

論文の内容の要旨

論文題目 胃・食道神経内分泌癌における治療標的分子発現の検討

氏名 山下 智

【第一部 胃神経内分泌癌における治療標的分子の検討】

【背景】

胃神経内分泌癌（neuroendocrine carcinoma, NEC）は稀で、悪性度が高く予後不良である。

胃癌に対する分子標的療法は、HER2 標的モノクローナル抗体療法と PD-1/PD-L1 経路標的免疫チェックポイント阻害薬があり、それぞれ標的分子を発現する胃癌の患者に有効である。抗 HER2 薬は HER2 陽性胃癌患者に対する有効性は確立されているが、胃 NEC 患者では HER2 陽性は稀という報告があり、胃 NEC 患者に対して有効ではない可能性が示唆されている。

胃・食道胃接合部腺癌で PD-L1 陽性の腫瘍では、抗 PD-1 抗体ペムブロリズマブが 2 次・3 次治療として推奨されている。しかし現在まで胃 NEC についての報告は少なく、胃 NEC における PD-L1 発現とペムブロリズマブの有効性の報告は十分でない。

腫瘍細胞と腫瘍微小環境内の免疫細胞の PD-L1 発現は、共に免疫チェックポイント阻害薬に対する応答に関連していると考えられ、近年、PD-L1 発現の評価方法 Combined Positive Score (CPS) が開発された。これは免疫細胞と腫瘍細胞上の PD-L1 発現を総合的に評価するスコアリング法で、胃癌患者のペムブロリズマブに対する有効性の予測において、Tumor Proportion Score (TPS) よりも優れていることが報告された。2017 年 9 月米国 FDA は、PD-L1 CPS \geq 1 の PD-L1 陽性再発・局所進行・転移性胃癌患者の治療薬としてペムブロリズマブを承認した。しかし、これまで胃 NEC 症例における PD-L1 を CPS で評価した研究は存在しなかった。

HLA-class I 遺伝子 (HLA-A, B, C) は、CD8 陽性 T 細胞に細胞内ペプチドを提示する。HLA の発現低下は腫瘍免疫の回避につながる。腫瘍抗原に対して細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 反応を誘導するがんペプチドワクチンの治療標的としても、HLA-class I は重要と考えられている。ペプチドワクチンの臨床試験が複数、胃癌に対して行われている。HLA-class I 陰性腫瘍細胞においては、T 細胞が腫瘍細胞を抗原認識・傷害できず CTL 反応が誘導できないため、PD-1/PD-L1 阻害剤をはじめとする T 細胞ベースの免疫療法が効きにくいことが知られており、免疫治療における課題となっている。

免疫チェックポイント治療の適応を探る上で、腫瘍免疫微小環境における腫瘍組織浸潤リンパ球 (Tumor infiltrating lymphocytes, TIL) も近年重要視される。TIL と PD-L1 発現の有無に基づいて腫瘍免疫微小環境 (Tumor immune microenvironment, TIME) を分類することが最適な免疫療法戦略を検討するうえで重要と考えられている。

ミスマッチ修復蛋白(mismatch-repair protein, MMR)は DNA 複製エラーの修復遺伝子

として知られる。MMR 発現消失を伴う腫瘍はマイクロサテライト不安定性を示し、腫瘍抗原となる変異蛋白が多く蓄積され、免疫チェックポイント治療が効きやすいと考えられている。マイクロサテライト不安定性の固形癌は、原発臓器の種類を問わず免疫チェックポイント阻害薬の適応がある。胃 NEC における MMR 異常は 11%と報告されている。

本研究では、胃 NEC に対する分子標的治療の可能性を探るために、PD-L1, HER2, HLA-Class I、MMR 蛋白の発現を調べ、TIL についても評価した。また NEC の発生に重要と考えられている p53 及び Rb も評価した。

【対象と方法】

2002 年から 2018 年までの間に、東京大学医学部附属病院胃食道外科で治癒的胃切除を受けた胃 NEC 患者 25 例を対象とした。免疫組織化学的に HER2 と PD-L1、HLA class I、Rb、p53、MMR 蛋白の発現を評価し臨床病理学的因子を検討した。PD-L1 は CPS と TPS を用いて定量的に評価し CPS・TPS ともに ≥ 1 を陽性と定義した。TIL は腫瘍全体の間質 (sTILs) と浸潤縁 (幅 1mm) (peritumoral TILs) における腫瘍浸潤リンパ球面積割合を評価した。

【結果】

PD-L1 CPS は、 ≥ 1 (陽性) が 18 例 (72%)、 < 1 (陰性) が 7 例 (28%)。PD-L1 TPS ≥ 1 (陽性)は 10 例(40%)であった。なお、CPS ≥ 1 陽性であるにも関わらず TPS < 1 陰性症例は 8 例存在し、この症例は免疫細胞により強く PD-L1 の発現を認めた。TPS は CPS より計測範囲が狭いため、PD-L1 CPS と TPS の比較において TPS の方が CPS を上回る症例を 3 例認めた。リンパ節転移は PD-L1 CPS < 1 の症例の方が PD-L1 CPS ≥ 1 の症例よりも頻度が高かった。HER2 は、NEC 成分では全例陰性であった。

MMR 欠損は 25 例中 4 例 (16%) で認め、NEC3 例と MANEC1 例であった。4 例中 3 例は PD-L1 陽性 (CPS ≥ 1)、1 例は PD-L1 陰性 (CPS < 1) であった。メチル化特異的 PCR (MSP) により、4 例中 3 例で MLH1 プロモーターの異常なメチル化を認めた。

