

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：12602  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2018～2021  
課題番号：18K09342  
研究課題名(和文) 再発転移頭頸部癌に対するニボルマブ最適化投与のためのバイオマーカーに関する研究

研究課題名(英文) Study on Biomarkers for Optimal Administration of Nivolumab for Recurrent Metastatic Head and Neck Cancer

研究代表者  
朝蔭 孝宏 (Asakage, Takahiro)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50361481  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：再発転移頭頸部癌患者さんのなかでニボルマブが有効な方は十数%しかいません。効果がない患者さんにとっては不要な投薬を受けることになるだけでなく、投薬による副作用に晒される危険性もあります。また、その他の有効な治療の機会を失う危険性もあります。よって、どのような患者さんに有効であるかを、事前に知ることは大変重要な意義を持ちます。我々は遺伝子解析技術をもちいて、有効症例の抽出を試みました。その結果65歳を境にして、ニボルマブへの反応と、遺伝子変異の様相が異なることが分かりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
再発転移頭頸部癌患者さんのなかでニボルマブが有効な方は十数%しかいません。効果がない患者さんにとっては不要な投薬を受けることになるだけでなく、投薬による副作用に晒される危険性もあります。また、その他の有効な治療の機会を失う危険性もあります。よって、どのような患者さんに有効であるかを、事前に知ることは大変重要な意義を持ちます。我々は遺伝子解析技術をもちいて、有効症例の抽出を試みました。その結果65歳を境にして、ニボルマブへの反応と、遺伝子変異の様相が異なることが分かりました。

研究成果の概要(英文)：Among patients with recurrent metastatic head and neck cancer, nivolumab is effective in only several percent. Patients who do not respond to the drug risk not only receiving unnecessary medication, but also being exposed to the side effects of the drug. They also risk losing the opportunity for other effective treatments. Therefore, it is very important to know in advance what kind of patients a drug will be effective for. We have attempted to identify effective cases by using genetic analysis technology. As a result, we found that the response to nivolumab and the aspect of genetic mutation differed after the age of 65 years.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：再発転移頭頸部癌 ニボルマブ 遺伝子解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

2017年3月末に再発転移頭頸部癌に対するニボルマブの使用が認可された。そのきっかけとなったのは Checkmate141 試験とよばれる論文 (New Engl J Med 2016) である。同論文では再発または転移性頭頸部扁平上皮癌 361 例を対象として、ニボルマブ群 240 例、治験医師選択治療群 121 例のランダム化比較試験を行った。その結果、ニボルマブ群が全生存期間(OS)中央値 7.49 ヶ月、治験医師選択治療群の OS 中央値が 5.06 ヶ月で、ハザード比が 0.70 であるため死亡リスクを 30%減少させることができたというものであった。しかしながら、本試験には大いなる問題点があった。つまり、治験医師選択治療群で実際に選択された治療が、これまでの再発転移頭頸部癌に対する標準的治療であるシスプラチン、5-FU、セツキシマブの3剤を用いた治療でなく、実臨床では全く行われることないセツキシマブ、メソトレキセート、ドセタキセルいずれか1剤による単剤治療となっている点であった。それに加えて、サブ解析ではドセタキセル単剤治療例との比較では有意差を認めないという結果であった。つまり、うがった見方をすれば、何もしないよりはいいかもしれないが、再発転移頭頸部癌に対する標準治療以下のドセタキセル単剤と同等程度の効果しか期待できない高額医薬品と捉えることができた。それを反映してかその時点で既に全国で 1000 例もの症例に投与されているが、効果がみられている症例は 10 数%しか認めなかった。また、他の癌種では PD-L1 発現がバイオマーカーとなっているが、頭頸部癌では PD-L1 発現が必ずしもバイオマーカーとはならないことが明らかとなってきた。効果の期待できる患者に適切に投与し、効果の期待できない患者が不要な有害事象で苦しむことがないように、頭頸部癌におけるバイオマーカーの同定が急務となっていた。

### 2. 研究の目的

2016年に発表された国際共同治験である checkmate141 試験以降、全世界で頭頸部癌に対してニボルマブが実臨床で使用されるようになったばかりである。この試験では PD-L1 発現が 1%以上、5%以上、10%以上と上昇しても、ハザード比は 0.5 のままで変化なく PD-L1 発現程度と有効性に相関を認めなかった。よって、現時点では再発転移頭頸部癌に対するニボルマブの有効性を予測するバイオマーカーはまだ同定されていないと考えられる。そこで本研究では次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析、腫瘍微小環境の検索、マイクロアレイおよび RNA シーケンシスにより取得した発現プロファイルからの間質の構成細胞の推定、シングルセル RNA シーケンシスなど最新の研究技術をもちいて、癌細胞および癌周囲の微小環境からニボルマブの有効性を予測するバイオマーカーを同定することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 対象症例とゲノム DNA サンプル

