



Title	神経内分泌腫瘍に対する抗Survivin治療の有用性に関する検討
Author(s)	羽根, 佑真
Description	配架番号 : 2961
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16651号
Issue Date	2025-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16651
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98261
Type	doctoral thesis
File Information	HANE_Yuma.pdf, 全文



学 位 論 文

神経内分泌腫瘍に対する
抗 Survivin 治療の有用性に関する検討

(Study for Survivin as a therapeutic target
for neuroendocrine neoplasms)

2025 年 9 月

北海道大学

羽 根 佑 真

学 位 論 文

神経内分泌腫瘍に対する
抗 Survivin 治療の有用性に関する検討

(Study for Survivin as a therapeutic target
for neuroendocrine neoplasms)

2025 年 9 月

北海道大学

羽 根 佑 真

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	7 頁
方法	11 頁
結果	16 頁
考察	27 頁
結論	31 頁
謝辞	32 頁
利益相反	33 頁
引用文献	34 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Hane Y, Tsuchikawa T, Nakamura T, Hatanaka KC, Sasaki K, Kawai N, Takeuchi S, Tanaka K, Nakanishi Y, Asano T, Noji T, Shichinohe T, Hatanaka Y, Hirohashi Y, Torigoe T, Hirano S.

Survivin as a therapeutic target for neuroendocrine neoplasms

Neuroendocrinology 2・1-31, (2025)

要旨

【背景と目的】

神経内分泌腫瘍（neuroendocrine neoplasm : NEN）は enterochromaffin 細胞由来の稀な腫瘍で、発生率は 10 万人あたり 3.56 人とされ、増加傾向にある。発育は緩徐であるが、最新の報告では 5 年生存率が 39.4%とされており、特に肝転移がある場合 5 年生存率は 13-54%と低い。転移に対し手術、分子標的薬、経動脈的化学塞栓療法といった集学的治療が推奨されているが、既存の治療法の効果は限られており、新しい治療法の開発が急務とされている。免疫療法は神経内分泌腫瘍治療において着目されており、特にソマトスタチン受容体や Cadherin（CDH）17 が神経内分泌腫瘍のキメラ抗原受容体-T 細胞（Chimeric Antigen Receptor-T : CAR-T）療法のターゲットとなる可能性があり、抗 CDH17 CAR-T 療法の第 1 相試験が進行中である。一方、腫瘍関連抗原が細胞障害性 T 細胞（CTL : Cytotoxic T lymphocyte）に認識され、癌特異的な免疫応答を誘導することは広く知られている。腫瘍関連抗原の 1 つである Survivin はアポトーシス阻害蛋白であり、過剰発現は多くの癌腫で予後不良因子とされている。特に Survivin-2B のスプライシングバリエーションである Survivin-2B 80-88 は日本人の Human Leukocyte Antigen（HLA）-A24 によって認識され、このペプチドによって誘導された Survivin-2B 80-88 CTL は Survivin 陽性腫瘍細胞を認識できると報告されている。また、様々な癌腫の血液より誘導された Survivin-2B 80-88 CTL clone は細胞株に対し HLA-A24 拘束性に細胞障害活性を示したため、Survivin ペプチドワクチン療法が複数の癌に有用な可能性が示唆されている。しかしながら NEN 患者に対する Survivin 抗原ペプチドが誘導する免疫学的効果の報告は少ない。本研究では NEN における Survivin 抗原の臨床的重要性について評価し、新規治療候補となりうるか検討した。

【材料と方法】

第 1 に NEN 細胞株の Survivin 発現をフローサイトメトリーで、Survivin のスプライシングバリエーションである Survivin-2B の発現をリアルタイム reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction（RT-qPCR）で評価した。また NEN 細胞株の HLA-A24 発現を半定量 RT-PCR で評価した。

第 2 にクローニングした Survivin-2B 80-88 CTL の NEN 細胞株に対する IFN- γ 発現を Enzyme-Linked ImmunoSpot（ELISPOT）法、細胞機能アッセイで評価した。

続いて NEN 患者血清中の Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞の頻度を Tetramer 染色で評価した。また手術前後での NEN 患者血清中の Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞の頻度の変化を評価した。さらに上記細胞性免疫だけでなく液性免疫の観点から NEN 患者血清 Survivin 濃度を Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法で評価した。

最後に NEN 組織標本の Survivin 免疫組織化学染色を行い、Survivin 発現と臨床病理学的特徴や予後との関連を解析した。

【結果】

入手できた NEN 細胞株 2 種類のうち、膵 NEN 由来の QGP-1 は HLA-A24 陽性、肺 NEN 由来の H727 は HLA-A24 陰性であった。Survivin のスプライシングバリエーションである Survivin-2B の mRNA レベルの発現は H727 では十分であったが、QGP-1 ではネガティブコントロールと同程度であった。

細胞障害活性については、Survivin-2B 80-88 CTL clone は HLA-A24 陽性の QGP-1、HLA-A24 陰性の H727 に対し ELISPOT 法、細胞内 Interferon- γ 染色いずれにおいても細胞障害活性を示さなかったが、Survivin ペプチドと共培養した QGP-1 に対しては細胞障害活性を示した。

Tetramer 染色を施行した計 10 例のうち、NEN 患者 3 例のみ Tetramer 染色陽性であった。Tetramer 染色陽性であった 3 例のうち 2 例で手術後に Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞が減少し、2 例とも 3 年無再発生存中である。手術前後で Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞の頻度の変化が認められなかった残り 1 例は肝転移再発を認めた。

NEN 患者と健常者の血清 Survivin 濃度を ELISA 法で比較した結果、NEN 患者の血清 Survivin 濃度は、健常者と比較し有意に低値であった ($P=0.0045$)。免疫組織化学染色では、全生存率に関しては Survivin 発現との関連は認められなかったが、無増悪生存期間に関しては核内 Survivin 発現が高いほど有意に予後が不良であった ($P=0.0371$)。細胞質内 Survivin と予後の関連は認められなかった。核内 Survivin と臨床病理学的特徴の関連については、核内 Survivin 発現は腫瘍径 >2 cm、リンパ節転移、肝転移、機能性との有意な相関を認めた。

【考察】

Survivin-2B 80-88 CTL は QGP-1 単独に対して IFN- γ を発現しなかったが、Survivin ペプチドと共培養した QGP-1 に対して IFN- γ を発現した。RT-PCR で QGP-1 の Survivin-2B mRNA の発現が低値であることが示されており、QGP-1 の Survivin 発現が IFN- γ 発現を誘導するには不十分であったためと

推測した。

Tetramer 染色により NEN 患者 7 人中 3 人に Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞が確認された。さらには Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞陽性であった 3 人のうち 2 人は手術により Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞が陰性化した。これらの知見により、NEN に発現する Survivin は抗原性を有しており、Survivin-2B 80-88 ペプチドは HLA-A24 陽性 NEN 患者の T 細胞に認識され得ることが示唆された。

様々な癌腫で Survivin 発現と腫瘍浸潤、転移との相関が示唆されているのと同様、本研究においても核内 Survivin 高発現群で有意に無増悪生存期間が短く、さらには Survivin 発現がリンパ節転移や肝転移と相関していた。Survivin は上皮間葉転換を促進することが知られており、Survivin が NEN において転移のマーカーである可能性が考えられた。リキッドバイオプシーとしての血清 Survivin 測定の有用性については証明できなかった。

【結論】

NEN 中の Survivin には抗原性があり、NEN は Survivin-2B 80-88 CTL 前駆体を介して細胞性免疫を誘導する可能性がある。Survivin を標的とした免疫療法は特に Survivin が高発現している NEN の治療に有用である可能性が示唆された。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

CAR-T	Chimeric Antigen Receptor-T cell
CTC	Circulating Tumor Cells
CDH	Cadherin
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition
FBS	Fetal bovine serum
FCM	Flowcytometry
FITC	Fluorescein isothiocyanate isomer-I
GEP	Gastroenteropancreatic
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leukocyte Antigen
HRP	Horseradish peroxidase
IFN- γ	Interferon- γ
IO	Ionomycin
IgG	Immunoglobulin G
MHC	Major histocompatibility complex
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NEC	Neuroendocrine carcinoma
NEN	Neuroendocrine neoplasm
NET	Neuroendocrine tumor
NHDF	Normal Human Dermal Fibroblasts
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate-buffered saline
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed cell death ligand 1
PE	phycoerythrin
PMA	Phorbol myristate acetate
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex
ROC	Receiver operating characteristic
RT-qPCR	Reverse transcription-quantitative polymerase chain

TAA

Tumor associated antigen

緒言

神経内分泌腫瘍（Neuroendocrine neoplasm : NEN）は enterochromaffin 細胞由来の腫瘍であり、その発生率は本邦では 10 万人あたり 3.53 人と稀である（Dasari A et al, 2017; Masui T et al, 2020）。近年増加傾向であり、Surveillance Epidemiology and End Results data base によると 2000 年には 10 万人あたり 4.90 人であったのに対し、2018 年には 10 万人あたり 8.19 人と約 2 倍に増加している（Peiwen WU et al, 2023）。NEN は通常発育は緩徐であり、最新の報告では 5 年生存率は 39.4% と報告されている（Man D et al, 2018）。WHO 2019 では組織学的に神経内分泌パターンを示す腫瘍を高分化と称し、Ki-67 指数が <3%、3-20%、>20% の判定によりそれぞれ NET (Neuroendocrine Tumor) G1、G2、G3 と分類し、形態学的に低分化な神経内分泌腫瘍で Ki-67 指数が 20% を超える腫瘍を神経内分泌癌 NEC (Neuroendocrine Carcinoma) と定義している（表 1）。

表 1. NEN の WHO 分類 2019

Terminology	Differentiation	Grade	Mitotic rate (mitoses/2 mm ²)	Ki-67 index
NET, G1	Well differentiated	Low	<2	<3%
NET, G2		Intermediate	2–20	3–20%
NET, G3		High	>20	>20%
NEC, small-cell type (SCNEC)	Poorly differentiated	High [‡]	>20	>20%
NEC, large-cell type (LCNEC)			>20	>20%
MiNEN	Well or poorly differentiated [‡]	Variable [‡]	Variable [‡]	Variable [‡]

