

**女性研究者支援 第 4 回万有医学奨励賞**  
**研究成果報告書（追加助成）＜概要＞**

<b>所 属</b>	東京大学
<b>氏 名</b>	田口 歩
<b>研究テーマ</b>	子宮頸部上皮内腫瘍における、間質をターゲットとした治療戦略の検討

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを 1 ページにまとめてください。（図表、写真などの貼付を含む）

**【研究の背景と目的】**子宮頸癌の多くは human papillomavirus (HPV) 感染が原因で発病するといわれている。HPV 感染細胞は、ヒト宿主免疫細胞とウイルスの免疫モニタリング回避システムの相互作用で、進展退縮を繰り返し、持続感染を成立させ、一部は子宮頸癌へと進展することが知られている。

我々は、先行研究より、高度異形成病変(CIN3)では、それ以下の病変に比べて形質細胞浸潤が多いことを見出した。形質細胞も多くの免疫担当細胞同様に、非特異的な炎症に伴い浸潤する場合と、抗原特異的な免疫反応に伴い浸潤する場合が考えられ、前者の場合は腫瘍促進に、後者の場合は抗腫瘍的な働きをすると考えられる。これらの背景や先行研究をもとに、本研究では子宮頸癌の発癌、進展における子宮頸部形質細胞の機能解明を目的とした。

**【研究方法】**本研究では、1. 前向きコホートを用いた CIN 進展における形質細胞の関与の検討、2. CIN における形質細胞の単離と BCR レパトア解析、3. 子宮頸癌における BCR レパトア解析を行った。

**【研究結果】**

**結果 1、CIN 進展における形質細胞の関与の検討：**患者コホートのうち、登録時の HE 標本および予後データをいずれも得ることができた 137 例に関して、HE 標本をもとに浸潤形質細胞の多寡と予後との関連について検討した。観察期間の中央値は 27 ヶ月（範囲 5.6– 42 ヶ月）であり、観察期間中に CIN3 へ進展したのは 17 例であったが、形質細胞の多寡と CIN3 進展には有意な関連はみられなかった ( $p = 0.36$ )。

**結果 2、CIN における形質細胞の単離と、BCR レパトア解析：**まず、子宮頸部リンパ球を用いて形質細胞および B 細胞が単離可能かをフローサイトメトリーにより検討した結果、子宮頸部形質細胞は、 $CD19^+IgD^-CD38^+$  領域として検出可能であった。子宮頸部リンパ球を用いて、BCR レパトア解析を行った結果、 $CD19^+IgD^-CD38^+$  細胞数と BCR レパトア diversity index は相関する傾向が見られた（相関係数 = 0.87,  $p = 0.13$ ）。つまり、CIN3 に浸潤する形質細胞は、腫瘍抗原に反応する特異性の高い形質細胞ではなく、非特異的に浸潤している可能性が推察された。

**結果 3、子宮頸癌における BCR レパトア解析：**6 例の子宮頸癌患者において、腫瘍—PBMC のペア検体を用いて BCR レパトア解析おこなった。6 例中 5 例では末梢血と比べ腫瘍組織で clonality が高かった（oligoclonal であった）が、1 例（HPV18 型陽性検体）では腫瘍組織の clonality が極めて低かった。次に、CDR3 配列のリード数について主成分分析を行った結果、全症例において同一症例内での腫瘍組織と末梢血の CDR3 配列は近接しており、症例ごとに配列の特徴が決定づけられていると考えられた。また、1 症例ではあるが、HPV18 型陽性症例では、他の症例と異なる特徴を有することもわかった。

**【考察】**形質細胞浸潤は CIN3 で有意に増加していたが、CIN 進展の原因とはなっていないことが示唆された。また、BCR レパトア解析の結果、浸潤形質細胞の数と BCR レパトア diversity が相関する傾向にあったことから、抗原特異的な形質細胞ではなく、CIN 進展に伴う炎症により非特異的に浸潤していた可能性が高い。なお、癌における検討では、多くの症例では腫瘍検体において、BCR レパトアの diversity が低くなる（clonality が高くなる）特徴を認めた。これは、子宮頸癌に浸潤する形質細胞は子宮頸癌抗原と反応している可能性が考えられた。

