

令和元年5月22日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10533

研究課題名(和文)大腸癌における新規免疫治療PD-1/PD-L1経路阻害剤の効果予測マーカーの検証

研究課題名(英文)Clinical burden of PD-L1-PD-1 axis in colorectal cancer

研究代表者

廣 純一郎(Hiro, Junichiro)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70444437

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)：大腸癌におけるPD-1/PD-L1 axisやCTLA4の臨床的意義を組織と血清を用いて解明することを目的に研究をおこなった。その結果、大腸癌組織中のPD-L1発現やCTLA4発現が有用な再発・予後予測マーカーになるほか、大腸がん患者血清中の可溶性PD-L1濃度やCTLA4濃度が同様に有用な予後予測マーカーとなることがわかった。さらに本研究を胃癌領域にもすすめて解析すると、同様に胃癌患者血清PD-L1が有用な予後予測マーカーとなりうることを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果を用いることで、あらたな予後予測マーカーとなりうるほか、免疫チェックポイント阻害剤の効果予測因子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify clinical burden of PD-1-PD-L1 axis in colorectal cancer patients. Interestingly, elevated expression of PD-L1 was significantly correlated with poor overall survival and disease-free survival in CRC patients. Furthermore, assessment of CTLA4 concentration in preoperative serum could also identify high-risk population for recurrence and survival in CRC.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 PD-1

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

## 1. 研究開始当初の背景

### 【大腸癌患者の推移】

近年、食生活の欧米化に伴って、日本においても大腸癌による死亡者数が増加しており、女性においては悪性新生物による死亡者数で第1位となっている。症例が増加する一方で手術技術の進歩の他、分子標的薬などの新薬、新レジメンの導入により大腸癌患者の予後は向上してきている。しかしながら、大腸癌の予後を規定する因子は術後再発、遠隔転移であることは変わらず、これらに対する治療の向上が急がれている。

### 【第四の癌治療として免疫療法の登場と新たなバイオマーカーの必要性】

**PD-1 (programmed cell death -1/CD279)**は主に活性化したリンパ球の細胞膜表面上に発現するレセプターで、リンパ球の活性化を抑制する免疫チェックポイント分子の一つである。**PD-1**はそのリガンドである**PD-L1 (programmed cell death-1 ligand-1)**とともに**PD-1/PD-L1**経路を形成しており、腫瘍に発現した**PD-L1**から**T**細胞上の**PD-1**にシグナルが送られると、**T**細胞の活性化が抑えられ、腫瘍免疫の応答が抑制される。そのため、**PD-1/PD-L1**経路を遮断することによって腫瘍免疫応答を再活性化させることが期待され、癌治療の新規治療として注目されている。

最近、完全ヒト型 **IgG4** モノクローナル抗体である抗 **PD-1** 抗体 (**Nivolumab**) は、悪性黒色腫、腎細胞癌、非小細胞肺癌において抗腫瘍効果が認められており、臨床試験の結果を踏まえて、悪性黒色腫に関しては日米で、肺扁平上皮癌に対しては米国で薬事承認されている。また、抗 **PD-1** 抗体は上記以外に卵巣癌、頭頸部癌、胃癌、ホジキンリンパ腫でも有効性が期待され、抗 **PD-L1** 抗体は膀胱癌において有効性が期待されており、多岐に渡る癌種において抗 **PD-1/PD-L1** 抗体による免疫療法を導入できる可能性がある。一方で、治療に反応する患者群は一部に留まっており、各症例において免疫状態の個人差が大きい事が考えられ、免疫療法の有効性に関するバイオマーカーの同定が望まれる。抗 **PD-1/PD-L1** 抗体の治療に対する患者選択のバイオマーカーとして腫瘍内 **PD-L1** 発現が注目されているが、**PD-L1** 発現と治療効果の相関がない、または陰性例にも治療効果があるなど議論の余地が残されている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、多岐にわたる癌種に導入が期待される抗 **PD-1/PD-L1** 抗体の免疫療法に関して、大腸癌におけるその治療効果ならびに治療効果予測に関して基礎的、臨床的検討を行うことである。特に、変異抗原が多い癌種では、それを特異的に認識する **T** 細胞も数多く存在し、同時に **PD-L1/PD-1** 経路を介した免疫抑制が生じていることが推測されるため、抗 **PD-1/PD-L1** 抗体阻害剤が有望であると考えられている。そこで大腸癌における **PD-L1** 発現および抗 **PD-1** 抗体の効果をもスマッチ修復(MMR)遺伝子発現の有無とそれに依存する癌腫瘍免疫、ならびに宿主免疫と関連づけて検証する。これにより今後大腸癌にも導入される可能性がある抗 **PD-1** 抗体の治療効果判定を系統的に提示することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### ・大腸癌組織における PD-L1, CTLA-4 の免疫染色解析