NEN はホルモン産生症状を有する機能性と無症状の非機能性に大別され、機能性 NEN はインスリノーマであれば低血糖症状、ガストリノーマであれ

ば消化性潰瘍といった産生されるホルモン特異的な症状を呈する。切除可能例では外科的あるいは内視鏡的切除が推奨され、ホルモン症状を有する機能性の場合にはオクトレオチドやランレオチドといったソマトスタチンアナログが、また切除不能であり腫瘍制御を目的とした場合ソマトスタチンアナログに加えエベロリムスやスニチニブといった分子標的薬、白金製剤やストレプトゾシン、イリノテカン、エトポシドなどの細胞障害性抗がん剤が標準治療として本邦のガイドラインで推奨されている（膵・消化管 NEN 診療ガイドライン 2019 年第 2 版）。また、NEN はソマトスタチン受容体が高率に発現していることから近年ソマトスタチンアナログに放射線同位元素を標識した薬剤を用いる **Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRT)** が開発されてきた。根治切除不能な中腸 NEN を対象とした第Ⅲ相試験（NETTER1 試験）では、ソマトスタチンアナログにルテチウムを結合したルテチウムオキソドトロチドが高用量のオクトレオチドと比較し有意に良好な無増悪生存期間が示され（Strosberg JR et al, 2017）、PRRT が標準治療に位置付けられた。本邦でも 2021 年から保険適用となったが、日本国内で PRRT を提供できる施設は 90 施設程度と限られており、十分に普及していないのが現状である。遠隔転移は重要な予後規定因子であり、肝転移を有する患者の 5 年生存率が 13-54%であるのに対し、肝転移を有さない患者の 5 年生存率は 75-99%とされている（Frilling A et al, 2014）。National Comprehensive Cancer Network (NCCN) ガイドラインで転移例に対し手術、分子標的薬、経動脈的化学塞栓療法を組み合わせた集学的治療を推奨している（NCCN Guidelines Version1. 2025）。しかしながら、既存の治療では効果は限定的であり、新規治療の開発が喫緊の課題である。

免疫療法は手術、化学療法、放射線療法に続く新規がん標準治療として臨床で広く使用されており、効果が証明され保険収載されている免疫療法として腫瘍微小環境の免疫細胞に作用する免疫チェックポイント阻害薬、患者の T 細胞にキメラ抗原受容体（Chimeric Antigen Receptor : CAR）遺伝子を導入し T 細胞の細胞障害活性を高める CAR-T 細胞療法、光感受性物質（抗体と光感受性色素の複合体）投与後にレーザー光を照射し光感受性物質と結合した腫瘍細胞を障害する光免疫療法が挙げられる。NEN においても NET G3 や NEC といった低分化型腫瘍に対する従来薬の効果は極めて乏しく、免疫チェックポイント阻害剤の臨床試験が施行されてきた。肺以外の低分化型 NEN に対する抗 Programmed cell death protein 1（PD-1）抗体薬ペムブロリズマブ単剤療法の第 2 相試験では有効性は示されなかったが（Claire M et al, 2019）、進行性 NEN 患者に対する抗 Programmed cell death ligand 1（PD-L1）抗体薬アテゾリズマブ、抗 Vascular endothelial growth factor 抗体ベバシズマ

ブ併用療法では良好な抗腫瘍効果を示し、無増悪生存期間の延長傾向が示された (Daniel MH et al, 2022)。またソマトスタチン受容体、Cadherin (CDH) 17 は神経内分泌腫瘍における CAR- T 細胞療法の標的分子となり得ることから、抗 CDH17 CAR-T 療法の第 1 相試験が米国で進行中である (Mandriani B et al, 2022; Feng Z et al, 2022)。

従来から免疫療法のターゲットとして腫瘍関連抗原 (Tumor-Associated Antigen: TAA) が着目されており、TAA は細胞障害性 T 細胞 (CTL: Cytotoxic T lymphocyte) の存在により認識され、癌特異的な免疫応答を誘導するとされており、メラノーマをはじめ様々な癌腫で同定されている (Rosenberg S.A. et al, 1998; Rosenberg S.A. et al, 1999; Ilyas S et al, 2015)。がんワクチン療法は TAA に対する免疫応答を誘導する目的で、外部から TAA を患者に能動免疫して腫瘍免疫を賦活化する治療法である。臨床試験では頭頸部癌、食道癌、膀胱癌の一部で腫瘍縮小効果を示し (Kono K et al, 2012; Obara W et al, 2017; Yoshitake Y et al, 2015)、口腔扁平上皮癌の一部では全生存率が延長したと報告されているが (Tsuruta M et al, 2018)、進行癌に対する癌ワクチン療法単独での奏効率は 5%未満と満足のいく結果は得られていない (Tsuruta M et al, 2018)。TAA である Survivin は単一の Baculovirus repeat ドメインを有するアポトーシス阻害蛋白の 1 つである (Ambrosini G et al, 1997)。その上 Survivin は染色体パッセンジャー複合体のサブユニットであり、微小管ダイナミクスの制御因子でもあり、細胞死と細胞増殖という相反する機能を有する。Survivin は胎生期には顕著に発現しているが、大半の正常な終末分化組織には発現しておらず、複数の癌腫においてその過剰発現は予後不良因子とされている (Li F et al, 1998; Altieri D.C. et al, 2006; Roland H.S. et al 2007)。Survivin は主に細胞質内に存在しアポトーシス抑制因子として機能する一方、核内 Survivin は細胞分裂を制御する (Himani G et al, 2016)。また、Survivin の発現が化学療法抵抗性や腫瘍の悪性度と相関することから、癌治療の標的となると考えられている (Himani G et al, 2016)。

Survivin をコードする BIRC5 遺伝子は、Wild type、2B、 Δ Ex3、3B、2 α 、3 α といった 6 つのスプライシングバリエントをコードしている。特に Survivin-2B と Survivin- Δ Ex3 は臨床的に重要である。Survivin- Δ Ex3 は主に核内に存在し anti-apoptotic であり、大腸癌、乳癌、非小細胞肺癌など多くの癌腫でその発現が予後不良因子であった (De Necochea-Campio R et al, 2013)。一方で、Survivin-2B は主に細胞質内に存在し pro-apoptotic であり、Survivin-2B と Δ Ex3 は腫瘍の進行と治療反応性において互いに相反して機能する可能性があると考えられている (Li F, 2005)。

Survivin-2B 80-88 の 8mer “AYACNTSTL” は日本人に最も多い Human

Leukocyte Antigen (HLA) アリルである HLA-A24 によって認識、抗原提示される。このペプチドによって誘導された Survivin-2B 80-88 特異的 CTL は Survivin 陽性腫瘍細胞を認識することができる。様々な癌腫の血液より誘導された Survivin-2B 80-88 CTL clone は細胞株に対し HLA-A24 拘束性に細胞障害活性を示した。また Major histocompatibility complex (MHC) Tetramer 解析により HLA-A24 陽性の癌患者の末梢血単核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cell : PBMC) では Survivin-2B 80-88 特異的 CTL 前駆細胞が増加していることが報告されている (Hirohashi Y et al, 2002; Idenue S et al, 2005)。しかしながら NEN 患者に対する Survivin 抗原の免疫学的効果の報告は少ない。本研究では NEN における Survivin 抗原の臨床的重要性について評価し、新規治療候補となりうるか検討した。

方法

2019 年 4 月から 2021 年 3 月の間で、北海道大学病院消化器外科 I、II で手術を受けた NEN 患者症例の手術検体、血液検体を使用した。また、健康人ボランティアからの血液検体を使用した。なお、本研究で使用したデータは「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」に従い、北海道大学病院自主臨床試験 (No. 018-0163) として北海道大学病院倫理審査委員会の承認を得ており、全ての対象患者より書面による同意を得て行った。

1. 細胞株

QGP-1 (膵 NEN)、H727 (肺 NEN)、SW480 (大腸癌)、K562 (慢性骨髄性白血病) は American Type Culture Collection から購入した。Normal Human Dermal Fibroblasts: NHDF (ヒト皮膚繊維芽細胞) は Survivin の negative control として Lonza から購入した。T2-A24 (T2 細胞株に HLA-A*2402 を遺伝子導入した細胞株) は葛島清隆先生 (愛知がんセンター) より供与を受けた。QGP-1、H727、K562、T2-A24 は RPMI 1640 (WAKO, Tokyo, Japan) を、SW480 は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (WAKO, Tokyo, Japan) を使用し、いずれもウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS, Cell Culture Bioscience, Tokyo, Japan) と Penicillin/ Streptomycin (Life Technologies, Tokyo, Japan) を添加し、それぞれ終濃度 10%、1% とした。NHDF は Clonetics™FGM™-2 BulletKit™ (Lonza, Basel, Switzerland) を使用した。いずれの細胞株も 5% CO₂ 下で 37℃ の温度設定のもとインキュベートした。

2. NEN 細胞株における Survivin 発現の定量

2-1. Flowcytometry

免疫療法のターゲットとなりうる Survivin の蛋白レベルの発現量を評価するため、全ての細胞株の Survivin 発現の評価を Flowcytometry (FCM) で行った。細胞株は 0.2% EDTA を含む PBS を培養細胞に添加し、37℃ で 5 分間インキュベートして細胞を分離し、培養液で EDTA を中和して単一細胞懸濁液を調整した。マイクロテストチューブに 1×10^6 / ml の細胞液を調整し、4% パラホルムアルデヒドで氷上 15 分固定、0.1% サポニンで 15 分透過処理を行い、PE 標識マウス抗ヒト Immunoglobulin G (IgG) 1 モノクローナル抗体: 抗 Survivin (IC6472P; R&D Systems) で染色した。アイソタイプコントロールとして PE 標識抗体マウス抗ヒト IgG1 モノクローナル抗体 (IC002P; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を使用した。抗体染色は 4℃、

暗所で 30 分インキュベートした。0.5% BSA/ PBS で 2 回洗浄した後、MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて解析を行った。ヒストグラム解析は FlowJo 7.6.5 (TreeStar Inc, Ashland, OR, USA) で行った。

2-2. リアルタイム RT-PCR

各細胞株における Survivin-2B の発現を比較するためにリアルタイム Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) を施行した。各細胞株から RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて Total RNA を抽出し、Prime Script RT Master Mix (Takara Bio, Kusatsu, Japan) を用いて逆転写反応により cDNA を得た。SYBR Green PCR Master Mix (Toyobo, Osaka, Japan)を用いて標的遺伝子を増幅し、Light Cycler 96 (Roche, Basel, Switzerland)を用いて PCR を triplicate で行った。PCR は 95°C 2 分間の initial denature の後、95°C 20 秒の denature と 60°C 30 秒の annealing、extension を 45 サイクル繰り返した。Survivin-2B の mRNA 発現量は、ハウスキーピング遺伝子である β -Actin で標準化された $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて算出した相対値として表した (Livak, K.J et al, 2001)。使用したプライマー配列を表 2 に示す。

表 2. RT-PCR に用いたプライマー配列

Primer	Forward	Reverse
Survivin-2B	5'-TCAAGGACCACCGCATCTCTAC-3'	5'-GTGCTGGTATTACAGGCGTAAG-3'
β -Actin	5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3'	5'-AGAGGCGTACAGGGATAGCA-3'
HLA-A24	5'-ACTGACCGAGAGAACCTGCGGAT-3'	5'-TCTCCAGGTATCTGCGGAGCCCCG-3'

