

令和3年度シニア・リサーチフェロー

# 研究成果報告書

2022年 4月 28日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団  
理事長 堀田 知光 殿

報告者氏名： 奥村元紀

研究課題：希少がんの免疫プロファイリングと有効な免疫療法の確立  
(テーマ)

研究期間： 自 令和3年4月1日  
至 令和4年3月31日

研究指導者：氏名 小山正平

公益財団法人 がん研究振興財団

## (1) 研究報告

### 1) 要旨

血管肉腫は、その希少さ故に基礎研究が遅れており、治療の選択肢も少ない。腫瘍微小環境の詳細な解析と新規治療戦略の確立が喫緊の課題である。

本研究では、病理標本や凍結保存された腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) および末梢血単核球 (PBMC) を用いて、血管肉腫を免疫・ゲノムを網羅的にプロファイリングし、免疫抑制を担う分子を特定することを目的としている。約 50 例の FFPE を用いた多重免疫染色とフローサイトメトリー法により、血管肉腫に高発現する因子 X を特定した。さらに、特定因子 X に対するヒト化特異抗体を用いて NK 細胞の ADCC 活性が高まり、血管肉腫が排除されることを見出した。因子 X が発現するメカニズムおよび腫瘍免疫応答における機能を解明するため、更なる検討が必要である。

### 2) 序

皮膚や軟部組織に発生する血管肉腫は、肉腫全体の約 2% を占める希少がんであり、半数以上が肺や胸膜に転移し、5 年生存率 15% 程度と予後不良のがんである。主な治療法は外科的切除であるが、境界不明瞭かつ高い浸潤性がゆえに、高頻度に再発する。薬物療法としては、1<sup>st</sup> ラインでパクリタキセルが用いられるが、これも効果は一時的である場合が多く、放射線治療もまた同様である。パゾパニブなどチロシンキナーゼ阻害剤をはじめとする分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤など免疫療法については未だ確立されていない。

近年、皮膚にできる血管肉腫は UV が原因となり、腫瘍変異量 (Tumor Mutational Burden; TMB) が高いことが報告され (Corrie A. Painter. et al. *Nature Medicine*. 2020)、ニボルマブやイピリムマブを用いた臨床試験が開始している。しかしながら、血管肉腫の腫瘍微小環境について理解が乏しく、新たな治療標的候補分子の探索や免疫療法の効果の予測、悪性度マーカーの同定を実現するためには、網羅的かつ詳細な解析が必要である。

本研究では、血管肉腫の免疫学的解析を行い、その中で、これまで主に T 細胞に発現するとされてきた因子 X が血管肉腫のがん細胞に発現しており、腫瘍免疫を抑制している可能性を示唆する結果が得られた。未だ解析が十分でないため、これまで得られた結果を一部報告する。

### 3) 実験方法

#### A, 多重免疫染色による血管肉腫の腫瘍浸潤細胞の解析

血管肉腫オペ検体 5 症例、パンチ生検検体 8 症例、TMA (Tissue Micro Array)40 症例の FFPE を国立がん研究センター中央病院皮膚科から提供していただき、Opal Multi-plex IHC により様々な免疫細胞を染色した。パネルの詳細を以下に示す。

制御性T細胞パネル		エフェクター細胞パネル		マクロファージ好中球パネル		樹状細胞パネル	
Molecule	Opal Color	Molecule	Opal Color	Molecule	Opal Color	Molecule	Opal Color
CD4	520	CD56	520	CD163	520	CD80	520
Foxp3	540	CD3	570	Arg1	540	HLA-DR	540
Factor X	570	CD56	620	PD-L1	570	CD141	570
CD31	620	Granzyme B	650	CD66b	620	CD31	620
CD3	650	CD45	690	CD68	650	CD1a	650
CD45	690			CD45	690	CD45	690

上記のパネルで染色した切片を Akoya Bioscience 社の Vectra 3 Automated Quantitative Pathology Imaging System にて撮影し、Inform ソフトウェアでデータを抽出し、Indica Labs 社の HALO®IMAGE ANALYSIS PLATFORM により解析した。HALO にて、各細胞のフェノタイプを以下のように設定し、数値化した。

