

癌免疫療法におけるゲノムプロファイルに基づく治療戦略の確立

大阪国際がんセンター 呼吸器内科
國政 啓

1. 諸言

抗 PD-1 (programmed cell death receptor-1) / 抗 PD-L1 (PD-1 ligand) 抗体に代表される癌免疫療法は、その使用対象癌種を拡大しており、ほぼすべての固形癌で用いられるようになっている。進行期肺癌においては、合併症などで使用できない症例を除いて、非小細胞肺癌・小細胞肺癌ともに一次治療から使用されることが推奨されている (肺癌診療ガイドライン 2020 年版)。非小細胞肺癌を対象として 2019 年 1 月からは癌免疫療法と従来のプラチナ製剤を中心とした殺細胞性抗癌剤を併用する、複合免疫化学療法が用いられるようになったが、殺細胞性抗癌剤の追加により骨髄抑制などの毒性を中心とした副作用の頻度は有意に増加した。しかし 2019 年以前に主に使用されていた癌免疫療法の単独療法 (癌免疫単独療法) でも投与開始後、再発なく 3 年以上の経過を観察することができる症例も少なからず認めており、殺細胞性抗癌剤の追加がほんとうに必要な症例とそうでない症例の層別化が求められている。癌免疫療法に対するバイオマーカーとしては腫瘍細胞の PD-L1 発現率や腫瘍遺伝子変異量 (TMB) があるが、十分に治療効果を予測しうるマーカーではない。今回、われわれは本研究課題を通じて、当院で一次治療として癌免疫単独療法と複合免疫化学療法を受けた症例の癌遺伝子パネルを用いたゲノム解析を行い、ゲノムプロファイルに基づく癌免疫治療の最適化を目指したゲノムバイオマーカーの確立を行う。癌遺伝子パネル検査は 2019 年より本邦で保険収載されており、今後の実地臨床での活用も可能である。また本研究成果は他癌種にも応用しうるものであると考える。

2. 方法

2.1 症例集積

癌免疫療法は治療のラインによりその効果が影響を受けることが報告されており、本研究では一次治療でそれぞれの治療が投与された症例を後ろ向きに集積する。癌免疫単独療法が導入された 2017 年 3 月～2019 年 12 月までで当院で一次治療として投与された症例が 82 例あり、複合免疫化学療法が用いられるようになった 2020 年 1 月～2021 年 3 月までで当院で一次治療として投与された症例が 91 例確認されている。これらの症例を対象にゲ

ノムプロファイルの比較を行う。

2.2 ゲノム解析

本研究課題について同意の得られた症例に対して、治療導入前の保存腫瘍パラフィン包埋ブロックから病理医の評価のうえで腫瘍細胞が十分（腫瘍細胞含有率 30%以上）に存在すると確認された検体から、DNA を抽出し、次世代シーケンサー（NGS: next generation sequencing）（NextSeq（イルミナ社））を用いて、癌遺伝子パネル（TruSight Oncology500）を用いて解析を行う。TruSight Oncology500 は、2019 年に米国食品医薬品局（FDA）からブレイクスルーデバイスの指定を受けた遺伝子パネルであり、がん関連 523 個の遺伝子の全エクソンシーケンスが可能であり、分子バーコード法を用いた正確な変異の同定と TMB の算出が可能とされている。同意が得られなかった症例、十分な腫瘍細胞が確認できなかった検体については解析対象外とする。各群 50 例以上の解析成功は見込まれる。

2.3 ゲノムプロファイルと治療効果の相関解析

NextSeq（イルミナ社）に付随して作成されたプログラミングを用いて、網羅的に各遺伝子変異とそれぞれの治療効果の相関を評価する。治療効果は無増悪生存期間（progression free survival : PFS）にて行うものとする。特定の遺伝子変異もしくは遺伝子変異の組み合わせと治療効果との相関を解析し、癌免疫単独療法、複合免疫化学療法のそれぞれと有意に相関するゲノムバイオマーカーの同定を行う。既存のバイオマーカーである PD-L1 発現率や TMB との交絡についても解析を行ったうえで、癌免疫療法におけるゲノムバイオマーカーの確立を行う。この解析により、癌免疫単独療法でも十分に長期効果が望まれる症例と、単独療法では不十分であり、複合免疫化学療法が必要な症例の層別化が可能となる。本研究計画書はすでに、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に基づき、外部有識者を交えた大阪国際がんセンター内倫理委員会にて 2020 年 6 月に研究実施計画・内容について承認を受けている（承認番号『20085』）。同意の得られた症例から順次ゲノム解析を進めており、本申請書の提出時点で 60 例のゲノム解析が終了している。正確なゲノム解析が成功していることはイルミナ社との連携により確認しており、今後解析を続けていくことで十分成果が得られることが期待される。