3. HLA-A24 発現の評価

NEN 細胞株の HLA-A24 の発現の有無を評価するために、また NEN 患者の HLA-A24 発現を調べるために半定量 RT-PCR を施行した。NEN 患者の HLA-A24 発現の評価は NEN 患者の PBMC を使用した。末梢血 10 ml を遠心分離 (700×g, 20 min, 25°C) で赤血球層と Plasma 層に分離し、赤血球層を Ficoll 密度勾配遠心法 (700×g, 20 min, 25°C) で PBMC を回収した。DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて NEN 細胞株、NEN 患者 PBMC から Genomic DNA を抽出した。PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo) と StepOnePlus real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific)を用いて 94°C 2 分間の initial denature の後、94°C 15 秒の denature と 58°C 30 秒の annealing、72°C 30 秒の extension のサイクルを 35 回繰り返す。

返した。PCR 産物は 1.5%アガロースゲルで電気泳動を施行した。使用したプライマー配列を表 2 に示す。

4. NEN 細胞株に対する Survivin-2B 80-88 CTL clone の IFN- γ 発現の評価

4-1. ELISPOT

Human IFN- γ ELISPOT set (cat#551849; Beckton Dickinson Biosciences) を用いて実験を行った。ELISPOT プレートに Interferon (IFN) - γ 捕捉抗体を 4°Cで一晩コートした。プレートを 1×PBS 100 μ l /well で 2 回洗浄し、10% FBS を含む AIM-V 培地で室温で 2 時間ブロッキングした。次に、Survivin-2B 80-88 CTL clone を各 target の細胞株とともに triplicate で 1×10^4 個/well ずつ加えた。5% CO₂ 加湿チャンバー内で 37°C 24 時間インキュベートした後、1×PBS 0.05% Tween20 200 μ l/well で 5 回洗浄し、ビオチン化抗ヒト IFN- γ 抗体 100 μ l/well、HRP 標識ストレプトアビジン 100 μ l/well とインキュベートした。1×PBS 200 μ l/well で洗浄した後、発色試薬である AEC substrate buffer (cat#551951; BD Pharmingen)を 100 μ l/well 加え 30 分インキュベートした。ELISPOT リーダー (Carl Zeiss, Aalen-Oberkochen, Germany) を用いてスポットを可視化し、解析した。

4-2. 細胞機能アッセイ

各細胞株に対して Survivin-2B 80-88 CTL が分泌した IFN- γ を Immunocytochemistry を用いて FCM で評価した。Survivin-2B 80-88 CTL clone (1×10^5 /0.1 mL)を各細胞株と 1 : 1 の割合で 96 well dish で 6 時間共培養し、最後の 5 時間に monensin 10 μ l/well (GolgiStop Protein Transport Inhibitor; 1500:1; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) を添加した。QGP-1 は Survivin-2B 80-88 CTL clone との共培養前に Survivin 2B 80-88 ペプチド (NovoPro Bioscience, Shanghai, China) を 2 時間共培養した。Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Biosciences) を用いて共培養した細胞を固定・透過処理した後、FITC-mouse anti-Human IFN- γ (#554551; 50:1; BD Pharmingen)、anti-CD4-APC/FireTM750 (#100568; BioLegend)、anti-CD8-PerCP (#344710; BioLegend) で染色し、FCM で解析した。アイソタイプコントロールは FITC Mouse IgG1, k Isotype Control (#550616; 50:1; BD Pharmingen)、ポジティブコントロールとして Survivin-2B 80-88 CTL に Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; #162-23591; 50 ng/mL; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) と Ca²⁺ ionophore (Ionomycin: IO; #095-05831; 250 ng/mL; FUJIFILM Wako) を添加して同様のアッセイを行った。

5. Tetramer 染色

末梢血 10 ml から PBMC を回収した後、CD8 と Survivin-tetramer の二重染色を行った。PBMC に PE 標識 HLA-A*24:02 Survivin-2B tetramer (MBL, Tokyo, Japan) を加え室温で 20 分インキュベートし、次いで PerCP 標識抗 CD8 モノクローナル抗体 (BioLegend, California, USA) を加えて室温で 20 分インキュベートした。Tetramer のアイソタイプコントロールとして HLA-A*24:02 HIV env tetramer (MBL, Tokyo, Japan) を使用した。PBS で 2 回洗浄後 1 %ホルムアルデヒドで固定し、MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて FCM で解析を行った。ヒストグラム解析は FlowJo 7.6.5 (TreeStar Inc, Ashland, OR, USA) で行った。Survivin CTL 前駆細胞の頻度は HLA-A*24:02 Survivin-2B tetramer 陽性細胞数/CD8 陽性細胞数 (%) とした。先行論文 (Idenoue S et al, 2005) に基づき Survivin CTL 前駆細胞の頻度 > 0.1% を Survivin CTL 前駆細胞陽性と定義した。

6. 血清 Survivin 濃度の測定

Quantikine Human Survivin Immunoassay キット (DSV00 ; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を使用し、プロトコールに従って NEN 患者血清中の Survivin 濃度を ELISA 法で測定した。いずれのサンプルも duplicate で行い、結果はいずれも吸光度 450nm のプレートリーダーで測定した。

7. NEN 組織標本の Survivin 免疫組織化学染色

2014 年から 2019 年に北海道大学病院消化器外科 II で手術を施行した膵 NEN 患者 74 例を対象とした。

組織切片はキシレンで脱パラフィンし、段階的エタノール系列を用いて脱水した。熱誘導抗原賦活化は、Target Retrieval Solution, Low pH (Dako, Glostrup, Denmark) で行った。内因性ペルオキシダーゼは 3 %過酸化水素水 5 分間でブロッキングした。抗 Survivin ウサギポリクローナル一次抗体 (1:250, NB500-201; Novus Biological, Colorado, USA) で 30 分間抗体反応を行い、HRP 標識ポリマー法 (EnVision FLEX System, Dako, Glostrup, Denmark) を用いて切片を標識した。免疫染色した切片はヘマトキシリンで染色し、エタノールで脱水後、キシレンで清拭した。ホルマリン固定パラフィンブロックから得られたすべての組織切片を、HALO (v3.4, Indica Labs, New Mexico, USA) を用いて核および細胞質 Survivin の半定量的評価を行った。

免疫組織化学的スコアは、H-score として Survivin 陽性率と染色強度 (0 : なし ; 1+ : 弱 ; 2+ : 強) の積として計算された。1+と 2+の下限強度を図 1 に

示す。異なる染色強度を示す腫瘍細胞の割合は、2人の病理医によって評価された。

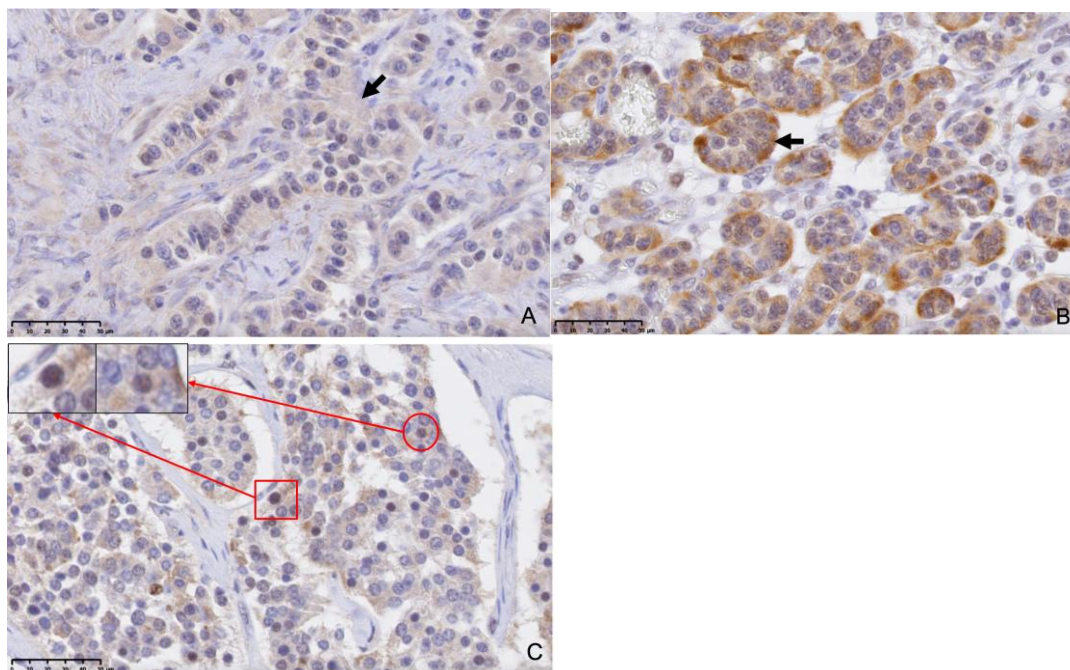


図 1. Survivin 染色強度下限の基準

(A) 細胞質 Survivin 1+ の下限 (矢印) (B) 細胞質 Survivin 2+ の下限 (矢印) (C) 核 Survivin 1+ の下限 (赤円) と 2+ の下限 (赤四角)
スケールバーは 10 μm を示す。

8. 統計解析

Survivin の H-score のカットオフ値を決定するために receiver operating characteristic (ROC) 曲線を用いた。連続変数としての H-score、および二値変数としての 5 年再発 (再発または再発なし) については修正 ROC 解析を用いた (Ueno T et al, 2018)。生存期間は Kaplan-Meier 法を用い、生存推定値は log-rank 検定を用いて比較した。全生存期間は、手術日から何らかの原因による死亡日または最終の追跡調査日までの期間とした。無増悪生存期間は手術日から再発あるいは腫瘍増悪が確認された日までとした。患者群と健常群間の血清 Survivin 濃度の差を比較するために student- t 検定を用いた。有意水準を $P < 0.05$ とした。全ての統計解析は、JMP Pro (Ver 17.0 ; SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。

