

# 胃癌患者における術前末梢血の免疫関連遺伝子発現に着目したフレイルティ評価法の開発

九州大学病院 別府病院外科  
講師 伊藤 修平

(共同研究者)

国立がん研究センター中央病院 胃外科	医長 深川 剛生
九州大学 生体防御医学研究所 情報生物学分野	助教 佐藤 哲也
九州大学病院 別府病院外科	教授 三森 功士

## はじめに

### 【背景】

#### (1) 末梢血、骨髄血における癌関連遺伝子発現

近年、癌研究において、血液中、尿中の循環腫瘍細胞 (CTC: circulating tumor cell) や遊離DNA (cfDNA: セルフリー DNA) に着目した予後予測マーカー、治療効果予測マーカーの開発が進んでいる。血液、尿を試料としたリキッドバイオプシーは、組織生検と比較し、低侵襲、簡便、頻回に施行可能であるといった利点がある。我々の研究室では、胃癌切除症例 1,030 例の術前末梢血、骨髄血を用い、*VEGFR-1*, *Vimentin*, *histon mRNA/miR-760*, *ID1* などの遺伝子発現が、癌の進展、予後に関与するという先駆的な成果を発表してきた<sup>(1-4)</sup>。

#### (2) 免疫チェックポイント阻害剤の臨床応用

近年、新たな免疫療法として、患者の腫瘍免疫反応を再活性化する免疫チェックポイント阻害剤 (抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体) の有望な治療成績が報告され、臨床応用されている。胃癌に対しても、切除不能進行胃癌、再発胃癌に対し、ニボルマブ (抗PD-1抗体) が世界で初めて生存期間の延長を示し (第III相臨床試験: ONO-4538-12)<sup>(5)</sup>、実臨床での使用が始まっている。一方で、免疫チェックポイント阻害剤は、高額な医療費を必要とするため、治療効果が期待できる症例を選別するためのバイオマーカーの同定が喫緊の課題であるが、依然明らかではない。近年の免疫チェックポイント阻害剤のバイオマーカー探索に伴い、宿主 (患者) の腫瘍免疫機構の解明が進んでおり、癌の発生、進展に関与する因子として、腫瘍側の因子だけでなく、宿主側の因子である腫瘍免疫能が注目されている。

#### (3) 癌手術患者におけるフレイルティ (脆弱性)

高齢者では、周術期合併症、死亡率が増加することが知られている。これは、加齢による全身の生理機能低下、臓器予備能低下に伴うフレイルティにより、手術侵襲に対して全身の恒常性が破綻しやすいためと考えられている<sup>(6,7)</sup>。これまでに、体重減少、栄養状態、基礎疾患などをもとに70以上のフレイルティの評価法が提唱されているが、様々な要因が関与

する複雑さのため<sup>(8)</sup>、いまだ正確な評価法は確立していない。

**【目的】** 本研究では、胃癌切除症例の術前末梢血における免疫関連遺伝子発現と患者のフレイルティの相関を明らかにすることにより、治療選択の決定に有用な評価法を確立し、胃癌患者の予後を改善する個別化医療へと展開することを目的とする。まず、基礎実験として免疫関連遺伝子*PD-1*、*PD-L1*、*CD8*のmRNA発現と臨床病理学的因子、予後の相関を検討した。

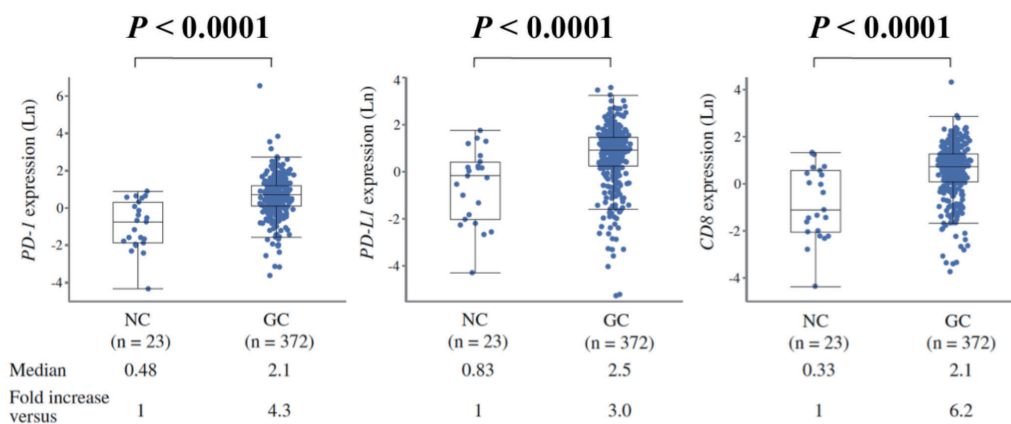
**【対象】** 胃癌切除例372例（治癒切除338例、非治癒切除34例）、健常人23例。