3.結果

3.1 症例集積

2017 年 3 月～2019 年 12 月までに当科で一次治療としてペムブロリズマブが投与された PD-L1 高発現患者は合計 82 例であり、その中から NGS 解析であったものは 61 例であった（図 1）。61 例の年齢中央値は 70（47～89）歳で、男性が 75.4%、女性が 24.6%であった。91.8%が Current/ Former smoker であり、組織型は 50.8%が腺癌、36.1%が扁平上皮癌、

13.1%がその他の組織型であった。病期は44.3%がIVB期、47.5%がIVA期であり、8.2%がIII期であった。全ての症例で、PD-L1 TPS 50%以上であり、そのうち54.1%ではPD-L1 80%以上であった。

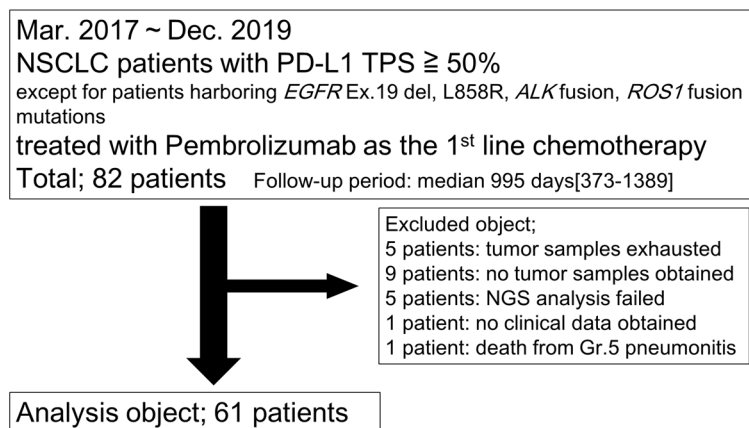


図1 解析対象患者グループ

3.2 61例のゲノムプロファイル解析とペムブロリズマブの治療効果（progression free survival : PFS）との関係

NGS解析可能であった61例のゲノムプロファイルを示す(図2)。TMBの中央値は9.4(2.4~30.6) (/Mb)であり、変異を認めた遺伝子は以下の通りであった：TP53 (67%)、KRAS (36%)、MYC (18%)、CDK4 (13%)、MET (13%)、PIK3CA (13%)、ERBB2 (11%)、KEAP1 (11%)、CDKN2A (10%)、EGFR (10%)、FGF19 (10%)、FGFR1 (10%)。これらの変異とペムブロリズマブに対するPFSとの相関を網羅的に解析したところ、TP53変異とERBB2増幅の複合変異、NEF2L2、KEAP1変異を有する症例ではペムブロリズマブに対するPFSが短縮する傾向を認めた(図3)。