結果

1. NEN 細胞株における HLA-A24 の発現

半定量 PCR により QGP-1 は HLA-A24 陽性、H727 は HLA-A24 陰性の結果を得た（図 2）。

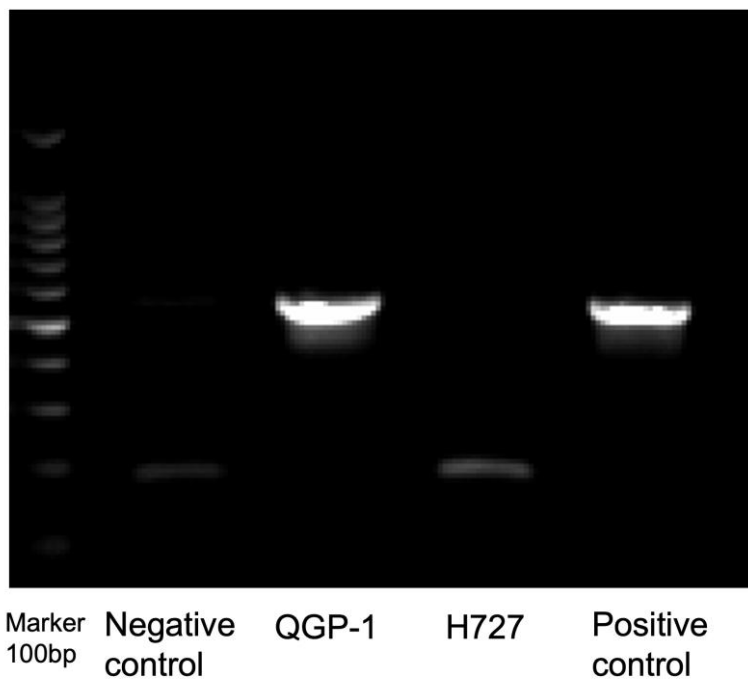


図 2. NEN 細胞株における HLA-A24 の発現

NEN 細胞株における HLA-A24 の発現の有無を半定量 PCR で評価した。

2. NEN 細胞株における Survivin および Survivin-2B の発現

QGP-1、H727 とともに Survivin 蛋白は十分に発現していた（図 3）。

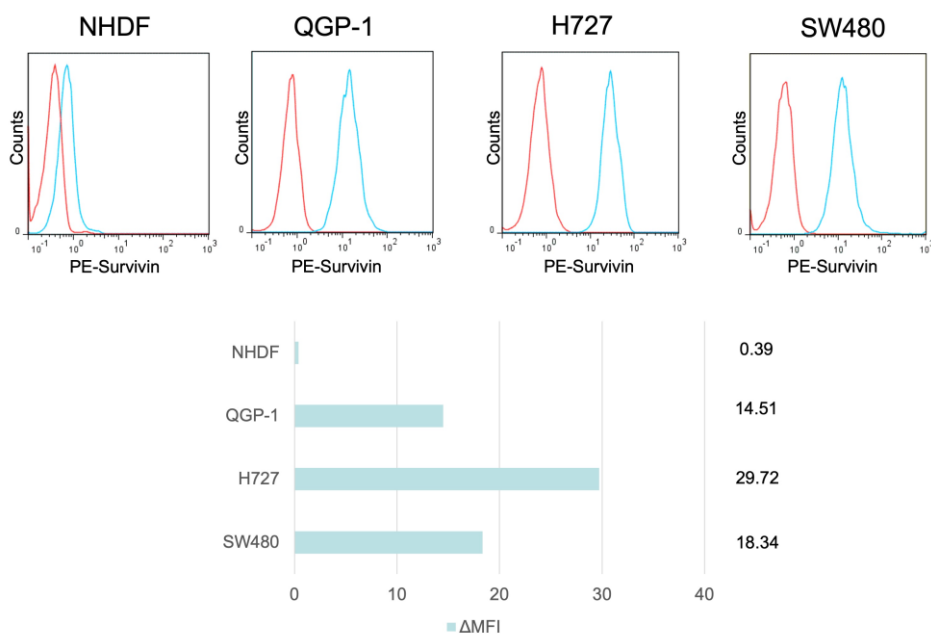


図 3. NEN 細胞株における Survivin 蛋白の発現

Flowcytometry による NEN 細胞株の Survivin 蛋白の定量

NHDF は negative control、SW480 は positive control として使用した。

Survivin のスプライシングバリエントである Survivin-2B の mRNA レベルの発現は H727 では十分であったが、QGP-1 ではネガティブコントロールと同程度であった（図 4）。

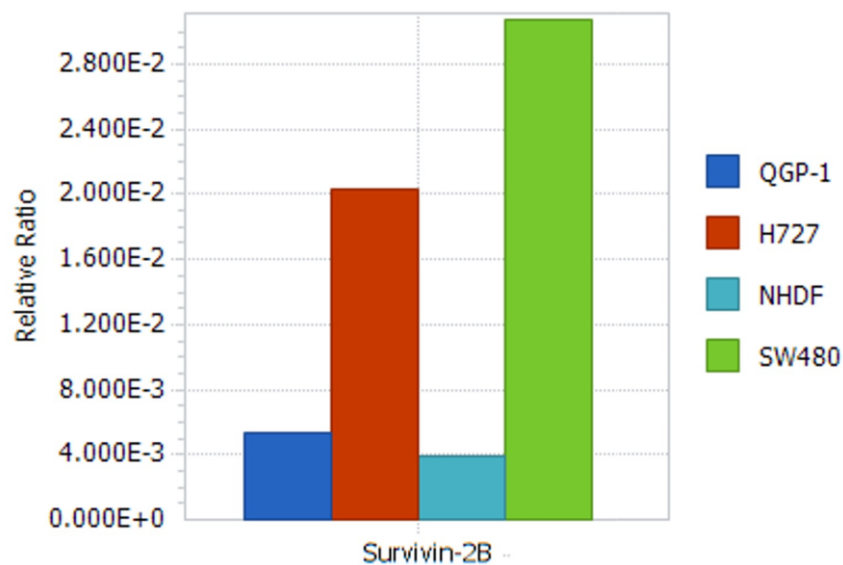


図 4. NEN 細胞株における Survivin-2B mRNA の定量

リアルタイム RT-PCR を用いて NEN 細胞株における Survivin-2B mRNA の発現を比較した。NHDF は negative control、SW480 は positive control として使用した。

3. Survivin-2B 80-88 CTL の NEN 細胞株に対する IFN- γ 発現の評価

3-1. ELISPOT

Survivin-2B 80-88 CTL clone は NEN 細胞株に対し IFN- γ 発現は示さなかった (図 5)。

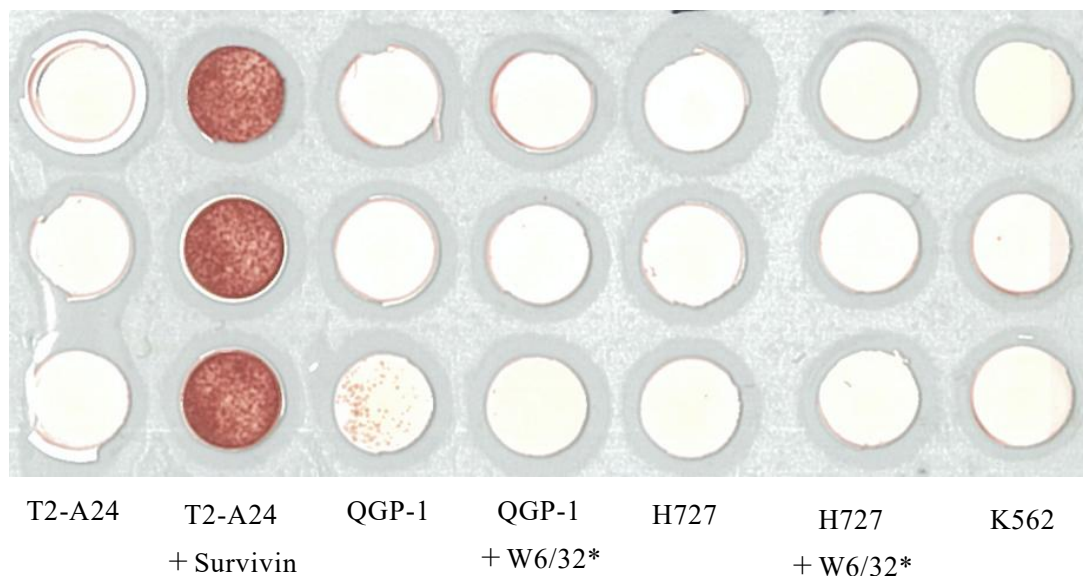


図 5. ELISPOT による IFN- γ 発現の評価

NEN 細胞株に対する Survivin-2B 80-88 CTL の IFN- γ 発現を ELISPOT 法を用いて評価した。K562 は negative control として使用した。

* W6/32 は抗 MHC class I 抗体

3-2. 細胞内 IFN- γ 染色

ELISPOT 法では Survivin-2B 80-88 CTL clone の NEN 細胞株に対し IFN- γ を発現しなかったため、絶対値として定量可能な細胞内 IFN- γ 染色で IFN- γ 発現を評価した。Survivin-2B 80-88 CTL clone は Survivin ペプチドと共培養した QGP-1 に対し IFN- γ を発現したが、QGP-1 単独や H727 に対し IFN- γ を発現しなかった (図 6)。

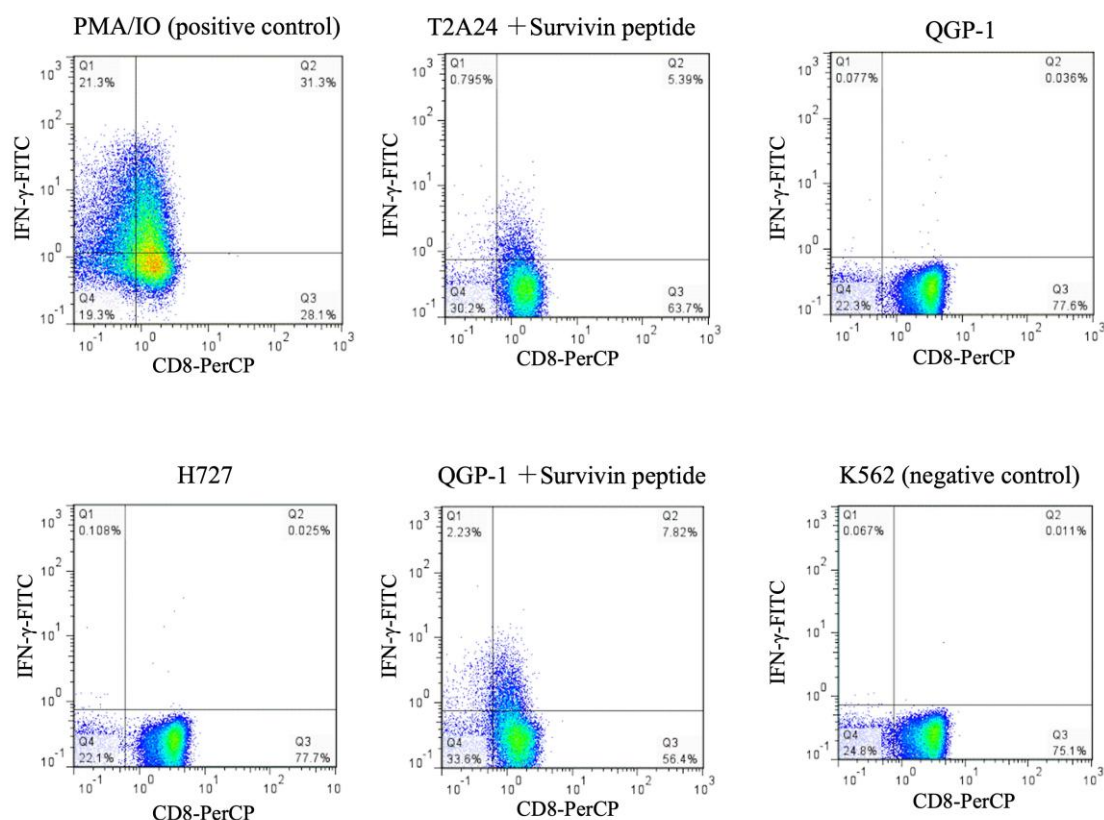


図 6. 細胞内 IFN- γ 染色

NEN 細胞株に対する Survivin-2B 80-88 CTL の IFN- γ 発現を細胞内 IFN- γ 染色を用いて評価した。PMA/IO は positive control として、K562 は negative control として使用した。

