

令和 4 年 5 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09165

研究課題名(和文) 胃癌マイクロサテライト不安定性評価の検証と薬物治療における臨床的意義の解明

研究課題名(英文) Verification of microsatellite instability status evaluated by cancer gene panel testing and clinical significance in the drug treatment for gastric cancer

研究代表者

羽入 隆晃 (Hanyu, Takaaki)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号：50719705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：癌遺伝子解析パネルはマイクロサテライト不安定性(MSI)やtumor mutation burdenも同時に評価できる。胃癌における癌遺伝子解析パネルのMSI評価の精度は不明である。本研究では癌遺伝子解析パネルによるMSI評価の精度は高く、pembrolizumabをはじめとする免疫療法の適応症例の選択に有用である可能性を示した。また、nivolumabによる免疫療法の治療効果に癌遺伝子解析パネルで評価したtumor mutation burdenが関連していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、現在保険診療として臨床使用されている癌遺伝子解析パネルを用い、胃癌におけるマイクロサテライト不安定性(MSI)解析の精度が高いことを明らかにした。がん遺伝子解析パネルは癌の発育進展に重要な複数のドライバー遺伝子で構成され、MSIも含めて包括的に遺伝子異常を評価できるため、今後の胃癌薬物治療の最適化に必要な不可欠なツールである。本研究では、免疫治療に効果の高い症例を選択することにも役立つ可能性が示唆されており、今後の癌遺伝子パネル検査の適応拡大や胃癌治療の発展のために重要な知見を得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Cancer gene panel can concurrently assess microsatellite instability (MSI) and tumor mutation burden. The accuracy of MSI assessment by cancer gene panel in gastric cancer is unknown. In this study, we demonstrated that the accuracy of MSI assessment by cancer gene panel is high and may be useful in the selection of patients who are candidates for immunotherapy, including pembrolizumab. We also found that the tumor mutation burden assessed by the cancer gene panel was associated with the therapeutic effect of nivolumab immunotherapy.

研究分野：消化器外科学

キーワード：胃癌 マイクロサテライト不安定性 ミスマッチ修復タンパク質 免疫組織化学染色 PD-L1 nivolumab tumor mutation burden

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

免疫療法は悪性黒色腫や肺癌に対する高い治療効果を認めたことで着目され、切除不能進行再発胃癌に対する抗 PD-1 抗体薬 nivolumab の有効性が証明され保険適用が承認された (J Clin Oncol 2017)。細胞分裂に伴う DNA 複製の際には塩基ミスマッチが生じるが、ミスマッチ修復機構 (MMR) による修復を受けることでゲノム安定性が保持される。この MMR には MLH1、PMS2、MSH2、MSH6 といった複数の遺伝子が関与している。これらの異常により MMR が破綻することで、遺伝子変異の蓄積が生じる (hypermutation)。塩基ミスマッチはマイクロサテライトと言われる繰り返し配列領域に起こり易い。そのため、MMR 破綻はこの繰り返し配列が延長したマイクロサテライト不安定性 (MSI) を検出することで診断される。現在一般的な MSI 検査には BAT25、BAT26、D5S346、D2S123、D17S250 の 5 種類のマイクロサテライトマーカーを用い (ベセスダパネル)、複数のマーカーに異常を認める場合を MSI-high (MSI-H) と判定する (Nat Rev Clin Oncol 2010)。胃癌は大腸癌と同様に MSI-H の頻度が高い腫瘍であるが (Nat Commun 2017)、これまで MSI-H の臨床的意義は不明であった。MSI-H の腫瘍は hypermutation による高い抗原性により免疫療法の治療効果が高い (J Clin Oncol 2016)。米国では FDA により抗 PD-1 抗体薬 pembrolizumab の適応が MSI-H 固形癌全般に拡大され、今後日本においても胃癌への適応が承認される (J Clin Oncol 2017)。MSI は胃癌の免疫療法の最適化にとって重要な遺伝子異常であり、MSI を正確に評価することが必要とされている。

癌遺伝子解析パネルは癌の発育進展に重要な複数のドライバー遺伝子で構成され、遺伝子変異やコピー数変化だけでなく、MSI も含めて包括的に遺伝子異常を評価できる。そのため、Precision Medicine に即した癌治療を実践するためには必要不可欠なツールである。これまでに申請者は日本人胃癌 207 例に対し、癌遺伝子解析パネルを用いた大規模な包括的癌遺伝子解析研究を施行し、日本人胃癌の約 10% が MSI-H であることを明らかにした (ASCO 2017)。癌遺伝子解析パネルによる MSI 解析ではベセスダパネルよりも多くのマイクロサテライトマーカーを用いることが可能であり、高い診断精度が期待されている。上述した学術的背景から考えられる学術的「問い」は以下の 2 点である。

