

総説

世界最大のOMPU尿路上皮がん包括データセットによる
腫瘍免疫微小環境の包括解析

小村 和正, 東 治人

大阪医科薬科大学医学部泌尿生殖・発達医学講座泌尿器科学教室

要旨: 近年の次世代シーケンス技術革新により, がんにおけるドライバー遺伝子変異やエピジェネティクス制御破綻の詳細解明が進んでいる。従来のがん種毎の標準治療という概念から, 個体毎のがんのジェネティクス, エピジェネティクスの特徴に基づいた横断的な治療概念(Precision Medicine)が広く知られるようになり, 日常臨床の現場に浸透しつつある。

本学OMPUバイオバンクはAMED(日本医療研究開発機構)指定バイオバンクに登録されており, その検体をもちいた解析において, 日本から世界初の化学放射線療法施行後がん検体における包括的CD274/PD-L1発現解析を報告している¹⁾。当教室では, TCGAと一線を画した臨床検体プロセッシングで, より高度に精度管理された日本人尿路上皮がん検体を使用し, 化学放射線療法耐性症例を含めた世界最大規模の包括的シーケンスデータ, 治療予後データ, Tissue Microarray (TMA)をさらに拡充(すでに450例以上を完了しており, 世界最大規模となっている), PhenoCyclerを用いた腫瘍免疫微小環境の網羅解析を併用することにより, チェックポイント阻害薬の治療奏功との相関にかかわるバイオマーカー, 特に意義不明変異(Alterations with unknown significance)の寄与について, 共同研究者らと徹底的に解明を進める。これにより, 既知の尿路上皮がんmolecular featureに更なるアップデートを加えることで, 本邦におけるがんチェックポイント阻害薬を含めたゲノム医療のさらなる拡充に寄与することを目的とする。

Key words: 尿路上皮がん, 腫瘍免疫微小環境, 次世代シーケンス, 次世代多重免疫染色

**研究の背景: 高品質固形がん臨床検体の必要性について
(本研究の希少性)**

先行研究の1つとして, 膀胱がんではTCGA(The Cancer Genome Atlas Program)が報告した解析結果(412例)が存在するが²⁾, これらはFFPE切片から抽出したRNAを用いてpoly A精製でRNA-seqを実施しているのに対し, 本学バイオバンク検体は, 徹底した高品質検体管理を行うために, 即時RNAlaterによる組織保存のための人員を配置している。さらにrRNA除去でRNA-seqを実施することにより, RNAスプライシング解析に適した高品質のデータであるとともに, long non-coding RNA(lncRNA)を含めたncRNA発現プロファイルを得ることが可能であり, 多層的・高品質データから高感度にBiomarkerや疾患鍵分子を同定することが期待

される。実際にスプライシング解析やtranscript fusion解析を実施すると, TCGAデータセットを用いた解析よりも高い解像度でvalidationが可能なスプライシング異常やpathogenic variant候補が多数同定されており, そのほとんどが, 意義不明変異(Alterations with unknown significance)である。また後述するが, 本研究プロトコールでは, TCGA研究でおそらく見逃されたと考えられるt(9;Z) fusionの同定に至ったが(米国特許申請書作製中), coding領域とは異なるmobile elementによるsoft clipping readが多数みられることがわかり, 全長RNA配列決定のためにlong-read seqや, digital droplet PCRが解析に必須の状況である(図1)。さらに, 大規模な腫瘍免疫微小環境の解析には, 試薬や資材の効率の問題からTissue Microarrayを使用することが必要になる