CD8<sup>+</sup>T 細胞 ; CD45+CD3+CD56-CD8+

NK 細胞 ; CD45+CD3-CD56+

CD4<sup>+</sup>T 細胞 ; CD45+CD3+CD4+

制御性 T 細胞 ; CD45+CD3+CD4+Foxp3+

腫瘍随伴マクロファージ(M2 マクロファージ) ; CD45+CD68+CD163+

腫瘍随伴好中球 (N2 好中球) ; CD45+CD66b+Arg1+

樹状細胞 (cDC1) ; CD45+HLADR+CD141+

#### B, 多重免疫染色による多種がんの因子 X 発現解析

血管肉腫 53 症例、メラノーマ TMA (US Biomax 社)32 症例、乳がん TMA (US Biomax 社)88 症例、大腸がん (国立がん研究センター東病院消化器外科より提供いただいた) の FFPE を用いて、因子 X を染色した。A のプロトコールと同様に撮影・データ抽出・解析を行い、因子 X の発現頻度を数値化した。

#### C, Public RNA-seq 解析

血管肉腫で発現が亢進している分子群の同定のため、GSE163359 を再解析し、因子 X の発現と相関が認められる分子の探索を行なった。

#### **D, フローサイトメトリー法による血管肉腫細胞株の因子 X 発現解析**

ヒト皮膚血管肉腫細胞株 ISO-HAS-B (東北大学 医用細胞資源センター・細胞バンク) の因子 X 発現について、その他のがん細胞株と比較するため、CCLE database からがん細胞株の RNA 発現データを抽出した。タンパクレベルでの発現を解析するため、SK-MEL-28 (JCRB 細胞バンク)、A2058 (JCRB 細胞バンク)、Hs.936T (ATCC) を入手した。PE/Cy7 標識抗 X 抗体および PE/Cy7 標識マウス IgG1 (アイソタイプコントロール) を用いて、細胞表面と細胞内を染色した。

