



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1982号
学位記番号	第1393号
氏名	真柄 徹也
授与年月日	令和5年9月25日
学位論文の題名	<p>Tumor immune microenvironment of cutaneous angiosarcoma with cancer testis antigens and the formation of tertiary lymphoid structures</p> <p>(皮膚血管肉腫における3次リンパ様構造の形成とがん・精巣抗原を含む腫瘍免疫微小環境)</p> <p>Frontiers in Oncology, 13, 1106434. https:// doi.org 10.3389/fonc.2023.1106434</p>
論文審査担当者	主査： 山崎 小百合 副査： 飯田 真介, 稲垣 宏

論文内容の要旨

皮膚血管肉腫（CAS：cutaneous angiosarcoma）は、非常に悪性度の高い軟部肉腫であり、有効な治療は乏しく、新たな治療が望まれている。抗 PD-1（programmed death-1）抗体を含む免疫チェックポイント阻害薬（ICI：Immune checkpoint inhibitors）が CAS に対して有効であることが近年報告され、適応の拡大が期待されているが、一般に腫瘍免疫学的に“cold”といわれる CAS の腫瘍免疫微小環境については未解明な点が多くある。我々は以前に、有用な免疫療法の効果予測マーカーとして注目されている、CD20 陽性 B 細胞を CD3 陽性 T 細胞が取り囲む三次リンパ組織様構造（TLS：Tertiary lymphoid structure）が、CAS の約半数の症例に存在し、悪性黒色腫など他の癌種と同様に、良好な予後と相関することを見出した。しかしながら、TLS が豊富にみられる症例と TLS が乏しい症例の違いは未だ分かっておらず、さらには、TLS の数は同一症例の病変間、例えば原発病変と再発病変の間でも大きく変化していた。

CAS における腫瘍免疫微小環境の変化をより詳細に解析するため、次世代シーケンサー（NGS：Next-generation sequencer）を用いた包括的 RNA シーケンスを実施した。名古屋市立大学病院で治療した CAS31 例から皮膚生検もしくは外科的切除で得られた 62 の FFPE（formalin-fixed paraffin-embedded）検体を収集した。平均年齢は 76.8 歳で、男性が多く（67.7%）、部位は頭頸部（83.9%）、次いで体幹（3.2%）、四肢（12.9%）であった。全 62 検体のうち、47 検体が原発病変、14 検体が再発病変であり、診断時にリンパ節転移があった症例は 2 例のみで、遠隔転移を認めた症例はなかった。そのうち、15 検体について Oncomine Immune Response Research Panel を用いて 395 の免疫反応に関する遺伝子発現の NGS 解析を行い、GSEA（Gene Set Enrichment Analysis）を実施した。ヒートマップは iDEP.94 を用いて作成した。全 62 検体について免疫組織染色による解析と Kaplan-Meier 法による予後解析を Graph Pad Prism 8 を用いて行った。

NGS の結果、TLS 陽性例ではがん・精巣抗原（CTA：Cancer testis antigens）の 1 つである NY-ESO-1 遺伝子発現が有意に増加しており（ $\log_2FC=4.426$ 、 $p\text{-value}=0.0296$ ）、GSEA では免疫活性状態であることが示唆された。TLS 陰性または TLS 少数例で、PD-1 や PD-L1

（programmed death-ligand 1）を含む免疫チェックポイント分子の遺伝子発現が上昇しており（PD-L1, $\log_2FC=9.427$, $p\text{-value}=0.0033$; PD-1, $\log_2FC=6.335$, $p\text{-value}=0.0373$ ）、TLS 形成の抑制との関連が推察された。原発病変と再発病変での比較では、再発病変で XAGE-1B を含む CTA 遺伝子発現が亢進していた（ $\log_2FC=8.042$, $p\text{-value}=0.034$ ）。浸潤する CD8 陽性細胞および TLS の数に関しては、原発病変と再発病変の間で有意な傾向を示さなかったが、腫瘍細胞の PD-L1 発現は、再発病変で有意に低下していた（paired t-test, $p\text{-value}=0.031$ ）。NY-ESO-1 発現と相関するケモカインは CCL21 と CXCL8 であり、CCL21 は TLS の数とも相関していたが（linear regression, $p\text{-value}=0.0273$ ）、XAGE-1 と相関するケモカインはなかった。NY-ESO-1 と XAGE-1 は、免疫組織染色で検出可能であり、それぞれ単独では予後予測マーカーとはならなかったが、TLS の存在有無と組み合わせることで有用なバイオマーカーとなる可能性を見出した（TLS and NY-ESO-1, $p\text{-value}=0.027$; TLS and XAGE-1, $p\text{-value}=0.021$ ）。

