

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月7日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10687

研究課題名(和文) 免疫チェックポイント阻害薬の新規バイオマーカーの抽出とその臨床応用

研究課題名(英文) Novel biomarker analysis predicting efficacy of immune checkpoint inhibitors

## 研究代表者

鈴木 弘行 (SUZUKI, HIROYUKI)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30322340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：免疫チェックポイント阻害薬の効果予測バイオマーカーを網羅的に解析した。約200例の肺癌組織検体から次世代シーケンサーを用いて全エクソーム解析を行いTMBのデータを抽出し、PD-L1や腫瘍浸潤リンパ球或いは各種Driver遺伝子異常等のパラメータとの関連について解析を行い、報告してきた。その結果TMBはPD-L1や腫瘍浸潤リンパ球の多寡とは直接関連せず、ICIのバイオマーカーを考慮する際にはこれらの因子を複合的に解析する必要性を提唱した。さらにTMBの臨床的意義を明らかにするべく検討を行った結果、世界で初めてTMBの多寡が肺癌の予後と有意な関連を認めることを明らかにし、報告した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害薬のバイオマーカーの抽出は症例の選択や医療経済的にも重要な課題である。今回の我々の検討結果の意義は単独では十分ではない個々のパラメータを複合的に解析することでより効果的なバイオマーカーとなることを明らかにした点にある。さらに、腫瘍の遺伝子変異数が肺癌の予後に関連するという結果は今後拡大されるであろう周術期での免疫チェックポイント阻害薬の治療選択を考慮するうえで、重要な基礎的知見となるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：We analyzed whole exome sequencing for over 200 cases of patients with non-small cell lung cancer specimen by using next generation sequencing technique to look at the predictive biomarkers for immune checkpoint inhibitors. And relationship among tumor mutation burden, PD-L1 expression, tumor infiltrating lymphocytes and several specific gene alterations were studied. We found no clear correlations among those parameters, therefore we proposed combination analysis by using those parameters. Furthermore, we found the novel findings that the amount of tumor mutation burden strongly correlated with prognosis of patients with non small cell lung cancer.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：がん免疫 免疫療法 免疫チェックポイント阻害薬 バイオマーカー

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

## 1 . 研究開始当初の背景

近年、固形癌の領域で ICI が有効であることが明らかにされ、本邦ではすでに PD-1 抗体がメラノーマで承認されている。肺癌に対しても使用可能となる見込みである。その一方で、これらの薬剤の効果を予測するバイオマーカー研究が盛んに行われている。これまでは、腫瘍における PD-L1 の発現と治療効果に関する研究が多くなされてきた。しかしながら、PD-L1 の発現の評価は免疫組織学的手法によって行われるため、抗体の種類や染色法、あるいは評価(カットオフ値の設定等)が研究毎に様々であることや、PD-L1 陰性症例でも一定の有効症例が存在することが示されるようになり、PD-L1 の評価のみでは効果予測のバイオマーカーとして充分でないという議論がなされるようになった。このような背景のなか、ごく最近になって、ミスマッチ修復機構の有無が大腸癌における ICI 治療の効果予測因子となることが示された。加えて、腫瘍における遺伝子変異の多寡、いわゆる mutation burden (TMB) がその治療効果と密接に関連する可能性についても研究が開始されている。腫瘍における種々の遺伝子異常は Neo-antigen と呼ばれる腫瘍抗原の供給源となる。従って、その多寡は免疫療法の治療効果と平行となることは想像でき、TMB の多寡が ICI の治療効果予測因子となることは合理的な結果である。しかし腫瘍における遺伝子変異を網羅的に定量的に解析することは容易ではなく、臨床応用は困難と考えられ、より簡便な方法によるバイオマーカーの抽出同定が必要と考えられている。

## 2 . 研究の目的

免疫チェックポイント阻害剤(ICI)が開発されその有効性が明らかにされている。その効果が期待される一方で ICI の効果を予測するバイオマーカーの抽出が重要と考えられるようになった。現在主に検討されているのは、腫瘍における PD-L1 分子の発現であるが、その有用性については議論が残されている。

