

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21506

研究課題名(和文) driver遺伝子異常肺癌に対する分子標的薬の耐性化と、抗PD1抗体の有効性

研究課題名(英文) Resistance mechanism of molecular targeted therapy and tumor micro environment as the immune-checkpoint inhibitor's biomarker

研究代表者

林 秀敏 (HAYASHI, Hidetoshi)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：10548621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR-TKIに耐性を示した後にニボルマブを使用したEGFR変異陽性非小細胞肺癌25例(T790M変異陽性8例)の有効性および免疫関連因子を検討した。陰性症例は陽性と比較して良好な有効性及び、PD-L1が高発現の傾向を示した。ニボルマブ使用症例9例の全エクソーム解析にてnon-synonymous mutation数を評価したところ、奏効例では有意にmutation数が高値であった。EGFR-TKI耐性症例に関しての耐性機序毎の抗PD-1抗体の有効性やnon-synonymous mutationを評価した初の報告であり、Annals of Oncology誌にて報告した。

研究成果の概要(英文)：The efficacy of PD-1 blockade in EGFR mutated NSCLC with different mechanisms of acquired resistance to EGFR-TKIs is unknown. We retrospectively evaluated nivolumab efficacy and immune-related factors in such patients according to their status for the T790M resistance mutation of EGFR. We identified 25 patients with EGFR mutation-positive NSCLC who were treated with nivolumab. Whole-exome sequencing of tumor DNA was carried out to identify gene alterations.

Efficacy of nivolumab tended to increase as the PD-L1 expression level increased with cutoff values of 10% and 50%. The proportion of tumors with a PD-L1 level of 10% or 50% was higher among T790M-negative patients than among -positive patients. Nivolumab responders had a significantly higher CD8+ TIL density and nonsynonymous mutation burden.

T790M-negative patients with EGFR mutation-positive NSCLC are more likely to benefit from nivolumab after EGFR-TKI treatment, possibly as a result of a higher PD-L1 expression level.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：バイオマーカー 個別化医療 免疫チェックポイント阻害薬

1. 研究開始当初の背景

Keywords: 抗PD-1抗体、EGFR遺伝子変異、ALK融合遺伝子、獲得耐性

肺癌は世界的にも癌死の原因として最多である。なかでも非小細胞肺癌 (NSCLC) がその80%以上を占め、その予後は不良である。近年、進行NSCLCの治療選択にあたってはこれらの遺伝子異常を検索することが必須となっている。これらはdriver遺伝子異常と称される強力な癌化遺伝子と考えられており、その阻害剤を投与する事で良好な治療成績が示されており、EGFR遺伝子変異陽性NSCLCではEGFR-TKI(EGFR-Tyrosine kinase inhibitor)は標準治療として認識されており、現在では初回治療に多くの場合で使用され、その治療成績は一般的な細胞傷害性抗がん薬と比較して極めて有効である。

一方で最近では免疫チェックポイント阻害療法である抗PD-1抗体(Programmed death-1抗体)の開発も急速に進んでいる。Programmed cell death protein 1 (PD-1)は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞表面受容体でありT細胞やpro-B細胞に発現している。PD-1とそのリガンドはT細胞の活性化を抑制することで自己免疫を抑制し自己免疫寛容を促進する事で、免疫システムの制御において重要な役割を担う。

PD-1阻害の効果はリンパ節での抗原特異T細胞のアポトーシスの促進と、それと同時に制御性T細胞のアポトーシスを減少させるという二つのメカニズムを介して示され、臨床試験においても抗腫瘍効果をもたらすことが示されている。進行NSCLCはPD-1抗体の治療開発が最も進んでいる癌腫の一つであり、2つの第3相臨床試験において、従来の化学療法と比較してPD-1抗体であるNivolumabの有意な生存延長効果が既に示されており、有効例では長期奏効を有する事が多いことも特徴的である。

