

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18222

研究課題名（和文）非小細胞肺癌における免疫チェックポイント阻害薬耐性メカニズムの解明とその克服

研究課題名（英文）Elucidation and overcoming of immune checkpoint inhibitor resistance mechanism in non-small cell lung cancer

研究代表者

武藤 哲史（Muto, Satoshi）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90722570

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）：免疫チェックポイント阻害薬の耐性メカニズム候補として考えられていた、免疫チェックポイント以外の免疫逃避メカニズムについて、非小細胞肺癌を対象に検討を行なった。その結果非小細胞肺癌ではWnt/ β -catenin経路の活性化が比較的高頻度に生じていた。非小細胞肺癌においてWnt/ β -catenin経路の活性化が免疫逃避を生じるメカニズムについて、抗原提示細胞に注目して解析を行い報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非小細胞肺癌における免疫チェックポイント阻害薬の耐性メカニズムとして、Wnt/ β -catenin経路の活性化が重要であることを明らかにした。今後Wnt/ β -catenin経路を阻害する薬剤を併用するなど、今回明らかとなった耐性メカニズムを解除することで、免疫チェックポイント阻害薬の治療効果を高めることが期待される。これにより新たな治療法の開発に発展する可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：We investigated immune escape mechanisms other than immune checkpoints, which were considered as candidates for resistance mechanisms of immune checkpoint inhibitors, in non-small cell lung cancer. As a result, activation of the Wnt/ β -catenin pathway occurred relatively frequently in non-small cell lung cancer. We analyzed and reported on the mechanism by which activation of the Wnt/ β -catenin pathway causes immune escape in non-small cell lung cancer, focusing on antigen-presenting cells.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：がん免疫 免疫療法 免疫チェックポイント阻害薬 薬剤耐性

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害薬の登場により、肺癌診療は大きく変化した。当科でもたった1回の投与で劇的な効果を示した症例を経験した。これらの薬剤は長期生存が得られることが特徴であるが、その割合は20%程度に限られている。このため治療効果を高めるため、併用療法について数多くの研究が試みられている。なかでも化学療法との併用は期待できる効果が報告され、本邦でも来年にも日常臨床に導入されることが予想される。しかし、化学療法との併用では副作用が多いことが問題で、別のアプローチによる新たな治療戦略の開発が望まれる。われわれはこれまで主に効果予測因子の研究を行ってきた。そのなかで、次世代シーケンサーを用いた whole exome sequence による tumor mutation burden (TMB) について検討を行い、TMBが多い NSCLC は外科切除後の予後が悪く、化学療法の効果も得られにくいことを報告してきた。一般に TMB が多いほど遺伝子変異に起因する腫瘍抗原（いわゆる Neo-Antigen）が多く、腫瘍内へリンパ球が多く浸潤すると考えられてきた。しかし、われわれの報告からも腫瘍浸潤リンパ球の機能を抑制する様々な免疫逃避機構が存在することが示唆される。他にも基礎的研究として報告されているものも含めると、数多くの免疫逃避機構があると考えられる。

2. 研究の目的

免疫チェックポイント以外の免疫逃避機構のなかで、非小細胞肺癌において免疫チェックポイント阻害薬の治療効果に特に強く関係するものは何か、それを明らかにしたいと考えた。本研究では薬剤候補が存在するメカニズムを対象とすることで、今後の複合免疫療法の開発につながる創造性がある。将来的には、本研究の結果あきらかとなった免疫逃避機構に対する薬剤と免疫チェックポイント阻害薬との併用により、有効性の高い治療法の開発に貢献できると考えている。