最近、ICI の効果予測因子として腫瘍の遺伝子変異の多寡が重要であるとする報告がなされた。腫瘍の遺伝子変異の多寡は腫瘍抗原の多寡に直結するため、ICI の効果予測因子としては合理的であるが、肺癌におけるデータは少なく、しかも遺伝子変異解析を網羅的に行う手法は実臨床への応用は難しい。そこで本研究では、肺癌における遺伝子変異の多寡と治療効果との関連を、我々がすでに確立している全エキソーム解析等を用いて網羅的に解析し、肺癌における有用性を確認するとともに、実臨床でも応用可能な、より簡便な評価手法の開発を試みる。

## 3 . 研究の方法

I . バイオマーカーの抽出のステップ：ゲノム解析で TMB の多寡と関連する因子を抽出する。腫瘍浸潤リンパ球、PD-L1、ミスマッチ修復関連分子、DNA 修復遺伝子群と TMB の多寡との関連を抽出。

II . バイオマーカーの検証のステップ：I . のステップで抽出した因子の有用性の検証。まず、in vitro にて ICH によるリンパ球の活性化の程度を確認し、抽出した因子との関連性を検討。ついで、前向き臨床試験を行い、実際の臨床効果と抽出された因子の関連性を確認し、臨床応用への可能性を検討。

### I . バイオマーカーの抽出

次世代シーケンサーを用い、全エキソーム解析を実施。その結果から症例毎の TMB を定量化する。これまで、すでに解析の終了している 100 例に加えさらに 100 例を解析(図 1)。

同様に、ミスマッチ修復に関連する遺伝子群（MLH1，MSH2，MSH6，PMS2 等）の発現解析を免疫組織学的手法および real-time PCR を用いて、定量化してデータベース化する。

## II. バイオマーカーの検証

I. の結果と腫瘍浸潤リンパ球の頻度及び、腫瘍の PD-L1 発現との相関を解析し基礎的データとして保持する。

I. の結果を基に、TMB の多寡と相関して発現を認める分子の抽出同定を行う。抽出した分子の発現或いは遺伝子変異と PD-L1 および、腫瘍浸潤リンパ球の多寡についての関連性についても検討する。p53, p16 を始めとした DNA 修復に関連する分子群から網羅的に解析を行うが、実際にはエクソーム解析とペアで行っている遺伝子発現プロファイルの結果も随時参照しながら、より有用性の高い遺伝子の絞込みを行う。

## 4. 研究成果

(1) 当初の計画どおり約 200 例の肺癌組織検体から次世代シーケンサーを用いて全エクソーム解析を行い TMB のデータを抽出し、PD-L1 や腫瘍浸潤リンパ球或いは各種 Driver 遺伝子異常等のパラメータとの関連について解析を行った。

(2) TMB の surrogate marker として TP53 の異常が強く関連することを明らかにした(表 1)。さらに TP53 の変異部位と TMB の多寡に関連性があることを見出した(図 2)。このことは近年報告されている TP53 が免疫チェックポイント阻害薬の効果予測因子となる可能性を支持する重要な知見である (Nature 554, 2018)。

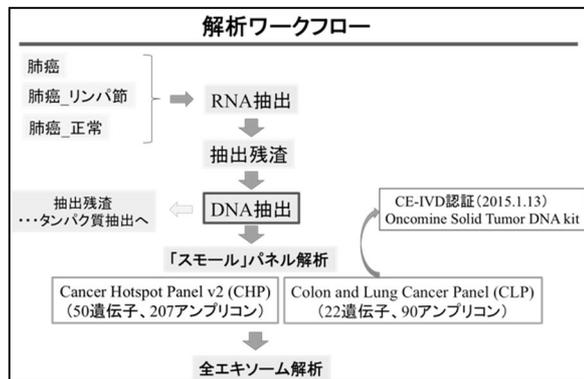
表 1

Explanatory variable	$\beta$ (95%CI)	p value(<0.05)
Squamous cell carcinoma	-14.47 (-89.9 61.0)	0.6993
EGFR-mutation +	-73.25 (-133.7 12.8)	0.0180
TP53-alternation +	72.72 (14.7 130.8)	0.0147
Age	-1.81 (-5.6 2.0)	0.3369
Male	-6.98 (-76.3 62.3)	0.8391
Brinkman Index	0.02 (-0.05 0.09)	0.5541
PD-L1 expression	-18.98 (-54.7 16.7)	0.2872