#### **E, NK ADCC assay**

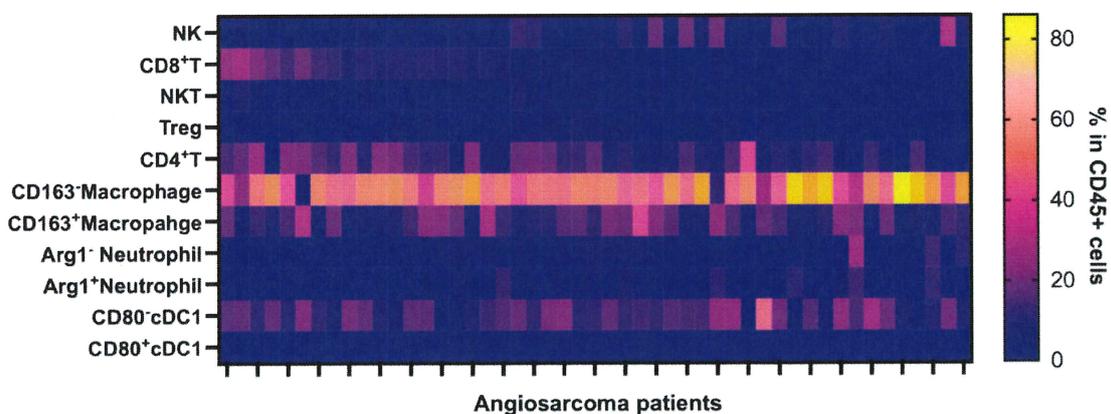
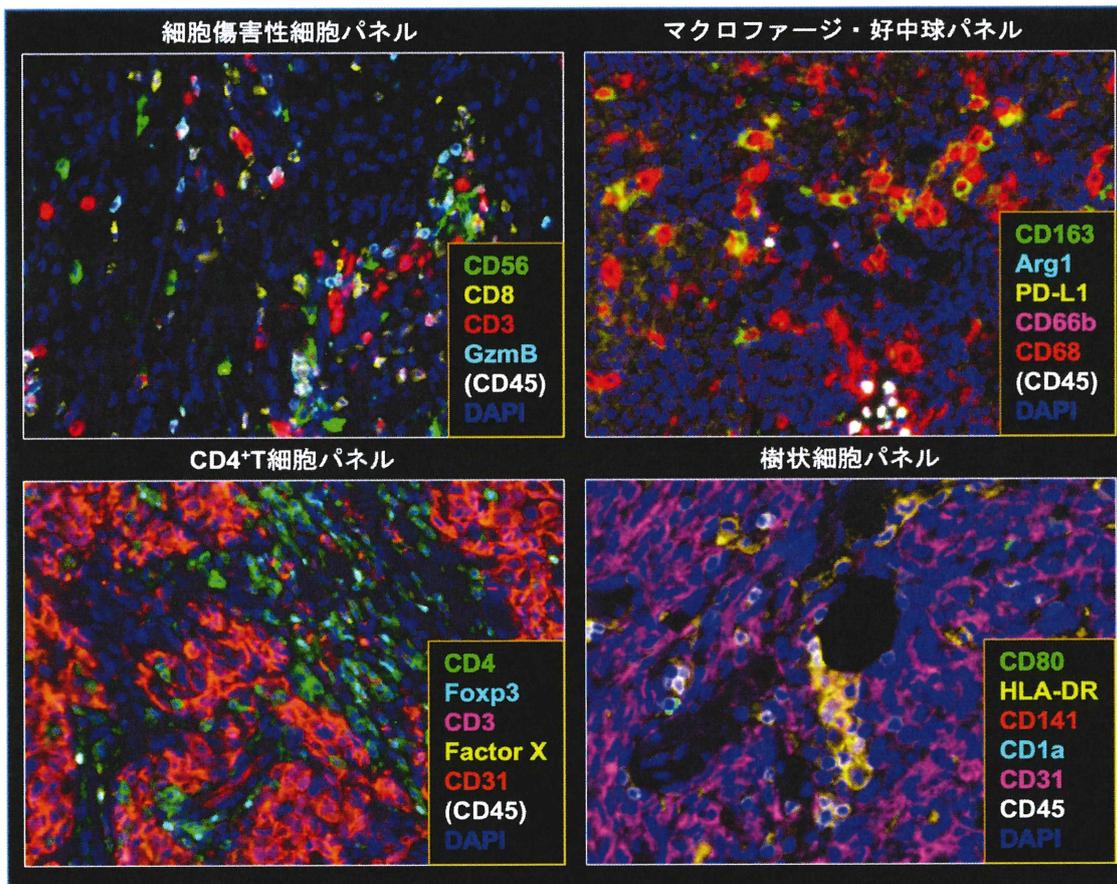
健常者の末梢血単核細胞から、NK cell isolation kit (Miltenyi Biotec) を用いて NK 細胞を分離した。血管肉腫細胞株 ISO-HAS-B と NK 細胞を 1:10 の割合で共培養し、同時にヒト IgG1 およびヒト化抗因子 X 抗体を添加した。共培養 5 時間後、NK 細胞の CD107a 発現、標的細胞の死亡率をフローサイトメトリー法により解析した。

#### 4) 結果

##### A, 多重免疫染色による血管肉腫の腫瘍浸潤細胞の解析

血管肉腫は、血管新生を促す VEGF 受容体やアンジオポエチン受容体 TIE2 を高発現するため、血管新生が亢進しており血流が豊富であることが予想されていた。多重免疫染色では、NK 細胞や CD8<sup>+</sup>T 細胞などの細胞傷害性細胞や、マクロファージや好中球などのミエロイド系細胞を同定した (図 1)。

