

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17624

研究課題名（和文）EGFR遺伝子変異陽性肺癌に対する免疫療法抵抗性の機序解明と克服法の開発

研究課題名（英文）Development of new treatment strategy focusing on immunotherapy resistance of lung cancer patients with EGFR mutation

研究代表者

宮内 栄作（Miyauchi, Eisaku）

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：00732562

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）： 始めに日本人肺癌患者における腸内マイクロバイオームの経時的安定性を確認した。次に、EGFR遺伝子変異陰性患者における糞便のマイクロバイオームの細菌構成と比較し、陽性患者に特有の微生物種ないし構成パターンの分析を行った結果、EGFR遺伝子変異陽性肺癌患者に特有の糞便細菌叢は認められなかった。しかし、一部の細菌種はEGFR陰性例と陽性例では構成比率が異なっていることが確認された。次に、肺癌患者および健常者の糞便を用いてメタボローム解析を実施した。肺癌患者では健常者と比較して特異的なアミノ酸代謝を有し、肺癌患者では解糖系代謝の亢進に加え、他にも複数の代謝経路の活性化がみられることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、癌患者における腸内マイクロバイオームの経時的安定性が確認された。また、EGFR遺伝子変異陽性肺癌患者では、一部の細菌種がEGFR陰性例と構成比率が異なっていることが明らかとなった。さらに肺癌患者では健常者と比較して特異的なアミノ酸代謝を有し、肺癌患者では解糖系代謝の亢進に加え、他にも複数の代謝経路の活性化が認められた。今後、さらに症例数を増やした検討を加え、免疫療法抵抗性に関わる腸内環境の特徴を明らかにする予定である。腸内環境の特徴を明らかにすることで、EGFR遺伝子変異陽性肺癌患者において免疫療法が有効な患者集団を見出し、治療選択に活用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We conducted gut microbiome analysis and metabolome analysis, and metabolome analysis for patients with non-small cell lung cancer. We collected fecal microbiome samples and characterized their gut microbiomes and metabolite status using shotgun metagenomic sequencing. As a result, we found the differences in microbial components between EGFR mutant and wild-type. Besides, we found the presence of different metabolite statuses in EGFR-mutant.

研究分野：肺癌

キーワード：非小細胞肺癌 EGFR遺伝子変異 免疫療法 マイクロバイオーム

1. 研究開始当初の背景

肺癌はあらゆる癌種の中で最も予後が悪い癌であり、日本では毎年 7 万人が肺癌で亡くなっている。2000 年代に EGFR や EML4-ALK などのドライバー変異陽性肺癌に対する分子標的薬が登場したことで、進行肺癌の治療成績が向上し、現在ではドライバー変異陽性肺癌患者の全生存期間は 4 年を超えるようになった。さらに、2010 年代には免疫チェックポイント阻害剤が登場し、ドライバー変異陰性の患者でも治療成績が向上している。このように進行肺癌に対する治療戦略が日々進歩する中で、最近では前述のような免疫チェックポイント阻害剤を用いた治療戦略が注目されている。非小細胞肺癌患者に対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効率は 20-40% とされているが、EGFR などのドライバー変異陽性例に限ると、その奏効率は残念ながら 10% 以下であることが報告されている (Garassino et al. JTO 2018)。しかし、ドライバー変異陽性肺癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の効果が乏しいメカニズムについては、まだほとんど解明されていない。

