

令和元年6月16日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10691

研究課題名(和文) 肺腺癌に対する免疫チェックポイント阻害薬の治療効果予測バイオマーカーの探索研究

研究課題名(英文) Analysis of Predictive Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Adenocarcinoma

研究代表者

高持 一矢 (Takamochi, Kazuya)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30397369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：免疫チェックポイント阻害薬の治療効果予測に有用なバイオマーカーを同定するために、喫煙歴、ドライバー遺伝子変異の有無、PD-L1の発現、Microsatellite instability (MSI)、腫瘍局所免疫状態など、過去の報告から想定される免疫チェックポイント阻害薬の治療効果予測因子について包括的に解析を行って相互の関連を明らかにした。MSIは肺腺癌においては希な異常であり、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としての有用性は低いこと、非小細胞肺癌は腫瘍における免疫関連分子の発現状態によって予後が異なることなどが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺腺癌における腫瘍局所免疫状態を包括的に解析することによって、喫煙歴、ドライバー遺伝子変異の有無、肺腺癌の組織亜型、組織学的浸潤の程度などによって、免疫関連分子の発現状態が異なることが明らかになった。本研究の成果は今後、日常臨床で有用な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絞り込んでいく上で、貴重な基礎データとなった。

研究成果の概要(英文)：Programmed death 1(PD-1), and its associated ligand (PD-L1) checkpoint blockade immunotherapy caused a new paradigm shift in treatment for patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). Appropriate patient selection is critically important. To identify predictive biomarkers immune checkpoint inhibitors, we comprehensively analyzed previously reported predictive biomarkers such as smoking status, driver oncogene alterations, PD-L1 expression, MSI and tumor immune microenvironment, and clarified the reciprocal relationship among them. We showed that MSI is a rare event in lung adenocarcinoma. MSI cannot be used as a biomarker to predict the treatment effect of immune checkpoint inhibitors for lung adenocarcinoma. NSCLCs can be divisible into immunoreactive and non-immunoreactive tumors. The prognostic value differs according to the immunomodulatory target and driver oncogene status.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺腺癌 免疫治療 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、肺癌をはじめ様々な癌腫に対し、免疫チェックポイント阻害薬(抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体)が従来の標準治療(抗癌剤治療)を上回る治療成績が示され、日常臨床でも治療の第一選択として用いられるようになってきている。一方、免疫チェックポイント阻害薬の莫大な治療費が医療経済を窮迫することが社会的に大きな問題として指摘されており、治療効果予測に有用なバイオマーカーを同定することが求められている。

## 2. 研究の目的

喫煙歴、ドライバー遺伝子変異の有無、PD-1 や PD-L1 の発現、Microsatellite instability (MSI) など、過去の報告から想定される免疫チェックポイント阻害薬の治療効果予測因子について包括的に解析を行って相互の関連を明らかにするとともに、肺腺癌における免疫チェックポイント阻害薬の至適治療選択規準を確立することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 肺腺癌における DNA mismatch repair (MMR) status の免疫チェックポイント阻害薬に対するバイオマーカーとしての意義

肺腺癌切除例 341 例を対象に、Lynch 症候群の MSI の診断に用いられている Promega panel を用いて解析を行った。MSI 陽性例については、腫瘍 DNA を用いて全エクソームシーケンス(WES)を行って、MMR 遺伝子群(*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, and *PMS2*)の変異の有無、mutation signature の解析を行った。さらに MMR 遺伝子産物、PD-1、PD-L1 の免疫染色を行った。対象の 341 例は MSI とドライバー遺伝子異常や喫煙との関連を検討するために、ドライバー遺伝子異常陽性例 141 例 (EGFR 50 例、KRAS 50 例、ALK 21 例、ROS1 10 例、RET 10 例)とドライバー遺伝子異常陰性例 200 例 (重喫煙者 100 例、非喫煙・軽喫煙者 100 例)を選択した。

