

博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 千田 圭悟

横浜市立大学大学院医学研究科医科学専攻 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 教授	中島 淳
副査	横浜市立大学附属病院 病理診断科	准教授 山中 正二
副査	横浜市立大学大学院医学研究科 免疫学教室	教授 田村 智彦

## 博士の学位論文審査結果の要旨

A Low Tumor Mutational Burden and PTEN Mutations Are Predictors of a Negative Response to PD-1 Blockade in Microsatellite instability-High (MSI-H)/deficient mismatch repair (dMMR) Gastrointestinal Tumors (MSI-H/dMMR)

消化器腫瘍において、腫瘍変異負荷低値と PTEN 変異が抗 PD-1 抗体の効果に対する負の予測因子となる

**【背景・目的】** マイクロサテライト高不安定性 (MSI-H) またはミスマッチ修復欠損 (dMMR) 腫瘍は、多数の遺伝子変異を有し、腫瘍特異抗原の発現増強、細胞障害性 T 細胞の高度浸潤、および免疫チェックポイント分子の発現に関与している (Li et al., 2020; Xiao and Freeman, 2015)。免疫チェックポイント阻害剤、特に PD-1 inhibitor は、肝胆道癌および膵臓癌を含む MSI-H/ dMMR 消化器腫瘍で著明な効果を示し、2018 年 12 月に Pembrolizumab が MSI-H/ dMMR 腫瘍に対する初の臓器横断的な薬事承認を獲得している (Le et al., 2019; Marabelle et al., 2020)。しかし、患者の約半数で早期の病勢進行を認め、PD-1 inhibitor への抵抗性を示すがその抵抗性に関わるバイオマーカーは不明である。本研究はこの抵抗性に関わる因子を明らかにするために、MSI-H/ dMMR 消化器腫瘍の PD-1 inhibitor に対する応答に焦点を当てた。

**【方法】** MSI の status は、Promega MSI 分析システム (MSI 検出用の 5 つのモノヌクレオチドマーカー: BAT-25、BAT-26、NR-21、NR-24、MONO-27) を用いて分析した。これらのうち少なくとも 2 つのマーカーで不安定性が認められた腫瘍を MSI-H と分類した。MMR status は、以下の抗体を用いた IHC で評価した: 抗 MutL ホモログ 1 (MLH1、ES05)、抗 MutS ホモログ 2 (MSH2、FE11)、抗 antipostmeiotic segregation increased 2 (PMS2、EP51)、および抗 MutS ホモログ 6 (MSH6、EP49) ; Agilent Technologies)。また、MLH1、MSH2、PMS2、MSH6 のいずれかが発現していない腫瘍

は dMMR とした。全エクソームシーケンシング(Whole exome sequencing: WES)では、GeneRead DNA FFPE キット (QIAGEN) を用いて FFPE 標本からゲノム DNA を分離し、RefSeq スパイクイン付き Human Core Exome キット (いずれも Twist Bioscience) を用いてエクソン断片を濃縮した。ライブラリーのシーケンスは NovaSeq 6000 システム (イルミナ) で行った。また、遺伝子増幅はコピー数が 5 以上のものと定義した。また、本研究の前に、遺伝子パネル解析 (Oncomine Cancer Research Panel (Thermo Fisher Scientific)、FoundationOne Liquid (Foundation Medicine)、Guardant 360 (Guardant Health)) を行った患者については、これらのゲノムデータも収集した。ゲノム解析は、既報として報告されている一般的ながんのシグナル伝達経路に着目して行った。腫瘍変異負荷 (tumor mutational burden: TMB) は、WES、Oncomine Cancer Research Panel、または FoundationOneLiquid における、インデルを含む非同義変異の総数、メガベースあたりの変異数 (mut/m) と定義した。Guardant 360 では、10,543 個の連続した臨床サンプルのトレーニングセットから得られた、腫瘍の種類と ctDNA の割合から予想される変異負荷に正規化して TMB を決定し、TMB スコアとして報告している。これらのサンプルのうち、上位 2% を TMB-high と定義した。Transcriptome 解析に関しては、RNeasyFFPE キット (QIAGEN) を用いて、FFPE 標本から Total RNA を抽出して行った。NEBNext rRNA Depletion kit (New England Biolabs) を用いて total RNA からリボソーム RNA を除去し、NEBNext Ultra RNA Library Prep kit (New England Biolabs) を用いて RNA-seq 用のシーケンスライブラリを調製した。調製した RNA-seq ライブラリは、150bp のペアエンド NGS シーケンスを行った。エンリッチドパスウェイは、Broad Institut のウェブサイト (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>) に掲載されている gene set enrichment analysis (GSEA) ツールを用いて決定した。さらに、FFPE サンプルにおける CD3, CD4, CD8, CD204, cytokeratin, PTEN のタンパク質発現レベルは、各抗体を用いた多重蛍光免疫染色法で評価した。PD-L1 combined positive score

