

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10775

研究課題名(和文) 免疫療法に反応した肺癌患者における標的T細胞エピトープ探索システムの開発

研究課題名(英文) Development of a Targeted T Cell Epitope Search System in Lung Cancer Patients Responding to Immunotherapy.

研究代表者

鈴木 秀海 (Suzuki, Hidemi)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60422226

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療法は、遺伝子変異の多い悪性黒色腫や肺癌で有効性が認められていることから変異蛋白由来の抗原が標的になっている可能性がある。免疫チェックポイント阻害療法は著効する症例から無効な症例の見極めが課題である。本研究の目的は、日本人の非小細胞肺癌における免疫チェックポイント阻害療法の標的および治療反応予測因子を検討することである。そのためにまず当施設で非小細胞肺癌に対し根治手術が施行された症例で術後に免疫チェックポイント阻害療法を施行された症例を集積した。その結果手術検体から採取されたPD-L1染色の割合が治療反応予測因子として有用であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFR等の分子標的薬に続いて、肺癌の治療において免疫チェックポイント阻害療法がその効果の高さからますます注目が高まっている。これまでに見られなかった効果を示す症例が散見され、またその持続効果の長さも特徴的だが、治療予測因子に関しては明らかとされていない。今回我々が手術後の免疫チェックポイント阻害療法を施行した患者のPD-L1測定値が治療予測因子と相関し予後予測因子となる可能性を示した。さらに今回は完遂できなかったがエピトープ解析を加えることにより今後周術期治療等にもますます適応が拡大する免疫チェックポイント阻害療法の適切な症例選択に役立つ研究となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Immune checkpoint blockade therapy may target antigens derived from mutated proteins because it has been shown to be effective in malignant melanoma and lung cancer, both of which have many genetic mutations. The identification of the invalid case from the case in which the immune checkpoint inhibition therapy is remarkably effective is a problem. The aim of this study was to investigate the targets of immune checkpoint blockade therapy and predictors of treatment response in Japanese non-small cell lung cancer. To begin with, the case which enforced the immune checkpoint inhibition therapy in the postoperative in the case which enforced the radical operation for the non-small cell lung cancer in this facility was accumulated. The percentage of PD-L1 staining obtained from surgical specimens was a useful predictor of treatment response.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：肺癌 免疫チェックポイント阻害療法 エピトープ

1. 研究開始当初の背景

肺癌は我が国で最も高頻度のがん死因であり、2015年度の推計では7万人超がこの疾患で死亡しており現在も増加傾向である。切除不能症例ではEGFRやALKなどの分子標的療法が定着し、一定の成果を上げているものの、その効果は依然限定的であり、平均予命は1年から2年に延長するが、効果持続期間は1年程で耐性化する。また肺癌の半数以上はその適応にならず、旧来の細胞障害性化学療法の適応となり、いまだ平均余命は1年程度である。唯一の根治療法である外科療法は、肺癌登録合同委員会による2004年症例の検討では5年生存率が約70%と改善傾向を示しているが、これは早期例の増加による影響が大きく、IB期以上の症例では40%以上が再発している。近年、固形がんの細胞表面に発現されている免疫チェックポイント分子(PD-1、PDL-1、CTLA-4)に対するモノクローナル抗体による阻害が免疫監視機構を発動し、臨床的にも悪性黒色腫や肺癌に対する治療効果が認められた。これら薬剤のうち **Nivolumab** (完全ヒト型リコンビナント抗ヒトPD-1モノクローナル抗体、IgG4型、商品名オプジーボ) は非小細胞肺癌に対する治療薬として2014年に米国で承認され、本邦においても承認後約1年が経過した。これは特異的細胞性免疫を担うT細胞側のPD-L1分子、標的となる腫瘍細胞あるいは抗原受容体側分子であるPD-1を抗体でブロックして負の補助シグナルを阻害することで、本来の免疫反応経路である標的側あるいは抗原提示側の組織適合抗原(major histocompatibility complex: MHC) + 抗原ペプチドとT細胞側のT細胞抗原受容体(T cell receptor: TCR)+CD3の反応を正常化させることが根本的なメカニズムと考えられている(図1)。

