

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08680

研究課題名(和文) 胃癌における抗PD-1抗体の効果予測—末梢血と局所の免疫担当細胞の機能解析

研究課題名(英文) Prediction of anti-PD-1 antibody treatment for gastric cancer

研究代表者

吉野 茂文 (Yoshino, Shigefumi)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60294633

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)： Nivolumabを投与した切除不能・再発胃癌患者を対象として、治療効果を予測するバイオマーカーの検索を行った。

治療開始前と開始6週後において末梢血の好中球/リンパ球比(NLR)を測定し、また末梢血単核球(PBMC)のCD4、CD8におけるPD-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3陽性細胞の測定を行った。Treg、MDSCの測定も行った。有効例では治療前後のNLRが維持されており、また治療開始前のCD4+PD-1+細胞、CD8+PD-1+細胞の割合が20%未満であった。

NLR、治療前のCD4+PD-1+、CD8+PD-1+が、治療効果を予測するバイオマーカーになる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌に対する免疫チェックポイント阻害薬である Nivolumabが保険適用となったが、有効性を予測できるバイオマーカーは存在しない。Nivolumabの有効性は約半数であり、しかも非常に高額であるため患者選択は必須である。研究代表者はこれまでに消化器癌に対する数多くの免疫療法の経験から、様々なバイオマーカーの検索を行ってきたが、その中でも特にCD4、CD8における PD-1、Tim-3が有用なバイオマーカーになるとの結果を得た。この経験からNivolumabにおいても免疫担当細胞における免疫チェックポイント分子が、新たなバイオマーカーになるのではないかとこの着想に至り本研究計画を立案した。

研究成果の概要(英文)： The purpose of the present study was to explore novel biomarkers that can predict the clinical outcome of patients before or during Nivolumab treatment. Neutrophil/lymphocyte ratio (NLR) of the peripheral blood, and PD-1, TIM-3, TIGIT, LAG-3 positive cells, Treg, MDSC in PBMC were measured by flowcytometry.

Multivariate analysis showed that the maintenance of NLR during the treatment was a positive predictive biomarker of overall survival. Moreover, responder of Nivolumab treatment showed a low expression level (<20%) of PD-1 on CD4+, CD8 cells before treatment.

These results indicate that NLR during the treatment and PD-1 expression on CD4+, CD8 cells before treatment may become a useful biomarkers that can predict the clinical outcome of patients receiving Nivolumab treatment.

研究分野：消化器外科

キーワード：胃癌 抗PD-1抗体 効果予測 バイオマーカー 免疫担当細胞

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

待望の免疫チェックポイント阻害薬 Nivolumab (抗 PD-1 抗体) が、2017 年 9 月に日本でも胃癌に保険適用となった。切除不能・再発胃癌に対する Nivolumab を用いた免疫療法は、有効例においては長期生存が期待できるため非常に希望の持てる画期的な治療法と言える。しかし無増悪生存期間が対照であるプラセボに対して有意な延長を示すものの、約 50% の症例ではプラセボと同様に 1.5 か月後には腫瘍が増悪しており有効性が認められていない (文献 1, 2)。しかも Nivolumab の薬価は高額であり、このような高額医療に対して有効例と無効例を治療前あるいは治療初期のうちに選別できる有効なバイオマーカーを発見することは重要な課題である。

### 2. 研究の目的

肺癌における抗 PD-1 抗体では、腫瘍における PD-L1 の発現が治療効果のバイオマーカーとなり得るが、胃癌における抗 PD-1 抗体では明確な治療効果予測のバイオマーカーが示されていない。これまでのバイオマーカー検索では腫瘍と細胞傷害性 T リンパ球とのインターアクションのみに注目して、専ら腫瘍における PD-L1 の発現が注目されてきた。本研究ではこれまでの研究の成果 (文献 3) から、胃癌患者の免疫担当細胞間のインターアクションに主眼を置いて新たなバイオマーカーの検索を行う計画を立てた。すなわち細胞傷害性 T リンパ球、ヘルパー T リンパ球における免疫チェックポイント分子の解析を行い、Nivolumab の効果との関係を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 対象