### (2) 非小細胞肺癌における免疫関連分子の包括的遺伝子発現解析

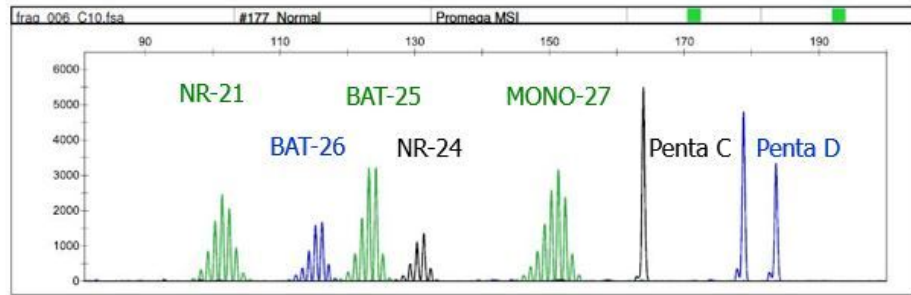
非小細胞肺癌 100 例 (腺癌 71 例、扁平上皮癌 22 例、その他 7 例)を対象に、プロモーターごとの遺伝子発現をゲノムワイドに調べることが可能な Cap Analysis of Gene Expression(CAGE)法を用いて、エフェクター T 細胞に発現している共刺激分子 (CD28, OX40, GITR, CD137, CD27, HVEM)、共抑制分子 (CTLA-4, PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA, LAG-3)、腫瘍に発現している PD-L1、PD-L2、腫瘍に浸潤している免疫細胞のマーカー (CD4, CD8, CD25, FoxP3, CD68, CD204) などについて包括的な遺伝子発現解析を行って、RNA レベルでの腫瘍組織局所免疫状態を評価した。さらに免疫関連分子の発現と臨床病理学的因子、ドライバー遺伝子変異の有無、予後との相関について検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 肺腺癌における DNA mismatch repair (MMR) status の免疫チェックポイント阻害薬に対するバイオマーカーとしての意義

MSI は 341 例中 1 例 (0.3%)のみに認められた (図 1)。同症例は 64 歳、男性の重喫煙者で、腫瘍にはドライバー遺伝子変異が認められず、WES で *MLH1* の点突然変異が検出された。smoking (C>A)と DNA MMR deficiency (C>T)の mutation signature の変異数が多かった。免疫染色では腫瘍細胞は、*MLH1*、PD-L1 とともに陰性であった (図 2)。MSI は肺腺癌においては希な異常であり、免疫チェックポイント阻害薬のバイオマーカーとしての有用性は低いことが明らかになった。

(A) Normal



(B) Tumor

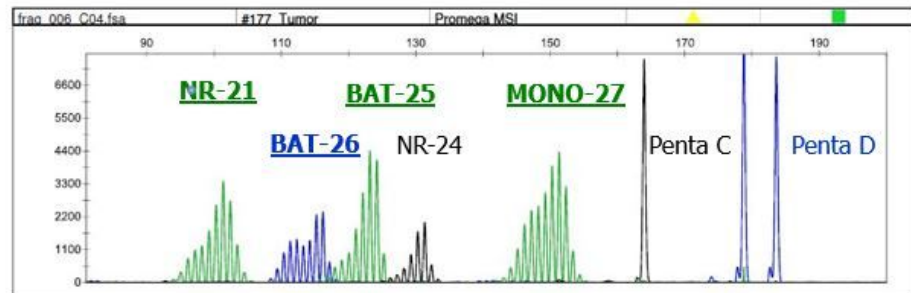


図 1 Capillary electrophoresis results of MSI analysis system.