ニボルマブを投与した患者 16 例のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織から GeneRead DNA FFPE Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて gDNA を抽出した。対象症例の年齢、性別、原発部位、分化度、初診時 cStage 分類、セツキシマブ先行使用の有無、およびニボルマブ使用に対する反応等と、遺伝子変異の関連を解析した。ニボルマブ使用に対する反応は、RECIST ガイドラインに沿って最良総合効果 (Best Overall Response) として CR/PR/SD/PD で記録し、CR/PR を奏効、SD/PD を非奏効とした。また CR/PR/SD を病勢制御、PD を非病勢制御とした。

#### ライブラリー調整およびシーケンシング

がんとの関連が判明している 409 の遺伝子のエクソン領域を調べるためのターゲットパネルである AmpliSeq for Illumina Comprehensive Cancer Panel (Illumina, California, USA) を用いてライブラリー調整を行った。調整済みライブラリーは受託解析会社を通じて、次世代シーク

エンサー-NovaSeq (Illumina)を用いて fastq データを取得した。アライメントには hg19 を用いた。

#### データ解析

得られた fastq データは東京大学医科学研究所のスーパーコンピュータ SHIROKANE と解析パイプライン Genomon2.6.3 (<https://github.com/Genomon-Project/GenomonPipeline>)を用いて遺伝子変異を解析した。Somatic mutation (SM)は 16 例で 103567 callsであった。生殖細胞変異の除去は公共データベースでの Allele frequency をもとに ToMMo の Genomic Variants (8.3KJPN) で 0.0001-1Human Genetic Variation Database の DBexome20170802 で 0.000413-1 1000genome プロジェクトの 1000g2014octall で 0.000199681-1NHLBI Exome Sequencing Project の esp6500 で  $7.7E-5-0.43$  を削除しまた Depth < 100 を削除して 9036 calls となった。Function で Indel SNV frameshift affecting start/stop codon splicesite を選択し snp138 にあって COSMIC70 になくて clinvar20150629 にないものを除外した。複数の症例で重複して出現する変異は IGV で確認しリードの端の変異などをミスリードとして除外した。Variant allele frequency (VAF) が 0.05 VAF < 0.9 の変異を選択し 242 calls となった。各症例の calls 数は 5 - 39calls で AmpliSeq for Illumina Comprehensive Cancer Panel の Cumulative target size は 1.7 Mb であることから各症例の Tumor mutation burden (TMB) は 2.9- 22.97 であった。TMB > 10 を TMB-High (TMB-H)、TMB < 10 を TMB-Low (TMB-L)とした。コピー数異常に関しては、bam ファイルを CONTRA (<https://sourceforge.net/projects/contra-cnv/>) (Bioinformatics. 2012 May 15;28(10):1307-13. doi: 10.1093/bioinformatics/bts146.)を用いて解析し、Gene 単位の adjusted GainLoss のありなしで表現した。

#### TP53 somatic mutations

TP53 体細胞変異に関しては 17 変異が call されたが、oncoplot 解析等に用いる変異は個々に検討し、dbSNP および Clinvar での登録情報から germline と判断した 16 変異を除外した。除外した変異を以下に示すと、p.L255S、p.L255F、p.Y220C、p.Y205H、p.R335\_E336insGR、p.C141Y、p.R282G、p.F134C、p.R213Q、p.C135F、p.R337H、p.P151S、p.G245G、p.G245V、p.H193L、p.H179R となる。その結果残った TP53 変異は、p.Q52X(症例 9)のみであった。

#### Oncoplot 解析

症例ごとの体細胞変異解析には R パッケージである Oncoplot (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/maftools.html>)を用いた。遺伝子変異は、がん抑制遺伝子群(TSG)やチロシンキナーゼ受容体群(RTK)、Notch パスウェイ群(NOTCH)、PI3K パスウェイ群(PI3K)に分けて検討した。

#### 4. 研究成果

全 16 例中、PR が 4 例 (25%)、SD が 6 例 (37.5%)、PD が 6 例 (37.5%) であり、奏効率は 25.0%、病勢制御率は 62.5%であった。

遺伝子変異の出現は、NOTCH1 が 7 例 (44%) に、CDKN2A、CSMD3、PIK3CA、RNF213 がいずれも 5 例 (31%) ずつに認めが、治療効果判定ごとに特徴的な遺伝子変異は認めなかった (図 1)。