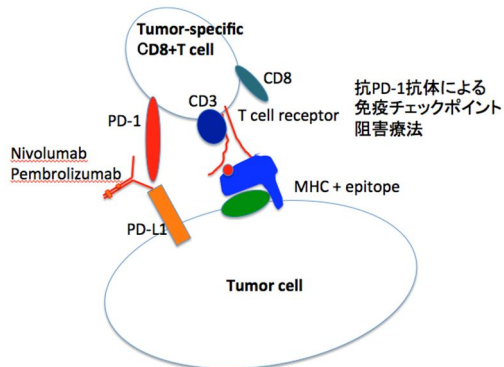


図1:免疫チェックポイント阻害療法

Checkmate017試験とCheckmate027試験では、それぞれ初回化学療法無効の扁平上皮肺癌と非扁平上皮肺癌に対し、二次化学療法と比較して有意にNivolumab群の生存が良好であったが、それぞれの試験におけるNivolumab群では41%、44%のprogressive disease患者が認められており、明らかに免疫療法不応群が存在する。反応群のマーカーとして腫瘍細胞におけるPDL-1分子の発現状況が免疫組織化学染色で検討されているが、明らかな基準は明確化されるには至っていない。このような非小細胞肺癌における臨床試験結果は固形がんでは悪性黒色腫に続く画期的な成果である。最近の次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子変異解析では、悪性黒色腫と肺癌は固形がんの中でも1MBあたり約1個の体細胞遺伝子変異が検出されており、全悪性腫瘍の中でも**遺伝子変異が高頻度のがん種**であることが明らかにされており、さらに肺癌のうち扁平上皮癌と腺癌ではAPOBEC遺伝子と関連する変異(C>T、C>G)、扁平上皮癌、腺癌、小細胞肺癌では喫煙関連の変異(C>A、C>T)が多く、個体間でも共通の遺伝子変異が多く存在する可能性が示唆されている。最近の肺腺癌の次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析では1腫瘍あたり約700変異が検出されており、さらに10~20%の変異は同一腫瘍内で多様なパッセンジャー変異であり、その多様さと病勢の関連が示唆されている。そのような遺伝子変異の多さは、翻訳産物としての変異蛋白の存在と関連して腫瘍細胞が異物としてT細胞による特異的免疫系に認識されうる機会が増加すると推測されている。

一般的に変異遺伝子から翻訳される変異蛋白は細胞内の粗面小胞体で生成された後にユビキチン化(翻訳後修飾)され、プロテアソームでプロセッシングされて8-9個の抗原ペプチド(T細胞エピトープ) TAP酵素により小胞体に移送されMHC class I分子と結合する。その後ゴルジ体を経て小胞輸送されて細胞表面に発現され(図2)。

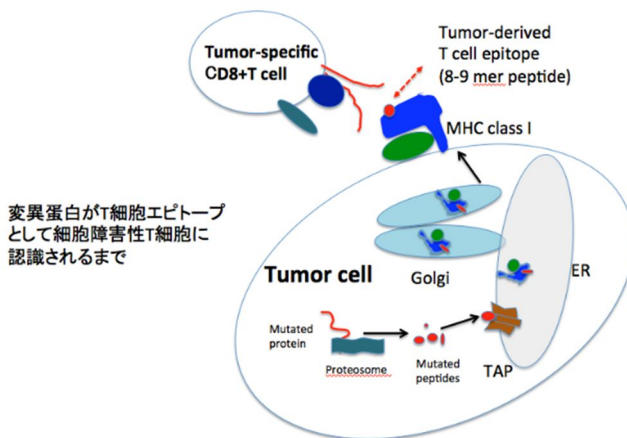


図2: 変異抗原がT細胞に認識されるまで

このMHC Class I分子との結合は、各タイプに一定のアミノ酸モチーフが存在することが知られている。例えばHLA(ヒト白血球抗原)-A*2402ではN末端がPro以外、N末端から2番目が

Trp、C末端がTrpあるいはPhe、HLA-A*0201ではN末端がTyrまたはPhe、N末端から2番目がLeu、C末端がVal、となっている。従って遺伝子変異の結果、このようなモチーフを獲得し、かつ正常の遺伝子では表出されていないものは、免疫療法の標的となりうる腫瘍由来 T 細胞エピトープの可能性はある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、日本人の非小細胞肺癌における免疫チェックポイント阻害療法の標的および治療反応予測因子を検討することである。該当症例の診断に用いられた試料や切除された検体より腫瘍部分と正常肺部分の c-DNA を調整して全エクソームの塩基配列を検索し、順次 in silico で HLA-A2 および HLA-A24 に提示されうるペプチドモチーフに合致する変異遺伝子およびアミノ酸配列（腫瘍由来 T 細胞エピトープ）を同定する。

3. 研究の方法

まず当施設の呼吸器外科において肺癌外科治療を行った対象に周術期に免疫チェックポイント阻害剤を使用された症例を抽出し、患者背景、効果判定、PD-L1 発現状況、副作用等の臨床的因子を解析した。

4. 研究成果

当施設で肺癌外科治療を受けた患者における免疫チェックポイント阻害剤を使用した症例の患者背景は表に示す通りであった。（図3）

	Nivolumab n=20	Pembrolizumab n=42	Durvalumab n=5	Atezolizumab n=7
手術時年齢	63.8 [47-76]	70.0 [49-79]	67.2 [63-70]	59.4 [50-76]
ICI投与時年齢	67.5 [48-81]	71.5 [51-81]	70.2 [65-77]	63.4 [53-77]
投与時PS (%)	10 (50.0)	18 (42.8)	5 (100)	3 (42.9)
	1 (35.0)	22 (52.5)	0 (0)	3 (42.9)
	3 (15.0)	2 (4.7)	0 (0)	1 (14.2)
組織型 (%)				
Ad	11 (55.0)	25 (59.5)	5 (100)	7 (100)
Sq	8 (40.0)	16 (38.1)	0 (0)	0 (0)
その他	1 (5.0)	1 (2.4)	0 (0)	0 (0)
化学療法併用 (%)				
CDDP+PEM	0 (0)	13 (31.0)	0 (0)	2 (28.6)
CBDC+PEM	0	2	0	0
CBDC+nab-PTX	0	5	0	0
CBDC+PTX+BEV	0	6	0	0
投与時期 (%)				
再発後1次治療	0 (0)	33 (78.6)	0 (0)	0 (0)
2次治療以降	20 (100)	9 (21.4)	5 (100)	7 (100)