(3) 大腸癌等で ICI のバイオマーカーとされているミスマッチ修復遺伝子の異常についても、検討を行ったものの肺癌検体ではその発生頻度が著しく低いことから、臨床的意義は乏しいものと考え、これ以上の検討は行わないこととした。

(4) 腫瘍浸潤リンパ球についても検討を行っている。腫瘍浸潤リンパ球の多寡については、当科で ICI の治療を行った症例において有意に効果と関連することを明らかにした。また腫瘍浸潤リンパ節の多寡だけでなく、腫瘍内の 3 次リンパ節組織様構造の多寡が肺癌症例の予後に関連することを明らかにしている(図 2, 未発表データ)。さらに、腫瘍局所には CD62L 陰性が

図 1



つCD39陽性の活性化抗原特異的と考えられるT細胞が多く浸潤していることを明らかにしている(図3)。

図2

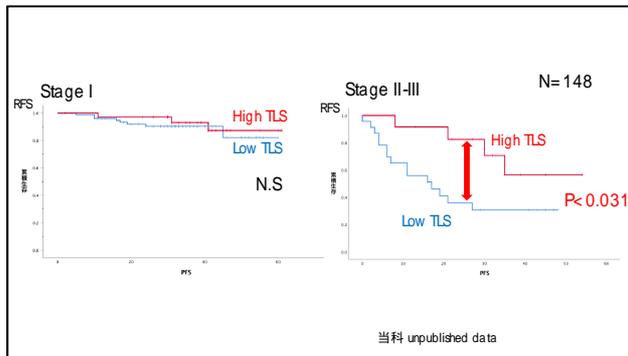
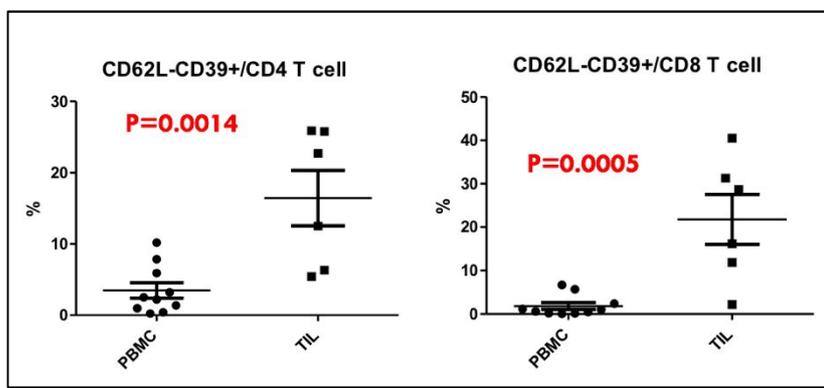


