

研究報告書
2019年度：A課題

2021年4月19日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 公益財団法人がん研究会有明病院

住 所 東京都江東区有明 3-8-31

研究者氏名 今村 裕



(研究課題)

上部消化管腺癌における MSI-low に着目した網羅的免疫・ゲノム解析による新規免疫治療創出

2020年 2月 28日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【研究目的】

MSI は、MSI-high、MSI-low および microsatellite stable (MSS) の 3 つに分類される。MSI-high は特徴的な分子亜型であり PD-1/PD-L1 系の免疫回避機構が重要である。一方、MSI-low については未だ解明されていない。我々はこれまで、MSI-low 上部消化管腺癌（胃腺癌・食道胃接合部腺癌、N=363）では LINE-1 低メチル化、特徴的 *TP53* 変異パターン、リンパ球浸潤傾向が高いことを見いだした。これに基づき、今回 MSI-low は独立した表現型であり、特徴的な免疫回避機構を有するのではないかと着想した。

本研究では、凍結組織を有する MSI-low 上部消化管腺癌 (N=61) のエキソーム、トランスクリプトーム (immune signature 解析)、メチロームとレパトア解析を行い、既知の大規模データベースと統合解析することにより、これまでになく大規模な MSI-low 腫瘍 (N=129) の網羅的遺伝子解析データから、そのゲノム変化の特徴と免疫回避機構を明らかにする。さらにニボルマブ治療症例を用いた MSI-low の新規バイオマーカーとしての可能性も検討する。

【方法】

本研究では、MSI-low を除外するのに有用な BAT40 を NCI の 5 マーカーに加えることとし、MSI-PCR 法 (BAT25, BAT26, BAT40, D2S123, D5S346, D17S250) を行った。判定方法は、2 つ以上のマーカーで不安定性を示した場合を MSI-high、1 マーカーのみを MSI-low、認めないものと Microsatellite stable (MSS) とした。

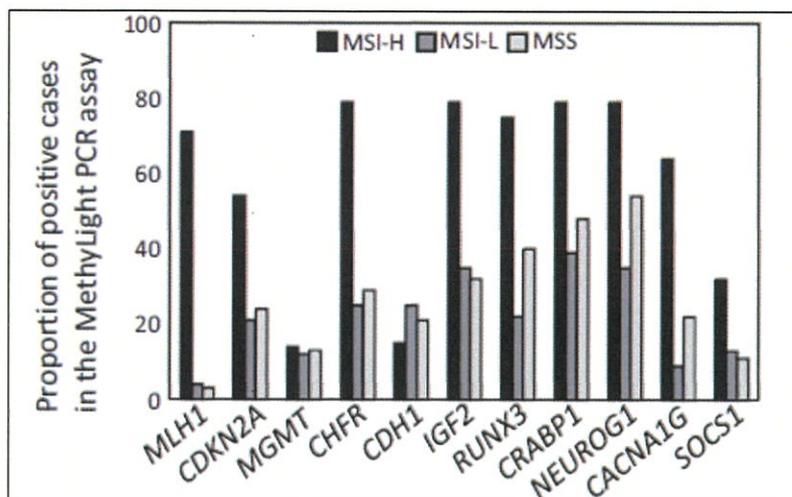
1. エピジェネティックな変化に関しては、腫瘍 FFPE 部分からマクロダイセクション法により腫瘍 DNA を抽出し、バイサルファイト処理を行った後、消化管腺癌に選択的な CpG アイランドプロモーターのミニパネルを用いてそのメチル化を測定した。Methy-Light PCR 法を用いて、ハウスキーピング遺伝子の *COL2A* 遺伝子と、ユニバーサルメチル化 DNA を用いたメチル化率の割合 (percentage of the methylated reference: PMR) を算出し、PMR ≥ 4.0 をメチル化陽性とした。
2. TCGA コホートを用いて、MSI ステータス別に indel burden を確認し、MSI-low 腫瘍でのネオアンチゲン産生の可能性を検討した。尚、TCGA では我々のマーカーに TGFR-II をマーカーとして加えて評価し、MSI-H $\geq 40\%$ の不安定マーカー陽性率、MSI-low は 1-39%、MSS は 0%としている。
3. ニボルマブ投与症例の腫瘍 FFPE 部分から同様に DNA を抽出し MSI-PCR アッセイを行い、ニボルマブの効果との相関を検討した。
4. Immune signature 解析を行うため、MSI-high 凍結組織 (N=2)、MSI-low 凍結組織 (N=2)、MSS 凍結組織 (N=2) を外注委託業者へマイクロアレイ解析に提出した。