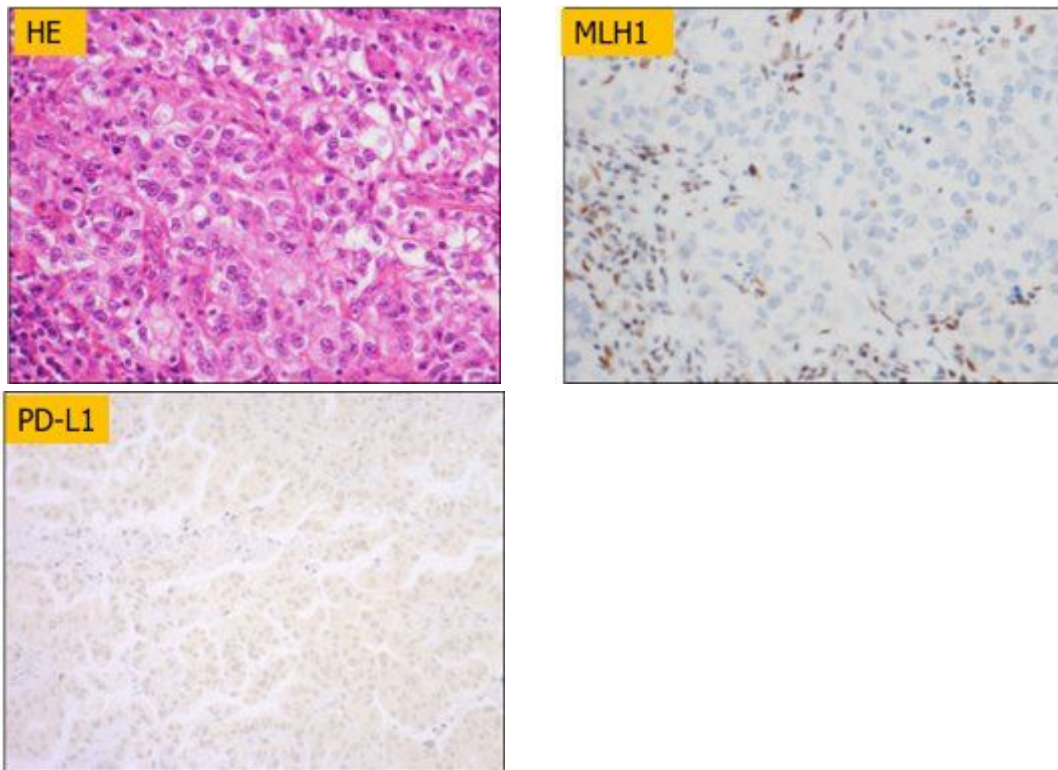


図 2 Hematoxylin and eosin staining, and immunohistochemical staining patterns of MLH1 and PD-L1 in a MSI-positive lung adenocarcinoma.

## (2) 非小細胞肺癌における免疫関連分子の包括的遺伝子発現解析

非小細胞肺癌は、ほとんどのすべての免疫関連分子が高発現している immunoreactive tumor と低～中等度発現の non-immunoreactive tumor の 2 群に分類された (図 3)。Immunoreactive tumor では、共刺激分子と共抑制分子が同時に高発現していた。腺癌における Immunoreactive tumor は、組織学的悪性度や EGFR 遺伝子変異の有無に関わらず、non-immunoreactive tumor

に比べて予後不良であった(図 4A)。しかし扁平上皮癌では Immunoreactive tumor は、Non-immunoreactive tumor に比べ、有意差には至らなかったが、予後良好な傾向が認められた(図 4B)。腺癌では CD137、TIM-3、HVEM の高発現は有意な予後不良因子であった。扁平上皮癌では CTLA-4、LAG-3 の高発現が予後良好因子で、HVEM の高発現が予後不良因子であった。非小細胞肺癌は免疫関連分子の発現状態によって、予後不良な immunoreactive tumor と予後良好な non-immunoreactive tumor の 2 群に分類でき、さらに腺癌と扁平上皮癌ではこれらの 2 群の予後が相反する傾向を示し、異なる分子が予後因子となることが明らかになった。