3. 研究の方法

これまでに当院で治療を受けた非小細胞肺癌患者を対象とする。われわれの先行研究の結果と、基礎研究等から免疫チェックポイント阻害薬の耐性への関与が示唆され、薬剤候補物質が存在する以下の6つのメカニズムについて検討する。

| 耐性メカニズム候補 | 方法とターゲット | |
|--------------------------------|----------------------|--|
| | IHC/mRNA 発現解析 | 全エクソーム解析 |
| ① 上皮間葉移行の傾向 | Vimentin 高発現 | - |
| ② Wnt/ β -catenin 経路の活性化 | β -catenin 高発現 | - |
| ③ JAK/STAT 経路の活性化 | STAT3 高発現 | <i>JAK1/2</i> mutation |
| ④ HLA 発現の低下 | HLA class I 低発現 | - |
| ⑤ PI3K/AKT 経路の活性化 | PTEN 低発現 | <i>PIK3CA</i> mutation <i>PTEN</i> mutation |
| ⑥ RAF 経路の活性化 | - | <i>BRAF</i> mutation |

免疫チェックポイント阻害薬の治療効果と、それに関連すると考えられる次の項目についてデータを収集する。上記6つのメカニズムと治療効果について、単変量解析および多変量解析を

行い、どのメカニズムが最も強く非小細胞肺癌における免疫チェックポイント阻害薬治療の耐性に関与するか検討する。また、探索的項目として、腫瘍浸潤リンパ球の多寡との関係についても統計学的に検討する。

| 項目 | 方法 |
|-----------------|-------------------------------|
| A. 治療効果判定 | 臨床データから腫瘍縮小率, PFS, OS を抽出 |
| B. 腫瘍の PD-L1 発現 | Anti-PD-L1 (22C3) の免疫組織化学法 |
| C. 腫瘍浸潤リンパ球の多寡 | CD3, CD4, CD8 細胞浸潤を免疫組織化学法で判定 |

なお、組織型や過去の治療経過、EGFR, ALK, ROS1 など既存の driver mutation 有無といった臨床情報も加味する。

4. 研究成果

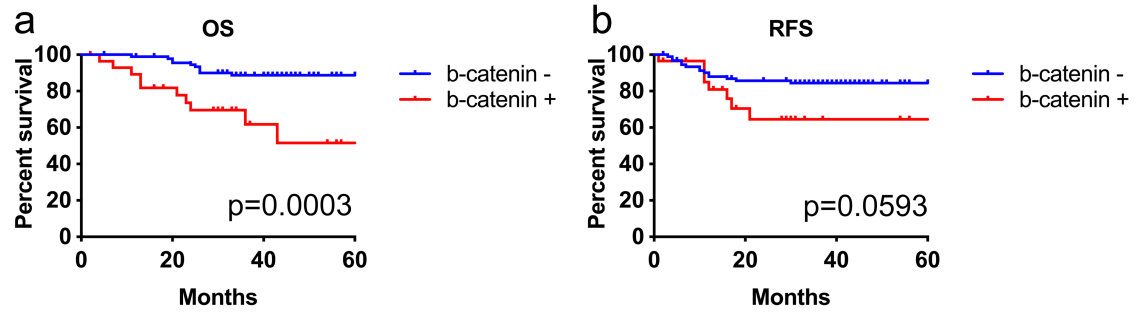
(1) まず外科手術による摘出検体を用いて、非小細胞肺癌における上記①～⑥の頻度を検討した。その結果、①上皮間葉移行、③JAK/STAT 経路の活性化、⑤PI3K/AKT 経路の活性化、⑥RAF 経路の活性化、については頻度が低く統計学的な解析が困難と考えられ、これ以上の検討は行わないこととした。また④HLA 発現の低下については、その客観的な判定を行うことが困難であった。したがって②Wnt/ β -catenin 経路の活性化を対象に以降の研究を行うこととした。

(2) 非小細胞肺癌における Wnt/ β -catenin 経路の活性化が免疫逃避に関わるメカニズムを明らかにした。上述のように想定外の形で Wnt/ β -catenin 経路の活性化だけが研究対象として残ったため、非小細胞肺癌においてもこのメカニズムが免疫逃避に関わることを示すこととした。その結果、Wnt/ β -catenin 経路の活性化は扁平上皮癌では約 60%と比較的高頻度に生じることが明らかになった。また Wnt/ β -catenin 経路が活性化している場合には TMB は有意に高いが ($p < 0.01$), CD11c をマーカーとした抗原提示細胞や CD8 T 細胞の腫瘍局所浸潤は有意に少ないことを示した (表 1)。さらに腫瘍の PD-L1 発現率は Wnt/ β -catenin 活性化例で低い傾向にあった。以上のことから Wnt/ β -catenin 経路が活性化している非小細胞肺癌では、癌の抗原性は高いが、腫瘍局所への抗原提示細胞浸潤を抑制することで抗腫瘍免疫を逃れていることが示唆された。さらに Wnt/ β -catenin 経路活性化例は有意に予後不良であった (図 1)。