免疫原性が高いとされる CTA は、CAS における腫瘍免疫微小環境の形成に不可欠な役割を担っている可能性がある。これらの知見は、CAS が腫瘍免疫学的に“hot”な腫瘍であることの証拠であり、潜在的な治療標的を提供し、ICI を含む免疫療法の適応拡大の一助となることを期待する。

論文審査の結果の要旨

【背景と目的】

皮膚血管肉腫（CAS）は、非常に悪性度の高い軟部肉腫であり、有効な治療は乏しく、新たな治療が望まれている。抗PD-1抗体を含む免疫チェックポイント阻害薬がCASに対して有効であることが近年報告され、適応の拡大が期待されているが、一般に腫瘍免疫学的に“cold”といわれるCASの腫瘍免疫微小環境については未解明な点が多くある。

【方法】

CASにおける腫瘍免疫微小環境の変化をより詳細に解析するため、名古屋市立大学病院で治療したCAS31例から皮膚生検もしくは外科的切除で得られた62のFFP検体を収集し、免疫染色による解析と、次世代シーケンサを用いた包括的RNAシーケンスを実施した。

【結果】

CASでは多くの症例で三次リンパ様構造（TLS）の形成が確認された。TLS陽性例ではがん・精巣抗原（CT）の1つであるNY-ESO-1遺伝子発現が有意に増加しており、GSEAでは免疫活性状態であることが示唆された。TLS陰性またはTLS少数例で、PD-1やPD-L1を含む免疫チェックポイント分子の遺伝子発現が上昇しており、TLS形成の抑制との関連が推察された。原発病変と再発病変での比較では、再発病変でXAGE-1Bを含むCTA遺伝子発現が亢進していた。浸潤するCD8陽性細胞およびTLSの数に関しては、原発病変と再発病変の間で有意な傾向を示さなかったが、腫瘍細胞のPD-L1発現は、再発病変で有意に低下していた。NY-ESO-1発現と関連するケモカインはCCL21とCXCL8であり、CCL21はTLSの数とも関連していたが、XAGE-1と関連するケモカインはなかった。NY-ESO-1とXAGE-1は、免疫組織染色で検出可能であり、それぞれ単独では予後予測マーカーとはならなかったが、TLSの存在有無と組み合わせることで有用なバイオマーカーとなる可能性を見出した。

【結論】

免疫原性が高いとされるCTAは、CASにおける腫瘍免疫微小環境の形成に不可欠な役割を担っている可能性がある。これらの知見は、CASが腫瘍免疫学的に“hot”な腫瘍であることの証拠であり、潜在的な治療標的を提供し、ICIを含む免疫療法の適応拡大の一助となることを期待する。

【審査の内容】

第一副査の飯田先生から、CASの原因となる遺伝子異常、抽出したRNAのQualityについて、NY-ESO-1やXAGE-1B陽性例における末梢血液でのテトラマー陽性細胞の検討について、PD-1/PD-L1以外の免疫チェックポイントの関与、TLSを形成するB細胞が何を標的抗原としているか等、10項目の質問があった。第二副査の稲垣先生から、TLSカウント時の面積補正の有無、CD8陽性細胞の数と陽性/陰性の判定方法、再発例の定義やheterogeneity、RNA発現細胞の由来、XAGE抗体の特異性について等、9項目の質問があった。主査の山崎よりRNA抽出の方法、マクロダイセクションの方法、免疫染色での高発現/低発現の判別、TLSの有無とCD8細胞数の相関の有無、intrapatient heterogeneity有無とその推察されるメカニズム、CCL21の分泌細胞、本研究成果を利用した治療戦略の可能性について等、10項目の質問を行った。これらの質問にいずれも満足すべき回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。また飯田先生よりゲノム異常と腫瘍免疫の相関について、稲垣先生より再発群がさらに2群に分けられる可能性について、今後の研究についてのアドバイスがあった。本研究はまれだが悪性度の高い悪性腫瘍の腫瘍免疫応答を詳細に解析したもので、意義のある研究といえる。従って本論文の筆者は博士（医学）の称号を与えるに相応しいと判断した。