4. NEN 患者における Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞の頻度

はじめに HLA-A24 陽性である NEN 患者 7 例と健常者 3 例の末梢血中 Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞の頻度を Tetramer 染色で測定した。NEN の原発巣は十二指腸 1 例 (G2)、胃 1 例 (G1/2)、直腸 1 例 (G3)、膵臓 4 例 (G1:2 例, G2:2 例) であった。Tetramer 染色を施行した計 10 例のうち、NEN 患者 3 例 (case 1, 2, 4) のみ Tetramer 染色陽性であった。Tetramer 染色陽性であった case 1 の代表画像を図 7 に示した。

次に Tetramer 染色陽性であった 3 例の手術前後での Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞の頻度を比較検討した。結果、Case 1, 2 の 2 例で手術後に Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞が減少し (図 8)、2 例とも 3 年無再発生存中である。手術前後で Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞の頻度の変化が認められなかった残り 1 例は肝転移を認めた。患者背景と tetramer 染色の結果を表 3 にまとめた。

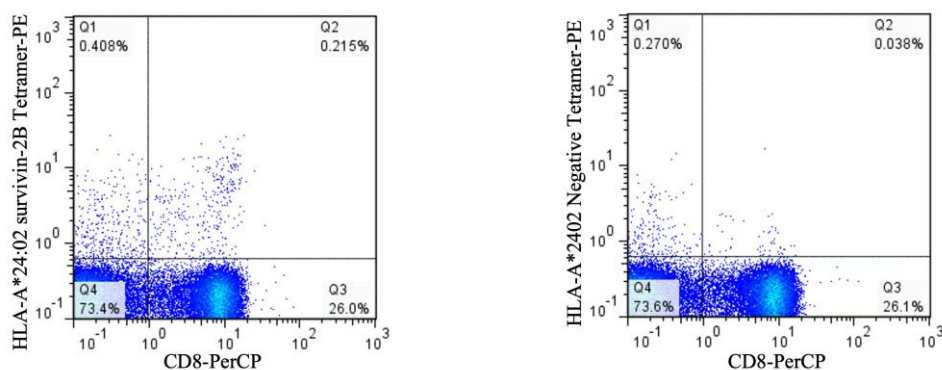


図 7. HLA-A*24:02 Survivin-2B tetramer 染色 (Case 1)

Case 1 の PBMC 中の Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞の頻度をテトラマー染色で定量した。

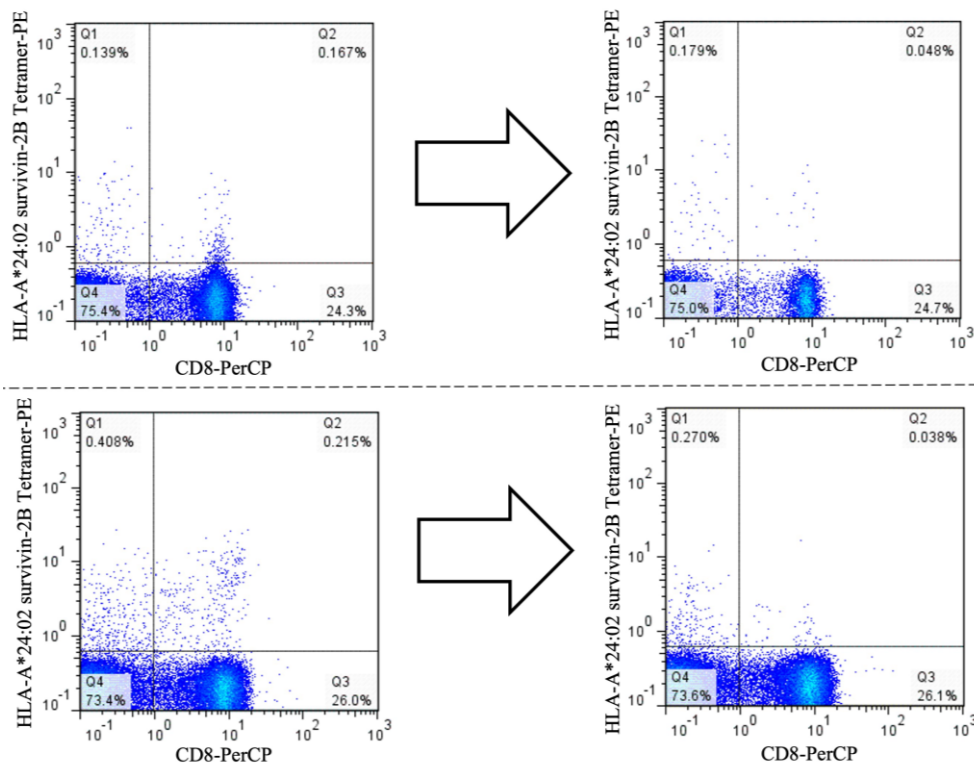


図 8. 手術前後での Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞の頻度の比較
(上段 : Case 2、下段 : Case 1)

手術前後での Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞の頻度の変化を Tetramer 染色で定量した (左 : 手術前、右 : 手術後)。

表 3. Tetramer 染色の結果と患者背景

No.	年齢	性別	原発	腫瘍径 (mm)	TNM (Stage)	grade (Ki-67)	機能性	CTL (%) 切除前	CTL (%) 切除後	再発
患者 1	40	M	十二指腸	11	T3N1M0 (III)	NET G2 (4.4%)	非機能性	0.21	0.038	なし
患者 2	33	F	膵臓	20	T1N0M0 (I)	NET G1 (2.1%)	インスリ ノーマ	0.16	0.048	なし
患者 3	44	F	胃	30	T2N1M1 (IV)	NET G1/2 (N/A)	ガストリ ノーマ	0.01	N/A	SD
患者 4	64	F	直腸	23	T2N0M1 (IV)	NEC G3 (>50%)	非機能性	0.18	0.14	肝転移
患者 5	46	M	膵臓	8	T1N0M0 (I)	NET G1 (1.9%)	非機能性	0.09	N/A	なし
患者 6	50	M	膵臓	22	T3N1M0((((III)	NET G2 (4.4%)	非機能性	0.014	N/A	肝転移
患者 7	53	F	膵臓	14	T1N0M0 (I)	NET G2 (9.8%)	非機能性	0.005	N/A	なし
健常 1	34	M	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.041	N/A	N/A
健常 2	30	M	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.033	N/A	N/A
健常 3	31	M	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	0.036	N/A	N/A

5. NEN 患者の血清 Survivin 濃度

36 人の NEN 患者と 4 人の健常者の血清 Survivin 濃度を ELISA 法で測定し比較検討した。NEN 患者の血清 Survivin 濃度中央値は 10 pg/ml (8–57 pg/ml) であり、健常者の中央値 13 pg/ml (12–16 pg/ml) と比較し有意に低値であった ($P = 0.0045$) (図 9)。

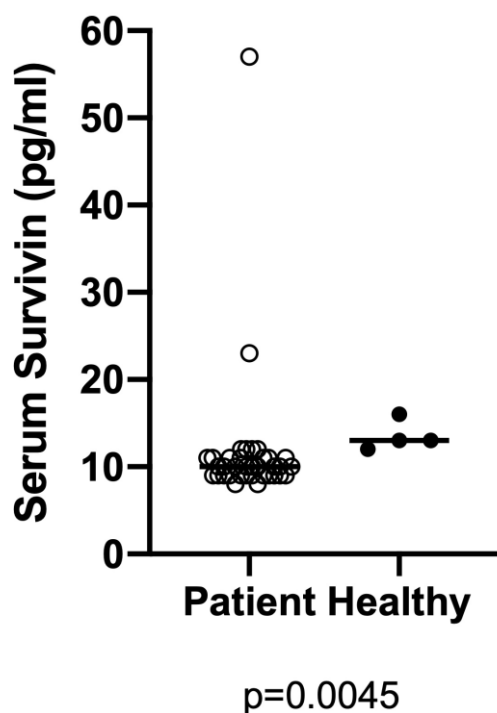
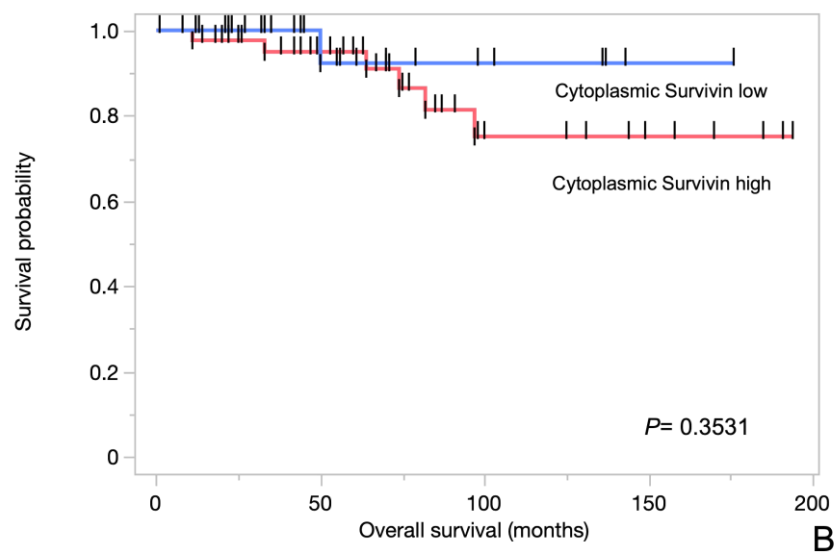
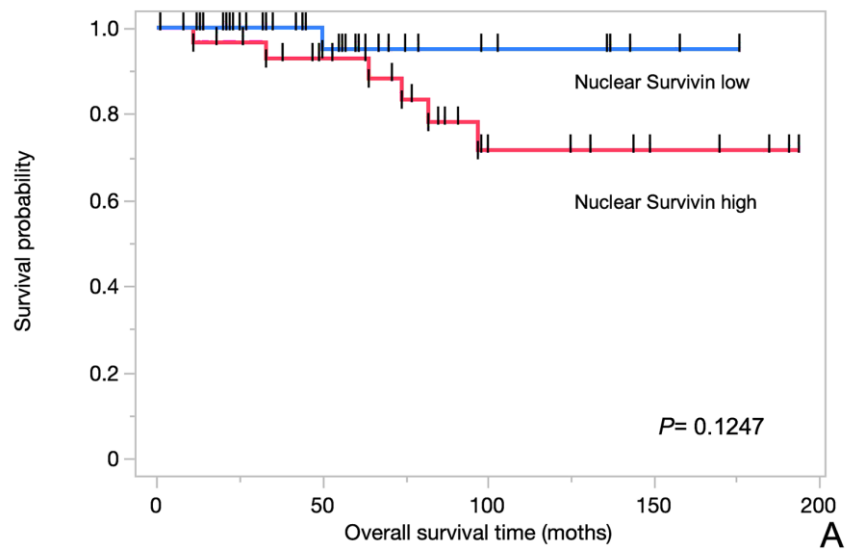


