

非小細胞肺がんの腫瘍量における腫瘍微小免疫環境を検討する観察研究

近畿大学医学部内科学 腫瘍内科部門

鈴木 慎一郎

1. 諸言

免疫チェックポイント阻害剤 (immune checkpoint inhibitor : ICI) 療法は、非小細胞肺がん (non-small cell lung cancer : NSCLC) 患者に長期生存をもたらすことがわかっており、program death -1 (PD-1) または PD-1 ligands (PD-L1) に対する抗体は、上皮成長因子受容体遺伝子 (epidermal growth factor receptor : EGFR) の変異や未分化リンパ腫キナーゼ遺伝子 (anaplastic lymphoma kinase : ALK) の融合などの特定のゲノム変化が認められない未治療の進行 NSCLC に対する標準的な治療法となっている¹⁻³⁾。しかし、進行した NSCLC の予後は依然として満足のいくものではなく、このような治療によって臨床的な利益を得る患者は一部に限られている。これまでの研究では、ICI 治療に対する反応性の低さは、腫瘍における PD-L1 の発現レベルの低さ、tumor mutation burden (TMB) または neoantigen load の低さ、T cell-mediated inflammation in the tumor microenvironment (TME) の低さ、および neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) の高さを特徴とする宿主の免疫状態の悪さなど、様々な要因によって少なくとも部分的に説明できることが示されている⁴⁻⁶⁾。しかし、PD-L1 の発現量や TMB が高くても、ICI の一次治療で早期に病勢が進行する NSCLC 患者がいることを考えると、これらの要因はマーカーとしては不十分であると考えられる。近年、PD-1/PD-L1 阻害剤に対する悪性腫瘍の反応性低下を予測する潜在的な抵抗性因子として、腫瘍量 (tumor burden : TB) が注目されている。

われわれは今回、多施設共同研究を実施し、ドライバー遺伝子陰性の未治療の進行 NSCLC 患者において、ICI の効果に対する TB の関係性を評価した。また、プラチナ製剤併用化学療法を単独で行った患者、または ICI を併用した患者を、それぞれ対照群または探索群として評価した。さらに、治療前の患者から採取した腫瘍組織を免疫関連遺伝子発現プロファイリング (immune related gene expression profiles : irGEP) で解析し、TME に対する TB の免疫学的影響を調べた。

2. 方法

2.1. 患者およびサンプル

2017年3月から2019年12月の間に、近畿大学病院、近畿大学奈良病院、岸和田市民病院、和泉市立総合医療センターで治療を受けた進行・再発 NSCLC の全患者の電子カルテをレビューした。組織学的に NSCLC と診断され、PD-L1 TPS が判明しており、Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status (ECOG-PS) が 0 または 1 であり、一次治療開始前 42 日以内に腫瘍径測定のために CT または MRI を施行し、治験責任医師による評価で少なくとも 1 つの測定可能な病変があり、EGFR 変異または ALK 融合遺伝子がない患者を対象とした。また、PD-1/PD-L1 阻害剤、プラチナ製剤併用化学療法、または PD-1/PD-L1 阻害剤とプラチナ製剤併用化学療法の併用療法を初回治療として受けていることを条件とした。260 名が抽出され、初回治療レジメンに基づいて、ICI、プラチナ製剤を用いた化学療法 (Chemo)、ICI+Chemo の群に分類した (図 1)。また、これらの患者のうち 51 人は、irGEP 解析をした。

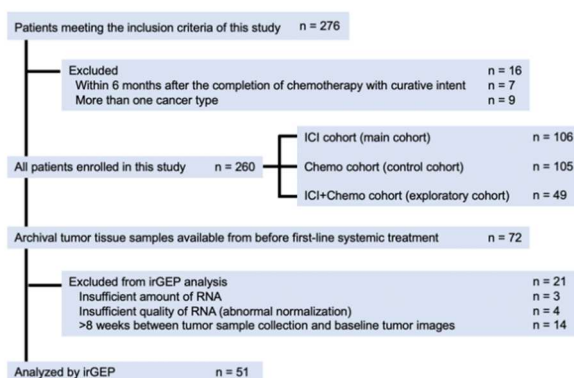


図 1 研究フロー

2.2. irGEP 解析

遺伝子セット解析のシグネチャースコアは、nCounter Advanced Analysis 2.0 (NanoString Technologies) を用いて算出した。インターフェロン (interferon : IFN) γ と免疫細胞のシグネチャースコアの遺伝子は、過去の研究に基づいて選択した。