切除不能・再発胃癌に対して Nivolumab を投与した 10 例を対象とし解析を行った。

#### (2) 末梢血好中球/リンパ球比 (NLR)

Nivolumab 投与前と投与 6 週間後の末梢血好中球/リンパ球比 (NLR) を測定した。

#### (3) フローサイトメトリーによる解析

Nivolumab 投与前と投与 6 週間後に末梢血を 15ml 採血し末梢血単核球 (PBMC) を凍結保存した。PBMC を用いてフローサイトメトリーにより CD4、CD8 における PD-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3 の測定を行った。また regulatory T-cell (Treg)、myeloid-derived suppressor cell (MDSC) の測定も行った。PD-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3 は、それぞれ Programmed death receptor-1、T cell immunoglobulin mucin-3、T-cell immunoreceptor with immunoglobulin and ITIM domains、Lymphocyte-activation gene 3 という免疫チェックポイント受容体である。PD-1、TIM-3、TIGIT、LAG-3 は、それぞれ抗 PD-1 抗体、抗 TIM-3 抗体、抗 TIGIT 抗体、抗 LAG-3 抗体を用いて PBMC を染色し、その陽性細胞を測定した。

Treg は CD4+ CD45RA- CD25high として同定される細胞、MDSC は CD11b + CD33+ として同定される細胞とした。

#### (4) これらのパラメーターと Nivolumab の治療効果の関係を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) Nivolumab の臨床効果

10 例の年齢中央値は 68.5 歳 (48-78 歳)、男/女=8/2、切除不能/再発=6/4 例、組織型は tub/por/muc=5/4/1 例で HER2 発現は 1 例で陽性、Microsatellite Instability (MSI) は検索した 9 例とも陰性であった。最良治療効果は PR/SD/PD=2/1/7 例で、奏効率 20%、病勢コントロール率は 30% であった。

#### (2) NLR と臨床効果の関係

この NLR 増加率に着目し、カットオフ値を中央値の 138.1% とし、それ以上の増加を示したものは NLR 上昇群 (n=5) それ以下を NLR 維持群 (n=4) で Overall 治療有効 (PR/SD, n=3) 群と無効 (PD, n=7) 群に分け、治療開始前と開始 6 週間後の各リンパ球数、NLR、その増加率について単変量解析を行うと、治療開始から 6 週間後の NLR 増加率が、治療有効群で有意に低かった (p=0.03)。1 Survival を比較すると NLR 維持群で有意に予後良好であった (p=0.044, log-rank 検定)。

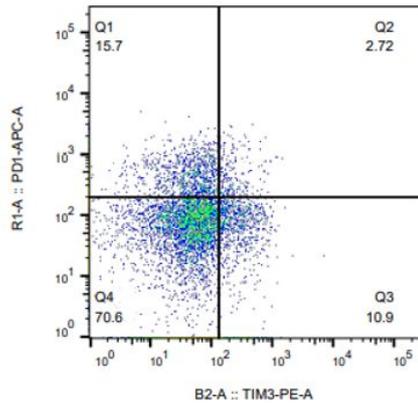
#### (3) フローサイトメトリーによる解析と臨床効果の関係

治療有効 (PR/SD, n=3) 群と無効 (PD, n=7) 群に分けフローサイトメトリーによる解析と臨床効果の関係を検討した。尚、陽性細胞の割合や変化率は、平均 ± 標準誤差で示す。

PD-1

治療開始前の CD4 における PD-1 陽性細胞の割合は、有効群が  $18.6 \pm 0.7\%$ 、無効群が  $22.5 \pm 3.5\%$  と両群間に差はなかったが、有効例では全例 20%未満であったのに対し、無効例では 7 例中 3 例で 20%以上であった（有効例と無効例のサイトグラムを図 1 に示す）。また、治療開始前後の CD4 における PD-1 陽性細胞の割合は、有効群が  $18.6 \pm 0.7$  から  $3.7 \pm 1.1\%$  へ、無効群が  $22.5 \pm 3.5$  から  $5.5 \pm 1.8\%$  へと低下しており、有効群、無効群ともに治療開始前に比べ治療後は、PD-1 陽性細胞の割合が有意に低下していた（有効群、無効群ともに  $p < 0.05$ 、図 2）。その変化率は有効群  $0.20 \pm 0.07$ 、無効群  $0.23 \pm 0.06$  であり、変化率は両群間に差がなかった。