我々は、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌患者における免疫チェックポイント阻害剤の治療抵抗性に着目し、EGFR 遺伝子変異陽性患者の切除腫瘍組織を用いた T 細胞受容体のレパトア解析を実施し、治療抵抗性のメカニズムについて検討を行った。その結果、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の T 細胞受容体のレパトアは、野生型の患者とは大きく異なることを明らかにした (Miyachi et al. Cancer Science 2019)。EGFR 遺伝子変異陽性肺癌では、野生型と比較し T 細胞受容体の多様性が大きく、T 細胞受容体のクローナルな増殖が見られないことが、腫瘍微小環境における免疫の活性化を妨げていることを突き止め、世界に先駆けて報告した。また、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌では野生型と比較し Tumor Mutation Burden が低く、故に体細胞変異によって作りだされる neoantigen 数も少ないこともまた、免疫チェックポイント阻害剤の治療抵抗性に影響していることも報告した。これらの知見をもとに、さらなる免疫チェックポイント阻害剤の新たな治療抵抗性のメカニズムを明らかにすべく、今回、我々はマイクロバイームに着目した基盤研究を計画した。ヒトの細菌叢であるマイクロバイーム解析は近年、あらゆる分野で注目されているが、がん患者における口腔内および腸内細菌叢の特徴や経時的安定性については、まだ明確なデータは示されていない。しかし、近年、肺癌やメラノーマに対する免疫チェックポイント阻害剤の臨床効果と腸内細菌叢に密な関係があることを示唆する海外での研究報告がなされるようになってきていることから (Gopalakrishnan et al. Science 2017) 臨床現場での実用化を想定してがん患者における細菌叢の経時的安定性を評価した上で、日本人でも再現性のある結果が得られるのか再評価する必要性が生じている。そこで我々は、日本人がん患者における口腔内、腸内細菌叢は複数回のサンプル採取による評価で再現性が得られ、経時的安定性が担保されるのか、同一がん患者における口腔内と腸内細菌叢のマイクロバイームの特徴に関連性が認められるのか、日本人 EGFR 遺伝子変異陽性および陰性患者におけるマイクロバイームは異なる特徴を有するのか、以上の 3 つの「問い」を明らかにする研究計画を立案した。本研究により EGFR 遺伝子変異陽性肺癌患者に対する免疫チェックポイント阻害剤治療抵抗性の新たなメカニズムが解明されることで、本薬剤が特に有効な進行肺癌患者を予測することが可能となり、その克服法の開発により肺癌の新たな治療戦略の確立に役立つことが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の 3 つである。

課題 1: 肺癌と診断され免疫療法を予定している患者を対象に、糞便検体を用いた腸内細菌叢のマイクロバイーム解析を行い、治療前の複数でのタイムポイントにおけるマイクロバイームデータの比較分析により、がん患者におけるマイクロバイームの経時的安定性を検証する。腸内細菌叢は食生活の違いにより、欧米やアジアなどの人種差があることが知られている。また、健常人におけるマイクロバイーム解析の経時的安定性は担保されているが、がん患者におけるマイクロバイームの特徴や経時的安定性についての研究報告はなされていない。そこで、まずは本検討を行うことで、日本人がん患者における腸内細菌叢の特徴と経時的安定性を明らかにし、マイクロバイーム解析を日常診療に実用化できるのか検証を行う。

課題 2: 上記と同一対象患者に対して、免疫療法開始前の口腔ケア実施時に口腔内サンプル(唾液、プラーク、縁下プラーク)を採取し、口腔内細菌叢のマイクロバイーム解析を行う。課題 1 で実施した腸内細菌叢のマイクロバイームデータとの比較分析を行い、口腔細菌叢と腸内腸内細菌叢に関連性が認められるか検証する。

肺癌患者における腸内細菌叢と免疫療法の効果の関連性の研究報告がなされているが、患者から解析に必要な糞便を採取する場合には、自宅で排便後速やかに糞便を採取してもらい 15 分以内に冷凍保存した上で試料を提出してもらう必要が生じるため、処理に心理的抵抗感を抱く患者が少なからず存在する。臨床現場における実用化を想定した場合、より簡便な方法での評価が望ましい。そこで、口腔細菌叢に着目し、免疫療法開始前に日常診療として口腔内の衛生状態を評価してもらう際に、一緒に唾液やプラークを採取してもらい、腸内細菌叢のマイクロバイーム解析と同様の特徴が見いだされるかどうか検証することを計画した。口腔細菌叢のマイク

ロバイオーム解析を実施することで、腸内細菌叢との関連性を評価し、口腔サンプルを用いたより簡便性の高いマイクロバイオーム解析を日常診療に実用化できるのか検証を行う。

課題3：課題1および課題2でマイクロバイオーム解析を実施した患者のEGFR遺伝子変異の有無を確認し、陽性患者と陰性患者における比較マイクロバイオーム解析を行い、EGFR遺伝子変異陽性患者におけるマイクロバイオームの特徴を明らかにする。さらに、免疫療法によるマイクロバイオームの変化と治療効果との関連性を評価し、免疫療法の治療効果を予測する細菌叢の特徴を明らかにする。

