

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 武井 将伍

横浜市立大学大学院医学研究科 消化器・腫瘍外科学

審査員

主査	横浜市立大学大学院医学研究科	肝胆膵消化器病学	主任教授 中島 淳
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	分子病理学	主任教授 藤井 誠志
副査	横浜市立大学大学院医学研究科	免疫学	准教授 西山 晃

博士の学位論文審査結果の要旨

Multiomic molecular characterization of the response to combination immunotherapy in MSS/pMMR metastatic colorectal cancer

(MSS/pMMR 大腸癌における併用免疫療法への治療効果に関する

分子学的特性のマルチオミックス解析)

【背景・目的】

マイクロサテライト安定 (MSS) またはミスマッチ修復機能保持 (pMMR) の切除不能進行大腸癌は、免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) 単剤に対する効果が限定的であることが知られている (Le et al., 2015; O'Neil et al., 2017). 本研究の目的は、MSS/pMMR 切除不能進行大腸癌の患者において、レゴラフェニブとニボルマブの併用療法 (REGONIVO 療法) および TAS-116 とニボルマブの併用療法 (TASNIVO 療法) に対する治療効果を予測するバイオマーカーを同定し、今後の免疫療法の開発に貢献することである。

【実験材料と方法】

本研究では、医師主導治験のもと REGONIVO 療法と TASNIVO 療法が施行され、かつ試験治療以前に ICI 治療を受けていない 22 名 (REGONIVO 療法) および 23 名 (TASNIVO 療法) の MSS/pMMR 切除不能進行大腸癌患者の治療開始前の検体を用いて全エクソームシーケンス (WES), RNA シーケンス (RNA-seq), および蛍光多重免疫染色 (mIHC) による多層オミックス解析を行った。

本研究は国立がん研究センター東病院臨床研究審査委員会により承認されている (ID: 2022-041)。

【結果】

RNA-seq において、REGONIVO 療法へのレスポンドー群では、上皮間葉転換経路および癌関連線維芽細胞に関連する遺伝子がアップレギュレートされ、TASNIVO 療法へのレスポンドー群では G2M チェックポイント経路がアップレギュレートされていることが明らかになった。また、REGONIVO 療法のノンレスポンドー群では MYC 経路がアップレギュレートされていた。REGONIVO 療法において、consensus molecular subtype (CMS) 4 の症例で他のサブタイプと比してレスポンドーの割合が高く、無増悪生存期間が有意に長かった ($p=0.035$, $p=0.006$)。mIHC では、REGONIVO 療法のレスポンドー群で腫瘍組織における CD8 陽性 T 細胞、制御性

T細胞, M2 マクロファージの密度が有意に高かった. WES で得られたデータでは, TASNIVO 療法のレスポonderと POLE 遺伝子の変異が有意に関連していたが, その他の変異や腫瘍遺伝子変異量とは有意な差は見られなかった.

【考察】

本研究は, MSS/pMMR 切除不能進行大腸癌における併用免疫療法の治療効果予測因子を特定するために包括的なバイオマーカー解析を行った最初の報告である. 本研究により, REGONIVO 療法および TASNIVO 療法への反応する分子学的特徴, 特に腫瘍微小環境 (TME) に関連する特徴が明らかになった. 特に, 上皮間葉転換経路がアップレギュレートされ, 癌関連線維芽細胞が多く存在し, CD8 陽性 T 細胞が浸潤しているが, 抑制系免疫細胞により免疫応答を抑制されている CMS4 大腸癌に対しレゴラフェニブを併用することで TME が変化しニボルマブが抗腫瘍効果を発揮した可能性が示唆された. 一般的に治療抵抗性で予後不良なサブタイプとされている CMS4 が, REGONIVO 療法では他のサブタイプと比べ良好な臨床転帰と関連していたことは重要な発見である.

【結語】

MSS/pMMR 切除不能進行大腸癌における REGONIVO 療法および TASNIVO 療法の治療効果と関連する分子学的特徴を特定した. これらの知見は, MSS/pMMR 切除不能進行大腸癌における将来的な併用免疫療法や個別化医療の開発において重要な発見であると考えられる.

審査にあたり、以上の論文内容の説明がなされた後、以下の質疑応答が行われた。

まず、西山副査より次の質問がなされた。

- 1) REGONIVO 療法におけるレスポonderと CMS 分類について、TMB がレスポonderと非レスポonderに差がなかったとのことだが、CMS 分類のどのサブタイプであってもがん抗原は十分だと考えるか。つまり ICI が効果を発揮するうえでさらなるがん抗原は必要ないのか。
- 2) CMS の分類の原著論文でネットワーク解析から Treg による抑制, M2 マクロファージの抑制に関する情報はあるか。もしそういったパスウェイが抽出できれば治療ターゲットにできる。
- 3) 示されている免疫染色の結果について、REGONIVO 療法による治療前の検体による染色結果であるが、治療後に Treg や M2 マクロファージがどのように変化したかは検討していないか。
- 4) この免疫染色のデータとしては CMS4 の immune inflamed の状況をみているものとするか。