- 癌遺伝子解析パネルによる MSI 解析の精度：癌遺伝子解析パネルによる MSI 解析とベセスダパネルによる MSI 検査との整合性はどの程度であるのか。癌遺伝子解析パネルによる MSI 解析がどの程度胃癌の MMR 遺伝子異常を検出できているのか。
- 日本の胃癌薬物治療における MSI の臨床的意義：切除不能進行再発胃癌の新規治療である nivolumab による免疫療法の治療効果と癌遺伝子解析パネルによる MSI 評価に関連はあるのか。

申請者はこれらの「問い」を明らかにするために「癌遺伝子解析パネルによる MSI 解析は胃癌の MMR 破綻を正確に検出できる。MSI を評価することで日本人胃癌の薬物療法を最適化することが可能である」という仮説を立て、本研究を企画した。

## 2. 研究の目的

「胃癌における癌遺伝子解析パネルを用いた MSI 解析の精度、およびその臨床的意義を明らかにすることで、MSI を基軸とした胃癌薬物治療発展への足がかりとすること」である。

## 3. 研究の方法

### (1) 胃癌腫瘍組織における MMR 遺伝子異常の評価：

癌遺伝子解析パネルによる遺伝子解析を施行した胃癌 130 例のうち、27 例 (MSI-high: 13 例、MSI-low/MSS: 14 例) を対象とした。胃癌原発巣のホルマリン固定後パラフィン包埋 (FFPE) 検体から 4µm で薄切した切片を用い、ミスマッチ修復 (MMR) タンパク質 (MLH1、PMS2、MSH2、MSH6) 発現を免疫組織化学 (IHC) で評価した。

### (2) 癌遺伝子解析パネルによる胃癌の遺伝子異常の評価：

胃癌切除検体 130 例の原発巣の FFPE 検体から DNA を抽出し、癌遺伝子解析パネル (CANCERPLEX; KEW Inc., Cambridge, MA) を用いて癌関連 435 遺伝子の一塩基置換、挿入・欠失、コピー数変化を評価した。MSI については BAT25、BAT26、D5S346、D2S123、D17S250 に加えて 950 の tandem repeat 領域を対象とし、アレル頻度 10% 以上の InDel を評価した。InDel が 26 以上の場合を MSI-high と定義した。Tumor mutation burden (TMB) はアレル頻

度 10%以上の single nucleotide variants (SNVs)の 1 Mb あたりの頻度として算出した。

- (3) 胃癌腫瘍組織における PD-L1 発現の評価  
胃癌原発巣の FFPE 検体から 4 $\mu$ m で薄切した切片を用い、IHC により PD-L1 (SP142) の発現を評価した。腫瘍細胞及び腫瘍浸潤免疫細胞における PD-L1 陽性細胞数の割合をそれぞれ算出した。
- (4) nivolumab による免疫療法の治療効果の評価：  
nivolumab による免疫療法を施行した症例の治療効果を臨床情報から抽出した。治療中の最良治療効果を RECIST ver1.1 に準じて評価した。