申請者は前述のように、EGFR遺伝子変異陽性肺癌患者における免疫療法抵抗性のメカニズムをT細胞受容体や遺伝子変異数、ネオアンチゲン数に着目して解明してきたが、これらとは別に、マイクロバイオームにおける治療抵抗性の機序が存在するのではないかと仮説を立てている。そこで、EGFR遺伝子変異陽性患者と陰性患者の比較マイクロバイオーム解析を行うことで、陽性患者におけるマイクロバイオームの特徴を明らかにすることを計画した。免疫療法の臨床効果との評価も合わせて行うことで、海外で報告された腸内細菌叢のマイクロバイオームの有用性が日本人でも再現性が得られるのかも明らかにすることが可能である。さらに、新たに口腔内細菌叢を用いたマイクロバイオームの有用性も検証することが可能となる。

3. 研究の方法

(1) 糞便サンプルの収集とサンプルからの細菌叢DNA抽出

東北大学病院で肺癌と診断され、免疫療法を予定している患者を対象に、本研究への参加を依頼し、同意を得た患者から糞便サンプルを収集した。サンプル採取にはテクノスルガ・ラボ社の採便キットを用いた。採便キットを用いて採取された糞便からビーズ破砕法によりDNAを抽出した。

(2) メタ16S遺伝子データによる菌種解析

抽出した細菌叢DNAを用いて構成細菌種の16S遺伝子の可変領域を共通PCRプライマーで一括増幅し、その16Sアンプリコンの配列データを次世代シーケンサーを用いて取得した。得られた16S配列データを用いて菌種の特定や菌種組成の解析を実施した。

(3) 糞便検体を用いたメタボローム解析

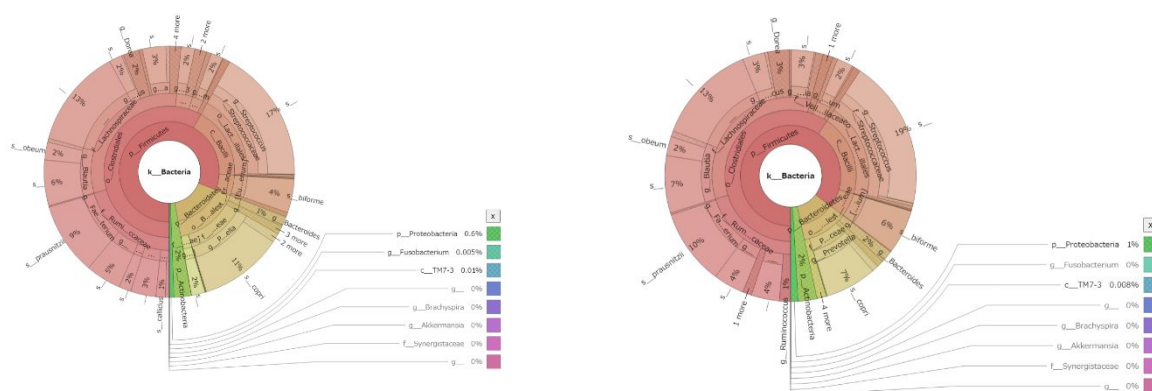
上記で使用した糞便検体を用いてメタボローム解析を実施した。内部標準物質入り超純水に重量を測定した糞便試料を加え、攪拌、遠心した。その後、上清を採取し、限外ろ過ユニットを用いて除タンパクを行いCE-MS解析を実施した。

4. 研究成果

(1) 肺がん患者における腸内細菌叢のマイクロバイオーム解析

腸内細菌叢は食生活の違いにより、欧米やアジアなどの人種差があることが知られている。また、健常人におけるマイクロバイオーム解析の経時的安定性は担保されているが、がん患者におけるマイクロバイオームの特徴や経時的安定性についての研究報告はなされていない。そこで、日本人がん患者における腸内細菌叢の経時的安定性を評価した。

肺癌患者3名について、治療前の糞便検体を3回採取し、マイクロバイオームデータの比較分析を行った。その結果、細菌叢の構成比率はわずかに異なっていたが、経時的なマイクロバイオームの安定性が確認された(図1)。