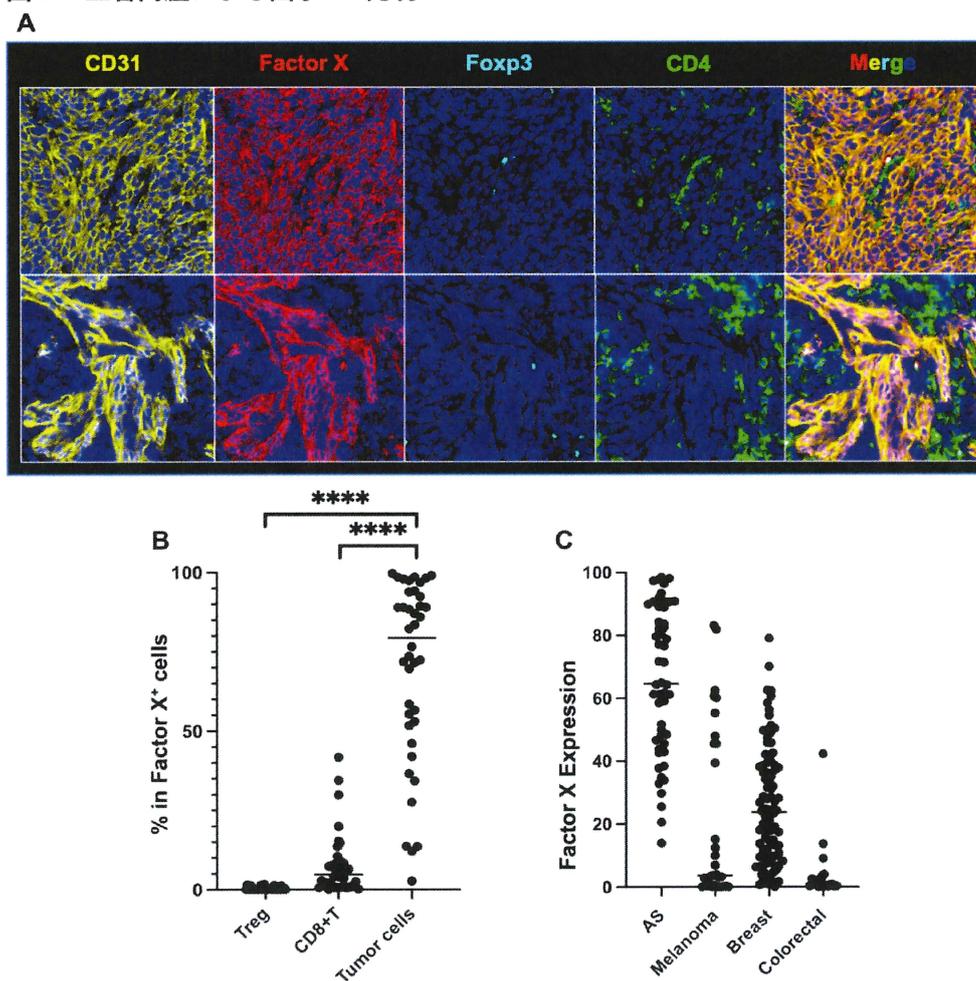
図1 血管肉腫に浸潤した免疫細胞の同定



## B, 多重免疫染色による多種がんの因子 X 発現解析

制御性 T 細胞および CD4<sup>+</sup>T 細胞の機能を評価する目的で染色した因子 X が、血管肉腫のマーカーとして用いた CD31 と共局在しているように観察されたため、詳細に再解析した (図 2A)。その結果、因子 X が制御性 T 細胞やその他 T 細胞だけでなく、血管肉腫のがん細胞で高発現していることが明らかになった (図 2B)。さらに、因子 X の発現がこれまで確認されているメラノーマや乳がんと比較した結果、特に血管肉腫では高頻度に発現していた (図 2C)。重要なことに、因子 X の発現は全ての患者検体で認められた。