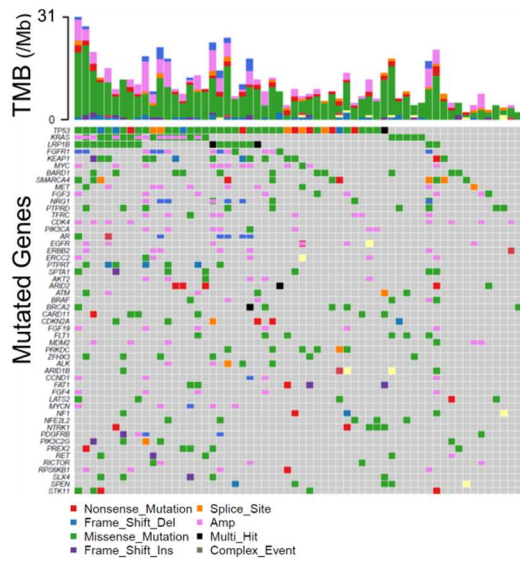


図2 変異遺伝子のヒート・マップ

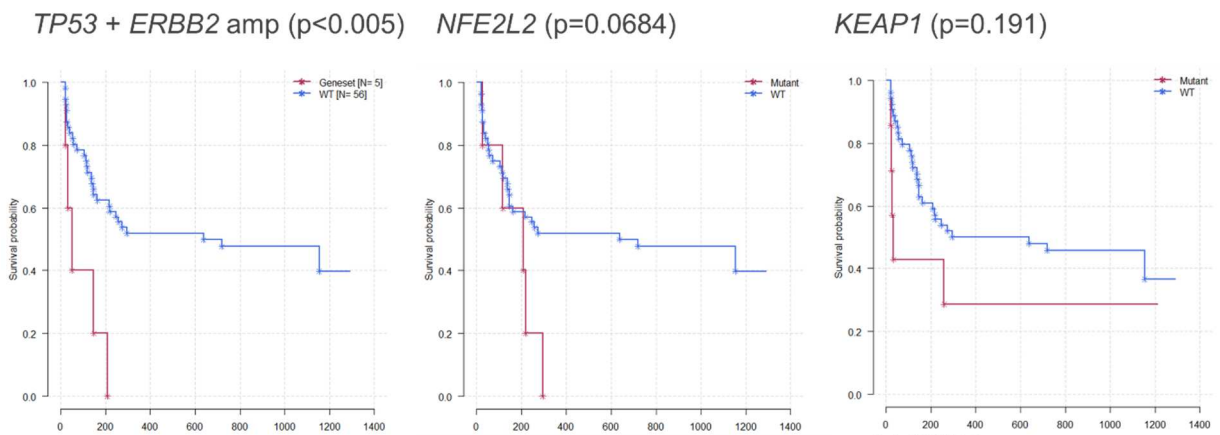


図3 Oncogenic mutation count とペムブロリズマブの治療効果との関係

ゲノムプロファイルから variant allele frequency 10%以上で OncoKB にて oncogenicity が確認されている変異 (oncogenic もしくは likely oncogenic) の個数を OMC (oncogenic mutation count) としてペムブロリズマブとの治療効果を検討した。61 例についてペムブロリズマブの PFS と各臨床因子 (年齢、性別、喫煙歴、組織型、胸郭外への転移巣の有無、PD-L1 TPS [%]、Tumor Burden、TMB [/Mb]、OMC) の関連を単変量解析・多変量解析にて検討したところ、単変量解析にてペムブロリズマブの PFS と有意な ($p < 0.05$) 相関を示したものは PD-L1 TPS と OMC の 2 つであった。またこれら 2 つの因子については、多変量解析では PD-L1 TPS のみが有意な相関を示したが、OMC についても相関する傾向を認めた (表 1)。以上からペムブロリズマブの治療効果に関連するバイオマーカーとして PD-L1 TPS と OMC の 2 つが認められた。またこれらの 2 つのマーカーの相関について検討したところ、

2つのマーカーにおいて有意な相関は認められなかった。

表 1 PD-L1 TPS と OMC を組み合わせたペムブロリズマブに対するバイオマーカー

Variables		n=61 (%)	Univariate		Multivariate	
			HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Age, ys	≤69	(49.2)	1		1	
	>70	(50.8)	1.51 (0.77-2.96)	0.23	1.28 (0.65-2.54)	0.48
Sex	Male	(77.0)	1			
	Female	(23.0)	0.84 (0.36-1.92)	0.68		
Smoking	Never	(8.2)	1			
	Ex, Current	(91.8)	2.15 (0.51-9.02)	0.30		
Histology	Ad	(52.5)	1			
	Sq or NSCLC	(47.5)	1.13 (0.58-2.19)	0.72		
Metastasis	IIIc or IVa	(55.7)	1		1	
	IVb	(44.3)	1.81 (0.93-3.53)	0.08	1.74 (0.88-3.45)	0.11
PD-L1, TPS(%)	≤80	(45.9)	1		1	
	>80	(54.1)	0.38 (0.19-0.76)	0.0067	0.43 (0.21-0.90)	0.02
Tumor Burden (mm) mean (range)	48 (0-193)		1			
			1.00 (0.99-1.01)	0.33		
TMB, /Mb	<11	(59.0)	1			
	≥11	(41.0)	0.82 (0.41-1.64)	0.58		
Oncogenic mutation count	0-2	(45.9)	1		1	
	≥3	(54.1)	2.58 (1.29-5.15)	0.0075	2.02 (0.98-4.15)	0.06