## 女性研究者支援 第4回万有医学奨励賞 研究成果報告書（追加助成）＜詳細＞

所 属	東京大学
氏 名	田口 歩
研 究 テーマ	子宮頸部上皮内腫瘍における、間質をターゲットとした治療戦略の検討

研究目的/方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

### 【研究の背景と目的】

子宮頸癌の多くは human papillomavirus (HPV) 感染が原因で発病するといわれている。HPV 感染細胞は、ヒト宿主免疫細胞とウイルスの免疫モニタリング回避システムの相互作用で、進展退縮を繰り返し、持続感染を成立させ、一部は子宮頸癌へと進展することが知られている。

一般に癌細胞は腫瘍内微小環境の中の様々な構成細胞と相互作用を及ぼすことでその性質を獲得し、また維持をしていると言われる。腫瘍細胞から産生されるサイトカインや酵素によって腫瘍内微小環境の構成成分は活性化され、炎症性サイトカインやケモカインやプロテアーゼなどを産生するようになる。腫瘍細胞と間質細胞の相互作用による微小環境には、リンパ球、マクロファージ、形質細胞、好中球など種々の免疫担当細胞が浸潤している。これらは、抗腫瘍作用、腫瘍促進作用の二面性を持つことが多い。近年では、このような上皮細胞と間質細胞や免疫細胞の相互作用は、前がん病変においても始まっていることが知られてきており、子宮頸癌の前がん病変である子宮頸部上皮内腫瘍(CIN)においても、CIN 間質部の ESR1 の発現上昇や CXCL12 の発現上昇と高度異形成が関連することが報告されてきている。また、組織内局所環境の他にも、近年では、腸内細菌叢と大腸癌の関係はじめ、局所細菌叢と癌の関係が着目されている。昨年、腔内細菌叢が HPV 持続感染と関連していることが報告され腔内細菌叢と CIN 進展の関連にも着目されてきている (Sci Rep 2017)。

我々は、先行研究より、高度異形成病変 (CIN3) では、それ以下の病変に比べて形質細胞浸潤が多いことを見出した。また、形質細胞浸潤が多い症例では腔内細菌叢には *Lactobacillus* が少なく *Gardnerella* が多い傾向があることを見出した。形質細胞も多くの免疫担当細胞同様に、非特異的な炎症に伴い浸潤する場合と、抗原特異的な免疫反応に伴い浸潤する場合が考えられ、前者の場合は腫瘍促進に、後者の場合は抗腫瘍的な働きをされると考えられる。本解析結果より、CIN に浸潤する形質細胞は、図 1 で示すように炎症促進作用を有し、発癌や腫瘍促進に関与することが考えられるが、その働きについては未だ解明で来ていない。