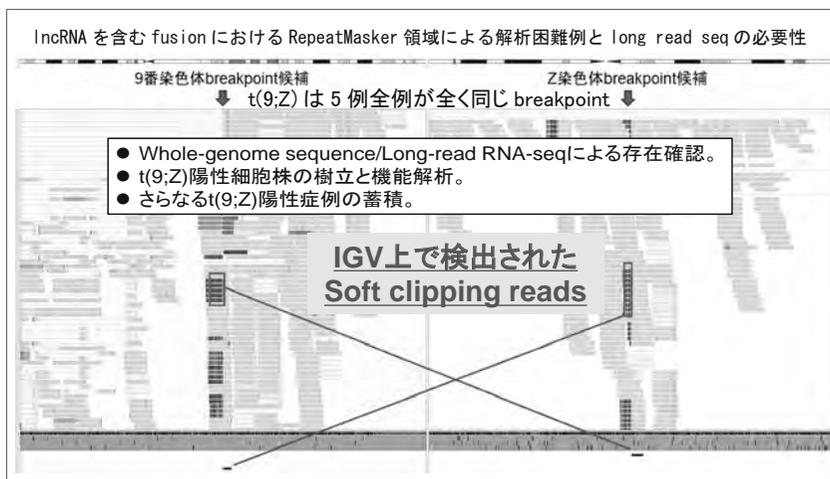


図 1

が、臨床治療情報、シーケンスデータを統合した包括データセットと完全にリンクした大規模なものは、当教室データセットが世界最大となる。

本研究の目的

2017年にアメリカ食品医薬品局 (FDA) によって承認されたチェックポイント阻害薬は、尿路上皮がんの治療戦略に大きな変革を起こしたが、現在もその客観的奏効率は21%程度であり、その奏効率の低さの克服が喫緊の課題である。このため、当教室では、現在までに全例のない規模の包括データセットをもちいて、チェックポイント阻害薬の効果を予測する腫瘍免疫微小環境を主とする詳細な分子機構の理解、および、その効果を増強する新しい治療アプローチの開発基盤となる知見集積を目標としている。

研究倫理について

本研究実行のために下記の研究プロトコルを、代表申請者機関ゲノム研究倫理委員会本会より承認を得たうえで、研究を進める。

- ・ 課題番号: 2305-10, 課題名: 大阪医科薬科大学病院受診者を対象とした悪性腫瘍克服のための研究基盤バイオバンクの構築
- ・ 課題番号: 2344-8, 課題名: 大阪医科薬科大学バイオバンク検体を用いた血中新規バイオマーカーの探索と新規治療法の開発
- ・ 課題番号: 2523-1, 課題名: 固形腫瘍病理組織検体からのTissue Microarrayを利用した免疫組織染色でのターゲット発現解析

- ・ 課題番号: 2808, 課題名: バイオバンク検体を用いた網羅的構造・機能解析による、がん病態の解明と、創薬・診断標的分子探索研究

当教室におけるすべての研究は、ヘルシンキ宣言(ヒトを対象とする医学研究の倫理的原則)の理念に基づいて行っている。また、本研究は倫理委員会承認事項のみではなく、他に「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」、「遺伝子治療等臨床研究に関する指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」及び「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」に則り行うことを徹底しており、必要に応じ都度、研究倫理委員会にて、その倫理性や科学的妥当性が審査されるように配慮している。利益相反ポリシーに関して、研究実施者及び関係者の利益相反を適切にマネジメントし、社会的信頼を失うことのないよう研究の適正な推進を図ることを目指しており、開示に係る必要事項は、利益相反管理委員会に設けて審議を行う。

研究目標①: 世界最大の尿路上皮がん腫瘍免疫微小環境アトラスと包括データセットの構築

現在までに約450例以上の尿路上皮がん検体において Whole Exome Seq, RNA-seqを完了しており、現状解析可能な389例において代表的な遺伝子変異において、現在世界最大規模であるTCGAの欧米報告との比較検討を完了している(図2)。

頻度の高いFGFR3変異においても、筋層非浸潤性膀胱がん(NMIBC)と進行性筋層浸潤性膀胱がん(MIBC)でhot spotが異なること、mRNAとの相関においても変異毎で