BRAF 遺伝子異常は認められなかった。

TIL は高い peritumoral TIL と PD-L1 CPS ≥ 1 が有意に相関した。HLA-Class I の発現は 21 例 (84%) で保持されていた。HLA-Class I の発現異常は 4 例 (16%) に認められた。PD-L1 CPS ≥ 1 の陽性症例 18 例中 16 例 (89%) に HLA-Class I が発現保持されていた。

なお変異型 p53 パターンは 17 例 (68%)、Rb 発現の完全消失は 9 例 (36%) に認められた。

【考察】

PD-L1 CPS が 1 以上の症例が比較的高い割合 (72%) で存在することが確認され、PD-L1 が胃 NEC の治療標的となり得ることが示唆された。しかし、今回の研究では NEC 成分には HER2 が全く発現していないことから、HER2 は胃 NEC の治療標的になる可能性は低いことが示された。

HLA-Class I 発現状態も併せて考慮すると、本研究において PD-1/PD-L1 経路阻害剤単独で抗腫瘍活性を期待できるのは、PD-L1 CPS \geq 1 かつ HLA-Class I 発現が保持された 16 症例 (64%) と考えられる。

【第二部 食道神経内分泌癌における免疫治療関分子発現の検討】

【背景】

食道の神経内分泌癌 NEC は稀で、胃 NEC と同様に予後不良である。食道癌に対して PD-1/PD-L1 経路標的免疫チェックポイント阻害薬が近年承認され、ペムブロリズマブは高 PD-L1 発現 (CPS \geq 10) 食道癌の 2nd line 標準治療として確立した。

食道 NEC について、PD-L1 CPS を評価した報告や、ペムブロリズマブの有効性を検証した報告はない。食道癌の先行研究では、PD-L1 発現と TIL の状態に基づいて腫瘍免疫微小環境(TIME)を 4 分類することで免疫療法応答予測マーカー及び予後因子として報告された。また、食道扁平上皮癌における MMR 異常の頻度は 2%未満と稀であることが報告されているが、食道 NEC における TIL やマイクロサテライト不安定性を検討した報告は殆どない。

【対象と方法】

2004 年から 2017 年までの間に、東京大学医学部附属病院で診断・治療を受けた食道 NEC 患者 15 例を対象とした。うち 6 例は外科切除検体と術前の生検検体の両方、8 例は生検検体のみ、1 例は手術検体のみが入手、評価可能であった。免疫組織化学的に PD-L1、HLA class I、Rb、p53、MMR 蛋白の発現を評価し臨床病理学的因子を検討した。PD-L1 は CPS と TPS を用いて定量的に評価し CPS \geq 1 または \geq 10 を示す症例の割合を調べた。TIL は sTILs と peritumoral TILs を評価した (生検診断例は sTILs のみ評価した)。

【結果】

PD-L1 CPS \geq 1 は 15 例中 9 例 (60%)、CPS \geq 10 (陽性) が 5 例 (33%)、TPS \geq 1% (陽性) は 5 例 (33%) に認められた。なお、食道 NEC では各成分の TPS が CPS を上回ることはなかった。生存解析では、PD-L1 CPS \geq 1 の症例群が PD-L1 CPS $<$ 1 の症例群よりも全生存期間が長く統計的有意差を認めた。

変異型 p53 パターン (びまん性の強染色または完全な消失) は 12 例 (80%)、Rb 発現の完全消失は 13 例 (86%) であり、発現異常が高頻度に認められた。MMR 蛋白の発現は全例で保たれていた。

HLA-Class I の発現は 10 例 (67%) で保持されていた。PD-L1 陽性と HLA-Class I 発現保持の組み合わせは、CPS \geq 1 の 9 例中 6 例 (67%)、CPS \geq 10 の 5 例中 4 例 (80%) で認められた。MiNEN5 例中 3 例 (60%) で NEC 成分のみで HLA-Class I の発現減弱を認めた。HLA-Class I の発現減弱症例で N 因子、TNM Stage が有意に高く、sTILs が低かった。

【考察】

PD-L1 CPS が 1 以上の症例が 60%、CPS が 10 以上の症例が 33%と比較的高い割合で存在することが確認され、PD-L1 が食道 NEC の治療標的となり得ることが示唆された。また、食道 NEC において CPS \geq 1 の群は CPS<1 の群と比べてより生存期間が長く、食道 NEC において CPS \geq 1 が予後予測マーカーとしての有用な可能性が示された。

HLA-Class I と CPS \geq 1 の組み合わせを食道 NEC9 例中 6 例 (67%) に発現を認め、がんワクチン併用によって腫瘍免疫応答を誘導した抗腫瘍効果の上乗せが期待されると考えられる。また、CPS<1 の抗 PD-1/PD-L1 阻害薬が効きにくいと考えられる食道 NEC6 例中 4 例 (67%) に HLA-Class I の発現が認められており、PD-L1 陰性症例においてもがんペプチドワクチンによる免疫治療の可能性は残されていると考えられる。本研究において PD-1/PD-L1 経路阻害薬単独で抗腫瘍活性を期待できるのは、PD-L1 CPS \geq 10 かつ HLA-Class I 発現が保持された 4 例 (27%) であると考えられる。

【結語】

本研究では胃及び食道 NEC における治療標的分子を探るため、PD-L1、HLA-Class I 及び HER2(胃のみ)の発現を免疫組織学的に検討した。胃 NEC における HER2 の発現は乏しく、NEC の治療標的分子としての意義は乏しいと考えられた。一方で PD-L1 や HLA-Class I の発現は胃、食道で高頻度に認められ、免疫チェックポイント阻害薬やがんワクチン等のがん免疫治療が、有望な治療選択肢と考えられた。