

免疫チェックポイント阻害剤で治療された
非小細胞肺癌患者における
血漿中 Neutrophil Extracellular Traps の臨床的意義
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系小児外科学専攻

洞口 俊

修了年 2024 年

指導教員 上原 秀一郎

緒言

Non-small cell lung cancer(NSCLC) は、がん関連死の主たる病因である^[1]。治療はステージに応じて、手術・化学療法、放射線療法、分子標的薬などが選択され^[2, 3]、近年では免疫チェックポイント阻害剤 (Immune Checkpoint Inhibitor : ICI) である抗 PD-1/PD-L1(Programmed death receptor-1/Programmed death-ligand 1)抗体が、新規治療戦略として確立されてきた^[4-7]。しかし、ICI の奏効率は限定的であり、治療効果を予測するバイオマーカーの発見が求められている^[8]。腫瘍関連炎症は、腫瘍浸潤・転移、薬物療法耐性に関与し、好中球対リンパ球比 (Neutrophil-Lymphocyte Ratio : NLR) 等は、がん患者の予後因子として報告されている^[9, 10]。近年、炎症環境による好中球活性誘発により、NETs(Neutrophil Extracellular Traps)が癌の進行・転移と関連があるとの報告が増えている^[11-16]。

目的

我々は、ICI 適応の NSCLC 患者の血漿中 NETs 濃度が予後に関連するか統計的手法により評価し、NETs モニタリングが ICI 有効性を示すマーカーとして妥当か検証した。

方法

本研究は、2017～2021年にかけて抗PD-1/PD-L1抗体治療を受けたステージIII、IV、再発NSCLC患者185名を対象として研究を実施した。性別、ECOG-PS、喫煙歴、ドライバー遺伝子変異の有無、組織型、臨床病期、腫瘍組織におけるPD-L1発現、ICIの種類、化学療法併用の有無、治療ラインなどの臨床情報を取得し、末梢血を用いてWBC、Plt、ALB、LDH、CRPを測定した。NETsの定量化はICI投薬前後の患者末梢血を採取し、遠心分離して血漿を確保した。ELISA法によって、ICI治療開始前後の“シトルリン化ヒストンH3(CitH3)”濃度をNETs代替マーカーとして測定した。

また、NETs放出に関連する因子の検索を目的として、98名の登録患者において、ICI投薬前の可溶性免疫メディエーター濃度を測定した。マルチプレックスアッセイにより、97種類の可溶性免疫メディエーター濃度を測定した。同様の目的で、98名の患者のPBMCを用いてRNAシーケンス解析も実行した。PBMCは、ICI投薬前の患者血液から密度勾配遠心分離によって分離し、Total RNA分離キットによりRNA抽出を行った。cDNAライブラリーの構築とRNAシーケンスは、SMART-Seq[®] v4 Ultra[®] Low Input RNAキット、NovaSeqシーケンスシステムを用いて解析し、FastQCでリード品質を確認し、GRCh38.v99を参照ゲノムとしてSalmon 1.1.0^[17]を使用して、転写産物

(Transcripts per Million: TPM) を計算した。 TPM データは、相関分析のために R Studio の「tximport」パッケージ (v1.22.0)^[18] を使用して遺伝子レベルまで解析した。

統計解析手法に関しては、Cox 比例ハザード回帰モデルによる単変量解析を実施し、Overall Survival(OS) / Progression-free Survival(PFS)と有意に関連する因子 ($p < 0.05$) を選択して、多変量解析によって予後に関連する因子を評価した。また、NETs 濃度の高/低値群間で OS / PFS 期間に有意差が生じるか Kaplan-Meier 生存曲線によって検討した。グループ間比較は Log-rank 検定にて実施し、 $P < 0.05$ を有意とした。一方、98 名の患者より検出した可溶性免疫メディエーターまたは PBMC の発現遺伝子濃度と NETs 濃度との相関関係を、Spearman の順位相関係数分析により評価した。相関係数(rs)と p 値は、cor および cor.test R 関数を使用して算出し、調整済み p 値は Benjamini-Hochberg 法を使用した FDR (False Discovery Rate) によって p.adjust R 関数を使用して算出した。FDR < 0.05 で相関係数 (rs) > 0.3 または < -0.3 の場合に相関有りとした。NETs 関連遺伝子経路の評価は、Metascape データベース^[19]を使用して、正の相関を示す遺伝子群 (rs > 0.3 、FDR < 0.05)を用いた Enrichment 解析を実施した。全ての統計は、IBM SPSS Statistics (version 19; IBM Corporation) および R programming language (ver. 4.1.3)を使用した。

結果

全 185 名の特徴を集計しカテゴリ分類した因子に関して、女性(n=44)、PS(n=66)、非喫煙者(n=33)、遺伝子変異を有する患者数(n=27)、扁平上皮癌の患者(n=55)、再発患者(n=48)、抗 PD-L1 抗体使用の患者(n=65)、化学療法併用の患者(n=63)が少数となる傾向にあった。