図 9. ELISA 法による NEN 患者と健常者の血清 Survivin 濃度の比較

6. Survivin 免疫組織化学染色と臨床病理学的特徴、予後の検討

ROC 曲線より核内 Survivin、細胞質内 Survivin の H-score のカットオフ値をそれぞれ 8.9、84.9 に設定した。H-score の cut off 値より高値の患者を Survivin-high 群、低値の群を Survivin-low 群に分類し、両群間の背景、予後を比較検討した。全生存率に関しては核内 Survivin-high 群と核内 Survivin-low 群で差は認められず、細胞質内 Survivin に関しても同様であった (図 10 A、B)。一方、無増悪生存期間に関しては核内 Survivin-high 群が核内 Survivin-low 群と比較し有意に予後不良であった ($P = 0.0371$) (図 10C)。細胞質内 Survivin に関しては無増悪生存期間の有意差は認められなかった (図 10D)。表 4 に核内 Survivin と臨床病理学的特徴の関連を示した。核内 Survivin-high 群では腫瘍径>2cm、リンパ節転移、肝転移、機能性の因子が有意に多い結果であった。



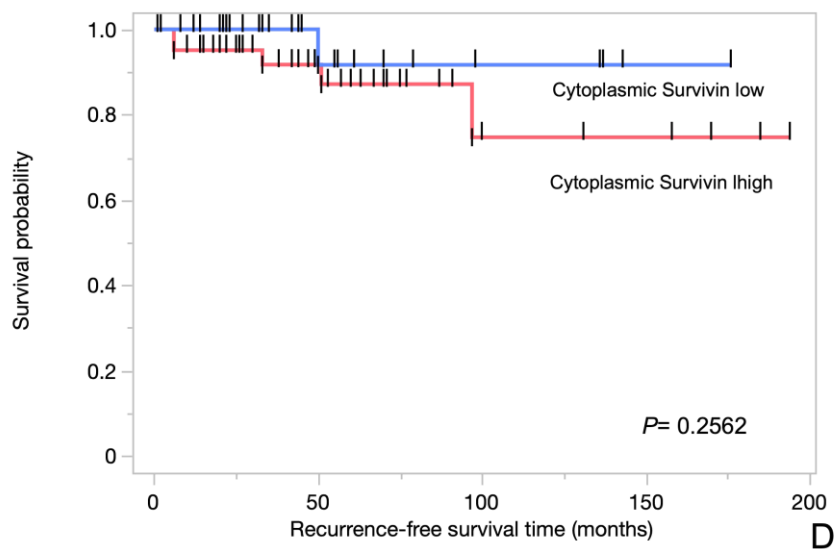
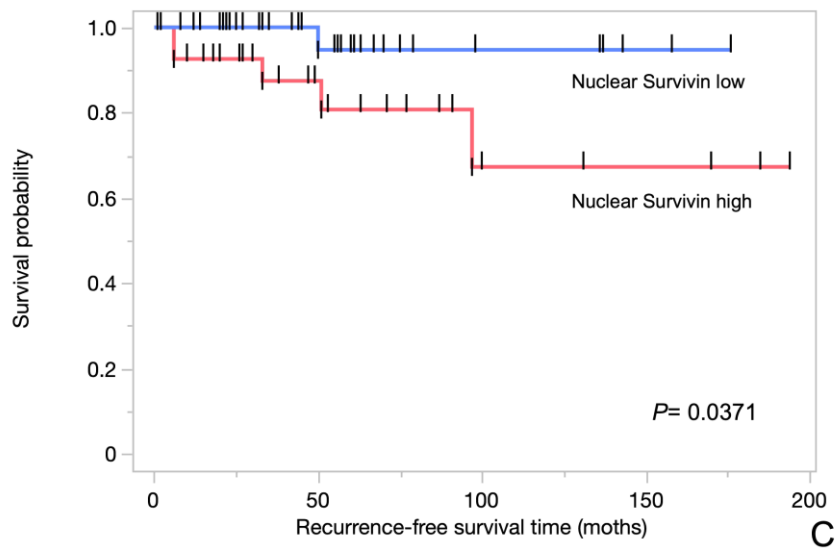


図 10. Survivin 発現と生存曲線

(A) 核内 Survivin 発現と全生存期間 (B) 細胞質内 Survivin 発現と全生存期間 (C) 核内 Survivin 発現と無増悪生存期間 (D) 細胞質内 Survivin 発現と無増悪生存期間

表 4. 核内 Survivin 発現と臨床病理学的特徴の比較

臨床病理的特徴	患者数	核内 Survivin 低発現	核内 Survivin 高発現	P 値
年齢				
<60	40	18	22	0.0025
≥60	34	27	7	
性別				
男	30	18	12	0.9061
女	44	27	17	
腫瘍局在				
臍頭部	29	14	15	0.0762
臍体尾部	45	31	14	
腫瘍径				
<2cm	42	33	9	0.0003
≥2cm	32	12	20	
リンパ節転移				
N0	57	40	17	0.0025
N1	17	5	12	
肝転移				
M0	66	44	21	0.0018
M1	9	1	8	
機能性				
非機能性	53	27	26	0.0037
機能性	21	18	3	
Ki-67				
<3%	40	28	12	0.079
≥3%	34	17	17	
Mitotic index				
<2%/10HPF	59	37	22	0.5064
≥2%/10HPF	15	8	7	

考察

近年、ペプチドワクチンを使用した免疫治療の臨床試験が広く行われている (Tarhini et al. 2012; Maslak et al. 2018; Pavlick et al. 2020)。膵・消化管 NEN において腫瘍の進行とともに核内 Survivin 発現は増加し、予後不良と関連し、Ki-67 指数と相関していたとの報告がある (Grabowski et al. 2005; Hanif et al. 2020)。そこで多くの腫瘍関連抗原の中から Survivin に注目した。

Survivin ワクチンを用いた臨床試験に関する先行研究では、その安全性と細胞性および液性免疫応答の誘導における限定的な有効性が示されている (Fenstermaker et al. 2016; Shima et al. 2019; Turuma et al. 2004)。実際、神経膠腫に対して Survivin ワクチンと補助化学療法を併用した最新の第 IIa 相試験では、放射線療法と補助化学療法に比べ、無増悪生存期間が有意に延長した (6 ヶ月無増悪生存率: 95.2% 対 54%; $P < 0.0001$) (Ahluwalia et al. 2023)。この研究では Survivin ワクチンが Survivin 特異的 CD8+ T 細胞と抗 Survivin 抗体を誘導したことが示された。さらに、ロズウェルパークのスピンオフ企業 Mimivax が神経膠腫の治療用に開発した Survivin を標的とする 15 アミノ酸の合成ペプチドワクチンである SurVaxM の、転移性 NEN に対する第 I 相試験が進行中である (Gupta et al. 2021)。また、HLA-A24 は日本人の約 60% に認められることから、HLA-A24 拘束性免疫療法は日本人患者に適している。しかし HLA-A24 拘束性免疫反応を誘導する可能性のある Survivin-2B 80-88 ペプチドが、NEN の治療に有用かどうかを明らかにした研究は今までに報告されていない。

Survivin は従来細胞内蛋白と考えられていたが、多くの癌細胞の細胞膜表面にも発現している (Fenstermaecker et al. 2018)。癌患者の血中に抗 Survivin 抗体、Survivin 特異的 CTL が存在し、さらには乳癌、大腸癌、膵癌、黒色腫患者の PBMC 中に Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞が存在することが報告されている (Idenoue et al. 2005; Shima et al. 2019; Tsuruma et al. 2004)。本研究では Tetramer 染色により NEN 患者 7 例中 3 例に Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞が確認された。さらには Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞陽性であった 3 例のうち 2 例は手術により Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞が陰性化した。これらの知見により、NEN に発現する Survivin は抗原性を有しており、Survivin-2B 80-88 ペプチドは HLA-A24 陽性 NEN 患者の T 細胞に認識され得ることが示唆された。Patient 4 は手術により Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞は陰性化しなかったが、その原因として以下のことが考えられる。Circulating tumor cells (CTCs) は原発巣から放出され、血流に乗って循環移

動するとされている (Lin et al. 2021)。CTCs は MHC class I、CD47、PD-L1、FAS Ligand の発現を調節することにより免疫監視から逃避し、CTCs の血管外漏出中に免疫細胞と相互作用することにより転移巣を形成する (Zhong et al. 2020)。Patient 4 は直腸 NEN 術後肝転移に対し肝切除を施行した症例である。肝転移を有していたため CTCs の存在が示唆され、CTCs により Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞が産生されているため、術後に Survivin-2B 80-88 CTL 前駆細胞が減少しなかったと推察した。

Hirohashi ら (Hirohashi et al. 2002) の報告によると、担癌患者の PBMC より作成された HLA-A24 拘束性 CTL は HLA-A24、Survivin 陽性の細胞株である 888-mel cells (黒色種)、LHK-2 cells (肺腺癌) に対し細胞障害活性を示した。本研究では同様に HLA-A24 拘束性 CTL が HLA-A24 陽性 NEN に対し IFN- γ を発現するかを検討した。結果、Survivin-2B 80-88 CTL は QGP-1 単独に対して IFN- γ を発現しなかったが Survivin ペプチドで共培養した QGP-1 に対しては IFN- γ を発現した。RT-PCR で QGP-1 の Survivin-2B mRNA の発現が低値であることが示されており、QGP-1 の Survivin 発現が IFN- γ 発現を誘導するには不十分であったためと推測した。

