が認識し、攻撃する。T 細胞に攻撃され細胞死を起こした腫瘍細胞は新たな腫瘍抗原を放出する。この一連のサイクルのどのステップが障害されても効果的な抗腫瘍免疫応答の誘導が困難になり、癌細胞が免疫系からの監視から逃避すると考えられている。

最適な癌免疫治療を行うためには、Cancer-Immunity Cycle のどのステップが障害されているかを、患者ごとに適切に評価することが望ましい。そこで我々は、個々の患者における腫瘍内免疫応答および癌免疫状態を把握するためのデータソースとして、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析データに注目した。次世代シーケンスデータから解析された Cancer-Immunity Cycle の各ステップの状態を、8本の軸からなるレーダーチャートで表現した（“Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle”）。そして、この immunogram を用いて、肺癌における腫瘍内免疫応答について解析した。

### 2 方法と結果

非小細胞肺癌に対する手術症例 20 例に対して解析を行った。20 例のうち、扁平上皮癌が 7 例、大細胞神経内分泌癌が 1 例であり、残りの 12 例が腺癌であった。腺癌のうち 7 例で EGFR 遺伝子変異を認めた。ALK 融合遺伝子は 1 例からも検出されなかった。術前に化学放射線治療を受けた症例はいなかった。

手術で採取した癌組織および正常肺組織から DNA と RNA を抽出した。また末梢血リンパ球から DNA を抽出した。全エクソンシーケンスを行い、腫瘍特異的遺伝子変異を解析した。またトランスクリプトームシーケンスから得られる網羅的遺伝子発現データから、癌免疫に関連する遺伝子を抽出し解析に用いた。

Immunogram の作成にあたり、各患者の癌免疫状態を、8 個の Immunogram Score (IGS) で評価した (IGS1. T 細胞の多寡、IGS2. 腫瘍の抗原性、IGS3. T 細胞のプライミング・活性化、IGS4. T 細胞の遊走・浸潤、IGS5. T 細胞による腫瘍の認識、IGS6. 抑制性免疫細胞 (Treg, 骨髄性抑制細胞; MDSC) の有無、IGS7. チェックポイント分子の発現の有無、IGS8. その他の抑制性因子

の有無)。Cancer-Immunity Cycle は T 細胞性免疫応答の惹起において重要な概念であるが、このことをふまえて T 細胞の多寡を immunogram の第 1 軸 (IGS1) に据えた。

#### 第 1 軸 (IGS1) T 細胞の多寡

網羅的遺伝子発現データから T 細胞浸潤の多寡を推量するにあたり、T 細胞の多寡を反映する 86 個の遺伝子からなる既報の遺伝子群 (T cell gene set) を使用した。GSEA (PreRanked) 法によって T 細胞浸潤の多寡をスコア化し (Normalized enrichment score; NES)、Benjamini-Hochberg 法を用いて false discovery rate (FDR; q 値) を計算した。FDR が 10%未満の場合に T 細胞浸潤度が今回のコホートにおいて有意に多い、または少ないと判定した。

第 1 軸の評価 (IGS1) にあたっては、まず T 細胞浸潤の NES を全 20 例において Z スコア変換した。つまり、20 例の NES の平均値を M とし、標準偏差を SD とした場合、各症例における IGS のための Z スコアを  $Z = (NES - M) / SD$  の式によって得た。そして、IGS1 を以下の式を用いて定義した

$$IGS1 = 3 + 1.5 * Z \quad (\text{最低 1 点、最大 5 点})$$

全 20 例のうち、9 例において T 細胞が有意に多いと判定された ( $q < 0.1$ )。以降、この 9 例を T cell-rich 型と呼ぶこととする。また、T 細胞が有意に少ないと判定されたのは 6 例だった (T cell-poor 型、 $q < 0.1$ )。残りの 5 例を T cell-intermediate 型に分類した。

#### 第 2 軸 (IGS2) 腫瘍の抗原性

腫瘍の抗原性の評価には、neoantigen 候補数 (neoantigen load) と癌生殖細胞抗原の発現数 (immunogenic cancer-germline antigen; imCG-Ag load) を使用した。全エクソンシーケンスデータから同定された腫瘍特異的遺伝子変異に対して MHC 結合予測プログラムを組み合わせることで、各変異が neoantigen 候補となり得るか予測した。Neoantigen load と imCG-Ag load の合算値を各患者の腫瘍抗原候補数とみなし、それを Z スコアに変換した後、IGS1 と同様の式を用いて IGS2 に変換した。

#### 第 3 軸 (IGS3) T 細胞のプライミング・活性化

T 細胞のプライミング・活性化を間接的に評価するために、活性化樹状細胞の多寡を反映する遺伝子群 (Activated DC gene set) を用いて、GSEA 法で NES と q 値を算出した。11 例で活性化樹状細胞が有意に多く浸潤しており、この 11 例は第 1 軸 (IGS1) の評価においていずれも T cell-rich 型または T cell-intermediate 型と判定された症例だった。IGS3 の算出は IGS1 と同様に行った。

#### 第 4 軸 (IGS4) T 細胞の遊走・浸潤

T 細胞の遊走・浸潤に関連する蛋白やケモカインとして、CXCL9, CXCL10, CCL5, CXCL1, LFA1, ICAM1, SELE の 7 つの遺伝子を選択した。各症例において、腫瘍における遺伝子の発現量が正常肺組織における発現量の平均値と比較して 2 倍以上だった場合に、発現亢進と判定した。発現亢

