

令和元年6月17日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16776

研究課題名(和文) 免疫環境と分子診断を基に分類された転移性尿路上皮癌に対応した非臨床モデルの構築

研究課題名(英文) Construction of non-clinical model corresponding to the metastatic urothelial carcinoma classified based on immune environment and molecular diagnosis

研究代表者

河原 貴史 (Kawahara, Takashi)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：50758919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱癌における遺伝子変異と免疫環境との関連を明らかにするため103名の膀胱癌組織をもちいて解析をおこなった。FGFR3変異陽性例ではCD8陽性浸潤細胞が少なく、TP53変異陽性ではCD8陽性細胞が多かった。分子分類ではbasal typeはluminal typeと比較するとCD8陽性細胞が多かった。FGFRのサブタイプのうちFGFR1,3に着目するとFGFR3高発現例はCD8陽性T細胞浸潤が少なく、FGFR1高発現例はCD8陽性T細胞浸潤が多かった。体細胞変異、分子分類、FGFRシグナルのサブタイプによる活性化機序により免疫環境が異なることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年膀胱癌でも免疫チェックポイント阻害剤が臨床応用されているが腫瘍内免疫環境の状態によって同薬剤の反応性が異なることが示されている。しかし、がん細胞の遺伝子変異や分子分類での腫瘍内免疫環境の関連は明らかとなっていない。今回の研究では体細胞変異および分子分類と腫瘍内免疫環境との関連に着目し、膀胱癌においてFGFR3遺伝子に変異を有する患者さんでは腫瘍細胞への免疫細胞浸潤が少なくTP53遺伝子に変異を有する患者さんでは腫瘍細胞への免疫細胞浸潤が多いことがわかった。また分子分類の違いにより免疫細胞浸潤が異なることを明らかとした。これらの結果は膀胱癌の個別化医療に向けての指標となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the relationship between somatic mutations and tumor immune environment in bladder cancer, we analyzed bladder cancer tissues of 103 bladder cancer patients. We compared the relationship tumor characteristics with tumor immune environment. There were less CD8 positive infiltrating cells in FGFR3 mutation than in FGFR3 wild cases. There were more CD8 positive cells in TP53 mutation than TP53 wild cases. In molecular subtype, there were few CD8 positive infiltrating cells in basal type than in luminal type. Next, focusing on FGFR signals, FGFR3 expression was frequently found in low grade and low stage, and FGFR1 expression was in high grade and high stage. FGFR1 overexpression case showed high infiltration of CD8 positive T cells. We found that somatic mutations, molecular subtype and different activation of FGFR signals have different immune environments in bladder cancer.

研究分野：泌尿器科領域

キーワード：膀胱癌 がん免疫環境 FGF-FGFRシグナル 体細胞変異 分子分類

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転移性尿路上皮癌に対してはプラチナ製剤を中心とした全身化学療法が施行されるが、生命予後は2年生存率10%であり、予後改善に向けた治療法の開発が切望されている。近年転移性尿路上皮癌の2次治療において免疫チェックポイント阻害剤の治療効果が示されたが、同薬剤の奏効率は30%程度と効果は限定的である。この為、免疫環境と遺伝子変異・発現変異の状況に立脚した尿路上皮癌に対する新規治療法の開発が今後重要である。免疫チェックポイント阻害剤に不応な尿路上皮癌に対する新規治療法を開発を念頭に腫瘍における遺伝子変異と免疫環境との関連性に関する分子機序を明らかにすることを目的とした。具体的には、遺伝子変異と免疫環境との関連性に関する分子機序の解明に関しては、*FGFR3* 変異を軸に尿路上皮癌で認められる他の遺伝子変異との組み合わせにより、遺伝子変異プロファイルが免疫環境に腫瘍細胞および腫瘍局所の間質細胞に対する影響を解明する。

2. 研究の目的

(1)膀胱癌における遺伝子変異の有無および遺伝子発現に基づく分子分類別の腫瘍内免疫環境との関連を明らかとする。

(2)*FGFR3* 変異および FGF-FGFR シグナルの活性化機序による免疫環境との関連を明らかとする。

3. 研究の方法

(1)ヒト膀胱癌組織を用いて cancer pnael (Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2)を用いてターゲットシーケンスを行い体細胞変異を評価し、体細胞変異の有無と腫瘍内免疫環境との関連を評価する。

(2)ヒト膀胱癌組織を用いて RNA-seq (Illumina NextSeq 500) による網羅的発現解析を行い、BASE47 により分子分類を行う。また免疫関連物質の発現状況を評価する。