2.3. 統計解析

ICI 群における TB (TB 低値 [LTB] と高値 [HTB]) に応じた無増悪生存期間 (progression-free survival : PFS) の差を、主要評価目的とした。また、副次的評価目的を、全生存期間 (overall survival : OS) とした。さらに、ICI+Chemo 群は、治療効果と TB の関係を検討するための探索的群として解析した。また、腫瘍の免疫状態と TB との関係を調べるために、irGEP データに基づく探索的な解析を行った。

3. 結果

3.1. 患者背景

登録された 260 名の患者の特徴を表 1 に示す。ICI 群のほとんどの患者は、PD-L1 TPS が 50%以上であり、臨床診療ガイドラインと一致していた^{7),8)}。群全体のベースライン腫瘍サイズ (baseline tumor size : BTS) の中央値は 92 mm (範囲、10~410 mm) であった。予想通り、HTB は、ECOG-PS が低いこと、前治療歴がないこと、血清乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase : LDH) が高いこと、derived NLR (dNLR)が高いこと、肝転移があること、年齢が若いことなどに関連していたが、PD-L1 TPS は LTB と HTB の間で差はなかった。

表 1. 患者背景 (n = 260)

Characteristic	No. of patients (%) ^a		
	ICI cohort (n = 106)	Chemo cohort (n = 105)	ICI+Chemo cohort (n = 49)
Median age (range), years	73 (26-89)	71 (41-82)	69 (31-80)
Sex			
Male	84 (79)	80 (76)	38 (78)
Female	22 (21)	25 (24)	11 (22)
ECOG-PS			
0	13 (12)	30 (29)	11 (22)
1	93 (88)	75 (71)	38 (78)
Smoking history ^b			
Never	14 (13)	15 (14)	5 (10)
Current or former	92 (87)	89 (85)	44 (90)
Unknown	0 (0)	1 (1)	0 (0)
Histology			
Squamous	44 (42)	31 (30)	18 (37)
Nonsquamous	62 (58)	74 (70)	31 (63)
Adeno	45 (42)	62 (59)	27 (55)
Adenosquamous	1 (1)	5 (5)	0 (0)
Large cell	1 (1)	0 (0)	1 (2)
NOS	15 (14)	7 (6)	3 (6)
Stage			
IIIB-IV	84 (79)	85 (81)	35 (71)
Recurrence	22 (21)	20 (19)	14 (29)
PD-L1 TPS (22C3)			
50-100%	103 (97)	13 (12)	11 (22)
1-49%	3 (3)	56 (53)	22 (45)
0%	0 (0)	36 (34)	16 (33)
Serum LDH			
Elevated (>222 IU/L)	40 (38)	47 (45)	25 (51)
Not elevated (≤222 IU/L)	66 (62)	58 (55)	23 (47)
Unknown	0 (0)	0 (0)	1 (2)
dNLR ^c			
>3	30 (28)	25 (24)	11 (22)
≤3	76 (72)	79 (75)	38 (78)
Unknown	0 (0)	1 (1)	0 (0)
Brain metastasis			
Yes	6 (6)	13 (12)	7 (14)
No	100 (94)	92 (88)	42 (86)
Liver metastasis			
Yes	10 (9)	6 (6)	3 (6)
No	96 (91)	99 (94)	46 (94)
ICI agent			
PD-1 inhibitor	106 (100)		47 (96)
PD-L1 inhibitor			2 (4)
ICI treatment as 2nd line or later			
Yes		47 (45)	
No		58 (55)	

Abbreviations: ICI, immune checkpoint inhibitor; Chemo, platinum-doublet chemotherapy; ECOG-PS, Eastern Cooperative Oncology Group performance status; NOS, not otherwise specified; PD-L1 TPS, programmed cell death-1 ligand 1 tumor proportion score; LDH, lactate dehydrogenase; dNLR, derived neutrophil to lymphocyte ratio; PD-1, programmed cell death-1.

^aPercentages may not add up to 100 because of rounding.

^bCurrent smokers were defined as individuals who had smoked ≥100 cigarettes including at least one within the year prior to diagnosis; former smokers as those who had smoked ≥100 cigarettes but had quit >1 year prior to diagnosis; and never smokers as those who had smoked <100 cigarettes.