進遺伝子の数について Z 変換した後、これまでの軸と同様にして IGS4 を算出した。

#### 第 5 軸 (IGS5) T 細胞による腫瘍の認識・抗原提示

T 細胞が腫瘍を認識するためには antigen processing および antigen presentation に関連する遺伝子の発現が正常であることが必要である。これをふまえて、HLA-A,B,C、 $\beta$  2microglobulin、TAP1、TAP2 を含む遺伝子リストを作成した。第 5 軸ではこれらの遺伝子の発現を評価した。

#### 第 6 軸 (IGS6) 抑制性免疫細胞 (Treg, MDSC) の有無

第 6 軸から第 8 軸では、Cancer-Immunity Cycle における最終ステップである「T 細胞による腫瘍細胞への攻撃」において、抑制的に作用する因子を評価した。まず、第 6 軸では、腫瘍微小環境において免疫抑制的に作用する細胞として、制御性 T 細胞 (Treg) および骨髄性抑制細胞 (MDSC) の浸潤を評価した。

#### 第 7 軸 (IGS7) チェックポイント分子発現による免疫抑制

T 細胞による免疫応答はチェックポイント分子の発現によって抑制される。PD-1、BTLA、TIM-3、LAG3、CTLA-4、PD-L1、VISTA を含むチェックポイント分子からなる遺伝子リストを作成し、第 7 軸の評価に用いた。

#### 第 8 軸 (IGS8) その他の抑制性分子の発現による免疫抑制

腫瘍微小環境において、チェックポイント分子以外にも抑制的に働く分子がいくつか存在する。ARG1、IDO1、INOS などの分子は、代謝に関与して免疫抑制的に作用する。また、IL-10 や TGF  $\beta$  などの可溶性分子も免疫抑制的に作用する。CTNNA1 の過剰発現が免疫抑制性の微小環境構築に影響することも注目されている。第 8 軸ではこれらの免疫抑制性分子の発現について評価した。

なお、第 6 軸から第 8 軸までは、抑制性因子の評価である。抑制性細胞の浸潤や抑制性分子の発現が高いほど、Cancer-Immunity Cycle にとっては不利であるため、IGS の大きさは小さくなるように定義した。

#### Immunogram を用いた肺癌に対する腫瘍内免疫応答の解析

以上の計算によって得られた 8 個のスコアからなるレーダーチャートを描画し、一人一人の患者の Cancer-Immunity Cycle の状態を表現する “Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle” を作成した。20 例の患者それぞれにおいて immunogram を描画したところ、一人として同じ immunogram を認めなかった。このことから、癌免疫が抑制されている原因について個々の症例ごとに評価するべきであることがあらためて認識された。

また、T 細胞の多寡 (IGS1) に注目して腫瘍を分類すると、いくつかの特徴的なパターンが描出された。T cell-rich 型、つまり T 細胞性の免疫応答がすでに存在する症例では、IGS3 (プライミング・活性化)、IGS4 (遊走・浸潤)、IGS5 (腫瘍の認識) が高かったものの、IGS6 (抑制性

免疫細胞による抑制), IGS7 (チェックポイント分子による抑制)のスコアが低く、抑制性因子による癌免疫の抑制が大きい傾向を認めた。このことは、T細胞性の免疫応答が、Cancer-Immunity Cycle 終盤で抑制性細胞浸潤やチェックポイント分子等の抑制性分子の発現によって拮抗性に抑制されていることを反映していると考えられた。逆に、T cell-poor 型では樹状細胞の活性化や腫瘍の抗原提示の段階ですでに Cancer-Immunity Cycle が障害されており、十分なT細胞性免疫応答が惹起されていない可能性が示唆された。また、いずれの組織型においても T cell-rich 型と-poor 型の immunogram が混在していた。

### 3 考察

最適な癌免疫治療を考える上では、癌免疫応答に関するシステム全体を評価することが必要であり、多角的・複合的な評価法そのものがバイオマーカーとして活用される時代が来ると予測される。また、次世代シーケンサーなどの大量で膨大なデータへのアクセスも日々進歩している。このような背景のもと、我々は患者毎の癌免疫状態を適切に評価するための手法として、次世代シーケンスデータに基づく Immunogram for the Cancer-Immunity Cycle を考案した。

今回の解析結果で最も注目すべきは、肺癌 20 例の immunogram を見比べた時、一人として同じ immunogram を呈した症例はいなかったという点である。一人一人の immunogram を描いたことで、Cancer-Immunity Cycle のどのステップが障害されているかを患者毎に評価することの重要性が、あらためて認識された。

一方で、今回は 20 例の自験例を用いた後方視的解析であり、今回の手法と解析結果を一般化して論ずることはできない。治療選択のためのツールとして活用するためには、臨床試験データや動物実験モデルを用いた検証と最適化が必須である。今回は Cancer-Immunity Cycle に注目して評価軸を設定したが、最適な評価軸の組み合わせについても検討しなければならない。

### 4 結語

肺癌に対する免疫応答を解析するにあたり、次世代シーケンスデータを活用して個々の症例における癌免疫状態を評価する immunogram を考案した。実臨床での利用に向けてはまだ課題も多いが、今後のさらなる発展と応用が期待される。