大腸癌組織 130 例の原発腫瘍の FFPE 標本から薄切を行い、PD-L1 と CTLA-4 の大腸癌組織における発現解析を行った。

### ・大腸癌術前血清における可溶性 PD-L1, 可溶性 CTLA-4 の濃度解析

免疫染色を施行した大腸癌組織 130 例の術前血清を用い、サンドウィッチ ELISA 法にて可溶性 PD-L1 と可溶性 CTLA-4 の濃度測定を行った。

### ・DNA 抽出(組織)

大腸癌組織 130 例の原発腫瘍、近傍正常大腸粘膜より採取した FFPE 標本から DNA を Qiamp DNA FFPE extraction kit(Qiagen)を利用して抽出した。

### ・KRAS Codon12/13, BRAFv600E, MSI 解析

大腸癌組織より抽出した DNA を用いて capillary sequencer による direct sequence で KRAS codon12/13, BRAFv600E を解析した。さらに MSI に関しては、BAT25、BAT26、NR-21、NR-24、NR-27 の 5 つのマーカーを使用したフラグメント解析を行った。

### ・がん微小環境における Tumor infiltrative lymphocytes 解析

大腸癌組織 130 例の原発腫瘍の FFPE 標本から薄切を行い、FOXP3 と CD-8 の大腸癌組織における免疫染色を行い、がん浸潤リンパ球(TIL)の程度を解析した。

## 4. 研究成果

大腸癌組織における PD-L1 発現の発現パターンやその臨床的意義を確認するために、まずは大腸癌における PD-L1 の発現解析を行った。

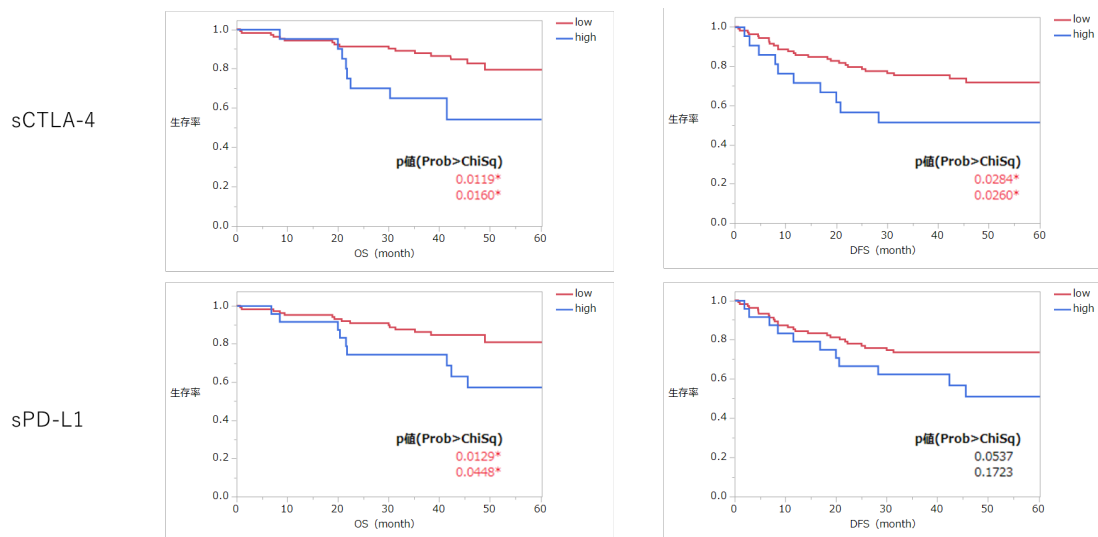
PD-L1 は、大腸がん細胞は正常粘膜や、大腸癌組織間質と比較し、有意に発現上昇をみとめた。またその発現は、がん深達度や、リンパ管侵襲と有意な相関を認めた。また予後解析を行うと、大腸癌組織における PD-L1 高発現群は有意に予後不良となることが分かった。また分子生物学的相関に関して、PD-L1 発現は KRAS 変異群において有意に発現増加する可能性が示唆された。