表 1

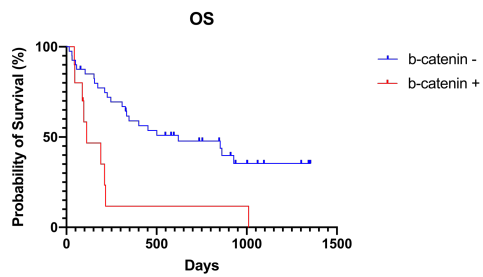
| | β -catenin | | | |
|------------------------------|------------------|----------|----------|----------|
| | Positive | Negative | | |
| 腫瘍局所 CD8 ⁺ T 細胞浸潤 | + | 10 (8%) | 80 (66%) | P<0.0001 |
| | - | 19 (16%) | 13 (11%) | |
| 腫瘍局所 CD11c ⁺ 細胞浸潤 | + | 15 (12%) | 65 (53%) | P=0.0788 |
| | - | 14 (11%) | 28 (23%) | |
| 腫瘍内 CD8 ⁺ 細胞数 | Large | 9 (7%) | 30 (25%) | P=0.8781 |
| | Medium | 18 (15%) | 54 (44%) | |
| | Small | 2 (2%) | 9 (7%) | |

図 1



(3) 免疫チェックポイント阻害薬の治療効果と Wnt/ β -catenin 経路活性化との関係についても解析を行なった。この結果 Wnt/ β -catenin 経路が活性化している非小細胞肺癌では、免疫チェックポイント阻害薬による治療効果が有意に悪かった。また、これらの症例においても抗原提示細胞や CD8 T 細胞の腫瘍局所浸潤は低下していた。

図 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Muto S, Ozaki Y, Yamaguchi H, Mine H, Takagi H, Watanabe M, Inoue T, Yamaura T, Fukuhara M, Okabe N, Matsumura Y, Hasegawa T, Osugi J, Hoshino M, Higuchi M, Shio Y, Nanamiya H, Imai J, Isogai T, Watanabe S, Suzuki H | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Tumor -catenin expression is associated with immune evasion in non-small cell lung cancer with high tumor mutation burden | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Oncology Letters | 6. 最初と最後の頁 203 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.12464 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Muto Satoshi, Ozaki Yuki, Inoue Takuya, Okabe Naoyuki, Matsumura Yuki, Hasegawa Takeo, Shio Yutaka, Suzuki Hiroyuki | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Diffuse Cystic Metastases in the Lung after Nivolumab Treatment in a Patient with Non-Small Cell Lung Cancer: A Case Report | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Case Reports in Oncology | 6. 最初と最後の頁 34 ~ 38 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000513426 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 武藤哲史, 山口光, 峯勇人, 高木玄教, 尾崎有紀, 渡部晶之, 井上卓哉, 山浦匠, 福原光朗, 岡部直行, 松村勇輝, 長谷川剛生, 大杉純, 星野美加, 樋口光徳, 塩豊, 鈴木弘行 | 4. 巻 47 |
| 2. 論文標題 【がん免疫療法のバイオマーカー探索】肺癌における腫瘍浸潤リンパ球の末梢血によるモニタリング | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 癌と化学療法 | 6. 最初と最後の頁 1287-1291 |
| 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 - |
| 1. 著者名 Takahashi Nobuhiko, Higa Arisa, Hiyama Gen, Tamura Hirosumi, Hoshi Hirotaka, Dobashi Yuu, Katahira Kiyooki, Ishihara Hiroya, Takagi Kosuke, Goda Kazuhito, Okabe Naoyuki, Muto Satoshi, Suzuki Hiroyuki, Shimomura Kenju, Watanabe Shinya, Takagi Motoki | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Construction of in vitro patient-derived tumor models to evaluate anticancer agents and cancer immunotherapy | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Oncology Letters | 6. 最初と最後の頁 406 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.12667 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Okabe Naoyuki, Mine Hayato, Takagi Hironori, Watanabe Masayuki, Muto Satoshi, Matsumura Yuki, Shio Yutaka, Suzuki Hiroyuki | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Pulmonary large cell carcinoma, highly positive for PD L1, shows marked response to pembrolizumab: A case report | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Thoracic Cancer | 6. 最初と最後の頁 1141 ~ 1144 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1759-7714.13850 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

