

腫瘍免疫環境解析による食道がん化学療法の奏効予測法の確立

大阪大学大学院医学系研究科 外科学講座消化器外科学

山本 慧

1. 諸言

切除可能進行食道がんに対する術前補助化学療法は標準治療として確立されている¹⁾。一方で、術前化学療法は手術症例全体の全生存期間を延長させたが、予後改善効果は化学療法の奏効例に限られている²⁾。非奏効例では予後不良に加え、強い副作用や周術期合併症の増加をきたす。術前化学療法の効果予測は、食道がんの治療戦略を考えるうえで非常に重要である。

がん治療における免疫チェックポイント阻害剤の成功は、食道がんにおいても腫瘍免疫の重要性を示している。がん化学療法は、がん細胞への直接的細胞傷害性を示すのみならず、周囲の癌免疫環境へも影響を及ぼすことで臨床効果に貢献していることが知られている（オフターゲット効果）³⁻⁵⁾。また、がん組織内免疫環境動態は種々の治療にかかわらず患者の予後を規定することが知られている（イムノスコア）⁶⁾。今回、がん組織内免疫環境の中でも、リンパ球の免疫学的疲弊の度合いが化学療法の奏効と関連する可能性に着目した。T細胞の疲弊化は、慢性感染やがんにおいて生じる腫瘍免疫の機能不全の主因である⁷⁾。なかでも、HMG ボックス転写因子 TOX は、T細胞疲弊化における重要な調節因子であることが、近年相次いで報告されている⁸⁾。種々のがん組織内で、TOX 陽性 CD8 T細胞の頻度が腫瘍免疫状態を規定することが報告されている⁹⁾。食道がん化学療法と腫瘍免疫の関わりにおいて、TOX 陽性 CD8 T細胞の臨床病理学的意義や化学療法奏効性との関連を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

当院にて術前化学療法を施行する食道がん患者から、治療前生検時と投与後の手術摘出時に新鮮組織・血液を採取した。組織検体からは腫瘍浸潤免疫細胞を抽出し、血液からは免疫細胞と血清を分離回収した。これら検体を用い、腫瘍内免疫担当細胞のうち特に CD8 T細胞に着目して、TOX を中心とした発現因子プロファイリング、TOX 陽性 CD8 T細胞の機能、TOX 陽性 CD8 T細胞の臨床病理学的意義について解析した。

3.結果

3.1 免疫担当細胞の発現因子プロファイリング

術前化学療法前の生検組織から腫瘍浸潤免疫細胞を抽出し、その中から CD8 T 細胞の TOX、PD-1、Tim-3、LAG-3、CD39 などの疲弊関連因子の発現頻度を、フローサイトメトリーで測定した (図 1)。生検組織 20 例の腫瘍組織内 CD8 T 細胞の解析では、TOX 陽性 CD8 T 細胞/全 CD8 T 細胞の頻度は中央値で 10.2% (0.8%~34.6%) であった。TOX 陽性 CD8 T 細胞は TOX 陰性 CD8 T 細胞と比較して、PD-1、Tim-3、LAG-3、CD39 を高頻度に発現していた (図 2)。

