

## 消化管間質腫瘍における癌免疫応答と免疫治療への可能性の検討

大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座 消化器外科学  
西塔 拓郎

### 1.緒言

進行・再発消化管間質腫瘍（Gastrointestinal Stromal Tumor; GIST）の治療は Tyrosine kinase inhibitor (TKI)が基本となるが、長期間使用すると最終的に不応となってくるため<sup>1)</sup>、治療効果増強を目指した新規治療法の開発が必要である。近年多くの癌腫で免疫チェックポイント阻害薬（Immune checkpoint inhibitor ; ICI）が認可されているが、GISTにおける免疫治療は開発途上であり、数個の臨床試験が施行される段階にある(NCT02880020, NCT03291054)。マウスにおいてはTKIの一種である Imatinib が抗 PD1 抗体の抗腫瘍免疫を増強することが報告されており<sup>2)</sup>、GISTにおいてICIが奏功する可能性があるが、GISTに対する免疫治療の可能性を検討する上においても、その腫瘍内免疫応答の解析が必須と考えられる。

ICIにより活性化された免疫細胞は、遺伝子変異由来新規癌抗原（ネオアンチゲン）を認識することで抗腫瘍免疫活性を発揮すると考えられ、ネオアンチゲン発現が高い腫瘍においてはICIの治療効果が高いとされる<sup>3,4)</sup>。免疫細胞が反応しやすいネオアンチゲンのアミノ酸配列が存在することが予測されるが、この配列の詳細は未だ明らかになっていない。GISTは *KIT*, *PDGFRA* 遺伝子の変異が driver mutation であり<sup>5)</sup>、基本的にはこの範囲を検索することによりGISTにおける遺伝子変異の検出が可能となる。GISTの中で免疫原性が高い遺伝子変異の種類を特定できれば、その腫瘍における免疫応答を解析し、driver mutation 内で免疫を高度に誘導する新規癌抗原を検出できる可能性がある。

今回の研究では、免疫原性の高いGISTの遺伝子変異型を抽出し、これらの腫瘍の中で免疫細胞が反応しやすい新規癌抗原の配列を検出することを目的とする。抗腫瘍免疫を高度に誘起する新規癌抗原のアミノ酸配列の同定は、GISTに対する免疫治療の可能性を検討可能とすると共に、癌腫非特異的にICIの治療効果を高める治療法の開発に繋がる事が予想される。

### 2.方法

以下の研究計画に従い、研究を遂行中である。

2-1) 免疫染色による腫瘍浸潤免疫細胞の検討

過去の GIST 切除標本の FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) スライドを用いて、CD3, CD4, CD8 等の各種抗体を用いて免疫染色を行い、免疫細胞浸潤の有無と *KIT*, *PDGFR* の遺伝子変異との関係を検討し、免疫原性の高い腫瘍種を抽出する。

#### 2-2) 末梢血中・腫瘍浸潤リンパ球における細胞分画の検討

新規 GIST 切除患者において、上記免疫染色と共に、末梢血・腫瘍浸潤リンパ球を抽出・保存し、CD3, CD4, CD8, CD25, PD1, Tim3 等の各種抗体を用いた FACS 解析にて免疫細胞の分画を検討する。

#### 2-3) 遺伝子変異の解析と新規癌抗原の検討

新規 GIST 切除標本より DNA と RNA を抽出し、*KIT*, *PDGFRA* の遺伝子変異を検出する。遺伝子変異と患者 HLA(Human Leukocyte Antigen)のデータを組み合わせて、*in silico* で新規癌抗原のアミノ酸配列候補を検出する。

#### 2-4) 腫瘍浸潤リンパ球における新規癌抗原への反応性の検討

新規癌抗原の候補アミノ酸配列を元にペプチドを作成し、このペプチドに対する腫瘍浸潤リンパ球の反応を *in vitro* で検索する。ペプチドに対する腫瘍浸潤リンパ球の反応が観察された場合には、免疫反応が起きる最短のアミノ酸配列を *in vitro* で検索し、ミニマムエピトープを同定する。