有効例 Nivolumab投与前  
CD4+PD-1+(18.5%)



無効例 Nivolumab投与前  
CD4+PD-1+(39.5%)

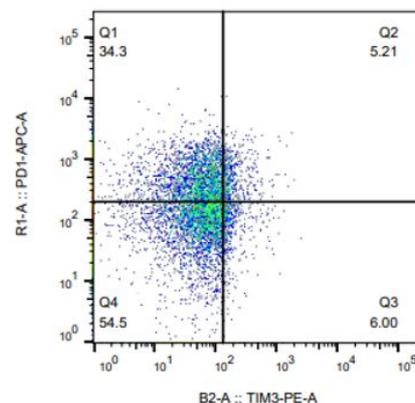
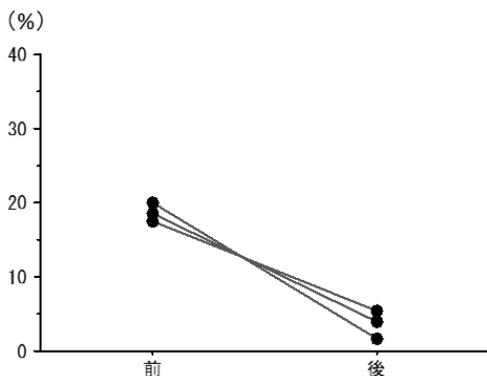


図 1 . 有効例と無効例の CD4+PD-1+細胞のサイトグラム

有効例と無効例の代表的な CD4+PD-1+細胞のサイトグラムを示す。縦軸が CD4+PD-1+細胞である。横軸は CD4+TIM-3+細胞。

有効例 Nivolumab投与前後の  
CD4+PD-1+ 細胞の推移



無効例 Nivolumab投与前後の  
CD4+PD-1+ 細胞の推移

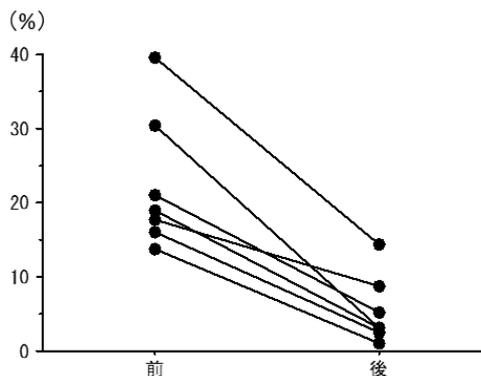
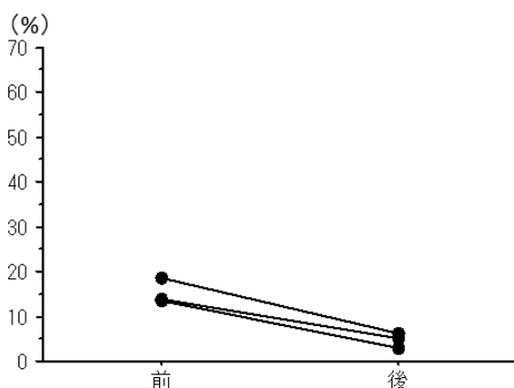


図 2 . 有効例と無効例における Nivolumab 投与前後の CD4+PD-1+細胞の推移

有効群、無効群ともに治療開始前に比べ治療後は、PD-1 陽性細胞の割合は有意に低下していた。治療開始前の PD-1 陽性細胞の割合は、有効例では全例 20%未満であったのに対し、無効例では 7 例中 3 例で 20%以上であった。