差異がみられること、日本人特有のFGFR3 fusion パートナーが存在することを明らかにしている。さらに、欧米人コホートとは異なり、リン酸化ドメインの特徴的な変異が見られることが判明し、これらが上皮間葉転換系

シグナルを介して、免疫微小環境の変遷を促し、チェックポイント阻害薬奏功に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆されている(図3)。

種々の治療ターゲット候補と考えられる免疫チェック

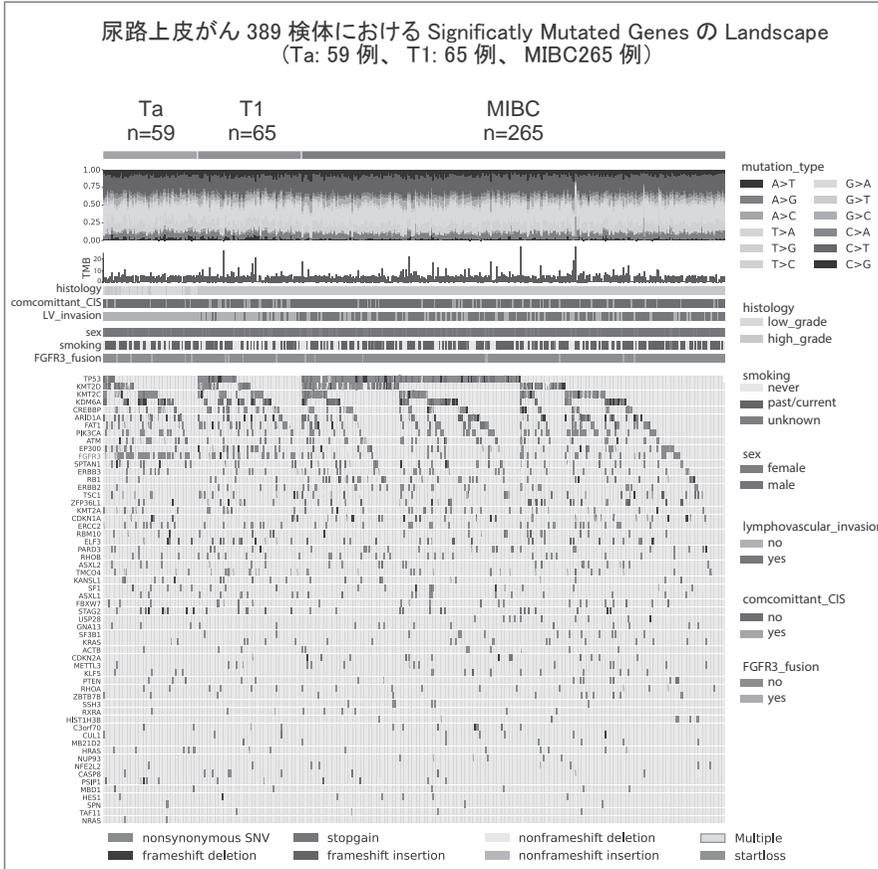


図 2

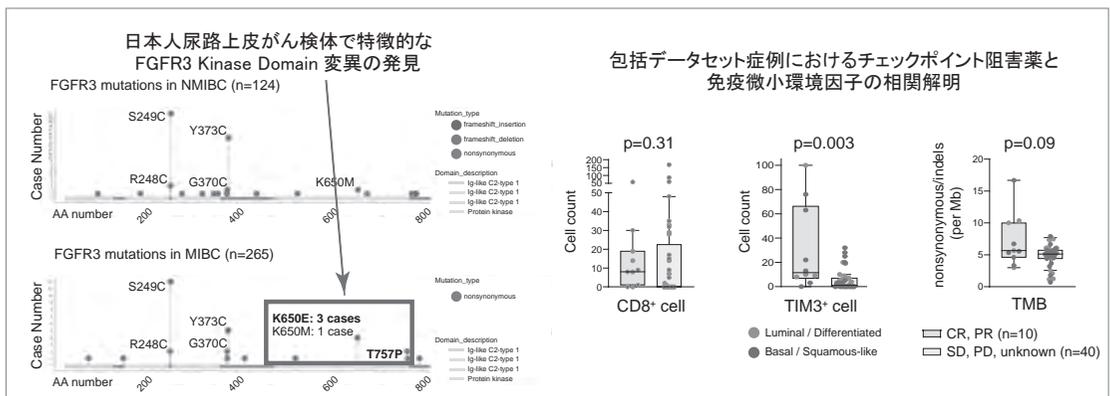


図 3

ポイント因子の網羅解析においては, FGFR3を1例として, そのAlterationの有無により, 発現しているチェックポイント因子が多様に変化することが確認されており, その空間解析を含めたvalidationのためにOpal多重免疫染色を施行してきた(図4)。しかしながら, 本手法では, 根本的に染色できる抗体数が限られること, 解析手法に施設間の差異があることが問題となっている。そこで今回, 共同研究者グループとともに, PhenoCycler (PhenoCode Discovery Immune Profiling Human Protein Coreを含む計41抗体使用)を450例以上のTissue Microarrayで染色, 解析する。さらにパネル外の因子についても検討のうえ, 適宜染色を追加することで, 世界に類を見ない腫瘍免疫微小環境解析パネルを構築中である。未発表の意義不明変異 (Alterations with unknown significance) との包括的な解析, またその手法確立を指している。

指している。

研究目標②: 新規non-coding領域Pathogenic Variant Fusion t(9;Z)の病態解析

予備解析の段階で固形がん検体で約2-3%に認められる融合遺伝子に注目し, cancer-specific deathに寄与するものに関して多変量解析を実施すると, 前述のt(9;Z)が抽出された(Hazard ratio = 4.304, P<0001)(米国特許出願書作製中)(図5)。当該5例は2年以内に全例が再発, 癌死している。固形がんには一般的に約10%のhistological variant症例が存在するが, 今回同定されたt(9;Z)陽性症例5例中, 4例がhistological variant (squamous differentiation)であった。さらなる症例蓄積を通じて, t(9;Z)の臨床的意義について明らかにする。一方で, t(9;Z)の病理学的意義は全く不明であるが, そ