**【方法】** 術前末梢血中の*PD-1*、*PD-L1*、*CD8*遺伝子mRNA発現を定量RT-PCR法にて測定した。また、*PD-1*、*PD-L1*蛋白発現の局在をフロサイトメトリー解析にて評価した。

## 結 果

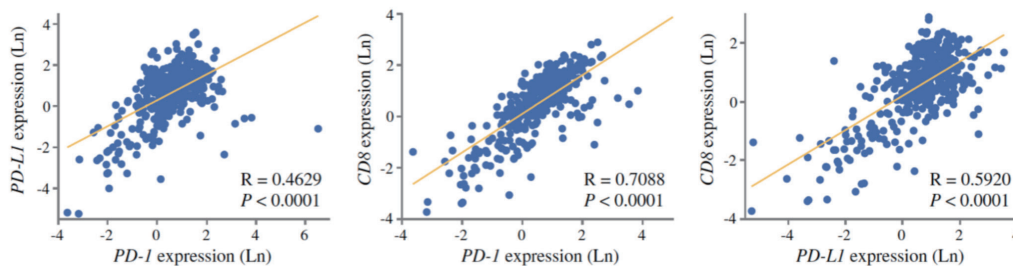
(1) 健常人との比較：胃癌患者では*PD-1*、*PD-L1*、*CD8* mRNAがそれぞれ4.3、3.0、6.2倍高発現していた（すべて $P < 0.0001$ ）（図1）。また、胃癌患者における*PD-1*、*PD-L1*、*CD8* mRNA発現は、いずれの2つの遺伝子も互いに正の相関を認めた（すべて $P < 0.0001$ ）（図2）。Stage I - IVのいずれの進行度においても、健常人と比較し*PD-1*、*PD-L1*、*CD8* mRNAは有意に高発現していた。