一方、大腸癌術前血清を用いた可溶性 PD-L1 濃度解析は、臨床病理学的因子との相関は認めないものの、予後解析においては興味深いことに sPD-L1 高値群は、全生存期間、無再発生存期間において有意に予後不良となった。

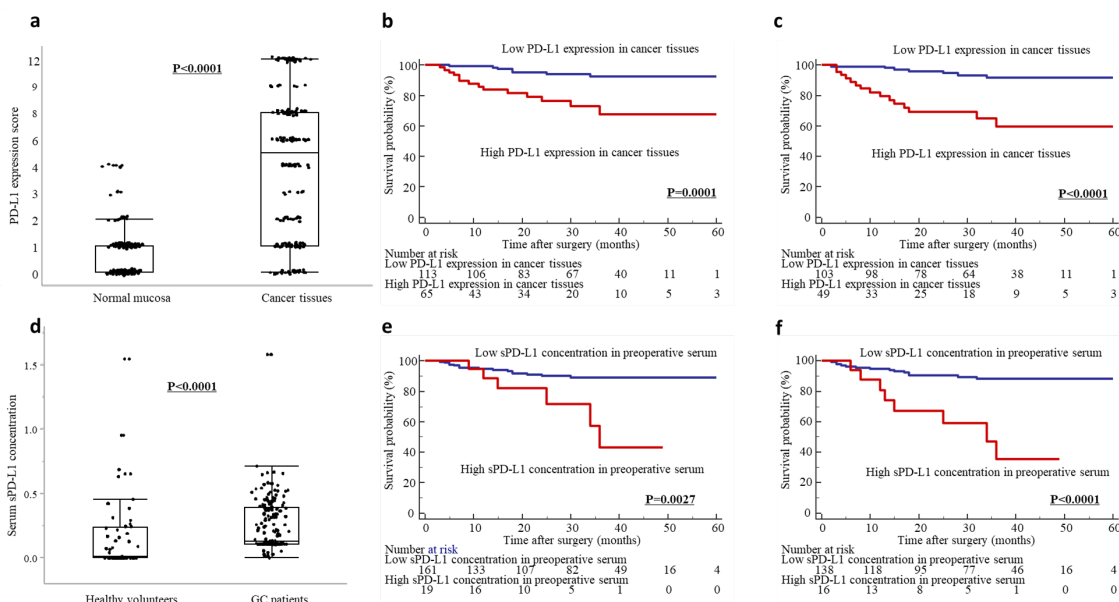
さらに CTLA-4 についても研究を進めたが、CTLA-4 の癌組織における高発現は、無再発生存期間、全生存期間において、有意に予後不良となったほか、可溶性 CTLA-4 高濃度群もまた同様に、無再発生存期間、全生存期間において、有意に予後不良となることがわかった。

実際、可溶性 PD-L1 高濃度かつ可溶性 CTLA-4 高濃度群は、その他の群と比較し、著明に予後不良であることが無再発生存期間、全生存期間において認めている。また癌微小環境における TIL や、RAS, RAF, MSI などの分子生物学的特徴との相関解析も行ったが、これらと可溶性 PD-L1, 可溶性 CTLA-4 高濃度とは有意な相関は認めなかった。

以上のことから血清中の PD-L1, CTLA-4 濃度測定は有用な予後マーカーとなるほか、PD-1 抗体や CTLA-4 抗体薬における有効性予測マーカーになる可能性が考慮された。



また本研究に付随して、大腸がんのみならず、胃癌においても同様な解析をすすめたところ、興味深いことに、胃癌組織における PD-L1 高発現、胃癌術前血清における可溶性 PD-L1 高濃度群は、無再発生存期間、全生存期間における有用な予後マーカーとなるほか、多変量解析を行うと、血清 PD-L1 濃度が独立した予後不良因子となることがわかった。



## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計5件)

Soluble PD-L1 expression in Circulation as a Predictive Marker for Recurrence and Prognosis in Gastric Cancer: Direct Comparison of the Clinical Burden Between Tissue and Serum PD-L1 Expression.