【研究の進捗】

1. 選択的 CpG プロモーターのメチル化率の検討

網羅的解析に耐えうる MSI-low 腫瘍の凍結サンプルが欠乏していることから、FFPE サンプルを用いて検討を行うこととした。選択した 11 か所の CpG サイトは *MLH1*, *CDKN2A*, *MGMT*, *CHFR*, *CDHI*, *IGF2*, *RUNX3*, *CRABP1*, *NEUROG1*, *CACNA1G*, *SOCS1* であり、胃腺癌、大腸腺癌で高頻度にメチル化を呈する CpG プロモーターである。以前に LINE-1 のメチル化状況を定量化し、MSI-low 群では有意にメチル化頻度が低いことが判明しており、今回の検討でも同様にすべてのマーカーでもメチル化率が低いことが明らかとなった (次頁図 1)。すなわち、MSI-L 腫瘍の発癌には、エピジェネティックな発癌は関係していない可能性が高いと考えられた。

(図1) 食道胃接合部腺癌における、消化管腺癌に高頻度にメチル化を来す CpG プロモーターメチル化率

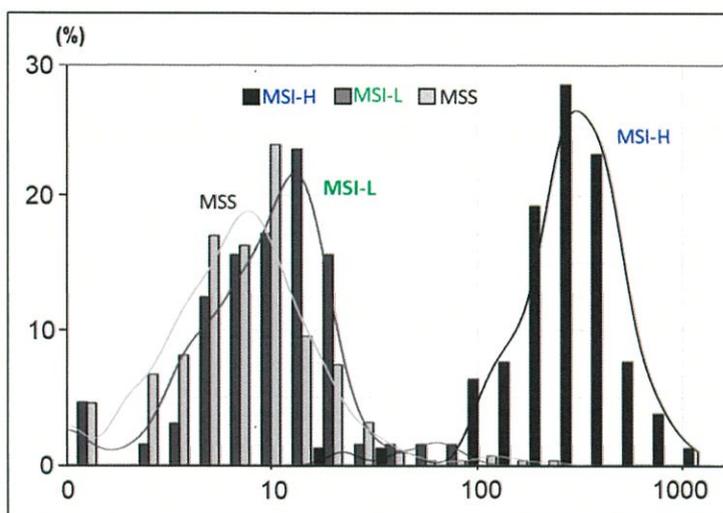


2. TCGA コホートをを用いた MSI ステータスによる indel 変異数の検討

TCGA のパブリックデータを cBioPortal サイトから抽出し、下図2に示すように、MSI ステータスごとに indel 変異数の分布を検討した。MSI-low の indel 数別にみた症例割合の分布は、明らかに MSS 群よりも MSI-high 群寄りにシフトしていることが判明した。この結果より、MSI-low 腫瘍は MSS 腫瘍よりも明らかに indel 変異を高頻度に来しており、それに由来するネオアンチゲンを産生・放出している可能性が示唆された。

(図2) 食道胃接合部腺癌 (TCGA, Nature, 2017) コホートにおける MSI ステータ別の indel 変異数の検討

X 軸は患者割合、Y 軸は indel 数を示す。
(MSI-H, MSI-high; MSI-L, MSI-low)



3. ニボルマブ治療効果予測マーカーの検討

当院でニボルマブ治療を受けた 40 症例について、MSI-PCR 法による MSI ステータス判定を行い、ニボルマブの臨床効果とその相関性を検討したが、MSI-high、MSI-low 症例はそれぞれ 1 症例ずつ認めるのみで、効果判定のマーカーとなりうるか十分な検討が困難な状況であり、今後の症例集積に期待している。

4. 凍結組織を用いた Immune signature 解析

既存検体で適切な質の核酸を有した症例は 6 症例しかなく、現在トランスクリプトーム解析中である。

【今後の展望】

今回の報告では、MSI-low の網羅的解析に耐える DNA クオリティを有する検体数が十分足りずに Methy-Light-PCR パネルでの検討となった。今後も症例集積を継続し、網羅的トランスクリプトーム解析や免疫治療との相関性を検討していく予定である。

【研究報告】

学会発表

- 1) 第 74 回日本食道学会学術集会 「Molecular subtype による食道胃接合部腺癌の至適リンパ節郭清範囲」 (2020/12/11)
- 2) 第 121 回日本外科学会定期学術集会 「Molecular subtype と食道浸潤長からみた食道胃接合部腺癌の至適リンパ節郭清範囲」 (2021/4/9)

論文

- 1) Imamura Y, Toihata T, Haraguchi I, Ogata Y, Takamatsu M, Kuchiba A, Tanaka N, Gotoh O, Mori S, Nakashima Y, Oki E, Mori M, Oda Y, Taguchi K, Yamamoto M, Morita M, Yoshida N, Baba H, Mine M, Nunobe S, Sano T, Noda T, Watanabe M
Immunogenic characteristics of microsatellite instability-low esophagogastric junction adenocarcinoma based on clinicopathological, molecular, immunological and survival analyses.
International Journal of Cancer 148:1260-75, 2021

- 2) Imamura Y, Watanabe M, Oki E, Morita M, Baba H
Esophagogastric junction adenocarcinoma shares characteristics with gastric adenocarcinoma: Literature review and retrospective multicenter cohort study.
Annals of Gastroenterological Surgery 5(1):46-59, 2021