年齢別にみても、65 歳未満の 9 例において、奏効率は 22.2%、病勢制御率は 77.8%であり、TMB が High の 3 例はいずれも病勢制御群に含まれていた。また、PD の 2 例はいずれも、NOTCH、PI3K、RTK のいずれのパスウェイにも変異がなかった。65 歳以上の 7 例において、奏効率は 28.6%で、病勢制御率は 42.9%であり、TMB と病勢制御との関連は認めなかった。NOTCH、PI3K、TSG の全てのパスウェイで変異があったのは、病勢制御 3 例中 1 例 (33.3%) であるのに対して、PD 4 例中 3 例 (75.0%) であった。TP53 変異は、65 歳未満の PD 2 例中の 1 例のみで Nonsense 変異が認められた。

以上より、65 歳未満と以上でニボルマブ投与に対する反応のみならず、遺伝子変異のプロファイルも異なっているようであった。

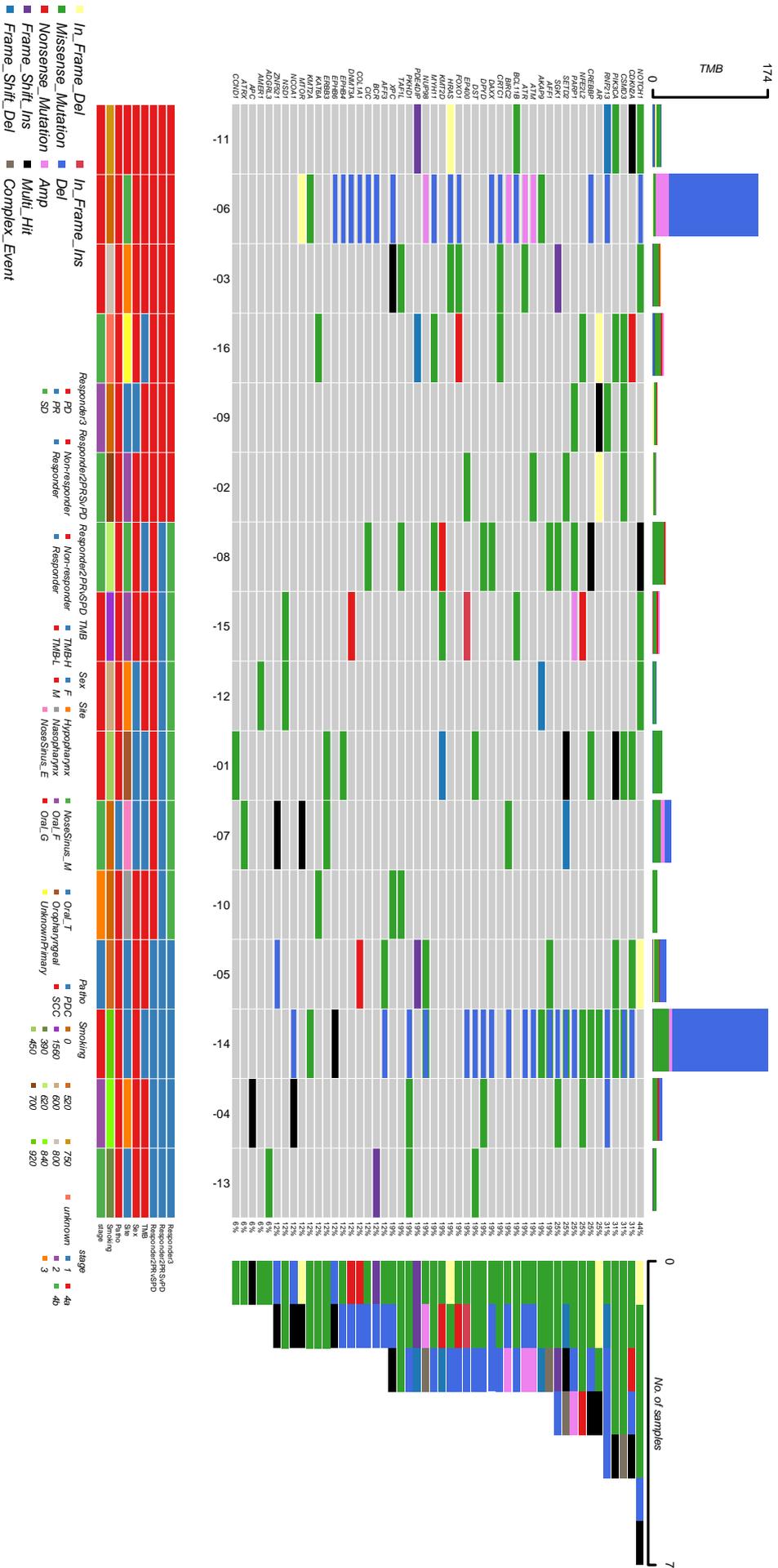


図 1 遺伝子ごとの Oncoplot 解析

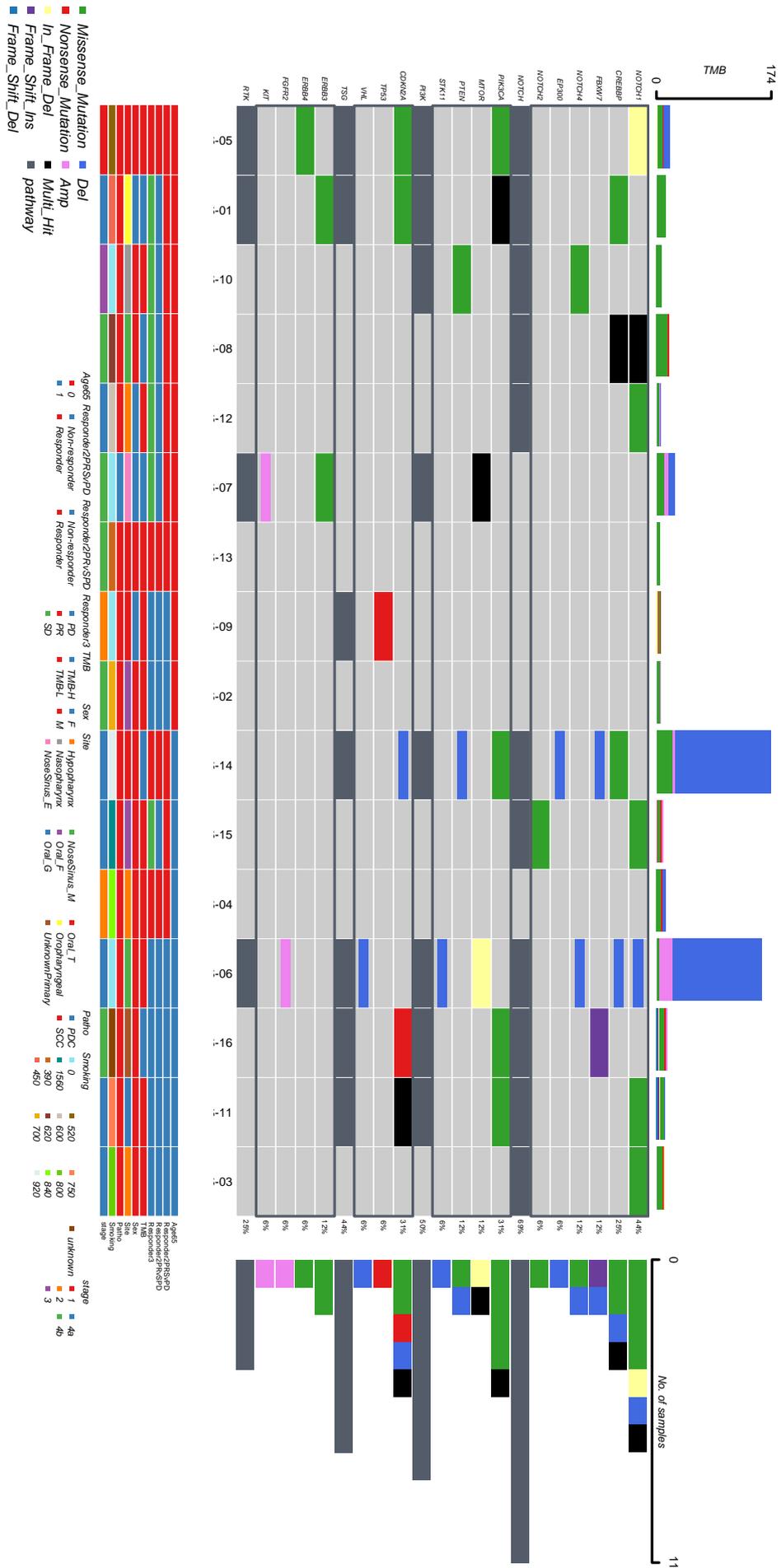


図2 パスウェイごとのOncoplot 解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	森田 圭一  (Morita Kei-ichi)  (10396971)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師   (12602)	
研究分担者	池田 貞勝  (Ikeda Sadakatsu)  (20787816)	東京医科歯科大学・医学部附属病院・准教授   (12602)	
研究分担者	稲澤 譲治  (Inazawa Juji)  (30193551)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授   (12602)	
研究分担者	石川 俊平  (Ishikawa Shunpei)  (50418638)	東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・教授   (12601)	
研究分担者	東 みゆき  (Azuma Miyuki)  (90255654)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授   (12602)	

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
---------	---------