図 2 血管肉腫による因子 X の発現

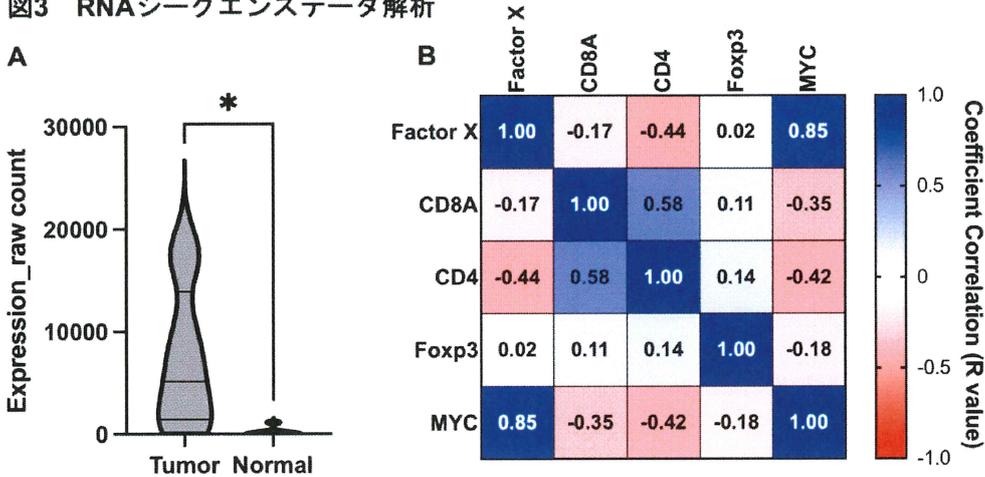


## C, Public RNA-seq 解析

血管肉腫患者の網羅的なゲノム解析を行うため、NCBI の GEO Datasets に保存されている RNA シークエンスデータ (GSE163359) を再解析した。その結果、因子 X は、正常組織に比べ、血管肉腫の組織で発現が上昇していた (図 3A)。さらに、T 細胞サブセットのマーカーである CD8A、CD4、Foxp3 発現とは発現に相関が認められなかった一方で、血管肉腫