免疫療法などの標的治療の前提条件として重要なのは腫瘍内に抗原などの標的構造が発現していることである。そこで本研究では膵 NEN に対し手術を施行した連続 74 症例に対し Survivin の免疫組織化学染色を施行した。様々な癌腫で Survivin の発現が予後不良因子であることが報告されており

(Oparina et al. 2021; Vay et al. 2022)、Krieg ら (Krieg et al. 2022) のメタ解析では膵・消化管 NEN の核内 Survivin の高発現例では有意に全生存期間が短く、NET G3 では G1/2 と比較し有意に核内 Survivin の発現が高い結果であった。また、Chu ら (Chu et al. 2012) は大腸癌において Survivin 発現がリンパ節転移の独立予測因子であったと報告しており、大腸癌、胃癌、非小細胞肺癌、前立腺癌で Survivin 発現と腫瘍浸潤、転移との相関が示唆されている (Yang et al. 2006; Yie et al. 2009; Zhang et al. 2010; Zhang et al. 2014)。

本研究においても核内 Survivin 高発現群で有意に無増悪生存期間が短く、さらに Survivin 発現はリンパ節転移や肝転移と相関していた。しかしながら転移のメカニズムにおける Survivin の直接的な役割は分かっていない。遠隔転移の最初のステップは浸潤であり (Galloway et al. 2017; Hanahan et al. 2000)、上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition : EMT) により細胞接着分子である E-カドヘリンや β -カテニンを喪失し、N-カドヘリンやビメンチンを発現することにより浸潤が起こるとされている (Huber et al. 2005)。肝細胞癌では Survivin mRNA や Survivin 蛋白の過剰発現が EMT を刺激することが示されている (Yu et al. 2021)。また、Liu ら (Liu et al. 2018) はイン

スリン様成長因子 I が Survivin の活性化を介して EMT を誘導すると報告している。これらの報告や本研究結果と併せ、Survivin は NEN において遠隔転移のマーカーである可能性は考えられる。また、Survivin は染色体パセンジャー複合体の重要な構成要素であり、細胞分裂の際の染色体の適切な分離と細胞質分裂に関与している (Li et al. 1999)。Yosikawa ら (Yoshikawa et al. 2018) は術前化学療法を施行した直腸癌患者において細胞増殖能のマーカーである Ki-67 と Survivin の有意な相関を報告している。本研究においても Survivin 高発現群において Ki-67 が高い傾向にあったが、有意差は得られなかった ($P=0.079$)。少数例の検討であったため、多数例での検討が必要と考える。

近年、従来の組織生検とは異なる概念であるリキッドバイオプシーが注目されている。リキッドバイオプシーは、診断や治療前の予後予測だけでなく、繰り返しの採取が簡便であることから治療中の癌の進行再発のモニタリングにも応用できる可能性が高まっている。末梢血中の腫瘍関連蛋白は腫瘍マーカーとして普及しており、リキッドバイオプシーの先駆けといえる。NEN においてはクロモグラン A、ニューロン特異的エノラーゼが腫瘍マーカーとして知られている。Khan ら (Khan et al. 2014) は、乳癌患者の血清中に Survivin がエクソソームを介して腫瘍細胞から放出され、すべての乳癌検体で Survivin 濃度が対照群よりも有意に高かったと報告している。さらに、血清 Survivin 濃度は膵管癌患者において有意に上昇し、独立した予後因子であると報告されている (Dong et al. 2015; Ren et al. 2014)。一方で大腸癌患者の血清 Survivin 濃度は健常対照群よりも有意に低く、血清 Survivin 濃度と臨床病理学的パラメータとの間には相関は認められなかった (Jakubowska et al. 2016)。本研究では血清 Survivin 値は NEN 患者で健常対照群より有意に低い結果であり、乳癌や膵管癌とは対照的に Survivin は NEN 細胞からエクソソームを介して放出されていない可能性が考えられた。従って NEN における血清 Survivin がリキッドバイオプシーとして臨床的に有効であるとは現時点では言い難く、さらなる検討が必要である。

本研究にはいくつかの limitation が挙げられる。第 1 に、NEN は希少腫瘍であるため、サンプルサイズが限られていた。第 2 に Survivin-2B 80-88 CTL clone は NEN 患者由来の PBMC ではなく、Survivin-2B の発現が低いため、HLA-A24 陽性神経内分泌細胞株単独に対して IFN- γ 発現が乏しい結果であった。第 3 に Tetramer 染色の際に NEN 腫瘍検体の HLA-A24 や Survivin-2B の発現を評価していないこと、NEN 細胞株や膵 NEN 組織標本の Survivin-2B の発現を評価していないことが挙げられる。第 4 に Survivin-2B が高発現している症例のみに本免疫療法が限定される可能性があり、生検または外科

的切除検体を使用した RT-PCR または免疫組織化学的検査によるスクリーニングが本免疫療法の候補を選択するのに有用である。

結論として、NEN 中の Survivin には抗原性があり、NEN は Survivin-2B CTL 前駆体を介して細胞性免疫を誘導する可能性がある。Survivin を標的とした免疫療法は特に Survivin が高発現している NEN の治療に有用である可能性が示唆された。

結論

①本研究により、申請者は以下の新知見を得た。

1. NEN 中の Survivin には抗原性があることを示した。NEN は Survivin-2B 80-88 CTL 前駆体を介して細胞性免疫を誘導する可能性がある。
2. Survivin-2B 80-88 CTL は Survivin ペプチドと共培養した NEN 細胞株に対し HLA-A24 依存的に IFN- γ を発現した。
3. 核内 Survivin 高発現群で有意に無増悪生存期間が短く、さらに Survivin 発現がリンパ節転移や肝転移と相関していた。

②新知見の意義

これまで NEN の転移に対し手術、分子標的薬、経動脈的化学塞栓療法を組み合わせた集学的治療が推奨されているが効果は限定的である。Survivin による免疫療法が NEN 治療の選択肢の 1 つとなる可能性がある。特にリンパ節転移例や肝転移例など、高度進行例に対する治療効果が期待される。

③本研究で得た新知見から今後どのような研究が展開されうるか

NEN 患者に対し Survivin ワクチンを投与し、腫瘍縮小効果の判定やワクチン投与前後での Survivin 2B 80-88 CTL 前駆細胞の頻度の変化を検証すべきである。本治療にソマトスタチンアナログや mTOR 阻害剤などの従来薬や免疫チェックポイント阻害剤を組み合わせることで、より効果的な抗腫瘍効果を発揮する新規治療法の開発も期待される。

④今後の課題

NEN は希少腫瘍であり、さらに HLA-A24 陽性患者に限定される結果であったため、本研究では絶対的にサンプルが不十分であった。集学的治療が必要な希少腫瘍であるため、全国的に症例を集積し、より多くの症例での解析が必要である。

細胞性免疫だけでなく、液性免疫の観点からリキッドバイオプシーとしての血清 Survivin や抗 Survivin 抗体の有用性、治療法としての抗 Survivin 抗体の有用性についてもさらなる検討が必要である。

NEN における Survivin と転移のメカニズムの検証も今後の課題である。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂いた、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室Ⅱ 平野 聡 教授に深く感謝致します。

本研究において、多大なご指導をいただいた北海道大学病院 消化器外科Ⅱ 土川貴裕 先生、札幌医科大学病理学第一講座 鳥越 俊彦 名誉教授、廣橋 良彦 准教授、学位論文作製にあたり、病理学解析において御協力をいただきました北海道大学病理部ゲノム・コンパニオン診断研究部 畑中 豊 特任准教授に深く感謝いたします。

最後に、本研究を支えてくださった北海道大学大学院医学研究院 消化器外科学教室Ⅱの全ての皆様に心より御礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Ambrosini G, Adida C and Altieri DC (1997) A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3, 917–921.

Altieri DC (2006) The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr Opin Cell Biol* 18, 609–615.

Ahluwalia MS, Reardon DA, Abad AP, Curry WT, Wong ET, Figel SA, Mechtler LL, Peereboom DM, Hutson AD, Withers HG, et al (2023) Phase IIa study of SurVaxM plus adjuvant temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol* 41, 1453–1465.

Chu XY, Chen LB, Wang JH, Su QS, Yang JR, Lin Y, Xue LJ, Liu XB and Mo XB (2012) Overexpression of survivin is correlated with increased invasion and metastasis of colorectal cancer. *J Surg Oncol* 105, 520–528.

Claire M, Nitya PR, Jennifer AC, Rahul RA, Pelin C, Thomas AH, Kanti K, Li Z, Susan C, Jennifer AG, et al (2019) Phase II study of pembrolizumab-based therapy in previously treated extrapulmonary poorly-differentiated neuroendocrine carcinomas: Results of Part A (pembrolizumab alone). *J clin Oncol* 37, 4.

De Necochea-Campio R, Chen CS, Mirshahidi S, Howard FD and Wall NR (2013) Clinico-pathologic relevance of Survivin splice variant expression. *Cancer Lett* 339, 167-174.

Dong H, Qian D, Wang Y, Meng L, Chen D, Ji X and Feng W (2015) Survivin expression and serum levels in pancreatic cancer. *World J Surg Oncol* 13, 189.

Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, Shih T and Yao JC (2017) Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol* 3, 1335-1342.

Daniel MH, Suyu L, Arvind D, David F, Priya B, Armeen M, Jeannelyn SE, Laura R, Ajaykumar CM, Mark K et al (2022) Assessment of Clinical Response Following

Atezolizumab and Bevacizumab Treatment in Patients With Neuroendocrine Tumors: A Nonrandomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 1, 904-909.

Frilling A, Modlin IM, Kidd M, Russell C, Breitenstein S, Salem R, Kwekkeboom D, Lau WY, Klersy C, Vilgrain, V, et al (2014) Recommendations for management of patients with neuroendocrine liver metastases. *Lancet Oncol* 15, e8–21.

Fenstermaker RA, Ciesielski MJ, Qiu J, Yang N, Frank CL, Lee KP, Mechtler LR, Belal A, Ahluwalia MS and Hutson AD (2016) Clinical study of a survivin long peptide vaccine (SurVaxM) in patients with recurrent malignant glioma. *Cancer Immunol Immunother* 65, 1339–1352.

Fenstermaker RA, Figel SA, Qiu J, Barone TA, Dharma SS, Winograd EK, Galbo PM, Wiltsie LM and Ciesielski MJ (2018) Survivin monoclonal antibodies detect survivin cell surface expression and inhibit tumor growth in vivo. *Clin Cancer Res* 24, 2642–2652.