この質問に対して以下のように回答が行われた。

- 1) CMS1 はがん抗原の量が多いとされているが、今回レスポonderと有意に相関のあった CMS4 が CMS2 や 3 と比較してがん抗原の量が多いという報告はない。また、CMS4 で多くの免疫細胞浸潤がみられる機序の詳細は明らかになっていない。その為、私自身の中で Neoantigen の少ない CMS4 で immune inflamed になっているのか、まだ解釈ができていない。ただ、CMS4 でリンパ球浸潤が多くいることは多くの研究で報告されていて、レゴラフェニブを制御性 T 細胞や M2 マクロファージを抑制することで ICI による治療効果が発揮できたことを考えると、このがん抗原の量でも治療効果はあったものと考えている。
- 2) 原著の CMS 分類の方法は、もともと独立した 6 つの分類方法を統一するための始まったプロジェクトであり、クラスタリングを決定する際には 6 つの分類方法の一致性によるネットワーク解析によりクラスタリングを行っているため、分類を決定するうえではパスウェイなどは見ていないが、分類後にそれぞれのサブタイプでどういったパスウェイがアップレギュレートしているか探索するとスライドの表中に記載されたパスウェイがアップレギュレートしていることがわかった。原著の限りでは表に記載されたもの以外で Treg, M2 マクロファージの浸潤に関連したパスウェイについて情報はみられなかった。
- 3) 中間審査でも指摘された部分であり治療後の検体による追加の染色を検討したが、残念ながら治療後の検体が使用できる症例がなく、追加の検討はできなかった。
- 4) ご指摘のとおり、CMS4 の状態を示したものと考えている。

次に藤井副査から以下の質問がなされた。

- 1) 西山先生の質問とも重なるが、実際にマクロファージなど immune cell の動きについては

明らかにしようとしていなかったのか。

- 2) 結果的に CMS4 のサブタイプがよく効くサブタイプということがわかったが、Limitation にもあった様に実臨床では CMS 分類を行うために全例に RNA シーケンスを行うわけにはいかないため、他の限られた IHC やパネル検査などの小さな手数でレスポンドを絞り込むことは可能か。
- 3) CMS4 すべてに効くわけではないということで、今回の結果からどのように REGONIVO 療法がいいのか TASNIVO 療法をやるのがいいのか実臨床でどのようなアプローチをしていくことが可能か。
- 4) 大腸癌の治療において肝転移をなんとかする必要があるが、肝転移巣のサンプルを用いて解析をしようとは考えなかったのか。国立がん研究センター東病院であれば他の病院よりも肝転移の検体もあるのではないか。
- 5) PD-L1 について CPS について、腫瘍浸潤免疫細胞の PD-L1 発現も加味するために CPS が選択されたのか。

この質問に対して以下のように回答が行われた。

- 1) ご指摘のとおり、治療介入前後で免疫染色の結果が観察できればより良かったと考えているが、大腸癌という特性上(原発巣を切除済みのことが多く生検が侵襲的になってしまう)と医師主導治験のプロトコル上も治療後のサンプル採取について規定がなかったため、治療後の検体が準備できなかった。ただし、REGONIVO 療法において併用療法が計画された背景にはレゴラフェニブが Treg や M2 マクロファージを抑制するという前臨床データがあったためであり、治療開始前の検体で Treg や M2 マクロファージが浸潤した腫瘍微小環境で効果を発揮したことは、ラショナルを証明できたものと考えている。
- 2) 例えば HE 染色から CMS 分類を予想する研究は報告されており、そういった RNA シーケンス以外から CMS 分類に近い情報を得る研究はなされているが実用化にはまだ時間がかかりそうな印象である。また、CMS4 が全例 REGONIVO 療法にレスポンスするわけではないため、CMS4 のなかでこういったポピュレーションが真にレスポンスするかが CMS 分類以外でわかれば更にはいいと考えるが、そこまで研究が進んでいない。
- 3) リンパ球浸潤がそもそも乏しいと REGONIVO 療法でもレスポンスさせるのは困難であるため、まず HE 染色でリンパ球浸潤があるかどうか評価し、そこからさらに肝転移症例は効果が期待できないなどとレスポンスが期待できる症例を絞り込んでいくことは可能かもしれない。一方で TASNIVO に関しては、本研究で M2 マクロファージの浸潤が多い症例が非レスポンドに多かったという結果があり、前臨床のデータでも TAS116 が Treg を抑えるというデータはあるが M2 マクロファージを抑えるという報告は見られず、HE 染色はマクロファージの浸潤が多い腫瘍では TASNIVO 療法の効果は期待できないかもしれないというように腫瘍微小環境の状況からアプローチしていく方法が考えられる。
- 4) 中間審査でも指摘されたことだが、国立がん研究センター東病院の研究で胃癌の併用免疫療法と ICI 単剤療法において原発巣と肝転移巣で免疫微小環境を比較したものが報告されているが、本研究では肝転移巣からのサンプルは少なく、研究はできなかった。大腸癌に

において原発巣と肝転移巣の微小環境の違いや、肝転移巣の微小環境とレスポンスで相関があるのかは非常に興味があり、今後の研究に期待したい。

- 5) 実際は、医師主導治験で規定された評価方法であり、TPS でなくなぜ CPS をあえて選択したかは確認できていない。ただ、医師主導治験の計画された時期が PD-1 抗体のバイオマーカーとして CPS が評価されてはじめての時期であったためである可能性もある。

次に中島主査から以下の質問がなされた。

- 1) スライドにおいて MSI-H は 6%程度とのことだが、欧米においてはもう少し多かったと記憶しているがどうか。

この質問に対して以下のように回答が行われた。

- 1) 6%というのはあくまで全大腸におけるデータであり MSI-H の率が高い右側結腸においてはもう少し高い値となる。

以上により博士（医学）の学位授与に値すると判断された。