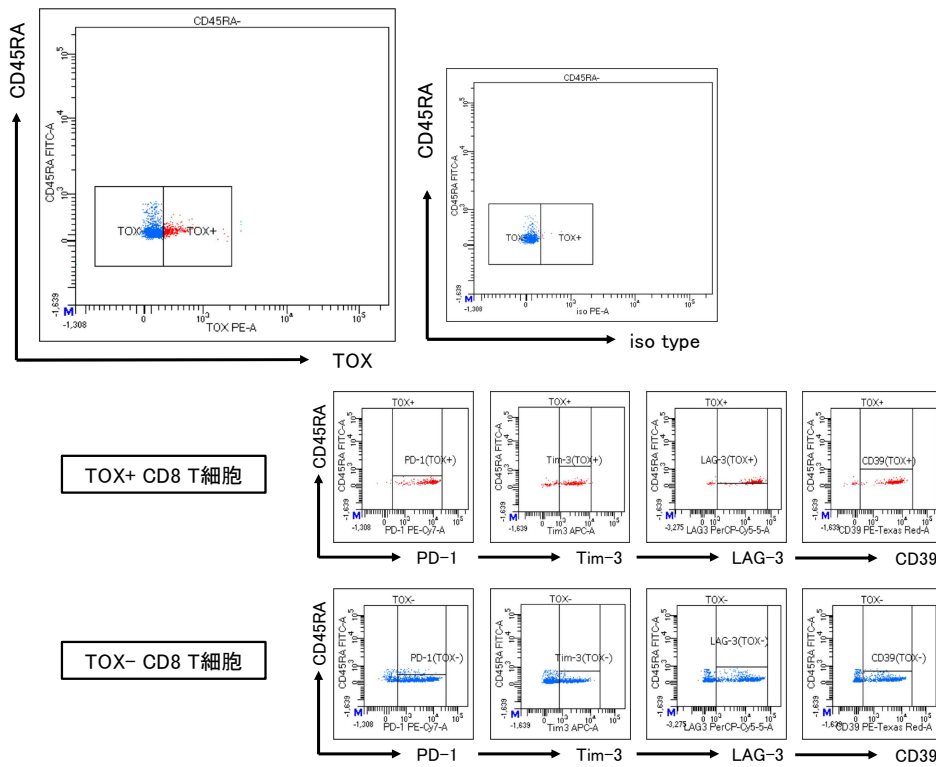
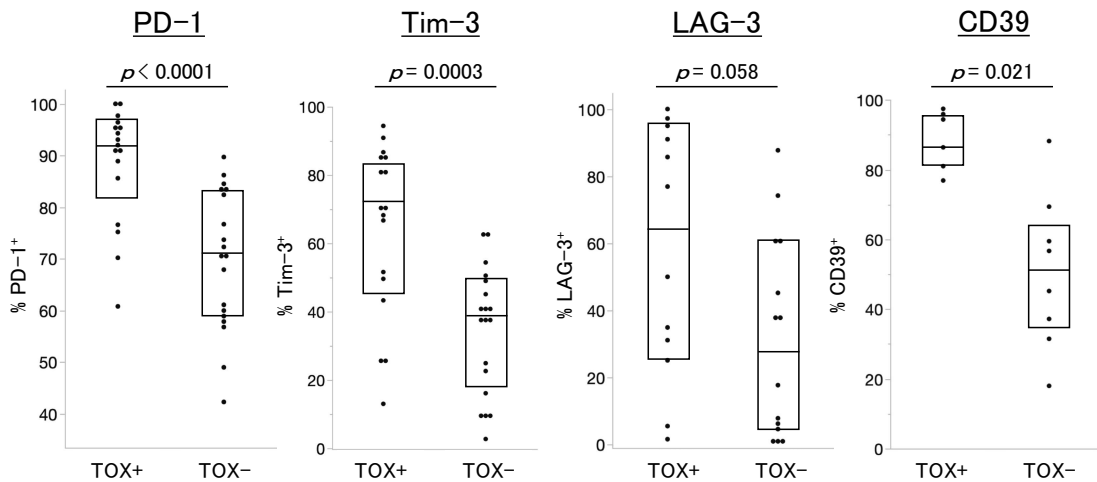


図 1 腫瘍内 CD8 T 細胞における発現因子プロファイリングの例

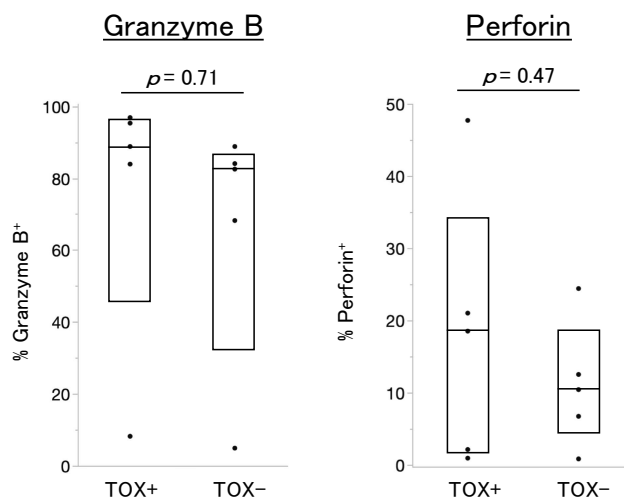


※ 全てMann-Whitney U検定で解析

図2 腫瘍内 TOX 陽性 CD8 T 細胞の疲弊関連分子発現

3.2 TOX 陽性 CD8 T 細胞の機能

前述の生検組織 20 例のうち 5 例において、腫瘍浸潤免疫細胞の細胞傷害顆粒 (Granzyme B、Perforin) をフローサイトメトリーで測定した。TOX 陽性 CD8 T 細胞と TOX 陰性 CD8 T 細胞の細胞傷害顆粒発現頻度に差はなかった (図 3)。同様に、腫瘍浸潤免疫細胞に PMA/Ionomycin 刺激をかけ細胞内サイトカイン産生 (IFN- γ 、TNF- α) をフローサイトメトリーで測定したが、測定不能であった。MACS[®] Cytokine Secretion Assays (Miltenyi Biotec) を用いて IFN- γ 、TNF- α を細胞表面で捕捉したが、同様に測定不能であった。内視鏡下生検にて採取できる組織は少なく、そこから抽出できる腫瘍浸潤免疫細胞数が非常に少なかったため、十分な結果が得られなかったものと推測する。



※ 全てMann-Whitney U検定で解析

図3 腫瘍内 TOX 陽性 CD8 T 細胞の細胞傷害顆粒発現

3.3 TOX 陽性 CD8 T 細胞の臨床病理学的意義

前述の生検組織 20 例のうち、16 例が術前化学療法（DCF：Decetaxel/Cisplatin/Fluorouracil）後に根治切除を施行された。TOX 陽性 CD8 T 細胞/全 CD8 T 細胞の中央値 10.2%を用いて、TOX 高発現群と低発現群の年齢/性別/BMI/TNM Stage/術前化学療法の効果を比較した（表 1）。統計学的有意差は認めないものの、TOX 高発現群は術前化学療法の組織学的効果が非奏効である傾向を認めた。