(3)FGFR サブタイプでの発現パターンと臨床病理学的特徴を評価するとともにの活性化機序別に腫瘍内免疫環境との関連を評価する。

4. 研究成果

(1) 膀胱癌組織において体細胞変異および分子分類の違いにより腫瘍内免疫環境は異なる

103名の膀胱癌患者を対象に cancer pnael (Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2)を用いて解析を行った結果と患者背景を表1に示す。103名の患者背景のうち NMIBC (non-muscle-invasive bladder cancer) では *FGFR3* および *RAS* の変異頻度が高く、MIBC(muscle-invasive bladder cancer)では *TP53* の変異頻度が高かった。

表1. 患者背景

	n	total 103	NMIBC 59	MIBC 44
年齢(歳)	中央値(最小-最大)	71 (39-87)	70 (39-87)	72 (42-87)
性別	男性	85	54	31
	女性	18	5	13
grade	Low grade	33	33	0
	High grade	70	26	44
体細胞変異 n (%)	<i>FGFR3</i> 変異	34** (33%)	26** (44%)	8 (18%)
	<i>FGFR3-TACC3</i> 融合	4** (4%)	2** (3%)	2 (5%)
	<i>RAS</i> * 変異	25 (25%)	20 (34%)	5 (11%)
	<i>PIK3CA</i> 変異	26 (25%)	14 (24%)	12 (27%)
	<i>TP53</i> 変異	30 (29%)	8 (14%)	22 (50%)

* *RAS*: *KRAS/HRAS/NRAS*

** *FGFR3* 変異と融合が共存する症例が1例あり

RNA-seq による網羅的発現解析の結果と BASE 47(Choi W, et al. Cancer cell 2014)を用いて分子分類を行った結果を図 1 に示す。図の左側に示す遺伝子群のうち上側が basal type で発現が上昇する遺伝子群で下側が luminal type で発現が上昇する遺伝子群とされている。われわれの解析した集団でも 47 遺伝子発現の発現パターンから basal type と luminal type に分類することができた。また NMIBC には luminal type が多く(89.9%)、basal type(10.1%)は少なかった。

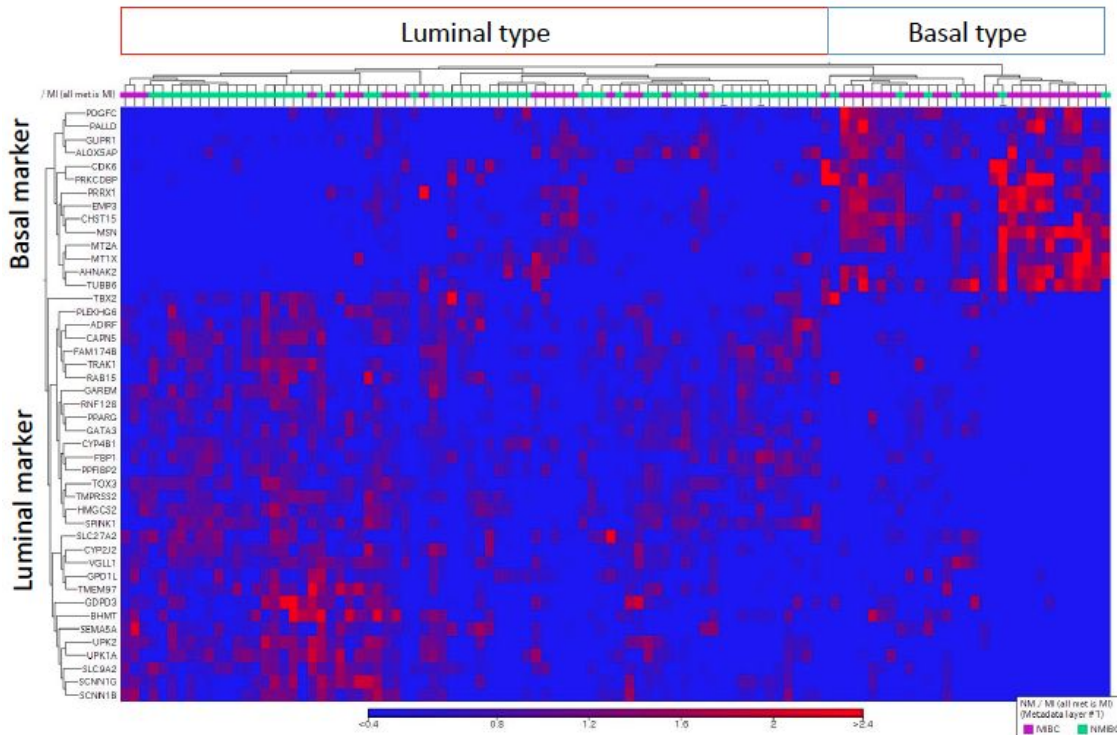


図 1. BASE47 による分子分類

以上の結果から体細胞変異の有無および分子分類の luminal type と basal type とで腫瘍細胞内の免疫環境を比較した。網羅的発現解析による腫瘍内免疫関連物質として CD8A と CD274(PDL-1)の発現値を、腫瘍内免疫細胞浸潤の評価として CD 8 による免疫染色を行い CD8 陽性 T 細胞の腫瘍内浸潤細胞数を計測し比較検討した。