#### 4. 研究成果

- (1) 癌遺伝子解析パネルによる MSI 評価の精度：  
癌遺伝子解析パネルによる評価で MSI-high の 13 例中、10 例で MLH1 及び PMS2 の loss を、2 例で PMS2 の loss を認め、1 例で MMR タンパク質発現が全て保たれていた。MSI-low/MSS の 14 例では、全例で MMR タンパク質発現が保たれていた。MSI-high 胃癌抽出において、MLH1 及び PMS2 の IHC による MMR 遺伝子異常評価の感度は 92%、特異度は 100%であった。また、MSI-high の 13 例を対象として、臨床検査であるマイクロサテライト不安定性 (MSI) 検査 (BAT25、BAT26、NR21、NR24、MONO27 の 5 マーカー) を施行した。13 例全てで 5 マーカーに MSI 陽性を認め、MSI-high と判定された。  
癌遺伝子解析パネルで同定された MSI-high 胃癌では、従来の報告通り MLH1 または PMS2 発現の欠失が多く認められる。癌遺伝子パネルによる MSI 評価の精度は高く、胃癌における pembrolizumab 療法適応症例の選択に有用である可能性が示唆された。
- (2) MSI-high 症例における PD-L1 発現の評価：  
腫瘍細胞の評価では、MSI-high の 1 例で PD-L1 陽性細胞数 > 5%であったが、残りの 25 例は全て陰性であった。腫瘍浸潤免疫細胞の評価では、MSI-high の 8 例(62%)、MSI-low/MSS の 5 例(38%)で陽性細胞数  $\geq$  1%であったが、有意差は認められなかった ( $P = 0.142$ )。腫瘍浸潤免疫細胞における PD-L1 発現と臨床病理学的因子の関連について検討したところ、PD-L1  $\geq$  1%群では pT2 または pT3 が 10 例(77%)、 $<$  1%群では pT4 が 9 例(69%)であり、 $\geq$  1%群は深達度が浅い傾向を示した ( $P = 0.05$ )。その他の臨床病理学的因子に有意な差は認められなかった。術後全生存については、PD-L1  $\geq$  1%群で有意に良好であった ( $P = 0.017$ )。
- (3) nivolumab の治療効果と癌遺伝子解析パネルによる MSI 評価や TMB との関連：  
癌遺伝子解析パネルによる遺伝子解析を施行した胃癌 130 例中例、術後再発病変に対して nivolumab による治療を行った 14 例を対象とした。最良治療効果は RECIST ver 1.1 で評価し CR、PR、SD を奏効群、PD を非奏効群と定義した。奏効群は 5 例、非奏効群は 9 例であった。MSI-high の症例は認められず、全例が MSS であった。奏効群の TMB は平均 18.9 counts/Mb、非奏効群は平均 14.0 counts/Mb であった ( $P = 0.037$ )。  
本研究により、胃癌原発巣における TMB は術後再発時の nivolumab 治療の効果に関連している可能性が示唆された。
- (4) 成果のまとめ  
癌遺伝子解析パネルによる MSI 評価の精度は高く、胃癌における pembrolizumab 療法適応症例の選択に有用な可能性がある。  
MSI-high 胃癌は Pembrolizumab の適応であるが、腫瘍浸潤免疫細胞で PD-L1 (SP142) 陽性の症例が 62%存在し、乳癌の診断基準に従えば Atezolizumab が治療選択肢となる可能性がある。  
胃癌原発巣における癌遺伝子解析パネルで評価した TMB は術後再発時の nivolumab 治療の効果に関連している可能性がある。

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 0件）

1. 発表者名 Takaaki Hanyu, Hiroshi Ichikawa, Yosuke Kano, Takashi Ishikawa, Yusuke Muneoka, Daisuke Motegi, Yoshifumi Shimada, Masayuki Nagahashi, Jun Sakata, Toshifumi Wakai
2. 発表標題 Association between MSI using oncogene panel for gastric cancer and mismatch repair gene expression
3. 学会等名 第93回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroshi Ichikawa, Hiroshi Yabusaki, Takaaki Hanyu, Yoshifumi Shimada, Masayuki Nagahashi, Jun Sakata, Takashi Kobayashi, Satoru Nakagawa, Hitoshi Kameyama, Toshifumi Wakai
2. 発表標題 Genomic alteration spectrum and future direction of targeted therapy for gastric cancer
3. 学会等名 第74回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroshi Ichikawa, Yoshifumi Shimada, Masayuki Nagahashi, Takaaki Hanyu, Yosuke Kano, Yusuke Muneoka, Takashi Ishikawa, Yuki Hirose, Kohei Miura, Jun Sakata, Takashi Kobayashi, Satoru Nakagawa, Hiroshi Yabusaki, Hitoshi Kameyama, Toshifumi Wakai
2. 発表標題 Tumor location and alteration spectrum of actionable genes in gastroesophageal cancer
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019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	奥田 修二郎  (Okuda Syujiro)  (00512310)	新潟大学・医歯学系・准教授    (13101)	

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	永橋 昌幸 (Nagahashi Masayuki)  (30743918)	新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員  (13101)	
研究分担者	市川 寛 (Ichikawa Hiroshi)  (50721875)	新潟大学・医歯学系・助教  (13101)	
研究分担者	石川 卓 (Ishikawa Takashi)  (70586940)	新潟大学・医歯学総合病院・准教授  (13101)	
研究分担者	小杉 伸一 (Kosugi Shin-ichi)  (90401736)	新潟大学・医歯学総合病院・特任教授  (13101)	
研究分担者	加納 陽介 (Kano Yosuke)  (90745580)	新潟大学・医歯学総合病院・助教  (13101)	
研究分担者	油座 築 (Yuza Kizuki)  (00745565)	新潟大学・医歯学総合病院・専任助教  (13101)	

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