### 3.結果

#### 3-1) 過去の GIST 手術症例における遺伝子変異の解析

1995 年 1 月より 2013 年 1 月の期間に、当院で原発 GIST に対して切除術を施行し、手術切除標本を用いて *KIT*, *PDGFRA* の遺伝子変異を検索した 122 例を対象とした。全 122 例中、*KIT* 遺伝子変異は 97 例、*PDGFRA* 遺伝子変異は 14 例、wild type は 11 例であった (表 1)。この中でも *KIT* exon11 遺伝子変異は 86 例と半数以上を占めていた。

<表1, 遺伝子変異の部位>

PDGFRA	exon12	3
	exon18	11
KIT	exon 9	5
	exon 11	86
	exon 13	0
	exon 17	3
	KIT other	3
Wild type		11 (例)

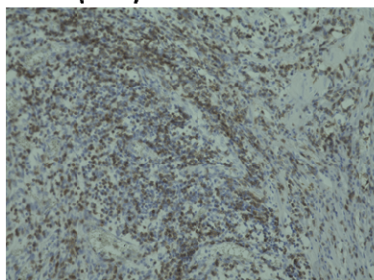
#### 3-2) 免疫染色の対象・結果

上記症例の中で、遺伝子変異が *PDGFRA* (n=3), *KIT* exon11 (n=10), *KIT* other (n=3) にある腫瘍と wild type

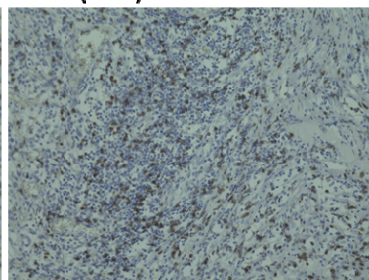
(n=2)の腫瘍を抽出し、FFPE スライドを用いて免疫染色で CD3, CD8 の評価を行った。腫瘍先進部において Hot spot を各々 3 カ所選び、単位面積当たり (mm<sup>2</sup>) の CD3 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T

<図1, 免疫染色の染色例>

CD3 (2点)



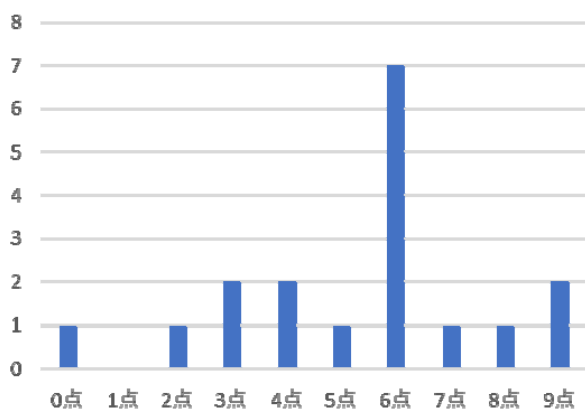
CD8 (1点)



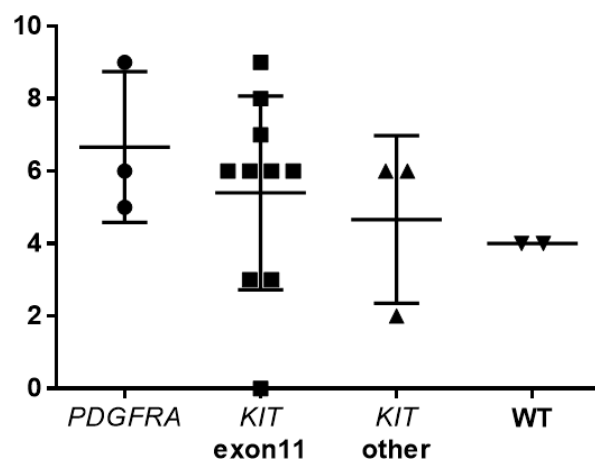
密度0-25% (0点), 25-75% (1点), 75-100%(2点)の3段階評価

細胞の浸潤細胞数を評価し、その密度を 0-25% (0 点)、25-75% (1 点)、75-100% (2 点) の 3 段階に分類し (図 1)、各 3 視野の CD3 陽性 T 細胞密度と CD8 陽性 T 細胞密度の合計点を腫瘍の immuno score とした<sup>6)</sup>。合計点は 0-12 点となり、分布は図 2 の様になった。各遺伝子変異ごとの immuno score では、*PDGFRA* 遺伝子変異の腫瘍の immuno score が高く、wild type の腫瘍が低い傾向に見えるが、症例数が少なく統計学的有意差は観察されなかった (図 3)。