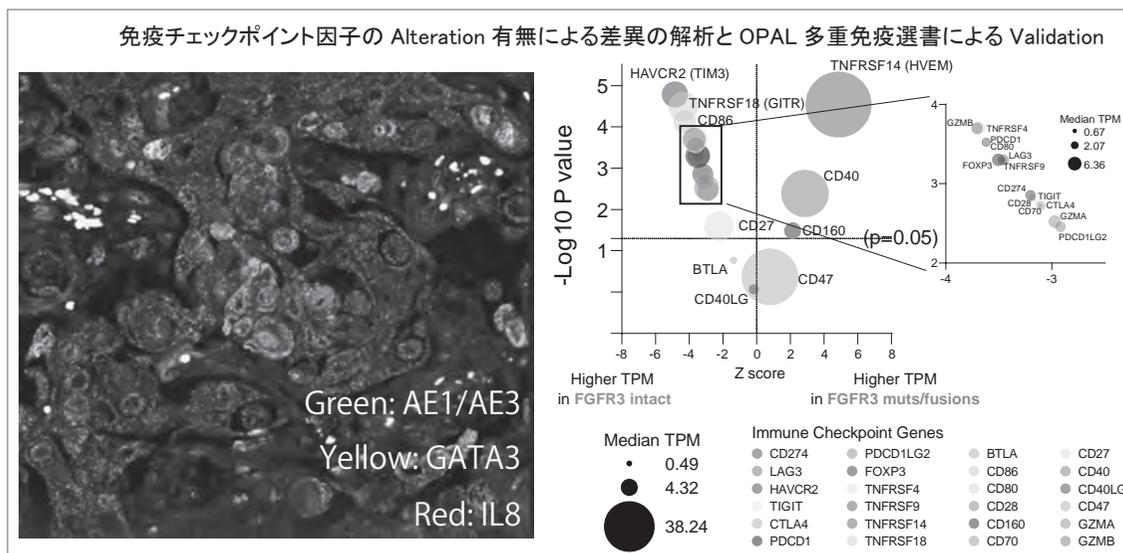


図 4

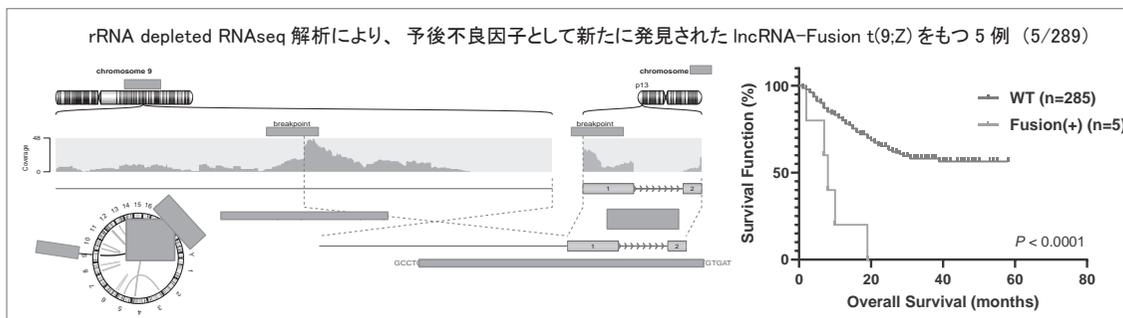


図 5

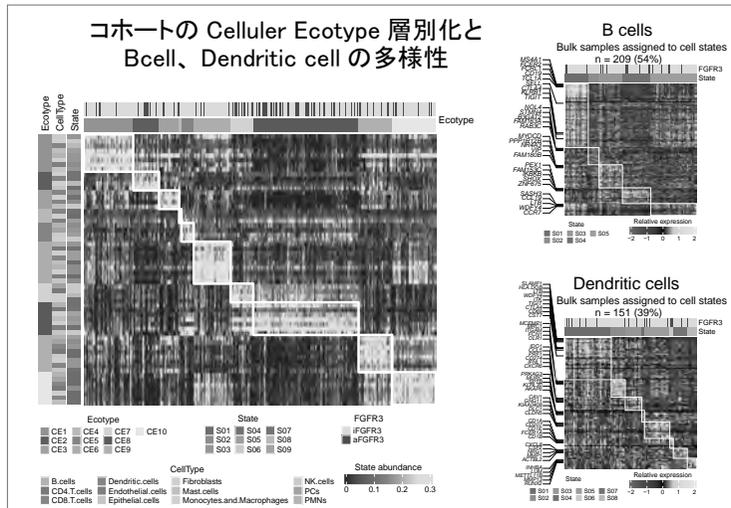


図 6

の5例においては全く同一のbreakpointにおいて染色体転座が生じていることが、トランスクリプトーム解析において示唆された。同染色体転座はpoly A精製が用いられたTCGAコホートのRNA-seqデータでは検出されず、本データセットのユニーク性を裏付けるものとなっている。

当該5例の予後が有意に不良で、さらにhistological variantがenrichされていること、先行解析でnon-coding RNA領域とがん代謝系遺伝子のsuper enhancer領域でのfusionである可能性が示唆されていることから、その分子細胞学的な意義は大きいと考えられる。さらに、この5例のチェックポイント阻害薬の使用症例は、CYBERSORTでのdigital cytometryによると明らかに、特定のimmune cell composition (特に制御性T細胞, M2マクロファージ)が高いことを明らかにしている。そこで、本研究ではPACBIO long-read seq (iso-seq), PhenoCycler (PhenoCode Discovery Immune Profiling Human Protein Core)により解析し、腫瘍免疫微小環境との相関解析により病理学的意義を解析中である。また、他にもチェックポイント阻害薬治療効果と相関の見られる新規fusion候補が同定されており、これらの全長RNA配列同定により、分子生物学的意義づけ、治療標的因子候補としての解析を行っている。