PD-L1 TPS および OMC とペムブロリズマブの PFS との相関についてそれぞれの層別化と関連を検討し、PD-L1 TPS 80%、OMC 3 個以上かそれ未満に分けることでペムブロリズマブの効果予測が可能となることがわかった (図 4)。PD-L1 TPS 80%以上で OMC 2 個以下の症例では、約 70%の症例でペムブロリズマブによる long tail effect が期待され、5 年以上の生存が期待される。

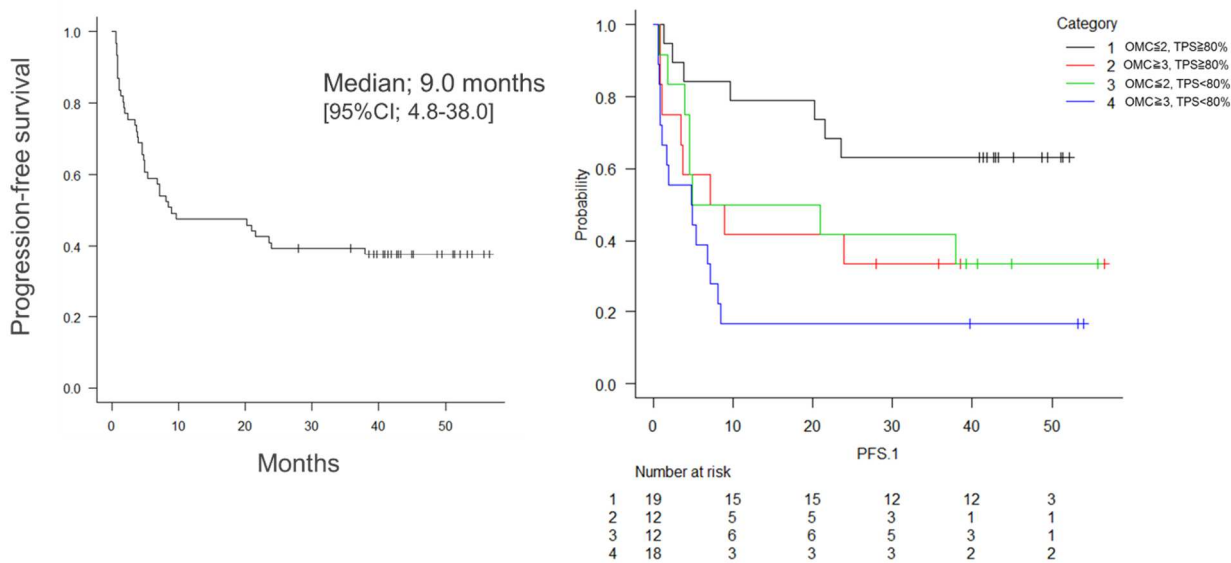


図 4 OMC および PD-L1 TPS によるグループ化

4.考察

今回の検討では PD-L1 TPS に加え、OMC を追加して検討することで、ペムブロリズマブの効果が期待できる症例を選別できる可能性が示唆された。PD-L1 TPS 50%以上の患者層でもさらに高発現 (TPS 80%以上) の症例では、ペムブロリズマブの有効性が高くなる傾向はこれまでも報告されていた。今回、われわれの提案した OMC は腫瘍の有するドライバー変異の個数を反映するものであり、その数が少ない腫瘍のほうがペムブロリズマブの効果が期待できる。これは腫瘍の進行の程度を間接的に評価するバイオマーカーといえる。ドライバー変異の個数が増すと、腫瘍の進行度、転移能などの悪性度が上がるという報告がなされている。今回の検討では腫瘍自体の広がりをも Tumor burden として、腫瘍の最大径でも検討したが、多変量解析では、腫瘍の最大径はペムブロリズマブの効果を反映するマーカーにはならず、OMC が有意なマーカーとして残った。これは、実臨床では IV 期症例の受診日は症例ごとに異なるため、腫瘍の最大径が大きかったとしても腫瘍の進展速度を正確に反映しているわけではないことが考えられる。受診機会などが遅れることで腫瘍が増大した形で発見されるが、その増大速度自体は速くない腫瘍もありうるからである。OMC が少ないということは、前述の参考文献のデータなどからは、転移を含めた腫瘍の広がりが少ない可能性もあり、OMC が少ないほうが腫瘍の進展度合いが少なく、ペムブロリズマブが奏効した可能性が示唆された。

