

学位論文の要旨

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 抗体に対する負の予測因子となる)

Keigo Chida

千田 圭悟

March, 2022

(2022 年 3 月)

Department of Gastroenterological Surgery

Yokohama City University Graduate School of Medicine,

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

(Research Supervisor: Takayuki Yoshino, Professor)

国立がん研究センター東病院 消化管内科

(研究指導教員：吉野 孝之 科長)

( Doctoral Supervisor : Itaru Endo, Professor )

(指導教員:遠藤 格 教授)

## 学位論文の要旨

# 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 抗体に対する負の予測因子となる)

<https://clincancerres.aacrjournals.org/content/27/13/3714>

### 【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/Mb) 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、相互に排他的に PD-1inhibitor に対する反応の負の予測因子である可能性がある。

【引用文献】

Le, D.T., Kim, T.W., Cutsem, E.V., Geva, R., Jäger, D., Hara, H., Burge, M., O’Neil, B., Kavan, P., Yoshino, T., et al. (2019). Phase II Open-Label Study of Pembrolizumab in Treatment-Refractory, Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: KEYNOTE-164. *J Clin Oncol Official J Am Soc Clin Oncol* 38, 11–19.

Li, K., Luo, H., Huang, L., Luo, H., and Zhu, X. (2020). Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. *Cancer Cell Int* 20, 16.

Marabelle, A., Le, D.T., Ascierto, P.A., Giacomo, A.M.D., Jesus-Acosta, A.D., Delord, J.-P., Geva, R., Gottfried, M., Penel, N., Hansen, A.R., et al. (2020). Efficacy of Pembrolizumab in Patients With Noncolorectal High Microsatellite Instability/Mismatch Repair-Deficient Cancer: Results From the Phase II KEYNOTE-158 Study. *J Clin Oncol* 38, 1–10.

Xiao, Y., and Freeman, G.J. (2015). The Microsatellite Instable Subset of Colorectal Cancer Is a Particularly Good Candidate for Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Cancer Discov* 5, 16–18.

## 論文目録

### I. 主論文

A Low Tumor Mutational Burden and *PTEN* Mutations Are Predictors of a Negative Response to PD-1 Blockade in MSI-H/dMMR Gastrointestinal Tumors  
Chida K, Kawazoe A, Kawazu M, Suzuki T, Nakamura Y, Nakatsura T, Kuwata T, Ueno T, Kuboki Y, Kotani D, Kojima T, Taniguchi H, Mano H, Ikeda M, Shitara K, Endo I, Yoshino T.  
Journal: Clinical Cancer Research. 2021;27(13):3714-3724

### II. 副論文

1. Diagnosis and Treatment of HER2-Positive Metastatic Colorectal Cancer.  
Chida K, Nakamura Y.  
Gan To Kagaku Ryoho. 2020;47(11):1565-1569.
2. Survival Benefit of Crossover Administration of Regorafenib and Trifluridine/Tipiracil Hydrochloride for Patients With Metastatic Colorectal Cancer: Exploratory Analysis of a Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum Multicenter Observational Study (REGOTAS).  
Chida K, Kotani D, Moriwaki T, Fukuoka S, Masuishi T, Takashima A, Kumekawa Y, Kajiwara T, Yamazaki K, Komoda M, Makiyama A, Denda T, Hatachi Y, Suto T, Sugimoto N, Enomoto M, Ishikawa T, Kashiwada T, Ando K, Yuki S, Okita Y, Kusaba H, Sakai D, Okamoto K, Tamura T, Yamashita K, Goshō M, Shimada Y.  
Front Oncol. 2021;11:576036.
3. Efficacy and safety of trifluridine/tipiracil plus bevacizumab and trifluridine/tipiracil or regorafenib monotherapy for chemorefractory metastatic colorectal cancer: a retrospective study  
Chida K, Kotani D, Nakamura Y, Kawazoe A, Kuboki Y, Shitara K, Kojima T, Taniguchi H, Watanabe J, Endo I, Yoshino T.  
Ther Adv Med Oncol. 2021;13:17588359211009143.
4. The Prognostic Impact of *KRAS* G12C Mutation in Patients with Metastatic Colorectal Cancer: A Multicenter Retrospective Observational Study  
Chida K, Kotani D, Masuishi T, Kawakami T, Kawamoto Y, Kato K, Fushiki K, Sawada K, Kumanishi R, Shirasu H, Matsubara Y, Yuki S, Komatsu Y, Yamazaki K, Yoshino T.  
Oncologist. 2021. doi: 10.1002/onco.13870. Online ahead of print.