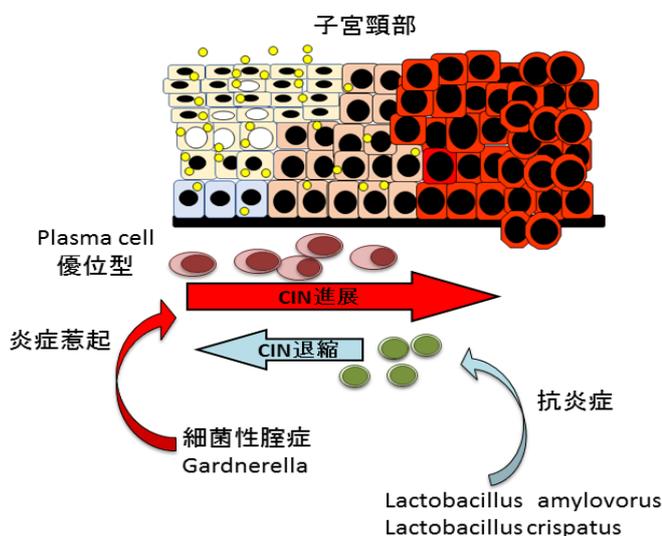


図 1. 腔内環境と子宮頸部局所環境と CIN 進展の関連

これらの背景や先行研究をもとに、本研究では子宮頸癌の発癌、進展における子宮頸部形質細胞の機能解明を目的とした。

## 研究目的/方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

## 【研究方法】

## 方法 1、CIN 進展における形質細胞の関与の検討：

形質細胞浸潤が増えたことが、CIN3 へ進展したことが原因となり起こったのか、形質細胞浸潤が原因となり、CIN3 へ進展したのかを解明するため、コホート検体を用いた解析を行う。具体的には、CIN1、CIN2 で形質細胞浸潤を認める病変を有する患者の予後を検討し、形質細胞浸潤の多寡で CIN 進展に差があるかを検討する。

## 方法 2、CIN における形質細胞の単離と、BCR レパトア解析：

子宮頸部異形成患者から子宮頸部リンパ球 (cervical mucosal monocyte; CMC) を単離し、flow cytometry で CD19 陽性 B 細胞の割合、CD19 中の、IgD 陰性 CD38 陽性形質細胞の割合を確認する。さらに、子宮頸部形質細胞の BCR レパトア解析を行い、BCR クローナリティーを評価する。BCR レパトア解析から、形質細胞浸潤を monoclonal type, oligo-clonal type, polyclonal type に分類する。

## 方法 3、子宮頸癌における BCR レパトア解析：

子宮頸癌組織をもとに、HPV ジェノタイプ判定を行い、感染 HPV ジェノタイプを特定する。次に、子宮頸癌患者における形質細胞の特徴や機能を解明するために、子宮頸癌組織と末梢血 (PBMC) をペアで採取し、BCR レパトア解析を行い、monoclonal type, oligo-clonal type, polyclonal type に分類する。解析方法として、PBMC に対して子宮頸癌組織において clonality が限定されている場合、その患者では腫瘍浸潤形質細胞はより、抗原特異的に反応している可能性が高いと考えられる。このような、clonality 評価とともに、HPV ジェノタイプとの関連も解析する。

## 【結果】

## 結果 1、CIN 進展における形質細胞の関与の検討：

患者コホートのうち、登録時の HE 標本および予後データをいずれも得ることができた 137 例に関して、HE 標本をもとに浸潤形質細胞の多寡と予後との関連について検討した。137 検体中、CIN1 が 86 検体、CIN2 が 51 検体であった。観察期間の中央値は 25.6 ヶ月 (範囲 5.6– 41.6 ヶ月) であり、観察期間中に CIN3 へ進展したのは 17 例であった。解析結果では、形質細胞の多寡と CIN3 進展には有意な関連はみられなかった ( $p = 0.36$ )。

## 結果 2、CIN における形質細胞の単離と、BCR レパトア解析：

子宮頸部リンパ球を用いた。まずこれらの検体において形質細胞および B 細胞が単離可能かをフローサイトメトリーにより検討した結果、図 2 に示すように、子宮頸部形質細胞は、 $CD19^+IgD^-CD38^+$  領域として検出可能であった。

子宮頸部リンパ球を用いて、BCR レパトア解析を行った結果、diversity index は症例毎に異なっていた。 $CD19^+IgD^-CD38^+$  細胞数と BCR レパトア diversity index は相関する傾向が見られた (相関係数 = 0.87,  $p = 0.13$ )。つまり、CIN3 に浸潤する形質細胞は、腫瘍抗原に反応する特異性の高い形質細胞ではなく、非特異的に浸潤している可能性が推察された。