^cAbsolute neutrophil count/(white blood cell count - absolute neutrophil count).

3.2. 腫瘍量における治療成績

全群の追跡期間の中央値は 21.4 カ月 (95%信頼区間 [CI]、19.5~23.1 カ月) であった。

Time-dependent receiver operating characteristic を用いて、ICI 群の 12 カ月 PFS を予測する上で、最適な TB のカットオフ値は 110 mm であることが算出された。Cox 比例ハザード回帰モデルでは、ICI 群において TB が PFS および OS と独立して関連することが明らかになった (PFS (hazard ratio : HR) 0.23 [95% CI 0.12-0.42]、P < .001 ; OS HR 0.21 [95% CI 0.10-

0.44], $P < 0.001$)であったが、Chemo 群ではなかった (PFS の HR 0.83 [95% CI 0.51-1.35]、 $P = 0.45$; OS の HR 1.22 [95% CI 0.68-2.19]、 $P = 0.50$)。さらに、このカットオフ値の TB は、ICI+Chemo 群における多変量解析で、PFS (HR 0.71 [95% CI 0.32-1.60]、 $P = 0.41$) および OS (HR 0.20 [0.03-1.23]、 $P = 0.08$) とは関連しなかった。また、この最適カットオフ値による治療成績の違いを評価するために、propensity score-weighted survival curve analysis を行った。その結果、ICI 群では、LTB の方が HTB よりも PFS が有意に延長し inverse probability weighting (IPW) 調整後 HR=0.32 (95% CI 0.19-0.53、 $P < 0.001$)、Chemo 群ではそのような差は見られなかった (IPW 調整後 HR=0.83 [0.26-2.65]、 $P = 0.76$) (図 2A および 2B)。OS も、ICI 群の HTB に比べて LTB で有意に延長し (IPW 調整後 HR=0.30 (95% CI 0.17-0.55、 $P < .001$))であったのに対し、Chemo 群では、OS に有意な差は見られなかった (IPW 調整後 HR=0.88 [0.31-2.46]、 $P = 0.80$) (図 2C および 2D)。このように、ICI 群でのみ TB が治療効果予測因子であることが確認された。

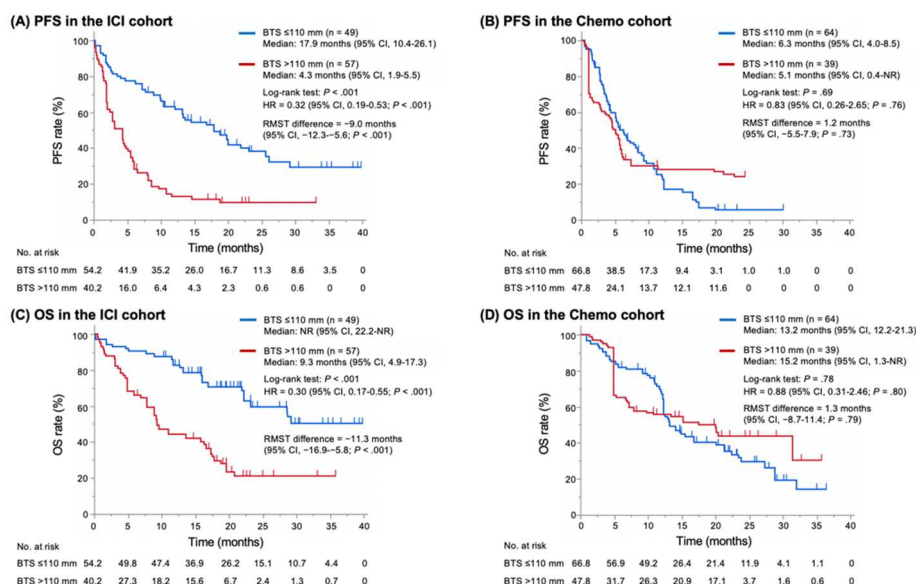


図 2 最適なカットオフ値で分けた時の PFS および OS の IPW 調整後の Kaplan-Meier 解析

3.3. 腫瘍量に基づいた腫瘍微小免疫環境

ICI 治療に対する HTB の不良治療効果予測因子のメカニズムを調べるために、irGEP 解析を行った。非扁平上皮型または PD-L1 陰性の腫瘍は、LTB 群よりも HTB 群で多く見られた。