表 1 TOX 陽性 CD8 T 細胞と臨床病理学的因子との関連

| n=16 | TOX陽性CD8 T細胞 | | p value |
|-----------------------------|--------------|-------------|---------|
| | 高発現 (n=7) | 低発現 (n=9) | |
| 年齢 | 70 (±6.5) | 74.6 (±6.7) | 0.19 |
| 性別、男/女 | 7 / 0 | 8 / 1 | 0.36 |
| BMI、kg/m ² | 20.5 (±2.5) | 23.2 (±2.9) | 0.075 |
| cT、1+2/3+4 | 0 / 7 | 2 / 7 | 0.18 |
| cN、0+1/2+3 | 3 / 4 | 6 / 3 | 0.61 |
| cM、0/1 | 6 / 1 | 6 / 3 | 0.38 |
| cStage、1+2/3+4 | 1 / 6 | 2 / 7 | 0.69 |
| 術前化学療法 | | | |
| 組織学的効果 奏効/非奏効 ¹⁾ | 1/6 | 5/4 | 0.094 |
| 臨床学的効果 奏効/非奏効 ²⁾ | 3/4 | 4/5 | 0.74 |

- 1) 食道癌取り扱い規約における組織学的効果判定：Grade2/3(奏効)、Grade1a/1b(非奏効)
 2) 術前化学療法前後のPET-CTにおけるSUV-Max減少率：70%以上(奏効)、70%未満(非奏効)

※ 連続変数：Student-t検定、名義変数：Pearson'sカイ二乗検定

4.考察

本研究では、腫瘍組織内における免疫環境を詳細に解析することで、T 細胞疲弊化における調節因子の一つである TOX が化学療法の奏効に関与するかを検証した。少ない症例数で統計学的有意差はないものの、腫瘍組織内 TOX 陽性 CD8 T 細胞高発現の症例は、術前化学療法の効果が不良であった。TOX 陽性 CD8 T 細胞では、細胞傷害性顆粒の発現は低下していないが、T 細胞の活性化かつ疲弊化関連因子である PD-1、Tim-3、LAG-3、CD39 が高頻度に発現されていた。

食道がん術前化学療法前の腫瘍組織において免疫担当細胞が発現する疲弊化因子が、術前化学療法のバイオマーカーとなる可能性が示唆される。今後は、さらに多くの症例を解析することでバイオマーカーの確立に向け前進し、無駄な化学療法を回避した外科的切除への早期移行を含めた新規治療体系の構築につなげる。

5.結語

食道癌において、治療前腫瘍組織内の TOX 陽性 CD8 T 細胞は術前化学療法のパイオマーカーとなる可能性が示唆された。

6.文献

- 1) Ando N, Kato H, Igaki H, et al. A Randomized Trial Comparing Postoperative Adjuvant Chemotherapy with Cisplatin and 5-Fluorouracil Versus Preoperative Chemotherapy for Localized Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Thoracic Esophagus (JCOG9907). *Annals of Surgical Oncology*. 2012;19:68-74.
- 2) Rizvi FH, Syed AA, Khattak S, Rizvi SS, Kazmi SA, Khan MQ. Complete pathological response after neoadjuvant treatment in locally advanced esophageal cancer predicts long term survival: a retrospective cohort study. *Int J Surg*. 2014;12:621-625.
- 3) Shevchenko I, Karakhanova S, Soltek S, et al. Low-dose gemcitabine depletes regulatory T cells and improves survival in the orthotopic Panc02 model of pancreatic cancer. *Int J Cancer*. 2013;133:98-107.
- 4) Li JY, Duan XF, Wang LP, et al. Selective depletion of regulatory T cell subsets by docetaxel treatment in patients with nonsmall cell lung cancer. *J Immunol Res*. 2014;2014:286170.
- 5) Vincent J, Mignot G, Chalmin F, et al. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res*. 2010;70:3052-3061.
- 6) Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313:960-1964.
- 7) Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. 2006;439:682-687.
- 8) Mann TH, Kaech SM. Tick-TOX, it's time for T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2019;20:1092-1094.
- 9) Sekine T, Perez-Potti A, Nguyen S, et al. TOX is expressed by exhausted and polyfunctional human effector memory CD8. *Sci Immunol*. 2020;5:eaba7918.

7.成果発表

- ・浦川 真哉, 山本 慧, 西塔 拓郎, 和田 尚, 土岐 祐一郎ほか. 食道がん術前化学療法効果と腫瘍浸潤リンパ球(TIL)との関連性. 第75回日本食道学会学術集会. 東京. 2021.
- ・山本 慧, 西塔 拓郎, 野瀬 陽平, 和田 尚ほか. 食道癌における腫瘍浸潤リンパ球と術前化学療法の治療効果との関連性の検討. 第24回日本がん免疫学会総会. 北海道. 2020.