治療開始前の CD8 における PD-1 陽性細胞の割合は、有効群が  $15.3 \pm 1.7\%$ 、無効群が  $24.7 \pm 7.1\%$  と両群間に差はなかったが、有効例では全例 20%未満であったのに対し、無効例では 7 例中 4 例で 20%以上であった。また、治療開始前後の CD8 における PD-1 陽性細胞の割合は、有効群が  $15.3 \pm 1.7$  から  $4.7 \pm 1.0\%$  へ、無効群が  $24.7 \pm 7.1$  から  $6.4 \pm 1.7\%$  へと低下しており、有効群、無効群ともに治療開始前に比べ治療後は、PD-1 陽性細胞の割合が有意に低下していた（有効群、無効群ともに  $p < 0.05$ 、図 3）。その変化率は有効群  $0.30 \pm 0.05$ 、無効群  $0.39 \pm 0.18$  であり、変化率は両群間に差がなかった。

### 有効例 Nivolumab投与前後の CD8+PD-1+ 細胞の推移



### 無効例 Nivolumab投与前後の CD8+PD-1+ 細胞の推移

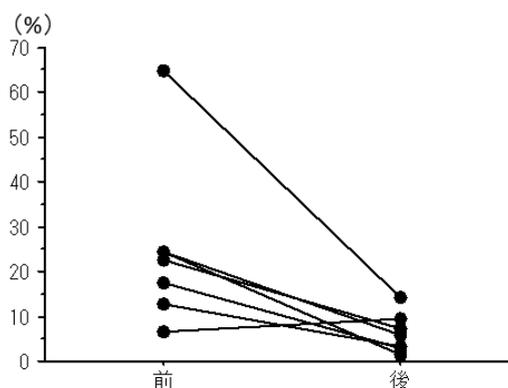


図3. 有効例と無効例における Nivolumab 投与前後の CD8+PD-1+細胞の推移

有効群、無効群ともに治療開始前に比べ治療後は、PD-1 陽性細胞の割合は有意に低下していた。治療開始前の PD-1 陽性細胞の割合は、有効例では全例 20%未満であったのに対し、無効例では 7 例中 4 例で 20%以上であった。

#### TIM-3

治療開始前の CD4 における TIM-3 陽性細胞の割合は、有効群が  $7.4 \pm 3.1\%$ 、無効群が  $8.5 \pm 2.1\%$ と両群間に差はなかった。また、治療開始前後の CD4 における TIM-3 陽性細胞の割合は、有効群が  $7.4 \pm 3.1$  から  $8.4 \pm 3.0\%$ 、無効群が  $8.5 \pm 2.1$  から  $6.5 \pm 2.3\%$ と、有効群、無効群ともに治療開始前後に変化がなかった。

治療開始前の CD8 における TIM-3 陽性細胞の割合は、有効群が  $13.7 \pm 1.6\%$ 、無効群が  $9.2 \pm 1.7\%$ と両群間に差はなかった。また、治療開始前後の CD8 における TIM-3 陽性細胞の割合は、有効群が  $13.7 \pm 1.6$  から  $15.0 \pm 2.6\%$ 、無効群が  $9.2 \pm 1.7$  から  $7.8 \pm 1.5\%$ と、有効群、無効群ともに治療開始前後に変化がなかった。

#### TIGIT

治療開始前の CD4 における TIGIT 陽性細胞の割合は、有効群が  $15.7 \pm 0.6\%$ 、無効群が  $16.5 \pm 2.0\%$ と両群間に差はなかった。また、治療開始前後の CD4 における TIGIT 陽性細胞の割合は、有効群が  $15.7 \pm 0.6$  から  $16.0 \pm 0.3\%$ 、無効群が  $16.5 \pm 2.0$  から  $14.0 \pm 1.4\%$ と、有効群、無効群ともに治療開始前後に変化がなかった。

治療開始前の CD8 における TIGIT 陽性細胞の割合は、有効群が  $42.5 \pm 7.9\%$ 、無効群が  $45.4 \pm 6.4\%$ と両群間に差はなかった。また、治療開始前後の CD8 における TIGIT 陽性細胞の割合は、有効群が  $42.5 \pm 7.9$  から  $44.6 \pm 11.4\%$ 、無効群が  $45.4 \pm 6.4$  から  $43.1 \pm 4.9\%$ と、有効群、無効群ともに治療開始前後に変化がなかった。