結果は表 2 に示す通りで、CD8A の発現は *FGFR3* 変異例では少ない傾向がみられたが有意差はなく、*RAS*、*PIK3CA*、*TP53* 変異陽性例で有意差をもって高かった。しかし、免疫組織学的(IHC: immunohistochemical analysis)に腫瘍細胞内の CD8 陽性 T 細胞の評価を行うと *FGFR3* 変異陽性例は *FGFR3* 変異陰性例と比較して少なく、*TP53* 変異陽性例は *TP53* 変異陰性例と比較して多いことがわかった。一方、*RAS* 変異および *PIK3CA* 変異の有無では腫瘍細胞内の CD8 陽性 T 細胞との間に有意差を認めなかった。CD274 の発現値に着目すると *FGFR3* 変異陽性例では陰性例と比較し低い傾向があり、*FGFR3* 変異以外の体細胞変異の有無では関連を認めなかった。分子分類の比較では basal type は luminal type と比較し CD8A の発現および腫瘍内 CD8 陽性細胞浸潤が多く、CD274 発現は有意に高かった。

表 2. 体細胞変異別 CD8A、CD274 の発現値および CD8 浸潤陽性細胞の比較

		FGFR3 mutation or fusion			RAS (KRAS,HRAS,NRAS)			PIK3CA		
		positive	negative	p* value	positive	negative	p* value	positive	negative	p* value
mRNA expression	CD8A	0.51 +/- 2.52	0.74 +/- 5.52	N.S	0.43 +/- 1.99	0.76 +/- 5.24	0.02	1.36 +/- 7.41	0.59 +/- 3.24	0.03
	CD274	0.69 +/- 1.91	0.95 +/- 4.65	0.08	0.76 +/- 1.37	0.94 +/- 4.40	N.S	1.12 +/- 2.18	0.80 +/- 4.35	N.S
IHC analysis	CD8	6.0 +/- 13.9	12.0 +/- 36.0	0.03	9.0 +/- 36.2	8.0 +/- 29.4	N.S	11.0 +/- 32.44	7.0 +/- 30.64	N.S

		TP53			molecular subtype		
		positive	negative	p* value	luminal	basal	p* value
mRNA expression	CD8A	1.41 +/- 7.07	0.53 +/- 3.17	0.02	0.51 +/- 2.06	1.73 +/- 7.66	<0.01
	CD274	1.23 +/- 4.82	0.87 +/- 3.49	N.S	0.86 +/- 1.40	1.59 +/- 6.53	0.02
IHC analysis	CD8	21.0 +/- 37.6	6.5 +/- 26.4	<0.01	7.0 +/- 17.3	30.0 +/- 45.6	<0.01

* Mann-Whitney's U test

以上の結果からヒト膀胱癌における腫瘍内免疫環境は体細胞変異および分子分類により異なる特徴を示すことを見出した。

(2) *FGFR1* および *FGFR3* の発現パターンと臨床病理学的に相反する特徴を示した。また、*FGFR1, 3* の活性化機序により腫瘍内免疫環境も相反する特徴を示した