< 図2, Immuno scoreの分布 >



< 図3, 遺伝子変異毎のImmuno score >



#### 4.考察

Gerardo らの報告によれば、*KIT* 遺伝子変異の GIST に比べて、*PDGFRA* 遺伝子変異の GIST において免疫応答が高いことが示され、HLA を用いた *in silico* の検討においてネオアンチゲン候補が検出されている<sup>7)</sup>。しかしながらこの報告においては、*in vitro* assay において、実際にネオアンチゲン候補の免疫応答誘起能までは検証されておらず、どのネオアンチゲン候補が腫瘍微小環境において抗腫瘍効果を持つのか明らかにはされていない。本院での少数例の検討でも、*PDGFRA* 遺伝子変異の GIST は確かに免疫応答が高い印象であるが、少数例の検討であるため、結果の検証が必要である。本研究においては検出されたネオアンチゲン候補を用いてペプチドを作成し、患者リンパ球サンプルを用いた免疫誘導能評価を行う必要性が示唆される。

*PDGFRA* 遺伝子変異や wild type の GIST は、*KIT* 遺伝子変異の GIST よりも予後が良いことが知られているが<sup>8)</sup>、*PDGFRA* 遺伝子変異の GIST に免疫細胞浸潤が多いことが証明されれば、免疫学的な因子により予後が良好であるという説明も可能と考えられる。一般的な悪性腫瘍で提唱される immuno score が GIST に関しても合致する可能性があり、immuno score を用いた免疫学的検討も GIST に関して重要であると考えられる。

## 5.結語

今回の検討では、どの遺伝子変異の GIST が免疫原性の高い腫瘍であるかどうか明らかには出来ていない。今後の症例数を増やし検討することにより、免疫原性が高い腫瘍種を抽出し、実際に新規癌抗原を検出する研究に進むことが必要であると考えられる。

## 6.文献

- 1) Verweij, J., Casali, P.G., Zalcberg, J., LeCesne, A., Reichardt, P., Blay, J.Y., Issels, R., Van Oosterom, A., Hogendoorn, P.C.W., Van Glabbeke, M., et al. (2004). Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: Randomised trial. *Lancet* 364, 1127–1134.
- 2) Balachandran, V.P., Cavnar, M.J., Zeng, S., Bamboat, Z.M., Ocuin, L.M., Obaid, H., Sorenson, E.C., Popow, R., Ariyan, C., Rossi, F., et al. (2011). Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of Ido. *Nat. Med.* 17, 1094–1100.
- 3) Rizvi, N.A., Hellmann, M.D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J.J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T.S., et al. (2015). Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* (80-. ). 348, 124–128.
- 4) Snyder, A., Makarov, V., Merghoub, T., Yuan, J., Zaretsky, J.M., Desrichard, A., Walsh, L.A., Postow, M.A., Wong, P., Ho, T.S., et al. (2014). Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N. Engl. J. Med.* 371, 2189–2199.
- 5) Nakahara, M., Isozaki, K., Hirota, S., Miyagawa, J.I., Hase-Sawada, N., Taniguchi, M., Nishida, T., Kanayama, S., Kitamura, Y., Shinomura, Y., et al. (1998). A novel gain-of-function mutation of c-kit gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 115, 1090–1095.
- 6) Pagès, F., André, T., Taieb, J., Vernerey, D., Henriques, J., Borg, C., Marliot, F., Ben Jannet, R., Louvet, C., Mineur, L., et al. (2020). Prognostic and predictive value of the Immunoscore in stage III colon cancer patients treated with oxaliplatin in the prospective IDEA France PRODIGE-GERCOR cohort study. *Ann. Oncol.*
- 7) Verweij, J., Casali, P.G., Zalcberg, J., LeCesne, A., Reichardt, P., Blay, J.Y., Issels, R., Van Oosterom, A., Hogendoorn, P.C.W., Van Glabbeke, M., et al. (2004). Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: Randomised trial. *Lancet* 364, 1127–1134.
- 8) Joensuu, H., Rutkowski, P., Nishida, T., Steigen, S.E., Brabec, P., Plank, L., Nilsson, B., Braconi, C., Bordoni, A., Magnusson, M.K., et al. (2015). KIT and PDGFRA mutations and the risk of GI stromal tumor recurrence. *J. Clin. Oncol.* 33, 634–642.