研究目標③: がん組織エコシステムと免疫微小環境—空間解析

バルクのがん組織検体を高解像度でシングルセル化することで、腫瘍免疫微小環境の理解が進むことは間違い

ないが、大量のヒト臨床検体で行うことは現実には難しい。我々はシーケンスデータからEcotyper pipelineによりbulk dataのdeconvolution解析を行うことにより、本コホートにおけるエコシステム層別化を行い、チェックポイント阻害薬奏功にかかわる因子としてB cell, Dendritic cellのCell stateの差異がみられることに注目している(図6)。本研究で、さらにPhenoCycler病理情報(特に、CD21, CD23 Follicular dendritic cell markers, DC-LAMP, MECA-79等)を多層的に融合することで、細胞間相互作用のフェノタイプマッピングと、Neighborhood解析を行っており、これにより、真に治療奏功に寄与する細胞構成また、そのStateを規定する因子の治療ターゲットとしての可能性を明らかにすることを目標にしている。

研究目標④: 意義不明SF3B1変異の病態解析および臨床的意義の解明

SF3B1遺伝子はがんの中で最も高頻度に変異を来たすスプライシング因子をコードする遺伝子であり、配列特異的に下流500-1,000遺伝子においてグローバルにmis-splicing event (MSE)を誘導すること、SF3B1変異によるスプライシング異常は臓器特異的・遺伝子変異アレル特異的に誘導されることが共同研究グループより明らかにされている³⁾。E902K/Q変異は膀胱がんに限定して見られ、非常に強い臓器特異性を持つが、その理由は解明されていない(図7)。SF3B1変異は下流のMSEによりがんの治療抵抗性に関わるだけでなく、チェックポイント阻害薬奏功に強くかかわることを見出しており、各種が

んにおけるSF3B1変異の非常に強い組織特異性を活用することによって、同変異の病理学的意義の解明と治療標的的同定に取り組んでいる。とくに、スプライシング異常の全容解明にlong-read seqを活用することで、新たな知見を生み出すことができると考えている。

最後に、本研究の意義

現在国内で行われている免疫療法を含むゲノム医療の普及促進の一つの課題として、解析後のアウトプットとなる臨床治験を含む治療選択肢の拡充が挙げられると申請者らは考えている(図8)。癌治療とその開発研究において特定のKey Moleculeによる多彩な形質変化を明ら