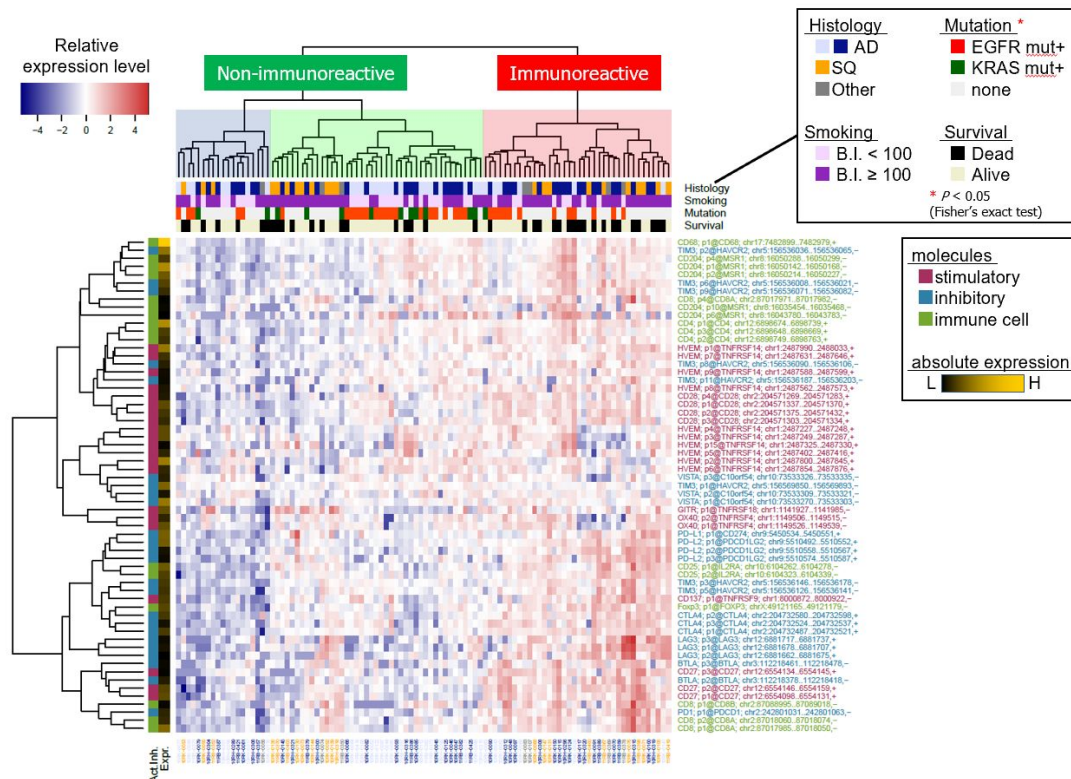


図 3 Immune profiles of tumor microenvironment in non-small cell lung cancers

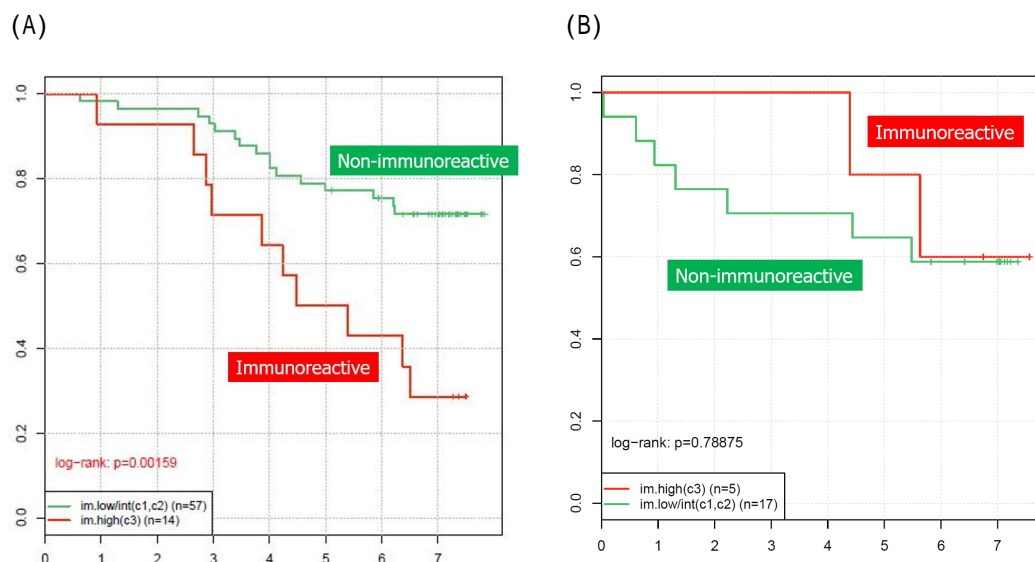


図 4 Prognosis of adenocarcinomas(A) and squamous cell carcinomas (B) according to the immune status

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 3 件)

1. Takamochi K, Oh S, Matsunaga T, Suzuki K. Prognostic impacts of EGFR mutation status and subtype in patients with surgically resected lung adenocarcinoma. J Thorac Cardiovasc Surg. 2017 Nov;154(5):1768-1774. doi:10.1016/j.jtcvs.2017.
2. Takamochi K, Takahashi F, Suehara Y, Sato E, Kohsaka S, Hayashi T, Kitano S, Ueno T, Kojima S, Takeuchi K, Mano H, Suzuki K. DNA mismatch repair deficiency in surgically resected lung adenocarcinoma: Microsatellite instability analysis using the Promega panel. Lung Cancer. 2017;110:26-31. doi: 10.1016/j.lungcan.2017.05.016.
3. Takamochi K, Mogushi K, Kawaji H, Imashimizu K, Fukui M, Oh S, Itoh M, Hayashizaki Y, Ko W, Akeboshi M, Suzuki K. Correlation of EGFR or KRAS mutation status with 18F-FDG uptake on PET-CT scan in lung adenocarcinoma. PLoS One. 2017 Apr 19;12(4):e0175622. doi: 10.1371/journal.pone.0175622.

〔学会発表〕(計6件)