Shigemori T, Toiyama Y, Okugawa Y, Yamamoto A, Yin C, Narumi A, Ichikawa T, Ide S, Shimura T, Fujikawa H, Yasuda H, Hiro J, Yoshiyama S, Ohi M, Araki T, Kusunoki M.

Ann Surg Oncol. 2019 Mar;26(3):876-883. doi: 10.1245/s10434-018-07112-x 査読有

Circulating miR-203 derived from metastatic tissues promotes myopenia in colorectal cancer patients.

Okugawa Y, Toiyama Y, Hur K, Yamamoto A, Yin C, Ide S, Kitajima T, Fujikawa H, Yasuda H, Koike Y, Okita Y, Hiro J, Araki T, Miki C, McMillan DC, Goel A, Kusunoki M.

J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2019 Mar 25. doi: 10.1002/jcsm.12403. 査読有

Lymphocyte-C-reactive Protein Ratio as Promising New Marker for Predicting Surgical and Oncological Outcomes in Colorectal Cancer.

Okugawa Y, Toiyama Y, Yamamoto A, Shigemori T, Ide S, Kitajima T, Fujikawa H, Yasuda H, Hiro J, Yoshiyama S, Yokoe T, Saigusa S, Tanaka K, Shirai Y, Kobayashi M, Ohi M, Araki T, McMillan DC, Miki C, Goel A, Kusunoki M.

Ann Surg. 2019 Feb 16. doi: 10.1097/SLA.0000000000003239. 査読有

Inflammation-based prognostic scores as indicators to select candidates for primary site resection followed by multimodal therapy among colorectal cancer patients with multiple metastases.

Shimura T, Toiyama Y, Saigusa S, Imaoka H, Okigami M, Fujikawa H, Hiro J, Kobayashi M, Ohi M, Araki T, Inoue Y, Uchida K, Mohri Y, Kusunoki M.

Int J Clin Oncol. 2017 Aug;22(4):758-766. doi: 10.1007/s10147-017-1113-2 査読有

Prognostic Impact of Preoperative Albumin-to-Globulin Ratio in Patients with Colon Cancer Undergoing Surgery with Curative Intent.

Fujikawa H, Toiyama Y, Inoue Y, Imaoka H, Shimura T, Okigami M, Yasuda H, Hiro J, Yoshiyama S, Saigusa S, Kobayashi M, Ohi M, Araki T, Mohri Y, Kusunoki M.

Anticancer Res. 2017 Mar;37(3):1335-1342. 査読有

### 〔学会発表〕(計3件)

重盛恒彦 問山裕二 奥川喜永 山本晃 大村悠介 井出正造 北嶋貴仁 浦谷亮 藤川裕之 安田裕美 吉山繁幸 廣純一郎 小林美奈子 内田恵一 荒木俊光 楠正人 大腸癌組織における PD-L1 の発現動態と臨床病理学的因子ならびに予後との相関. 第 118 回日本外科学会定期学術集会 2018

重盛恒彦 問山裕二 奥川喜永 山本晃 浦谷亮 藤川裕之 安田裕美 吉山繁幸 廣純一郎 小林美奈子 内田恵一 荒木俊光 楠正人 胃癌患者における予後予測バイオマーカーとしての組織および血清 PD-L1 発現の可能性について. 第 73 回日本消化器外科学会総会 2018

Shigemori T, Toiyama Y, Okugawa Y, Yamamoto A, Ichikawa T, Shimura T, Kitajima T, Ide S, Yasuda H, Fujikawa H, Okita Y, Hiro J, Yoshiyama S, Kobayashi M, Ohi M, Araki T and Kusunoki M. Tissue and serum PD-L1 expression as a predictive biomarker, early recurrence and prognosis in gastric cancer patients. The Digestive Disease Week(DDW) 2018.

### 〔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：問山 裕二

ローマ字氏名：(Toiyama, Yuji)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学部附属病院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：**00422824**

研究分担者氏名：井上 靖浩

ローマ字氏名：(Inoue, Yasuhiro)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学系研究科

職名：客員准教授

研究者番号（8桁）：**20324535**

研究分担者氏名：楠 正人

ローマ字氏名：(Kusunoki, Masato)

所属研究機関名：三重大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：**50192026**

### (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。