図3



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

- 1) Yuki Matsumura, Yuki Owada-Ozaki, Hiroyuki Suzuki. Significance of testing for TP53 gene mutations in lung adenocarcinoma using targeted gene sequencing. Journal of Thoracic Disease. 10(Suppl 33): S4147-S4150, 2018 Nov. doi: 10.21037/jtd.2018.10.66.
- 2) 尾崎有紀, 西山恭子, 小林敬広, 錫谷達夫, 鈴木弘行. 特集 免疫腫瘍学(Immuno-Oncology)の夜明け Immuno-Oncology におけるバイオマーカー検索 腸内環境と免疫チェックポイント阻害薬の関係 . 癌と化学療法. 45(9): 1234-1237, 2018
- 3) Yuki Owada-Ozaki, Satoshi Muto, Hironori Takagi, Takuya Inoue, Yuzuru Watanabe, Mitsuro Fukuhara, Takumi Yamaura, Naoyuki Okabe, Yuki Matsumura, Takeo Hasegawa, Jun Ohsugi, Mika Hoshino, Yutaka Shio, Hideaki Nanamiya, Jun-ichi Imai, Takao Isogai, Shinya Watanabe, Hiroyuki Suzuki. Prognostic Impact of Tumor Mutation Burden in Patients With Completely Resected Non-Small Cell Lung Cancer: Brief Report. Journal of Thoracic Oncology. 13(8):1217-1221, 2018 Aug. doi: 10.1016/j.jtho.2018.04.003.
- 4) Yuki Owada-Ozaki, Yuki Matsumura, Hiroyuki Suzuki. VV-ECMO during subsequent segmentectomy after right pneumonectomy. Journal of Surgical Case Reports. 2018(2): rjy213, 2018 Aug 28. doi: 10.1093/jscr/rjy213.
- 5) Motonobu Saito, Kouya Shiraishi, Akiteru Goto, Hiroyuki Suzuki, Takashi Kohno, Koji Kono. Development of targeted therapy and immunotherapy for treatment of small cell lung cancer. Japanese Journal of Clinical Oncology. 48(7): 603-608, 2018 Jul 1. doi: 10.1093/jjco/hyy068.
- 6) Kazuyoshi Takeda, Kazutaka Kitaura, Ryuji Suzuki, Yuki Owada, Satoshi Muto, Naoyuki Okabe, Takeo Hasegawa, Jun Osugi, Mika Hoshino, Takuya Tsunoda, Ko Okumura, Hiroyuki Suzuki. Quantitative T-cell repertoire analysis of peripheral blood mononuclear cells from lung cancer patients following long-term cancer peptide vaccination. Cancer

〔学会発表〕(計 14 件)