(CPS) は、PD-L1 IHC 22C3 pharmDx (Dako) を用いて、診断や他の識別情報を伏せた状態で病理専門医によって評価され、腫瘍細胞の総数に対する PD-L1 陽性細胞 (腫瘍細胞、リンパ球、マクロファージ) の数の比率に 100 をかけたものと定義した。

本研究プロトコールは、国立がんセンター東病院の Institutional Review Board で承認された(承認番号: 2019-168)。

**【結果】** 胃癌、大腸癌、胆管癌、小腸癌、膵臓癌、および十二指腸癌を含む MSI-H / dMMR 消化器腫瘍の合計 45 人の患者を解析した。TMB が低い患者(TMB-low)は、TMB-high の症例と比較して客観的奏効率が低く (0 vs 48.8%)、無増悪生存期間が有意に短かった (2.3 vs 15.6 か月、hazard ratio[HR] : 6.20、P = 0.002)。消化器腫瘍の代表的な遺伝子変異の中で、TMB-low とは相互に排他的に、PTEN 変異を有する症例は PTEN 野生型と比較して低い客観的奏効率と有意に関連していた (21.4 vs 54.8%; オッズ比 : 4.45、P = 0.045)。PTEN の変異部位をホスファターゼドメインと C2 ドメインに分けて解析すると、PTEN 野生型と比較して、PTEN ホスファターゼドメイン変異は客観的奏効率の低下 (12.5 vs 54.8%、P = 0.049)、無増悪生存率の短縮 (2.6 vs 15.6 か月、HR : 5.04、P <0.001)、腫瘍浸潤 CD8 + T 細胞の低下、腫瘍浸潤 CD204 +マクロファージの増加と有意に関連していた。また、トランスクリプトーム解析では PI3K / AKT / mTOR および mTORC1 pathway の有意な発現亢進を認めた。一方で PTEN の C2 ドメイン変異では PTEN 野生型と比較して上述の差は認めなかった。さらに多変量解析では、TMB-low および PTEN ホスファターゼドメイン変異は独立して生存率の低下と関連していることが示された。

**【結語】** TMB-low と PTEN ホスファターゼドメイン変異は、MSI-H / dMMR 腫瘍腫瘍患者において、相互排他的に PD-1 blockade の効果に対する反応の負の予測因子である可能性がある。

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、山中副査より次の質問がなされた。

- 1) *PTEN*の phosphatase domain が重要と考えているのか、mRNA の不安定性が関連しているのか。
- 2) *FGFR2*の変異がある症例も免疫チェックポイント阻害薬(ICI)の効果に関連があるとされていましたが、そちらの解析はされているのか。

この質問に対して以下のように回答が行われた。

- 1) まず、PTEN のタンパク発現に関しては phosphatase domain の truncating mutation が起こるとユビキチン化された結果、プロテアソームで分解されやすくなるという細胞株での結果が現時点で出ている。また、mRNA の不安定性に関しては phosphatase domain の truncating mutation に対しては non-sense mediated decay(NMD)によって mRNA が分解されている可能性もあり、それは今後の検討が必要であると考えます。また、phosphatase domain の missense mutation に関しても脱リン酸化のホットスポットとなっておりますので、同様に重要と考えています。
- 2) 今回の解析では ICI の効果がない変異に対して focus しており、*FGFR2*の変異があった症例は効果が高いという結果であったことから今回は詳細な検討はしていない。