【図1】同一肺癌患者におけるマイクロバイオームデータの比較分析の例

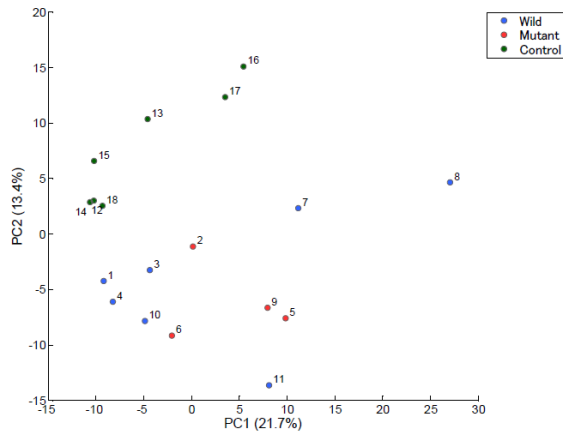
(2) 口腔内細菌叢のマイクロバイオーム解析

免疫療法開始前の口腔ケア実施時に口腔内サンプル(唾液、プラーク、縁下プラーク)を採取し、口腔内細菌叢のマイクロバイオーム解析を行う予定であったが、新型コロナウイルス感染症の拡大に伴い、口腔内サンプルの採取が困難となったため、本解析を見送り、代わりに腸内細菌叢のメタボローム解析を実施する計画に変更した。

(3) EGFR 遺伝子変異陽性患者と陰性患者におけるマイクロバイオームの比較解析

EGFR 遺伝子変異陽性患者と陰性患者における糞便のマイクロバイオームの細菌構成と比較し、陽性患者に特有の微生物種ないし構成パターンの分析を行った。その結果、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌患者に特有の糞便細菌叢は認められなかった。しかし、一部の細菌種は EGFR 陰性例と陽性例では構成比率が異なっていることが確認された。

次に、肺癌患者および健常者の糞便を用いてメタボローム解析を実施した。肺癌患者では健常者と比較して特異的なアミノ酸代謝を有し(図 2) 肺癌患者では解糖系代謝の亢進に加え、他にも複数の代謝経路の活性化がみられることが確認された。



【図 2】肺癌患者および健常者の糞便を用いたメタボローム解析の PCA 結果

PC1、PC2 はそれぞれ第 1 主成分得点、第 2 主成分得点を示し、括弧内の数値は各主成分の寄与率を示す。健常者と肺癌患者では異なるクラスタリングを形成することが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kotaro Abe, Masahiko Kanehira, Shinya Ohkouchi, Sakiko Kumata, Yamato Suzuki, Hisashi Oishi, Masafumi Noda, Akira Sakurada, Eisaku Miyauchi, Tohru Fujiwara, Hideo Harigae, Yoshinori Okada	4. 巻 10
2. 論文標題 Targeting stanniocalcin-1-expressing tumor cells elicits efficient antitumor effects in a mouse model of human lung cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Med .	6. 最初と最後の頁 3085-3100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.3852. Epub 2021 Apr 7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryoko Saito, Yasuhiro Miki, Takuto Abe, Eisaku Miyauchi, Jiro Abe, Ren Nanamiya, Chihiro Inoue, Ikuro Sato, Hironobu Sasano	4. 巻 123
2. 論文標題 11 hydroxysteroid dehydrogenase 1: a new marker for predicting response to immune-checkpoint blockade therapy in non-small-cell lung carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Br J Cancer .	6. 最初と最後の頁 61-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-020-0837-3. Epub 2020 Apr 27.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 有安亮, 内堀健, 田中寿志, 宮内栄作, 川嶋庸介, 大柳文義, 堀池篤, 酒谷俊雄, 齊木雅史, 丹保裕一, 谷本梓, 園田智明, 神山潤二, 上浪健, 工藤慶太, 土屋裕子, 西尾誠人	4. 巻 60
2. 論文標題 化学放射線療法後デュルバルマブの投与回避要因 (TOPGAN2020-01)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 肺癌	6. 最初と最後の頁 966-971
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 上浪健, 田中寿志, 宮内栄作, 川嶋庸介, 大柳文義, 齊木雅史, 酒谷俊雄, 堀池篤, 有安亮, 谷本梓, 丹保裕一, 園田智明, 神山潤二, 工藤慶太, 土屋裕子, 西尾誠人
2. 発表標題 実臨床でのDurvalumab投与可否のDecision Making Factorに関する検討
3. 学会等名 肺癌学会年次総会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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