- 1) 尾崎有紀, 高木玄教, 渡部晶之, 井上卓哉, 武藤哲史, 岡部直行, 長谷川剛生, 塩豊, 七宮英晃, 磯貝隆夫, 渡辺慎哉, 鈴木弘行. Tumor Mutation burden は肺癌の予後因子となり得るか. 第 31 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 2018.12.13-14 東京
- 2) 渡部晶之, 高木玄教, 尾崎有紀, 井上卓哉, 武藤哲史, 岡部直行, 長谷川剛生, 塩豊, 鈴木弘行. 非小細胞肺癌における末梢血リンパ球と腫瘍浸潤リンパ球での抑制系共分子発現の比較. 第 31 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 2018.12.13-14 東京
- 3) 武藤哲史, 深井智司, 峯勇人, 高木玄教, 尾崎有紀, 渡部晶之, 岡部直行, 長谷川剛生, 塩豊, 鈴木弘行. 非小細胞肺癌における  $\beta$ -catenin と癌免疫微小環境の検討. 第 59 回日本肺癌学会学術集会 2018.11.29-12.1 東京
- 4) 岡部直行, Park Wubgki, 高木玄教, 渡部晶之, 尾崎有紀, 武藤哲史, 長谷川剛生, 塩豊, Oh Micheal, Besse Benjamin, Lopes Gilberto, 鈴木弘行. 非小細胞肺癌に対する PD-1/PD-L1 阻害薬効果予測因子としての iSEND モデルの有用性 国際多施設共同研究. 第 59 回日本肺癌学会学術集会 2018.11.29-12.1 東京
- 5) 尾崎有紀, 峯勇人, 佐久間芽衣, 東孝泰, 高木玄教, 渡部晶之, 武藤哲史, 岡部直行, 長谷川剛生, 塩豊, 鈴木弘行. Tumor Mutation burden は非小細胞肺癌の予後因子となり得るか. 第 59 回日本肺癌学会学術集会 2018.11.29-12.1 東京
- 6) 山浦匠, 高木玄教, 尾崎有紀, 武藤哲史, 岡部直行, 長谷川剛生, 塩豊, 鈴木弘行. 肺腺癌における PD-L1 発現の検討. 第 59 回日本肺癌学会学術集会 2018.11.29-12.1 東京
- 7) Diana Saravia, Sarita Agte, Naoyuki Okabe, Wungki Park, Deukwoo Kwon, Raja Mudad, Hiroyuki Suzuki, Young Kwang Chae, Michael S Oh, Ashkon Rahbari, Gilberto Lopes. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Complements the Prognostic Ability of PD-L1 in Non-Small Cell Lung Cancer Treated with PD-1/PD-L1 Inhibitors. IASLC 19th World Conference on Lung Cancer. 2018.9.23-26 Toronto, Canada
- 8) 武藤哲史, 高木玄教, 渡部晶之, 尾崎有紀, 岡部直行, 長谷川剛生, 塩豊, 鈴木弘行. 非小細胞肺癌における  $\beta$ -catenin の発現と腫瘍浸潤リンパ球を介した腫瘍免疫の関わり. 第 28 回日本樹状細胞研究会 2018.6.28-30 名古屋
- 9) Diana Saravia, Naoyuki Okabe, Wungki Park, Deukwoo Kwon, Laura Mezquita, Young Kwang Chae, Raja Mudad, Mohammad Jahanzeb, Benjamin Besse, Hiroyuki Suzuki, Gilberto Lopes. Neutrophil-lymphocyte-ratio to complement the prediction ability of PD-L1 expression for outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with PD-1/PD-L1 inhibitors. 2018 ASCO Annual Meeting. 2018.6.1-5 Chicago, USA
- 10) Wungki Park, Laura Mezquita, Naoyuki Okabe, Deukwoo Kwon, Diana Saravia, Young Kwang Chae, Amrita Desai, David Planchard, Caroline Caramella, Raja Mudad, Mohammad Jahanzeb, Hiroyuki Suzuki, Benjamin Besse, Gilberto Lopes. Predicting outcomes of advanced non-small cell lung cancer patients treated with PD-1/PDL-1 inhibitors: Independent international validation of the iSEND model. ASCO Annual Meeting. 2018.6.1-5 Chicago, USA
- 11) 尾崎有紀, 井上卓哉, 福原光朗, 山浦匠, 武藤哲史, 岡部直行, 長谷川剛生, 塩豊, 七宮英晃, 磯貝隆夫, 渡辺慎哉, 鈴木弘行. Tumor Mutation burden は肺癌切除術後の予後と関連するか. 第 35 回日本呼吸器外科学会総会・学術集会 2018.5.17-18 千葉
- 12) 山浦匠, 尾崎有紀, 福原光朗, 武藤哲史, 岡部直行, 長谷川剛生, 塩豊, 鈴木弘行. 肺腺癌切除検体における PD-L1 発現の検討. 第 35 回日本呼吸器外科学会総会・学術集会 2018.5.17-18 千葉
- 13) 武藤哲史, 尾崎有紀, 井上卓哉, 山浦匠, 福原光朗, 長谷川剛生, 塩豊, 鈴木弘行. 非小細胞肺癌における  $\beta$ -catenin の発現は, 腫瘍局所の CD8 陽性細胞浸潤と負の相関があり, 予後不良に関連する. 第 118 回日本外科学会定期学術集会 2018.4.5-7 東京
- 14) 尾崎有紀, 井上卓哉, 福原光朗, 山浦匠, 武藤哲史, 長谷川剛生, 塩豊, 田中大輔, 菅野亮, 伊藤恵美, 七宮英晃, 今井順一, 磯貝隆夫, 渡辺慎哉, 鈴木弘行. 非小細胞肺癌における腫瘍浸潤リンパ球の臨床的意義. 第 118 回日本外科学会定期学術集会 2018.4.5-7 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

特になし

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：塩 豊

ローマ字氏名：(SHIO, yutaka)

研究協力者氏名：長谷川 剛生

ローマ字氏名：(HASEGAWA, takeo)

研究協力者氏名：岡部 直行

ローマ字氏名：(OKABE, naoyuki)

研究協力者氏名：武藤 哲史

ローマ字氏名：(MUTO, satoshi)

研究協力者氏名：福原 光朗

ローマ字氏名：(HUKUHARA, mitsuro)

研究協力者氏名：山浦 匠

ローマ字氏名：(YAMAURA, takumi)

研究協力者氏名：尾崎(大和田) 有紀

ローマ字氏名：(OWADA-OZAKI, yuki)

研究協力者氏名：渡部 晶之

ローマ字氏名：(WATANABE, masayuki)

研究協力者氏名：高木 玄教

ローマ字氏名：(TAKAGI, hironori)

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。