Gene set 解析の結果、HTB では、Wnt シグナルではなく、nuclear factor (NF) - κ B シグナル、Notch シグナル、transforming growth factor (TGF) - β シグナルなど、腫瘍形成の活性化を示すいくつかの主要なシグナルが有意に上昇していた (図 3A)。しかし、IFN シグナ

ル、JAK-STAT シグナル、サイトカインおよびケモカインシグナル、免疫細胞の接着と移動、抗原提示、IFN- γ などの腫瘍内免疫反応に関連するシグネチャーも、ICI 治療に対する反応性が低いにもかかわらず、HTB で有意に上昇していた。注目すべきは、骨髄系コンパートメントのシグネチャーも HTB で有意に上昇していたことである (図 4A) しかし、他の免疫細胞系のシグネチャーは HTB と LTB で有意な差はなかった。実際、Volcano plot 解析では、CCL7、CCL8、CCL20 などのマクロファージを誘引するケモカインの遺伝子や、CCL13、TGFB2 などの腫瘍性および抗炎症性の M2 型マクロファージが産生する分子の遺伝子の発現が、HTB で有意に高かった (図 3B)。また、angiopoietin like 4 (ANGPTL4) や vascular endothelial growth factor (VEGF) C などの血管新生関連遺伝子の発現も HTB で高く、M2 型マクロファージの分極化が明らかになった。さらに、M2 型マクロファージ関連遺伝子を調べると、mannose receptor C-type 1 (MRC1)、TGF beta receptor 2 (TGFB2)、membrane spanning 4-domains A4A (MS4A4A) などの M2 マクロファージ細胞表面マーカーの発現が、HTB で有意に上昇していた (図 3C)。

以上の結果から、HTB では、免疫反応に関連した表現型も見られたが、M2 型腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophage : TAM)、protumorigenic pathways、血管新生に関連した遺伝子発現表現型が一貫して関連していることがわかった。

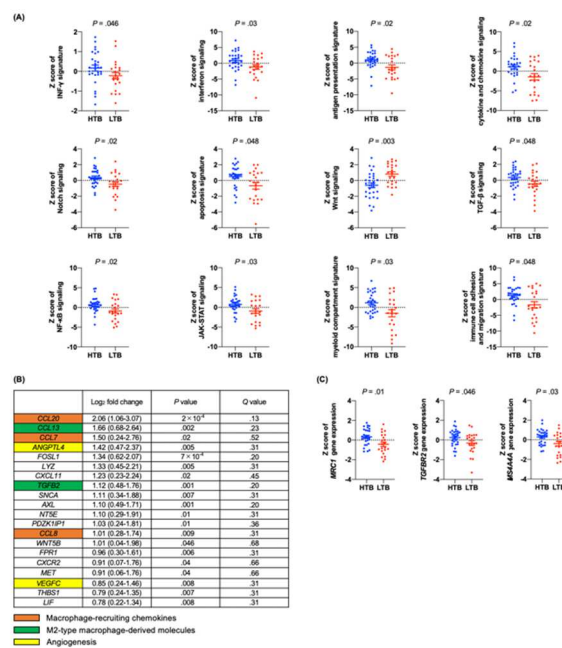


図 3 腫瘍量における免疫関連遺伝子の発現プロファイリング

4.考察

今回の多施設共同研究では、未治療の進行・再発 NSCLC 患者において、HTB が PD-1/PD-L1 阻害剤治療の予後不良と一貫して関連していることが明らかになった。この関連性は、

ICI 群においてのみ明らかであり、プラチナ製剤の Chemo 群においては治療効果に差がないことから、TB は進行・再発 NSCLC における ICI 特有の治療効果予測因子である可能性が示唆された。さらに、本研究の対象患者の治療前の腫瘍組織を対象とした探索的な irGEP 解析により、PD-1/PD-L1 阻害剤治療効果予測因子としての TB の根底にあるメカニズムについての検討することができ、HTB における免疫療法の予後不良な転帰には M2 型 TAM と protumorigenic pathways が関与していることがわかった。このように、われわれの研究は、臨床の場において、PD-1/PD-L1 阻害剤療法の抵抗因子としての HTB の重要性に光を当てた。