図1. 正常人、胃癌患者における免疫関連遺伝子発現



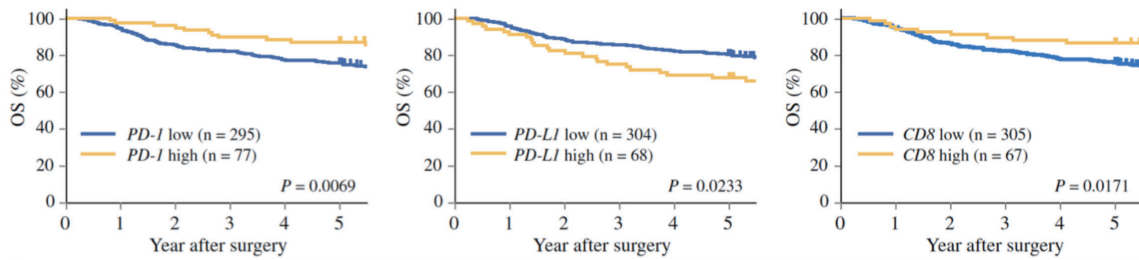
NC: 健常人、GC: 胃癌患者

図2. 胃癌患者における免疫関連遺伝子の相関



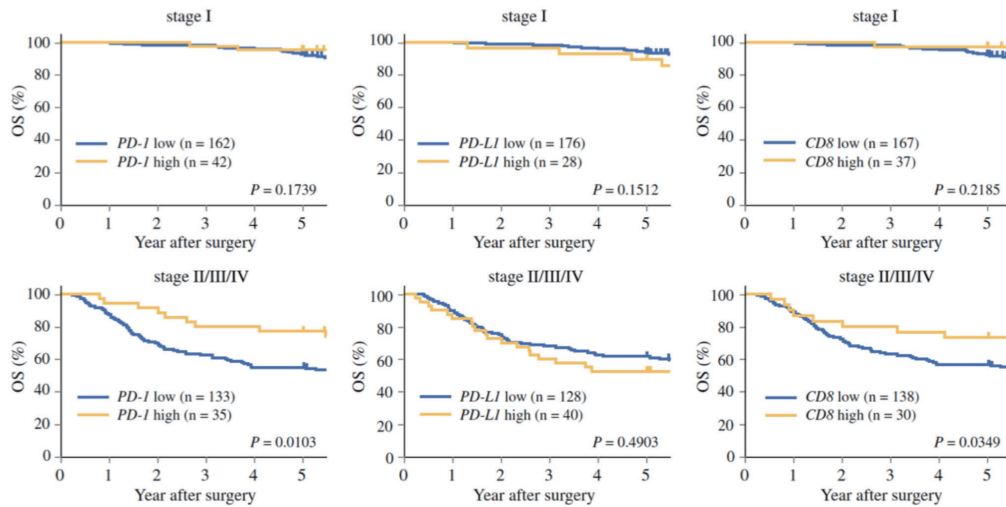
R: 相関係数

図3. 胃癌患者における免疫関連遺伝子発現と予後



OS: 全生存率

図4. 胃癌患者におけるstage別の免疫関連遺伝子発現と予後



OS: 全生存率

(2) 術前化学療法の影響：術前化学療法施行群 (n=11) では、術前無治療群 (n=361) と比較し、*PD-1*, *CD8* mRNA発現が有意に低下していた (ともに  $P < 0.05$ )。

(3) 予後：全生存率の解析では、*PD-1* mRNA低発現、*PD-L1* mRNA高発現、*CD8* mRNA低発現群は、それぞれ*PD-1* mRNA高発現、*PD-L1* mRNA低発現、*CD8* mRNA高発現群と比較し予後不良であった (それぞれ  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ ) (図3)。また、サブグループ解析において、Stage II/III/IV では、*PD-1* mRNA低発現、*CD8* mRNA低発現群は、それぞれ*PD-1* mRNA高発現、*CD8* mRNA高発現群と比較し、有意に予後不良 (ともに  $P < 0.05$ ) であったのに対し、Stage Iでは*PD-1* mRNA高/低発現、*CD8* mRNA高/低発現群で有意な差を認めなかった (図4)。治癒切除例における全生存率の多変量解析では、リンパ節転移、腹膜播種、遠隔転移、末梢血中の*PD-1* mRNA低発現、*PD-L1* mRNA高発現が有意な独立予後不良因子であった (*PD-1* mRNA低発現: HR 2.38, 95% CI 1.27–4.78,  $P < 0.01$ , *PD-L1* mRNA高発現: HR 1.81, 95% CI 1.15–2.78,  $P < 0.05$ )。また、無再発生存率の多変量解析では、リンパ節転移、遠隔転移、末梢血中の*PD-1* mRNA低発現が、有意な独立予後不良因子であった (*PD-1* mRNA低発現: HR 2.90, 95% CI 1.38–6.68,  $P < 0.01$ )。

**(4) PD-1, PD-L1 発現の局在：**PD-1は、Tリンパ球 (> 90%)、PD-L1はTリンパ球、もしくは単球 (> 70%) に発現していた。

## 考 察

術前末梢血において、胃癌患者は健常人と比較し、*PD-1* (T細胞の活性化の指標)、*PD-L1*, *CD8* (キラーT細胞のマーカー) mRNAが高発現しており、癌抗原に対する腫瘍免疫反応と考えられた。また、術前化学療法施行症例において*PD-1*, *CD8* mRNA発現が有意に低下していることや、より進行度の高い症例 (Stage II/III/IV) で*PD-1*, *CD8* mRNA低発現と予後不良が相関していることは、これらの症例における腫瘍免疫能の低下を反映していることが示唆された。以上の結果から、術前にT細胞の活性化が低い患者では、腫瘍免疫能の低下が腫瘍の増大、予後不良に関与すると考えられ、免疫関連遺伝子発現が予後予測マーカーとなる可能性が示唆された (Ito S et al. ASCO annual meeting, 2017)。

## 要 約

**【背景】** 近年、胃癌においても免疫チェックポイント阻害薬の臨床試験における良好な結果が報告され、抗PD-1抗体のニボルマブが保険承認された。免疫チェックポイント阻害薬は高額であり、治療効果予測、予後予測バイオマーカーの同定が喫緊の課題であり、免疫染色によるPD-L1蛋白発現の有用性が報告されているが、いまだ一定の見解を得ない。