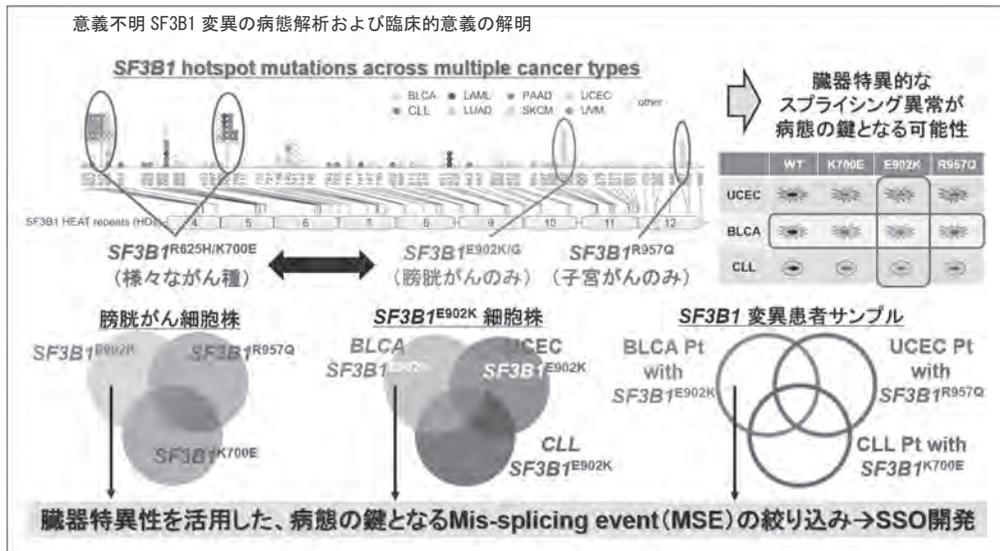


図 7

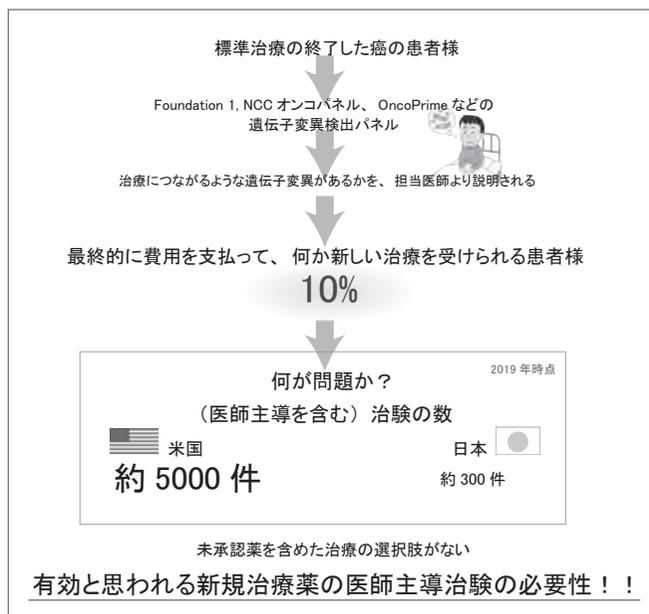


図 8

かにすることは、患者様の発現差異による層別化を可能にし、さらにその変化に伴う治療ターゲットの発見が個別化医療を可能にする。本研究では、意義不明変異 (Alterations with unknown significance) が腫瘍免疫微小環境に与える分子生物学的機序を、実臨床検体から網羅的に解析し、新規治療標的や、治療効果予測因子バイオマーカーを明らかにすることにより、Precision Immunotherapyへの医師主導治験を目指すとともに、ゲノム医療で加療選択され得る治療オプションの一つとなる可能性を明らかにしたいと考えている。患者様に真に資する研究成果を求めて、日々研究を進めている。

謝 辞

本研究を共に進めていただいております、共同研究グループの先生方に厚く御礼を申し上げます。

鈴木 穰 先生 東京大学大学院 新領域創成科学研究科
メディカル情報生命専攻 教授
吉見 昭秀 先生 国立がん研究センター研究所
がんRNA研究分野 分野長
白石 友一 先生 国立がん研究センター研究所
ゲノム解析基盤開発分野 分野長

文 献

- 1) Nishimura K, Nishio K, Hirotsuna K, et al. Efficacy of pembrolizumab and comprehensive CD274/PD-L1 profiles in patients previously treated with chemoradiation therapy as radical treatment in bladder cancer. *J Immunother Cancer*. Jan 2022;10(1)doi:10.1136/jitc-2021-003868
- 2) Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell*. Oct 19 2017;171(3):540-556 e25. doi:10.1016/j.cell.2017.09.007
- 3) Yoshimi A, Lin KT, Wiseman DH, et al. Coordinated alterations in RNA splicing and epigenetic regulation drive leukaemogenesis. *Nature*. Oct 2019;574(7777):273-277. doi:10.1038/s41586-019-1618-0