今回の研究は、PD-1/PD-L1 阻害剤を併用した、あるいは併用していない初回治療のプラチナ製剤併用化学療法を受けた群を含む、多数の治療歴のない NSCLC 患者を対象としたこと、TB の最適カットオフ値を解析したこと、多変量解析に加えて傾向スコアに基づく IPW などの統計的アプローチを採用したことなどが注目される。われわれは以前、マウスモデルにおいて、同じメラノーマ細胞株から発生した 2 種類の腫瘍であっても、大きな腫瘍は PD-1 阻害剤に反応せず、小さな腫瘍はよく反応することを示した⁹⁾。また、細胞障害性薬剤による治療で TB を減少させると、マウスでは PD-1/PD-L1 遮断療法に対する TB による ICI 抵抗性が克服された⁹⁾。この点から、ICI の有効性に対する TB の悪影響は、われわれの研究結果からプラチナ製剤併用化学療法を併用することで、少なくとも部分的には解消されると考えられる。また、われわれが知る限りこれまでに評価されたことのない、臨床検体における TB と腫瘍内微小免疫環境との関係についても調べた。HTB は、T 細胞の浸潤やインターフェロンなどのサイトカインのシグナル伝達に関連する遺伝子の発現に反映されるような、腫瘍における抗腫瘍免疫活性化の障害とは関連しておらず、メラノーマ患者の血液単核細胞を用いた分析で得られた既往の知見と一致していた¹⁰⁾。さらに、われわれの解析では、M2 型 TAM 活性、血管新生、TGF- β シグナルなど、いくつかの免疫抑制的な表現型が HTB と関連していることが示唆され、HTB 患者における PD-1/PD-L1 遮断療法の効果が低いことの一因となっている可能性がある。M2 型 TAM は、免疫抑制作用や抗腫瘍作用を持つことが知られており、血管新生や TGF- β シグナルと競合して抗腫瘍免疫の抑制に寄与している^{11),12)}。われわれが行った臨床サンプルの irGEP 解析では、HTB 患者において NF- κ B および Notch シグナル経路に関連する遺伝子の発現が増加していることが明らかになった。これらの経路は、TME とは独立した形でがん細胞の生存を促進し、最近では、腫瘍への M2 型 TAM の動員、異常な血管新生、TGF- β シグナルの活性化に関与していることが示唆されている^{13),14)}。このように、がん細胞におけるこれらの protumorigenic なシグナル伝達経路の活性化は、TB を増加させ、M2 型 TAM の浸潤、異常な血管新生、TGF- β シグナルを誘導すると考えられるが、これらの経路によって抗腫瘍免疫細胞の浸潤が直接阻害されることはないと考えられる。

これらのデータは、HTB による ICI 耐性を克服するための治療戦略を示唆している。大

きい腫瘍に対しては、細胞障害性治療と、放射線や腫瘍切除などの局所治療の併用が適しているかもしれないが、予想される毒性を考慮すると、LTB には PD-1/PD-L1 阻害剤単独療法を第一選択とすべきであろう。血管新生阻害剤による治療も考えられるが、HTB では VEGF-C 遺伝子の発現が増加していることがわかっていることから、マルチ VEGF 受容体阻害剤の方が適しているかもしれない。さらに、M2 型 TAM や TGF- β シグナルを阻害する新規の ICI が現在開発中であり、このような状況では検討が必要である¹⁵⁾⁻¹⁸⁾。

今回の研究にはいくつかの限界がある。第一に、本研究は後ろ向き観察研究であること。第二に、検証コホートを設定していないこと。第三に、トランスクリプトームデータに基づいてのみ TME を評価したことである。しかし、本研究では、複数の病院の患者を対象としているため、リアルワールドデータが得られる。異なるレジメンで治療された複数のコホートを有効な統計手法で解析した結果、ICI の有効性と TB の関連性が一貫して示された。また、われわれの irGEP データは、TME に関する最近の知見とも一致しており、HTB が ICI 耐性に寄与するメカニズムをより詳細に解明するためには、腫瘍内の複数の免疫細胞コンパートメントの免疫染色や、TMB や遺伝子変化を含むゲノム状態の特性評価など、さらなる調査が必要である。

5.結語

腫瘍量が多い NSCLC は、Notch や NF- κ B などのシグナル伝達経路が活性化され、M2 型 TAM、血管新生、TGF- β などのシグナル伝達により腫瘍免疫抑制状態になっているため ICI 効果が乏しく、初回治療から ICI+Chemo の併用療法を検討する根拠となる。また、ICI 耐性に関与する TME プロファイルを標的とした新規治療法の開発も望まれる。