PD-L1 TPS は、腫瘍内浸潤リンパ球の間接的なマーカーとなっている可能性が示唆される。腫瘍細胞表面の PD-L1 発現は、内因性のものと外因性のものの 2 つがあることが知られているが、腫瘍内部に浸潤したリンパ球からのインターフェロンシグナルにより発現が

誘導されることが報告されている。腫瘍内浸潤リンパ球がペムブロリズマブの効果に関連することが報告されており、PD-L1 発現の高さは腫瘍内浸潤リンパ球の多さを反映したものである可能性がある。

OMC は腫瘍形成に関わる遺伝子変異の総数を表すものであるが、TMB との相関は認められなかった。これはドライバー変異とパッセンジャー変異の違いが影響している可能性があり、TMB はペムブロリズマブによらず抗 PD-1/PD-L1 抗体の治療効果予測マーカーとされているが、今回のわれわれの検討では TMB はペムブロリズマブの効果を予測しなかった。OMC の意味付けについては OncoKB のデータベースを用いており、発癌との関連の意義づけがなされていることで、TMB よりも臨床的意義が増しているものとする。

単一もしくは組み合わせによるゲノムバイオマーカーとペムブロリズマブとの効果の相関をランダムに検討した解析では、TP53 変異と ERBB2 増幅、NEF2L2 変異、KEAP1 変異がそれぞれ、ペムブロリズマブの効果に対する負の予測因子であることが示唆された。NEF2L2 は転写制御因子であり、酸化ストレスを引き起こす求電子物質や活性酸素に応答し、薬剤代謝酵素や抗酸化酵素の発現を制御する KEAP1-NFE2L2 シグナルの作用分子として働くことが報告されている。これらの変異が抗 PD-1/PD-L1 抗体の負の治療効果予測マーカーであることはすでに報告されており、今回の検討でも同様の結果が得られたことは、今回の解析の妥当性を補強するものと思われる。また TP53 変異と ERBB2 増幅の組み合わせについては、今回の報告が初めての報告であり、その生物学的意義づけについては今後のさらなる検討が求められる。

今回の検討では、比較的少数例の検討であり、統計学的な意義が弱いこと、また別のコホートでの確認が本来は求められるが、それがなされていないことが大きな欠点として挙げられる。また OMC についても、OncoKB 以外のデータベースでの意義づけを行った場合にも同様の結果が得られるのかは検証すべきであると考えている。今後、免疫療法以外のコホートでの OMC の意義づけを行ったうえで、論文報告を予定している。

5. 結語

PD-L1 高発現患者に対する 1st line ペムブロリズマブにおけるゲノムバイオマーカーの探索を行い、oncogenic mutation count (OMC) と PD-L1 TPS を組み合わせることで、従来よりも正確に有効な患者集団を同定することに成功した。今後、別のコホートを用いることで、同バイオマーカーの検証を進めていく。

6. 文献

1. Cristescu R, Mogg R, Ayers M, Albright A, Murphy E, Yearley J, et al. Pan-tumor genomic biomarkers for PD-1 checkpoint blockade-based immunotherapy. *Science*. 2018.12;362(6411):eaar3593.

7.成果発表

学会発表

國政啓. PD-L1 高発現非小細胞肺癌患者への一次 Pembrolizumab におけるゲノムバイオマーカーの探索. 第 19 回日本臨床腫瘍学会学術集会. 京都. 2022.

論文発表

Kunimasa K, Matsumoto S, Nishino K, Honma K, Maeda N, Kuhara H, et al. Comparison of sampling methods for next generation sequencing for patients with lung cancer. *Cancer Med*. 2022 Mar 10. doi: 10.1002/cam4.4632. Online ahead of print.

Kunimasa K, Okami J, Takenaka S, Honma K, Kukita Y, Nagata S, et al. Conversion Surgery for Advanced Thoracic SMARCA4-Deficient Undifferentiated Tumor With Atezolizumab in Combination With Bevacizumab, Paclitaxel, and Carboplatin Treatment: A Case Report. *JTO Clin Res Rep*. 2021 Oct 6;2(11):100235.

Kunimasa K, Kawamura T, Tamiya M, Inoue T, Kuhara H, Nishino K, et al. Capmatinib successfully overcomes tepotinib-induced intolerable peripheral edema. *Thorac Cancer*. 2021 Dec;12(24):3426-3428.