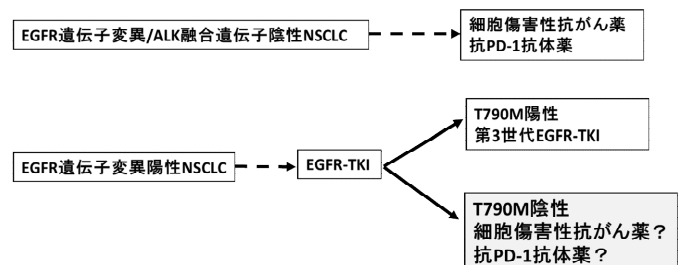
EGFR遺伝子変異陽性NSCLCでは、EGFR遺伝子変異を有する気道上皮細胞ではPD-L1の発現が誘導されており、さらにはEGFR-TKIによるEGFRの阻害がPD-L1の発現も低下させることが示されており、EGFR遺伝子変異陽性NSCLCにおいてPD-1/PD-L1経路の阻害による治療戦略は有望な可能性を示唆する。ただし、EGFR遺伝子変異陽性NSCLCの中でEGFR-TKIの未治療例ではEGFR-TKIによる治療が非常に有用であることが広く認識されており、PD-1抗体がそれに代る可能性は少ないと考えられる。一方でEGFR-TKIは約1年程度の無増悪生存期間が報告されているが、最終的には耐性化が避けられず(獲得耐性)、その後の予後は不良のため、克服に向けた治療戦略

は急務である。獲得耐性の機序の一つとして、EGFRにおけるEGFR-TKIとの結合部位の二次的変異(T790M変異など)が挙げられる。T790M変異が原因でEGFR-TKIに耐性化したEGFR mut NSCLCに対する治療戦略としては、第3世代EGFR-TKIとも称される変異型EGFR選択的EGFR-TKIによる治療戦略の開発が進められており、近い将来の臨床導入が期待されている。

T790M変異以外の獲得耐性の機序としてはMET遺伝子の増幅やそのリガンドである肝細胞増殖因子(HGF)の過剰発現によるMetの活性化などの側副経路(Bypass Track)、上皮間葉移行(EMT)や小細胞肺癌転化などが知られている。

そこで本研究では、EGFR遺伝子変異陽性NSCLCに対してその獲得耐性の機序とPD-1抗体の有効性のバイオマーカー候補因子(IHCによるPD-L1発現や、mutational landscapeなど)の関係を分子標的薬に対して耐性化した細胞株と、分子標的薬治療に耐性化した再生検臨床検体とを用いて、免疫チェックポイント阻害療法に影響を与える可能性がある因子について解析することで明らかにする。

- (1) EGFR遺伝子変異陽性EGFR-TKI耐性細胞株やALK融合遺伝子陽性ALK-TKI耐性株を使用して、PD-L1の発現解析やmutational landscape解析を行い、耐性機序とこれらの関連を明確にする。
- (2) EGFR遺伝子変異陽性EGFR-TKI耐性細胞株の中でT790M変異より耐性化を有した細胞株に関しても、第3世代EGFR-TKIの耐性株を樹立し、この耐性機序とPD-1関連経路との関連を明確にする。
- (3) EGFR遺伝子変異陽性やALK融合遺伝子陽性患者から得られた生検検体を解析し、分子標的治療前後での免疫チェックポイント阻害剤の有効性バイオマーカーの変動を検索し、その臨床成績との関連を検討する。



## 2. 研究の目的

非小細胞肺癌における driver 遺伝子異常 (EGFR 遺伝子変異や ALK 融合遺伝子など) に対する分子標的薬治療およびその耐性化と、免疫チェックポイント阻害療法の有効性との関係性について基礎的および臨床的に検討する。

## 3. 研究の方法

### 1.Driver 遺伝子異常を有する細胞株の分子標的薬に対する耐性株と親株とを用いた基礎解析

1.1. 過去に作成した複数の耐性細胞株と親株について (HCC827, HCC827ER, HCC827EPR, PC-9, PC-9/ZD, H4006, H4006ER, H3122, H3122TR) PD-L1 の発現を mRNA レベルおよびタンパクレベルで解析する。特に細胞表面での PD-L1 発現が最も重要であると考えられているのでフローサイトメトリーを用いた表面マーカーの解析も実施する。研究の一部を担当する富樫庸介は近畿大学ゲノム生物学教室にて既に本研究に着手しており、また次世代シーケンシング技術を用いた研究経験も豊富に有している。

1.2. これら細胞株については耐性機序が過去に明らかになっており (HCC827ER: MET シグナルの活性化, HCC827EPR・PC-9/ZD: T790M, H4006ER: EMT, H3122TR: HER シグナルの活性化) その耐性機序を抑制することによる変化も検討し、PD-L1 の発現に関わるシグナルを明らかにする。

1.3. 効果予測バイオマーカーとして報告されている体細胞変異について次世代シーケンシング技術を用いてエクソームシーケンシングを行い耐性株と親株とで比較検討する。