6.文献

- 1) Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1823-1833.
- 2) Mok TSK, Wu YL, Kudaba I, Kowalski DM, Cho BC, Turna HZ et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for previously untreated, PD-L1-expressing, locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-042): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet.* 2019;393(10183):1819-1830.
- 3) Herbst RS, Giaccone G, de Marinis F, Reinmuth N, Vergnenegre A, Barrios CH et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1-Selected Patients with NSCLC. *N Engl J Med.* 2020;383(14):1328-1339.
- 4) Lu S, Stein JE, Rimm DL, Wang DW, Bell JM, Johnson DB et al. Comparison of Biomarker Modalities for Predicting Response to PD-1/PD-L1 Checkpoint Blockade: A Systematic Review and

Meta-analysis. *JAMA Oncol.* 2019.

5) Keenan TE, Burke KP, Van Allen EM. Genomic correlates of response to immune checkpoint blockade. *Nat Med.* 2019;25(3):389-402.

6) Mezquita L, Auclin E, Ferrara R, Charrier M, Remon J, Planchard D et al. Association of the Lung Immune Prognostic Index With Immune Checkpoint Inhibitor Outcomes in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* 2018;4(3):351-357.

7) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Non-Small Cell Lung Cancer Version 3.2021.

8) Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Updated version published 15 September 2020 by the ESMO Guidelines Committee.

9) Haratani K, Yonesaka K, Takamura S, Maenishi O, Kato R, Takegawa N et al. U3-1402 sensitizes HER3-expressing tumors to PD-1 blockade by immune activation. *J Clin Invest.* 2020;130(1):374-388.

10) Huang AC, Postow MA, Orlowski RJ, Mick R, Bengsch B, Manne S et al. T-cell invigoration to tumour burden ratio associated with anti-PD-1 response. *Nature.* 2017;545(7652):60-65.

11) Pathria P, Louis TL, Varner JA. Targeting Tumor-Associated Macrophages in Cancer. *Trends Immunol.* 2019;40(4):310-327.

12) Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(7):399-416.

13) Meurette O, Mehlen P. Notch Signaling in the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell.* 2018;34(4):536-548.

14) Taniguchi K, Karin M. NF-kappaB, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol.* 2018;18(5):309-324.

15) Strauss J, Heery CR, Schlom J, Madan RA, Cao L, Kang Z et al. Phase I Trial of M7824 (MSB0011359C), a Bifunctional Fusion Protein Targeting PD-L1 and TGFbeta, in Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 2018;24(6):1287-1295.

16) Paz-Ares L, Kim TM, Vicente D, Felip E, Lee DH, Lee KH et al. Bintrafusp Alfa, a Bifunctional Fusion Protein Targeting TGF-beta and PD-L1, in Second-Line Treatment of Patients With NSCLC: Results From an Expansion Cohort of a Phase 1 Trial. *J Thorac Oncol.* 2020;15(7):1210-1222.

17) Papadopoulos KP, Gluck L, Martin LP, Olszanski AJ, Tolcher AW, Ngarmchamnanrith G et al. First-in-Human Study of AMG 820, a Monoclonal Anti-Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Antibody, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res.* 2017;23(19):5703-5710.

18) Gomez-Roca CA, Italiano A, Le Tourneau C, Cassier PA, Toulmonde M, D'Angelo SP et al. Phase I study of emactuzumab single agent or in combination with paclitaxel in patients with advanced/metastatic solid tumors reveals depletion of immunosuppressive M2-like macrophages.

Ann Oncol. 2019;30(8):1381-1392.

7.成果発表

学会発表

- Shinichiro Suzuki, Koji Haratani, Hidetoshi Hayashi, Yasutaka Chiba, Junko Tanizaki, Ryoji Kato *et al.* The association of baseline tumor size with the efficacy of anti-PD-1 drugs for treatment naïve advanced non-small-cell lung cancer. 第 18 回日本臨床腫瘍学会, Web, 2021.

雑誌論文

- Shinichiro Suzuki, Koji Haratani, Hidetoshi Hayashi, Yasutaka Chiba, Junko Tanizaki, Ryoji Kato *et al.* Association of tumour burden with the efficacy of programmed cell death-1/programmed cell death ligand-1 inhibitors for treatment-naïve advanced non-small-cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 2022; 161:44-54.