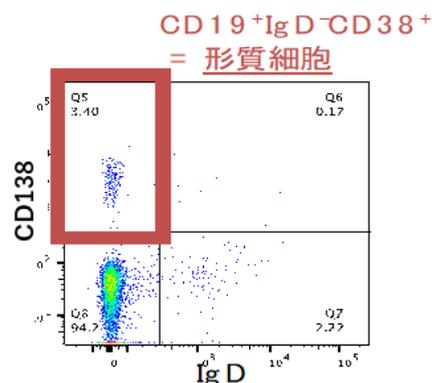


図 2 子宮頸部形質細胞の単離

### 結果 3、子宮頸癌における BCR レパトア解析

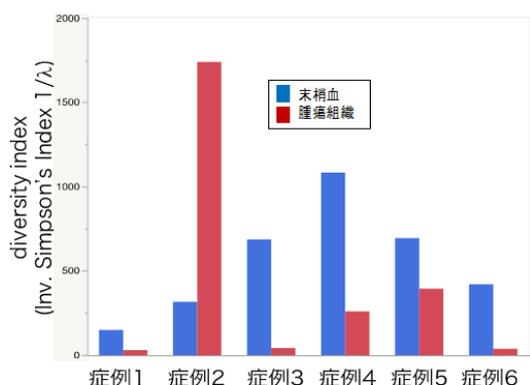


図3 子宮頸癌症例におけるBCR diversity index

6例の子宮頸癌患者において、腫瘍—PBMCのペア検体を用いてBCRレパトア解析おこなった。検出されたHPV型は16型単独が3例(症例1,5,6)、18型が1例(症例2)、52型単独が1例(症例3)、16型と52型の検出が1例(症例4)であった。diversity indexについて検討した結果、6例中5例では末梢血と比べ腫瘍組織でclonalityが高かった(oligoclonalであった)が、1例(症例2)では腫瘍組織のclonalityが極めて低かった(図3)。

抗原特異性を最も高く有するCDR3配列について、分布の特徴を検討するため、それぞれの検体中でのCDR3配列のリード数について主成分分析をおこなった(図4)。全症例において同一症例内での腫瘍組織と末梢血のCDR3配列は近接しており、腫瘍組織や末梢血といった採取検体によらず症例ごとに配列の特徴が決定づけられていると考えられた。症例2では、他の症例と異なる特徴を有することもわかった。

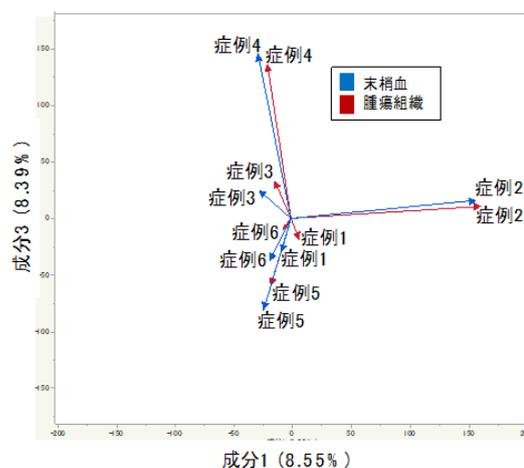


図4 子宮頸癌症例におけるBCR主成分解析

#### 【考察】

本研究では、子宮頸部に浸潤する形質細胞がCIN進展に関与しているかを検討するとともに、浸潤形質細胞の特徴についてBCRレパトア解析を用いて検討した。形質細胞浸潤はCIN3で有意に増加していたが、CIN進展の原因とはなっていないことが示唆された。また、BCRレパトア解析の結果、浸潤形質細胞の数とBCRレパトアdiversityが相関する傾向にあったことから、抗原特異的な形質細胞ではなく、CIN進展に伴う炎症により非特異的に浸潤していた可能性が高い。

なお、癌における検討では、多くの症例では腫瘍検体において、BCRレパトアのdiversityが低くなる

(clonalityが高くなる)特徴を認めた。これは、子宮頸癌に浸潤する形質細胞は子宮頸癌抗原と反応している可能性が考えられた。一方、一例ではあるが、HPV18型陽性検体においては、腫瘍検体におけるBCRはpolyclonalパターンを呈した。HPV18型感染症例は急速に発癌することが報告されており、形質細胞の選択が行われなかった可能性が考えられた。

#### 【今後の方針】

本研究では形質細胞をターゲットとした治療戦略の開発には直接的には結び付けられなかった。一方で、腫瘍に浸潤する形質細胞は基本的には腫瘍抗原に反応している可能性が高いことがわかった。このことより、腫瘍に浸潤する形質細胞の認識抗原を同定したり、腫瘍に浸潤する形質細胞の抗体を増幅させたりすることにより、新規アプローチによる、子宮頸癌抗体療法の確立に繋がる可能性がある。今後、腫瘍浸潤形質細胞の特徴解明により、新規抗体療法の開発が期待される。