#### LAG-3

治療開始前の CD4 における LAG-3 陽性細胞の割合は、有効群が  $2.2 \pm 0.4\%$ 、無効群が  $2.6 \pm 0.9\%$ と両群間に差はなかった。また、治療開始前後の CD4 における LAG-3 陽性細胞の割合は、有効群が  $2.2 \pm 0.4$  から  $1.9 \pm 0.5\%$ 、無効群が  $2.6 \pm 0.9$  から  $2.0 \pm 0.5\%$ と、有効群、無効群ともに治療開始前後に変化がなかった。

治療開始前の CD8 における LAG-3 陽性細胞の割合は、有効群が  $4.2 \pm 0.7\%$ 、無効群が  $2.6 \pm 0.5\%$ と両群間に差はなかった。また、治療開始前後の CD8 における LAG-3 陽性細胞の割合は、有効群が  $4.2 \pm 0.7$  から  $5.2 \pm 1.6\%$ 、無効群が  $2.6 \pm 0.5$  から  $2.9 \pm 0.7\%$ と、有効群、無効群ともに治療開始前後に変化がなかった。

#### Treg

治療開始前の Treg の割合は、有効群が  $1.5 \pm 0.1\%$ 、無効群が  $1.7 \pm 0.3\%$ と両群間に差はなかった。また、治療開始前後の Treg の割合は、有効群が  $1.5 \pm 0.1$  から  $1.8 \pm 0.1\%$ 、無効群が  $1.7 \pm 0.3$  から  $1.7 \pm 0.4\%$ と、有効群、無効群ともに治療開始前後に変化がなかった。

#### MDSC

治療開始前の MDSC の割合は、有効群が  $28.1 \pm 3.8\%$ 、無効群が  $25.0 \pm 2.6\%$ と両群間に差はなかった。また、治療開始前後の Treg の割合は、有効群が  $28.1 \pm 3.8$  から  $26.2 \pm 3.2\%$ 、無効群が  $25.0 \pm 2.6$  から  $25.5 \pm 2.8\%$ と、有効群、無効群ともに治療開始前後に変化がなかった。

#### (4) 結果の考察

本研究では、Nivolumab 投与開始から 6 週間後の NLR 増加率が治療効果や予後に関連する可能性が示唆された。

Nivolumab 投与により CD4+PD-1+細胞の割合、CD8+PD-1+細胞の割合がともに低下することが明らかとなった。

Nivolumab 開始前の CD4+PD-1+細胞の割合、CD8+PD-1+細胞の割合が 20%未満の症例が、Nivolumab 治療の有効例になる可能性が示唆された。

Nivolumab 治療の有効性を予測するバイオマーカーとして、治療前後の NLR、治療開始前の CD4+PD-1+細胞の割合、治療開始前の CD8+PD-1+細胞の割合が、候補になる可能性が示唆された。

#### <引用文献>

Kang YK, et al. Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, Published online October 6, 2017

Charles S, et al. KEYNOTE-059 cohort 1: Efficacy and safety of pembrolizumab (pembro) monotherapy in patients with previously treated advanced gastric cancer. *J Clin Oncol* 35, 2017 (suppl; abstr 4003)

Shindo Y, Yoshino S, et al. Predictive biomarkers for the efficacy of peptide vaccine treatment: based on the results of a phase II study on advanced pancreatic cancer, *J Exp Clin Cancer Res* 2017; 36. doi: 10.1186/s13046-017-0509-1.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中島 千代、吉野 茂文、武田 茂、飯田 通久、兼清 信介
2. 発表標題 Nivolumab投与した胃癌症例の末梢血好中球/リンパ球比（NLR）と予後との関連
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020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	武田 茂  (Takeda Shigeru)  (50403671)	山口大学・大学院医学系研究科・講師   (15501)	
研究分担者	飯田 通久  (Iida Michihisa)  (50554797)	山口大学・大学院医学系研究科・助教   (15501)	
研究分担者	兼清 信介  (Kanekiyo Shinsuke)  (80555730)	山口大学・大学院医学系研究科・助教（特命）   (15501)	

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