[学会発表] 計9件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Satoshi Muto, Hayato Mine, Hironori Takagi, Masayuki Watanabe, Yuki Ozaki, Naoyuki Okabe, Yuki Matsumura, Takeo Hasegawa, Yutaka Shio, Hiroyuki Suzuki |
| 2. 発表標題 Can immunologically hot lung cancer be distinguished from cold tumor by peripheral blood? |
| 3. 学会等名 2020 ASCO-SITC Clinical Immuno-Oncology Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 武藤哲史, 山口 光, 峯 勇人, 高木玄教, 渡部晶之, 尾崎有紀, 岡部直行, 松村勇輝, 長谷川 剛生, 塩 豊, 鈴木弘行 |
| 2. 発表標題 肺癌切除検体に見る腫瘍局所の免疫状態と, 末梢血に見る全身の免疫状態 |
| 3. 学会等名 第37回日本呼吸器外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 武藤哲史, 山口 光, 峯 勇人, 高木玄教, 渡部晶之, 尾崎有紀, 岡部直行, 松村勇輝, 長谷川 剛生, 塩 豊, 鈴木弘行 |
| 2. 発表標題 免疫学的にHOTな肺癌を末梢血から探る試み |
| 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 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 武藤哲史, 山口 光, 峯 勇人, 高木玄教, 尾崎有紀, 岡部直行, 松村勇輝, 塩 豊, 鈴木弘行 |
| 2. 発表標題 末梢血から探る, 肺癌局所の免疫環境 |
| 3. 学会等名 第61回日本肺癌学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 S. Muto, S. Inomata, H. Yamaguchi, H. Mine, H. Takagi, Y. Ozaki, N. Okabe, Y. Matsumura, Y. Shio, H. Suzuki |
| 2. 発表標題 Study of relationship between proportion of CTLA-4 positive Tregs in tumor infiltrating lymphocytes and PD-L1 TPS |
| 3. 学会等名 2020 World Conference on Lung Cancer (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 武藤哲史, 山口 光, 峯 勇人, 高木玄教, 尾崎有紀, 岡部直行, 松村勇輝, 塩 豊, 鈴木弘行. |
| 2. 発表標題 非小細胞肺癌における腫瘍浸潤リンパ球の多寡は, 末梢血の活性化CD4 T細胞の割合と関連する |
| 3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 武藤哲史, 高木玄教, 渡部晶之, 尾崎有紀, 岡部直行, 長谷川剛生, 塩豊, 鈴木弘行 |
| 2. 発表標題 非小細胞肺癌における β -cateninの発現と, 樹状細胞・リンパ球の腫瘍浸潤との関係 |
| 3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 武藤哲史, 高木玄教, 渡部晶之, 尾崎有紀, 岡部直行, 長谷川剛生, 塩豊, 鈴木弘行 |
| 2. 発表標題 非小細胞肺癌における, -cateninの発現と, 樹状細胞・リンパ球の腫瘍浸潤を介した免疫編集 |
| 3. 学会等名 第36回日本呼吸器外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 武藤哲史, 松石彬, 山口光, 峯勇人, 高木玄教, 渡部晶之, 尾崎有紀, 岡部直行, 長谷川剛生, 塩豊, 鈴木弘行 |
| 2. 発表標題 -cateninを発現する非小細胞肺癌における, 樹状細胞・リンパ球の腫瘍内浸潤低下による免疫逃避メカニズム |
| 3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会 |
| 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

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 |
|---------|---------|
| | |