### 2.Driver 遺伝子異常を有する NSCLC (主に EGFR 遺伝子変異) の臨床検体について、分子標的薬 (主に EGFR 阻害剤) 治療開始前の生検検体と耐性化時の再生検体とをペアにして用いた解析

2.1. 遺伝子変異に対応する分子標的治療薬治療開始前と耐性化時とのペア検体を用いて PD-L1 の免疫染色を行い 1. の結果を踏まえて比較検討する。腫瘍の PD-L1 だけではなく腫瘍浸潤リンパ球なども検討する。再生検体の際には T790M の有無については検討されているため、そういった背景因子との相関も検討する。また、改めて耐性機序に関して検索し、耐性機序と PD-L1 の発現や腫瘍浸潤リンパ球との関連も検討する。

2.2. DNA が抽出可能な検体についてはペアでエクソームシーケンシングを行い体細胞

変異も比較する。

### 3. 第 3 世代 EGFR-TKI 耐性株樹立と耐性株に対する基礎解析

3.1. T790M 変異 NSCLC 細胞株において第 3 世代 EGFR-TKI の耐性株を樹立する。

3.2. これに対して免疫チェックポイント阻害剤の有効性の可能性を in vitro, in vivo において検討する。耐性株樹立後の手法は上記の手法 1 および 2 と同様である。

## 4. 研究成果

EGFR-TKI に耐性を示した後にニボルマブを使用した EGFR 変異陽性非小細胞肺癌 25 例の有効性および免疫関連因子を検討した。25 例全例で T790M 変異検索が行われ、8 例が T790M 変異陽性であった。T790M 陰性症例は陽性症例と比較して無増悪生存期間 (PFS) 及び奏効率ともに良好な傾向が認められたのに加え、PD-L1 の発現も T790M 陰性症例で高い傾向であった。

また、PD-L1 の高発現例では、有意差をもってニボルマブの奏効率が改善した。さらに EGFR-TKI 耐性後で T790M 変異検索が行われている 60 例において PD-L1 発現および CD8、FOXP3 陽性の T リンパ球を免疫染色において評価したところ、T790M 変異陰性例において PD-L1 発現率が高い傾向を認め、有意な FOXP3 陽性 T リンパ球の減少を認めた。

また、ニボルマブ使用症例 9 例 (うち奏効例 3 例) の全エクソーム解析にて non-synonymous mutation 数を評価したところ、奏効例では有意に mutation 数が高値であった。EGFR-TKI 耐性症例に関しての耐性機序毎の抗 PD-1 抗体の有効性や non-synonymous mutation を評価した初めての報告であり、Annals of Oncology 誌に採択され報告した (Haratani K, Hayashi H, et al Ann Oncol. 2017 Jul 1;28(7):1532-1539. doi:10.1093/annonc/mdx183.)。

加えて EGFR 経路の MAPK 経路を介した活性化により、腫瘍の MHC class 1 発現が抑制され、こちらに対して EGFR の阻害および MAPK の阻害が MHC class 1 の発現回復に繋がる事を in vitro に示している。T790M 変異により Gefitinib や Erlotinib, Afatinib に耐性を来している EGFR 遺伝子変異陽性の肺癌細胞株である PC9GR に対し、IFN- 暴露下で Osimertinib を投与することで、MHC Class1 の発現が回復することもしている。本研究の詳細に関しても論文投稿中である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Haratani K, Hayashi H, Tanaka T, Kaneda H, Togashi Y, Sakai K, Hayashi K, Tomida S, Chiba Y, Yonesaka K, Nonagase Y, Takahama T, Tanizaki J, Tanaka K, Yoshida T, Tanimura K, Takeda M, Yoshioka H, Ishida T, Mitsudomi T, Nishio K, Nakagawa K. Tumor immune microenvironment and nivolumab efficacy in EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer based on T790M status after disease progression during EGFR-TKI treatment. *Ann Oncol* ,28(7);1532-1539,2017.
2. 林秀敏, 光徹哉, 肺がんにおける EGFR 遺伝子変異と免疫チェックポイント阻害薬, 癌と化学療法 44 巻 9 号;722-726,2017.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 原谷浩司、林秀敏、田中妙、金田裕靖、富樫庸介、坂井和子、吉岡弘鎮、光徹哉、西尾和人、中川和彦, EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌における EGFR-TKI 耐性後 T790M 変異有無によるニボルマブ治療効果と腫瘍微小免疫環境の後向き検討, 第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会,2017.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

林 秀敏 (HAYASHI, Hidetoshi)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号:10548621