1. Kazuya Takamochi, Fumiyouki Takahashi, Yoshiyuki Suehara, Shigehisa Kitano, Eiichi Sato, Shinji Kohsaka, Kenji Suzuki. A microsatellite instability analysis using the Promega panel in lung adenocarcinoma. CHEST(2016/10/22-26)
2. Kazuya Takamochi, Fumiyouki Takahashi, Yoshiyuki Suehara, Shigehisa Kitano, Eiichi Sato, Shinji Kohsaka, Kenji Suzuki. A microsatellite instability analysis using the Promega panel in lung adenocarcinoma. 第14回日本臨床腫瘍学会学術集会(2016/7/28-30)
3. Kazuya Takamochi, Masaki Hosoya et al. Comprehensive analysis for immune profiles of tumor microenvironment in lung adenocarcinomas: Prognostic effect of immunomodulatory molecules. ESMO MAP(2018/9/14-15)
4. Kazuya Takamochi, Masaki Hosoya et al. Comprehensive analysis for immune profiles of tumor microenvironment in non-small cell lung cancers: Prognostic effect of immunomodulatory molecules. ESMO(2018/10/19-23)
5. Kazuya Takamochi, Takuo Hayashi et al. The PD-L1 expression in surgically resected lung adenocarcinoma: Its correlations with the prognosis, driver oncogene alterations and clinicopathological features. ESMO ASIA(2018/11/23-25)
6. 高持一矢、原 貴恵子、林 大久生、王 志明、鈴木健司、肺腺癌切除例における PD-L1 発現と臨床病理学的特徴、ドライバー遺伝子異常、予後との相関、日本呼吸器外科学会総会(2019/5/16-17)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (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。