Feng Z, He X, Zhang X, Wu Y, Xing B, Knowles A, Shan Q, Miller S, Hojnacki T, Ma J, et al (2022) Potent suppression of neuroendocrine tumors and gastrointestinal cancers by CDH17CAR T cells without toxicity to normal tissues. *Nat Cancer* 3, 581–594.

Grabowski P, Griss S, Arnold CN, Hörsch D, Göke R, Arnold R, Heine B, Stein H, Zeitz M and Scherübl H (2005) Nuclear survivin is a powerful novel prognostic marker in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor disease. *Neuroendocrinology* 81, 1–9.

Galloway NR, Ball KF, Stiff T and Wall NR (2017) Yin Yang 1 (YY1): Regulation of Survivin and Its Role in Invasion and Metastasis. *Crit. Rev. Oncog* 22, 23–36.

Gupta M, Fenstermaker RA, Qiu JX and Iyer RV (2021) A phase I study of safety and immunogenicity of survivin long peptide vaccine (SurVaxM) in patients (pts) with metastatic neuroendocrine tumors (NETs). *J Clin Orthod* 39 (3_suppl), TPS375–TPS375.

Hanahan D and Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.

Hirohashi Y, Torigoe T, Maeda A, Nabeta Y, Kamiguchi K, Sato T, Yoda J, Ikeda H, Hirata K, Yamanaka N, et al (2002) An HLA-A24-Restricted cytotoxic T lymphocyte epitope of a tumor-associated protein, survivin. *Clin Cancer Res* 8, 1731–1739.

Huber MA, Kraut N, and Beug H (2005) Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17, 548–58.
Himani G, Prerna S, Jagdish CG, G. P. Talwar, and Shweta D (2016) Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell International* 16, 49.

Hanif A, Lee S, Gupta M, Chander A, Kannisto ED, Punnanitnont A, Fenstermaker R, Ciesielski M, Attwood K, Qiu J, et al (2020) Exploring the role of survivin in neuroendocrine neoplasms. *Oncotarget* 11, 2246–2258.

Idenoue S, Hirohashi Y, Torigoe T, Sato Y, Tamura Y, Hariu H, Yamamoto M, Kurotaki T, Tsuruma T, Asanuma H, et al (2005) A potent immunogenic general cancer vaccine that targets survivin, an inhibitor of apoptosis proteins. *Clin Cancer Res* 11, 1474–1482.

Ilyas S and Yang JC (2015) Landscape of tumor antigens in T cell immunotherapy. *J Immunol* 195, 5117–5122.

Jakubowska K, Pryczynicz A, Dymicka-Piekarska V, Famulski W and Guzińska-Ustymowicz K (2016) Immunohistochemical expression and serum level of survivin protein in colorectal cancer patients. *Oncol Lett* 12, 3591–3597.

Kono K, Iinuma H, Akutsu Y, Tanaka H, Hayashi N, Uchikado Y, Noguchi T, Fujii H, Okinaka K, Fukushima R, et al (2012) Multicenter, phase II clinical trial of cancer vaccination for advanced esophageal cancer with the peptides derived from novel cancer testis antigens. *J Transl Med* 10, 141.

Khan S, Bennit HF, Turay D, Perez M, Mirshahidi S, Yuan Y and Wall NR (2014) Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer. *BMC Cancer* 14, 176.

Krieg S, Roderburg C, Fung S, Luedde T, Knoefel WT and Krieg A (2022) Nuclear survivin is a prognosticator in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: a meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 148, 2235–2246.

Li F, Ambrosini G, Chu EY, Plescia J, Tognin S, Marchisio PC and Altieri DC (1998) Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature* 396, 580–584.

Li F, Ackermann EJ, Bennett CF, Rothermel AL, Plescia J, Tognin S, Villa A, Marchisio PC and Altieri DC (1999) Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol* 1, 461–466.

Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.

Li F (2005) Role of Survivin and its splice variants in tumorigenesis. *Br J Cancer* 92, 212–216.

Liu F, Sun Y, Liu B, Lu J, Li H, Zhu H, Gao H, Zhou X and Chang H (2018) Insulin-like growth factor-1 induces epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma by activating survivin. *Oncol Rep* 40, 952–958.

Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, Zhu F, Zhou D, Zheng S, Chen Y, et al (2021) Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduct Target Ther* 6, 404.

Man D, Wu J, Shen Z and Zhu X (2018) Prognosis of patients with neuroendocrine tumor: a SEER database analysis. *Cancer Manag Res* 10, 5629–5638.

Masui T, Ito T, Komoto I and Uemoto S (2020) Recent epidemiology of patients with gastro-entero-pancreatic neuroendocrine neoplasms (GEP-NEN) in Japan: a population-based study. *BMC Cancer* 20, 1104.

Maslak PG, Dao T, Bernal Y, Chanel SM, Zhang R, Frattini M, Rosenblat T, Jurcic JG, Brentjens RJ, Arcila ME, et al (2018) Phase 2 trial of a multivalent WT1 peptide vaccine (galinpepimut-S) in acute myeloid leukemia. *Blood Adv* 2, 224–234.

Mandriani B, Pellè E, Mannavola FA, Palazzo A, Marsano RM, Ingravallo G, Cazzato G, Ramello MC, Porta C, Strosberg J, et al (2022) Development of anti-somatostatin receptors CAR T cells for treatment of neuroendocrine tumors. *J Immunother Cancer* 10, e004854.

Obara W, Eto M, Mimata H, Kohri K, Mitsuhashi N, Miura I, Shuin T, Miki T, Koie T, Fujimoto H, et al (2017) A phase I/II study of cancer peptide vaccine S-288310 in patients with advanced urothelial carcinoma of the bladder. *Ann Oncol* 28, 798-803.

Oparina N, Erlandsson MC, Beding AF, Parris T, Helou K, Karlsson P, Einbeigi Z and Bokarewa MI (2021) Prognostic significance of BIRC5/Survivin in breast cancer: results from three independent cohorts. *Cancers* 13, 2209.

Pavlick A, Blazquez AB, Meseck M, Lattanzi M, Ott PA, Marron TU, Holman RM, Mandeli J, Salazar AM, McClain CB, et al (2020) Combined vaccination with NY-ESO-1 protein, poly-ICLC, and montanide improves humoral and cellular immune responses in patients with high-risk melanoma. *Cancer Immunol Res* 8, 70–80.

Peiwen WU, Dongjie He, Hao Chang and Xiaozhi Zhang (2023) Epidemiologic trends of and factors associated with overall survival in patients with neuroendocrine tumors over the last two decades in the USA. *Endocr Connect* 12, e230331.

Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, et al (1998) Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4, 321–327.

Rosenberg, SA (1999) A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10, 281–287.

Roland HS, Wolf M and Shirley KK (2007) Nuclear and Cytoplasmic Survivin: Molecular Mechanism, Prognostic, and Therapeutic Potential. *Cancer Res* 67, 5999-6002.

Ren YQ, Zhang HY, Su T, Wang XH and Zhang L (2014) Clinical significance of serum survivin in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 18, 3063–3068.

Shima H, Tsurita G, Wada S, Hirohashi Y, Yasui H, Hayashi H, Miyakoshi T, Watanabe K, Murai A, Asanuma H, et al (2019) Randomized phase II trial of survivin 2B peptide vaccination for patients with HLA-A24-positive pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Sci* 110, 2378–2385.

Tsuruma T, Hata F, Torigoe T, Furuhashi T, Idenoue S, Kurotaki T, Yamamoto M, Yagihashi A, Ohmura T, Yamaguchi K, et al (2004) Phase I clinical study of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent colorectal cancer. *J Transl Med* 2, 19.

Tarhini AA, Leng S, Moschos SJ, Yin Y, Sander C, Lin Y, Gooding WE and Kirkwood JM (2012) Safety and immunogenicity of vaccination with Mart 1 (26–35, 27L), gp100 (209–217, 210M), and tyrosinase (368–376, 370D) in adjuvant with PF-3512676 and GM-CSF in metastatic melanoma. *J Immunother* 35, 359–366.

Tsuruta M, Nishimura Y (2018) The Present Status and Future Prospects of Cancer Immunotherapy Using Active Immunization of Tumor-Associated Antigens. *Major Histocompatibility Complex* 25, 40-49.

Ueno T, Tsuchikawa T, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Mitsunashi T, Nakanishi, Y.; Noji, T.; Nakamura, T.; Okamura, K, Matsuno Y, et al (2018) Prognostic impact of programmed cell death ligand 1 (PD-L1) expression and its association with epithelial-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncotarget* 9, 20034–20047.

Vay C, Babaei S, Safi SA, Dizdar L, Rehders A, Haeberle L, Roderburg C, Loosen SH, Esposito I, Knoefel WT, et al (2022) Clinicopathological and prognostic value of survivin expression in surgically resected pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancers* 14, 3494.

Yang D, Schneider S, Azuma M, Iqbal S, El-Khoueiry A, Groshen S, Agafitei D, Danenberg KD, Danenberg PV, Ladner RD, et al (2006) Gene expression levels of

epidermal growth factor receptor, survivin, and vascular endothelial growth factor as molecular markers of lymph node involvement in patients with locally advanced rectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 6, 305–11.

Yie SM, Lou B, Ye SR, He X, Cao M, Xie K, Ye NY, Lin R, Wu SM, Xiao HB, et al (2009) Clinical significance of detecting survivin-expressing circulating cancer cells in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 63, 284–90.

Yoshitake Y, Fukuma D, Yuno A, Hirayama M, Nakayama H, Tanaka T, Nagata M, Takamune Y, Kawahara, Nakagawa Y et al (2015) Phase II clinical trial of multiple peptide vaccination for advanced head and neck cancer patients revealed induction of immune responses and improved OS. *Clin Cancer Res* 21, 312-321.

Yoshikawa K, Shimada M, Higashijima J, Nakao T, Nishi M, Takasu C, Kashiwara H, Eto S and Bando Y (2018) Ki-67 and survivin as predictive factors for rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Anticancer Res* 38, 1735–1739.

Yu J, Wang Z, Zhang H, Wang Y and Li DQ (2021) Survivin-positive circulating tumor cells as a marker for metastasis of hepatocellular carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 27, 7546–62.

Zhong X, Zhang H, Zhu Y, Liang Y, Yuan Z, Li J, Li J, Li X, Jia Y, He T, et al (2020) Circulating tumor cells in cancer patients: developments and clinical applications for immunotherapy. *Mol Cancer* 19, 15.

赜・消化管神経内分泌腫瘍（NEN）診療ガイドライン 2019年第2版
NCCN Guidelines Version 1. 2025
https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/neuroendocrine.pdf