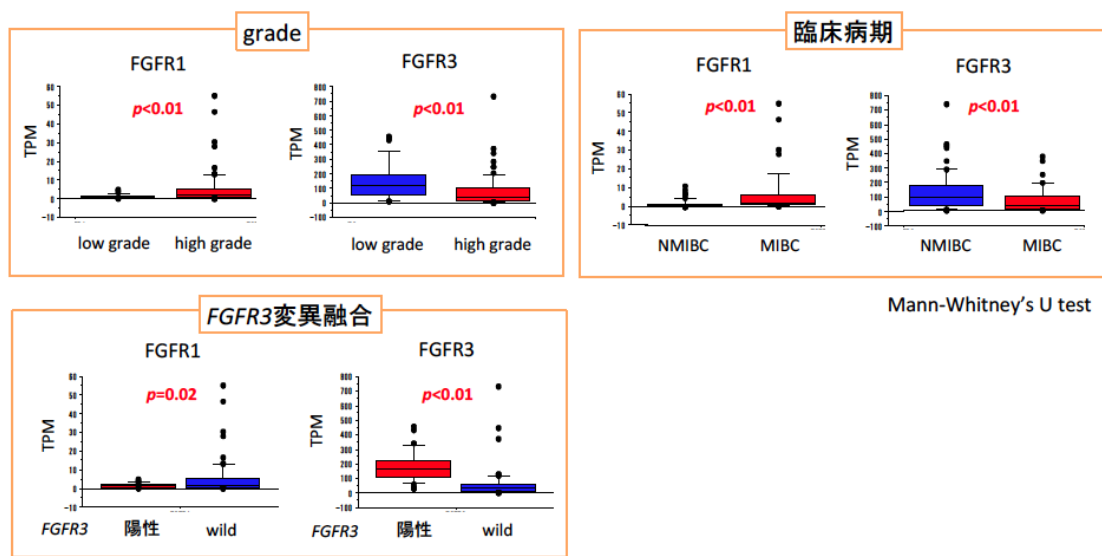


図 2. grade、臨床病期、*FGFR3* 変異融合の有無による *FGFR1,3* 発現値

FGFR1 および *FGFR3* の発現と grade、臨床病期、*FGFR3* 変異の有無によるそれぞれの発現パターンを比較検討した。結果は図 2 に示すように、*FGFR3* は low grade、low stage の腫瘍に高く発現し、*FGFR3* 変異陽性で発現が上昇していた。一方、*FGFR1* は high grade、high stage の腫瘍に高く発現し *FGFR3* 変異陽性では発現が低下し *FGFR1* と *FGFR3* の発現パターンは相反する特徴を示すことを明らかとした。

また *FGFR3* 変異および *FGFR1, FGFR3* 高発現例 (高発現の上位 10%) と免疫関連物質および腫瘍内 CD8 陽性 T 細胞浸潤細胞との比較する (表 3) と *FGFR3* 高発現例では *FGFR3* 変異陽性例と同様に腫瘍内 CD8 陽性 T 細胞浸潤細胞が少ない傾向がみられた。一方 *FGFR1* 高発現例では腫瘍内 CD8 陽性 T 細胞浸潤細胞が多い傾向があり、CD274 (PD-L1) の発現も高かった。

表 3.FGFR シグナルの活性化機序別による CD8A, CD274 発現および CD8 陽性細胞の比較

		FGFR3 mutation or fusion			FGFR3 expression			FGFR1 expression		
		positive	negative	p* value	oveexpression	normal	p* value	oveexpression	normal	p* value
mRNA expression	CD8A	0.51 +/- 2.52	0.74 +/- 5.52	N.S	0.73 +/- 1.73	0.65 +/- 4.91	N.S	3.89 +/- 10.98	0.58 +/- 2.99	<0.01
	CD274	0.69 +/- 1.91	0.95 +/- 4.65	0.08	0.65 +/- 2.53	0.92 +/- 4.03	N.S	2.87 +/- 7.95	0.87 +/- 3.13	0.02
IHC analysis	CD8	6.0 +/- 13.9	12.0 +/- 36.0	0.03	4.0 +/- 6.7	10.0 +/- 32.2	0.05	27.0 +/- 49.8	7.0 +/- 27.2	0.06

* Mann-Whitney's U test

FGFR3 変異陽性および高発現は FGFR1 高発現例と比較し、臨床病理学的特徴および腫瘍内免疫環境において相反する特徴を示すことを見出した。また FGFR サブタイプの活性化機序によりそれぞれ腫瘍内免疫環境に差があることは免疫チェックポイント阻害剤の治療による反応性が異なる可能性が示唆された。また FGFR サブタイプにより腫瘍の特徴や腫瘍内免疫環境が異なることは現在開発が進んでいる FGFR 阻害剤の効果が異なる可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

河原貴史、小島崇宏、黒部匡広、志賀正宣、田中建、神鳥周也、根来宏光、河合弘二、西山博之 「FGFR シグナルの活性化機序により膀胱癌の腫瘍内免疫環境が異なる」第 28 回泌尿器科分子・細胞研究会 2019 年

河原貴史、小島崇宏、木村友和、河合弘二、西山博之 「Germline TP53 codon72 is associated with FGFR3 and RAS mutation and FGF signals in bladder cancer」第 77 回癌学会 2018 年

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 小島 崇宏

ローマ字氏名： Takahiro Kojima

所属研究機関名：筑波大学

部局名：医学医療系

職名： 准教授

研究者番号(8桁): 40626892

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。