で発現が亢進しているとされる MYC とは非常に強い相関が認められた (図 3B)。

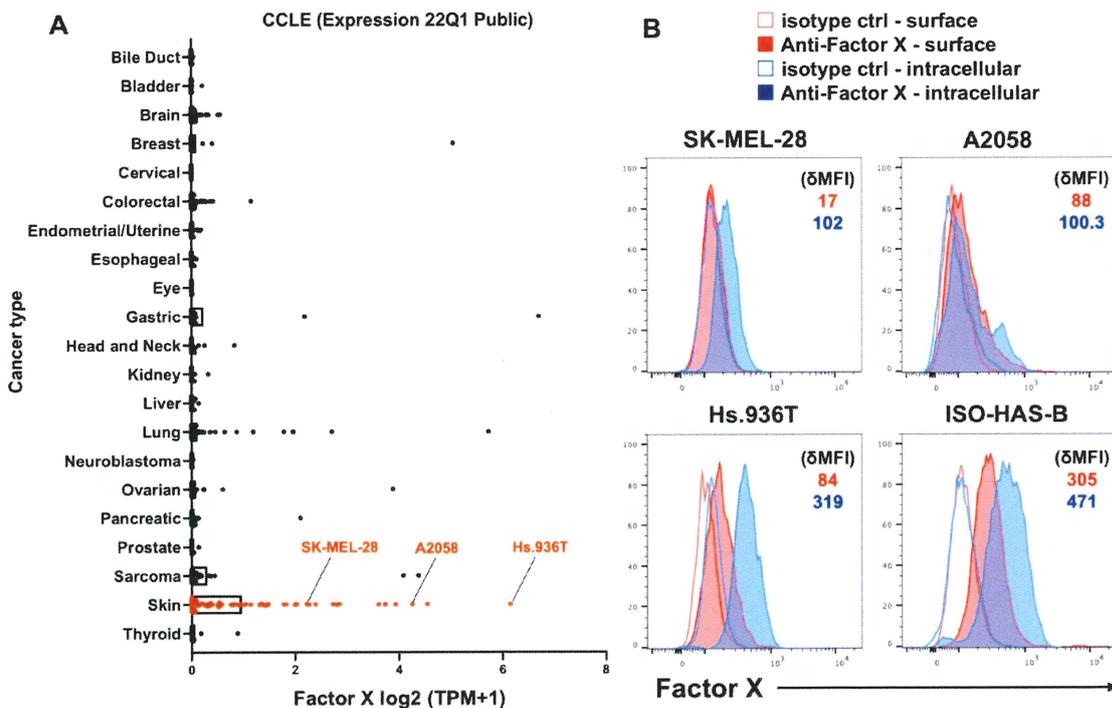
図3 RNAシーケンスデータ解析



D, フローサイトメトリー法による血管肉腫細胞株の因子 X 発現解析

血管肉腫細胞による因子 X のタンパク発現レベルを、その他のがん細胞株と比較するため、CCLE (Cancer Cell Line Encyclopedia) データベースより因子 X の RNA 発現レベルが最も高いメラノーマの細胞株を抽出した (図 4A)。メラノーマ細胞株 SK-MEL-28、A2058、Hs.936T、血管肉腫細胞株 ISO-HAS-B の細胞内および細胞表面を、因子 X に特異的に結合する抗体で染色した。その結果、ISO-HAS-B が最も高い発現を示した (図 4B)。

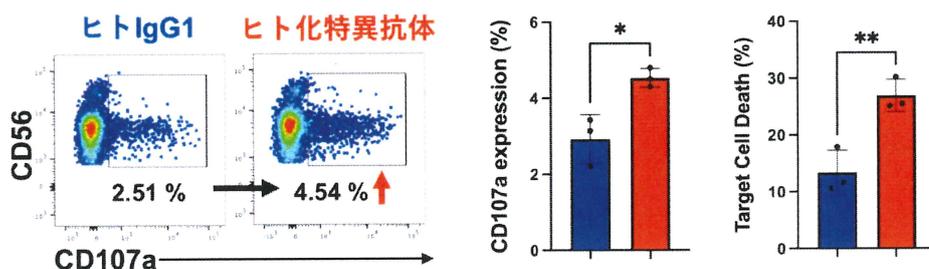
図4 血管肉腫細胞株による因子X発現解析



## E, NK ADCC assay

因子 X が分子標的薬の候補となりうるのか調べるため、ISO-HAS-B と NK 細胞を共培養する実験系により、抗因子 X 抗体の効果を評価した。その結果、抗体により NK 細胞の ADCC 活性が亢進し、がん細胞の排除が促進されることが明らかになった(図 5)。

図5 NK細胞のADCC assay



## 5) 考察

本研究では、血管肉腫に浸潤する免疫細胞を多く同定し、偶然にも、これまで T 細胞に発現するとされてきた因子 X が血管肉腫のがん細胞に発現していることを見出した。さらに、フローサイトメトリーを用いた解析により因子 X が細胞表面に発現しており、NK 細胞の ADCC を介した分子標的薬の候補分子となり得ることを明らかにした。

### (2) 研究成果を今後どのように役立てるか

本研究で明らかにした因子 X が腫瘍微小環境へ与える影響は未だ全く不明である。これまでの因子 X に関する研究報告から、免疫逃避に関与すると予想されるが、より詳細な免疫・ゲノム解析が必要である。最も興味深いポイントは、因子 X の発現制御メカニズムである。血管肉腫特有の遺伝子変異により発現が上昇するのか、血管肉腫が構築する腫瘍微小環境により発現が調節されるのか、ChIP-seq や CRISPR Screening Library により検討を重ねる。さらに、マウスモデルにより、因子 X を標的とした治療法の樹立を目指す。

希少がんの研究には、検体の集積の難しさだけでなく、病態の情報が少ないことが大きな問題点であることを実感した。本研究で必ず患者検体の網羅的解析を遂行し、血管肉腫の病態解明の一助となることを期待している。