図3: 患者背景及び投与薬剤

奏効率は41.9% (31例)、疾患制御率は66.2% (49例)を示し、術後再発症例においても、免疫チェックポイント阻害薬の効果は一定程度に認められた。Grade3以上の有害事象は免疫関連4例（重症筋無力症および腸炎1例、副腎不全3例）、その他8例（薬剤性肺炎6例、皮膚障害2例）で認められたが、いずれも制御可能であった。（図4）

	Nivolumab n=20	Pembrolizumab n=42	Durvalumab n=5	Atezolizumab n=7
免疫関連	1 (重症筋無力症症状、 腸炎など)	3 (副腎不全、 ACTH単独欠損症)	0	0
その他	1 (皮膚障害)	6 (薬剤性肺炎、皮膚障害)	0	1 (薬剤性肺炎)

図4: 投与薬剤と有害事象

術後使用された10例に対しPD-L1 IHC 28-8 pharmDx DacoとPD-L1 IHC 22C3 pharmDx Dacoで染色を行ったが、CR/PRを示した30%の症例ではいずれもTPS 10%以上を示していた。（図5）

	Nivolumab n=20	Pembrolizumab n=42	Durvalumab n= 5	Atezolizumab n=7
PD-L1発現率 (%)				
0	3 (15.0)	3 (7.1)	2 (40.0)	3 (42.8)
1-49	6 (30.0)	11 (26.2)	1 (20.0)	2 (28.6)
50-99	2 (10.0)	23 (54.8)	2 (40.0)	0 (0)
100	0 (0)	5 (11.9)	0 (0)	0 (0)
不明	9 (45.0)	0 (0)	0 (0)	2 (28.6)
効果判定				
CR	3 (15.0)	3 (7.1)	1 (20.0)	0 (0)
PR	2 (10.0)	18 (42.9)	2 (40.0)	2 (28.6)
SD	3 (15.0)	10 (23.8)	1 (20.0)	4 (57.2)
PD	12 (60.0)	11 (26.2)	1 (20.0)	1 (14.2)
投与期間(月)	6.2 [1-44]	10.0 [1-45]	8.0 [2-12]	13.0 [1-29]

図 5: PD-L1 発現率と効果判定

手術検体による評価が術後の治療効果予測因子になる可能性が示唆された。

今回は完遂に至らなかったが、日本人の約 80%に発現される HLAA2 や A24 に提示されうる腫瘍由来 T 細胞エピトープの数と共通抗原の存在に着目し、臨床腫瘍検体の全エクソーム解析から変異遺伝子を同定し、HLA-A2/A24 親和性の高いアミノ酸配列モチーフを *in silico* で解析することができれば、当該エピトープを合成し、MHC テトラマー結合させて患者末梢血 T 細胞との反応性を検証し、今後の臨床応用が期待できるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuki Shiina, Hidemi Suzuki, Kai Nishii, Hotaka Ooeda, Taisuke Kaiho, Kota Ohashi, Yuki Sata, Atsushi Hata, Takahide Toyoda, Yuichi Sakairi, Hajime Tamura, Hironobu Wada, Taiki Fujiwara, Takahiro Nakajima, Masako Chiyo, Masayuki Ota, Satoshi Ota, Yukio Nakatani, Ichiro Yoshino
2. 発表標題 Does PD-L1 expression of the archive surgical specimen of primary tumor predict the sensitivity of recurrence to Nivolumab in patients with non-small lung cancer (NSCLC)?
3. 学会等名 International Association for the Study of Lung Cancer 18th World Conference on Lung Cancer (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 椎名裕樹, 鈴木秀海, 清水大貴, 今林宏樹, 植松靖文, 伊藤祐輝, 小野里優希, 松本寛樹, 海竇大輔, 佐田諭己, 山本高義, 田中教久, 坂入祐一, 和田啓伸, 中島崇裕, 吉野一郎
2. 発表標題 肺癌術後再発に対する免疫チェックポイント阻害薬
3. 学会等名 第72回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 海竇 大輔、鈴木 秀海、佐藤 祐太郎、祖父江 晃向、中山 浩介、山中 崇寛、由佐 城太郎、太枝 帆高、西井 開、伊藤 祐輝、松本 寛樹、畑 敦、田中 教久、坂入 祐一、芳野 充、吉野 一郎
2. 発表標題 肺癌術後再発症例における免疫チェックポイント阻害薬の使用経験
3. 学会等名 第39回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	金田 篤志 (Kaneda Atsushi) (10313024)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中島 崇裕 (Nakajima Takahiro) (20400913)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	
研究分担者	吉野 一郎 (Yoshino Ichiro) (40281547)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	本橋 新一郎 (Motohashi Shinichiro) (60345022)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関