次に田村副査より次の質問がなされた。

- 1) 今後医師主導治験を考えているということでしたが、どんな治験をするということか。
- 2) multi-VEGF receptor の TKI の 2 つの臨床試験(EPOC1603 と EPOC1706)が今回の phosphatase domain mutation とどのように関わっているのか。
- 3) 消化管腫瘍全体とまとめているが、phosphatase domain mutation はどの癌種に多かつ

たのか。

- 4) 一般的に大腸癌全体に対する免疫チェックポイント阻害薬の効果はどうか。また、大腸癌は mutation が多いのに効かないということであったか。
- 5) Mutation が多いタイプ(いわゆる TMB-high になるタイプ)の大腸癌の割合はどの程度であるか。
- 6) VEGFR-TKI は今回の phosphatase mutation との直接の関連はないと思われるが、今回の phosphatase domain 変異に対して特定の pathway の阻害薬などは検討されなかったのか。

この質問に対して以下のように回答が行われた。

- 1) 前臨床試験で multi-VEGF receptor(VEGFR)をすることによって、腫瘍関連マクロファージが減少し、腫瘍浸潤 CD8+リンパ球の減少が報告されている。また、当院で行われた2つの第二相医師主導治験(EPOC1603 と EPOC1706)では、microsatellite-stable(MSS)大腸癌と胃癌で multi-VEGFR-TKI+PD-1 blockade の有望な結果が得られている。以上から PD-1 blockade に不応となった症例に対して multi-VEGF receptor(VEGFR) TKI と PD-1 を併用することで耐性を overcome 可能性があると考えている。
- 2) 直接の関連はないが、PD-1 不応となった MSI-High 腫瘍の中に phosphatase domain mutation 同様の免疫抑制状態にある症例があると想定されるため、VEGFR-TKI がその免疫抑制性の微小環境を overcome できるのではないかと考えている。
- 3) 特定の癌種に多かったということはなく、胃癌・大腸癌・小腸癌・膵癌に認められた。
- 4) MSS 大腸癌に関しては主要な臨床試験における ICI 単剤に対する response は 0%で、ほとんど効果がないと報告されている。MSI-H や POLE mutation を有するような mutation が多い腫瘍では ICI の効果はあるが、TMB が低い症例では効果はほとんど

ないとされている。

- 5) MSI-H 大腸癌が全体の 5%程度であり、さらに DNA ポリメラーゼ(POLE など)の異常が生じた場合も TMB が非常に高くなるが、その割合が 2%程度であるため、併せても 6-7%であると既報からは言えると思われる。
- 6) まず、腫瘍関連マクロファージに対するフロント阻害薬と PD-1 blockage の併用の試験があまり良い結果ではなかったということ、さらに PI3K- $\beta$  の阻害薬と PD-1 blockade の併用の試験も PTEN loss の腫瘍に対して行われたが、有効性は限定的であったということがある。私が個人的に考えているのは、全体として腫瘍抑制性の免疫環境が出来上がっているので単一の pathway の阻害薬というよりは、multi-kinase inhibitor のような全体として免疫抑制性の環境を reverse するような薬剤との併用の方がまだ効果が期待できるのではないかと考えている。

次に中島主査より

- 1) Nivolumab と Pembrolizumab で効果の違いはあったのか。
- 2) 最近では PD-L1 阻害薬を使用する上で CD 8 の疲弊化に関しても問題となっているが、そこに関してはどう考えるか。

この質問に対して以下のように回答が行われた。

- 1) Nivolumab と Pembrolizumab で効果の違いはなかった。
- 2) CD 8 の疲弊化に関しても重要であると考えておりまして、最近では melanoma で LAG3 と PD-1 阻害薬併用の有効性が示されており、大腸癌でも臨床試験が開始されている。PD-1 だけではない免疫チェックポイント分子の阻害薬との併用についても今後注目していく必要があると思っている。

以上のように各質問に対して回答を行った。審査員による協議の結果、本研究は博士(医学)の学位論文に値するものと判定された。