**【目的】** 胃癌患者における末梢血中の*PD-1*, *PD-L1*, *CD8* mRNA発現の臨床的意義を検討する。

**【対象】** 胃癌切除例372例 (治癒切除338例、非治癒切除34例)、健常人23例。

**【方法】** 術前末梢血中の*PD-1*, *PD-L1*, *CD8* 遺伝子mRNA発現を定量RT-PCR法にて測定した。また、PD-1, PD-L1蛋白発現の局在をフロサイトメトリー解析にて評価した。

### 【結果】

**(1) 健常人との比較：**胃癌患者では*PD-1*, *PD-L1*, *CD8* mRNAがそれぞれ4.3、3.0、6.2倍高発現していた (すべて $P < 0.0001$ )。また、胃癌症例において*PD-1*, *PD-L1*, *CD8* mRNA発現はいずれの2つの遺伝子も互いに正の相関を認めた (すべて $P < 0.0001$ )。

**(2) 予後：**全生存率においては、*PD-1* mRNA低発現、*PD-L1* mRNA高発現、*CD8* mRNA低発現群は、それぞれ*PD-1* mRNA高発現、*PD-L1* mRNA低発現、*CD8* mRNA高発現群と比較し予後不良であった (それぞれ $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.05$ )。全生存率の多変量解析では、リンパ節転移、腹膜播種、遠隔転移、末梢血中の*PD-1* mRNA低発現、*PD-L1* mRNA高発現が有意な独立予後不良因子であった (*PD-1* mRNA低発現: HR 2.38, 95%CI 1.27-4.78,  $P < 0.01$ , *PD-L1* mRNA高発現: HR 1.81, 95%CI 1.15-2.78,  $P < 0.05$ )。

**(4) PD-1, PD-L1 発現の局在** : PD-1 は、Tリンパ球 (> 90%)、PD-L1 はTリンパ球、もしくは単球 (> 70%) に発現していた。

**【結語】** 胃癌切除症例において、術前末梢血中の *PD-1*, *PD-L1*, *CD8* mRNA 発現は抗腫瘍免疫反応を反映しており、*PD-1* mRNA 低発現、*PD-L1* mRNA 高発現は独立した予後不良マーカーになることが示唆された。<sup>(9)</sup>

(Ann Surg Oncol. 2018 Sep, Epub ahead of print)

## 文 献

1. Mimori K, Fukagawa T, Kosaka Y, et al.: Hematogenous metastasis in gastric cancer requires isolated tumor cells and expression of vascular endothelial growth factor receptor-1. Clin Cancer Res, 14: 2609 – 2616, 2008.
2. Iwatsuki M, Mimori K, Fukagawa T, et al.: The clinical significance of vimentin-expressing gastric cancer cells in bone marrow. Ann Surg Oncol, 17: 2526 – 2533, 2010.
3. Iwaya T, Fukagawa T, Suzuki Y, et al.: Contrasting expression patterns of histone mRNA and microRNA 760 in patients with gastric cancer. Clin Cancer Res, 19: 6438 – 6449, 2013.
4. Iwatsuki M, Fukagawa T, Mimori K, et al.: Bone marrow and peripheral blood expression of ID1 in human gastric carcinoma patients is a bona fide indicator of lymph node and peritoneal metastasis. Br J Cancer, 100: 1937 – 1942, 2009.
5. Kang YK, Boku N, Satoh T, et al.: Nivolumab in patients with advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer refractory to, or intolerant of, at least two previous chemotherapy regimens (ONO-4538-12, ATTRACTION-2) : a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet, 390: 2461 – 2471, 2017.
6. Desserud KF, Veen T, Soreide K: Emergency general surgery in the geriatric patient. Br J Surg, 103: e52 – 61, 2016.
7. Robinson TN, Walston JD, Brummel NE, et al.: Frailty for Surgeons: Review of a National Institute on Aging Conference on Frailty for Specialists. J Am Coll Surg, 221: 1083 – 1092, 2015.
8. Ethun CG, Bilen MA, Jani AB, et al.: Frailty and cancer: Implications for oncology surgery, medical oncology, and radiation oncology. CA Cancer J Clin, 67: 362 – 377, 2017.
9. Ito S, Fukagawa T, Noda M, et al.: Prognostic Impact of Immune-Related Gene Expression in Preoperative Peripheral Blood from Gastric Cancer Patients. Ann Surg Oncol, 2018.