## 女性研究者支援 第4回万有医学奨励賞

## 研究成果報告書（追加助成）＜発表実績/予定一覧＞

所 属	東京大学
氏 名	田口歩

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> <li>掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。</li> <li>著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。</li> <li>国内外雑誌を問わない。</li> <li>印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。</li> <li>欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	<u>Taguchi A</u> , Furusawa A, Ito K, Nakajima Y, Shimizuguchi T, Hara K, Takao M, Kashiyama T, Kino N, Karasawa K, Yasugi T. Postradiotherapy persistent lymphopenia as a poor prognostic factor in patients with cervical cancer receiving radiotherapy: a single-center, retrospective study. Int J Clin Oncol. 2020; 25:995-962、査読有
② <論文 PDF 添付なし>	
1	Shimizuguchi T, Sekiya N, Hara K, <u>Taguchi A</u> , Nakajima Y, Miyake Y, Shibata Y, Taguchi K, Ogawa H, Ito K, Karasawa K. Radiation therapy and the risk of herpes zoster in patients with cancer. Cancer. 2020;126:3552-3559. 査読有
2	Maru Y, Kawata A, <u>Taguchi A</u> (Corresponding), Ishii Y, Baba S, Mori M, Nagamatsu T, Oda K, Kukimoto I, Osuga Y, Fujii T, Hippo Y. Establishment and Molecular Phenotyping of Organoids from the Squamocolumnar Junction Region of the Uterine Cervix. Cancers (Basel). 2020;12:694. 査読有
3	Baba S, <u>Taguchi A</u> (Corresponding), Kawata A, Hara K, Eguchi S, Mori M, Adachi K, Mori S, Iwata T, Mitsuhashi A, Maeda D, Komatsu A, Nagamatsu T, Oda K, Kukimoto I, Osuga Y, Fujii T, Kawana K. Differential expression of human papillomavirus 16-, 18-, 52-, and 58-derived transcripts in cervical intraepithelial neoplasia. Virol J, 2020;17:32 査読有
4	Kaito S, Nakajima Y, Hara K, Toya T, Nishida T, Uchida N, Mukae J, Fukuda T, Ozawa Y, Tanaka M, Ikegame K, Katayama Y, Kuriyama T, Kanda J, Atsuta Y, Ogata M, <u>Taguchi A</u> (Corresponding), Ohashi K. Heterogeneous impact of cytomegalovirus reactivation on non-relapse mortality in hematopoietic stem cell transplantation. Blood Adv, 2020;4: 1051-1061. 査読有
5	<u>Taguchi A</u> , Hara K, Tomio J, Kawana K, Tanaka T, Baba S, Kawata A, Eguchi S, Tsuruga T, Mori M, Adachi K, Nagamatsu T, Oda K, Yasugi T, Osuga Y, Fujii T. Multistate Markov Model to Predict the Prognosis of High-Risk Human Papillomavirus-Related Cervical Lesions. Cancers (Basel). 2020;12. pii: E270. 査読有
6	Ishii Y, <u>Taguchi A</u> , Kukimoto I. The homeobox transcription factor HOXC13 upregulates human papillomavirus E1 gene expression and contributes to viral genome maintenance. FEBS Lett.2019;594:751-762. 査読有

<b>2. 学会発表実績</b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>・ 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。</li> <li>・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。</li> <li>・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。</li> <li>・ 国内外を問わない。</li> <li>・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。</li> </ul>		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2019年10月	第57回 日本癌治療学会、 発表者：田口歩、古澤 啓子、伊藤 慶、清水口 卓也、高尾 茉希、樫山 智子、喜納 奈緒、八杉 利治 演題：子宮頸がん放射線療法後に持続するリンパ球減少の、予後因子としての有用性の検討
2		
3		
4		
<b>3. 投稿、発表予定（投稿中の論文も含める）</b>		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		