Cox 比例ハザード回帰モデルによる単変量解析では、PS、喫煙歴、PD-L1 発現レベル、化学療法併用の有無、治療ライン、ALB、LDH、CRP、NETs 濃度が OS と有意に関連すると示された（各々 $p=0.003$ 、 $p=0.033$ 、 $p=0.035$ 、 $p=0.019$ 、 $p=0.025$ 、 $p<0.001$ 、 $p=0.006$ 、 $p=0.024$ 、 $p<0.001$ ）。上記 9 因子で多変量解析を実行すると、PD-L1 発現レベル（ハザード比[HR] 0.589、95%信頼区間[CI] 0.351~0.975、 $p=0.039$ ）、ALB（HR 0.397、95%CI 0.224~0.705、 $p=0.002$ ）、NETs（HR 1.702、95%CI 1.356~2.137、 $p<0.001$ ）が OS と有意な関連性を示した。OS に対する治療前 NETs 濃度の影響を評価するため、Kaplan–Meier 生存曲線を作成し、NETs 濃度の中央値（7.04 ng/mL）を cut-off 値として 2 群に分けた場合、NETs<7.04 群で OS 延長が示された（ $p=0.002$ ）。Cox 比例ハザード回帰モデルによる単変量解析により、性別、喫煙歴、PD-L1 発現レベル、化学療法併用の有無、治療ライン、ALB、NETs 濃

度が PFS と有意に関連性が示された (各々、 $p=0.041$ 、 $p=0.020$ 、 $p=0.008$ 、 $p=0.015$ 、 $p=0.016$ 、 $p=0.007$ 、 $p<0.001$)。以上 7 因子を用いた多変量解析では、PD-L1 発現レベル (HR 0.539、95% CI 0.367~0.792、 $p=0.002$) および NETs 濃度 (HR 1.566、95% CI 1.323~1.855、 $p<0.001$) は PFS と有意な関連性を示した。PFS に対する治療前 NETs 濃度の影響を評価するため、Kaplan-Meier 生存曲線を作成し、NETs 濃度の中央値 (7.04 ng/mL) を cut-off 値として 2 群に分けた場合、NETs<7.04 群で PFS 延長が示された ($p<0.001$)。

性別、年齢、PS、喫煙歴、遺伝子変異、組織型、臨床病期、PD-L1 発現レベル、ICI の種類、化学療法併用の有無、治療ライン等の因子により層別したサブグループにおいて、治療前 NETs 濃度と予後との関連性を評価した。単変量解析にて全てサブグループ間で治療前 NETs 濃度が OS と関連性を示した。同様に、女性、喫煙歴なし、遺伝子変異陽性を除く全てのサブグループにおいて、治療前 NETs 濃度が PFS との関連性を示した。

NETs 放出に関連する因子の評価のため、98 名の患者において NETs 濃度と血漿中可溶性免疫メディエーター濃度との相関関係を Spearman の順位相関係数分析によって評価した。IL-6、LIGHT、IL-2Ra、IL-8、Pentraxin -3、IL-11、IL-16、IL-10、TSLP、IFN γ 、CXCL2 の 11 種において、有意な相関関係が示された ($rs=0.531$ 、 $rs=0.478$ 、 $rs=0.394$ 、 $rs=0.357$ 、 $rs=0.348$ 、

rs=0.342、rs=0.325、rs=0.307、rs=0.307、rs=0.301、rs=0.301)。また、NETs 濃度と PBMC の遺伝子発現量との相関関係も Spearman の順位相関係数分析によって評価した。NETs 濃度と正の相関関係を示す 189 の遺伝子群が検出され Enrichment 解析を実施すると、「好中球脱顆粒経路」が最も有意な経路として同定された。

考察

NETs は、がんの予後関連因子であるとの報告がある^[11-16]。腫瘍進行・転移、がん関連血栓症の発生に、NETs が影響することが理由とされるが、ICI を使用するがん患者における NETs の臨床的意義については、十分に検討されていない。本研究では、ICI 治療前の血漿 NETs 濃度が NSCLC 患者の OS / PFS に関連すると示し、血漿 NETs 濃度測定が NSCLC 患者の ICI 効果を予測するバイオマーカーとなる可能性を見出した。

近年、NETs のがん進行におけるメカニズムは多く報告されており、NETs 内に含まれる好中球顆粒分子が休眠状態のがん細胞を直接再活性化させる特性や、転移性ががん細胞が好中球から NETs 放出させ、がん細胞の浸潤と遊走を誘導するとされる^[26-30]。加えて、NETs は腫瘍微小環境内の免疫細胞を制御すると報告され、腫瘍由来 IL-8 が CXCR1/2 を介して NETs を放出し、NETs が

腫瘍細胞を被覆して免疫細胞の介入を妨害する機構や、IL-17 が好中球を刺激し NETs 放出を促して免疫細胞を排除するとされている。また、NETs に発現する PD-L1 が細胞傷害性 T 細胞を疲弊させるとも示されている^[20, 31-33]。以上から、NETs は免疫細胞に対して阻害的・抑制的に作用することで、ICI 治療抵抗性を来すと考えられる。

がん患者における NETs 放出のメカニズムとして、炎症性サイトカインによる好中球刺激が NETs 放出を促しているとの報告があり、血漿中 IL-6,-8 と NETs 濃度間に正の相関があることや、IL-1 β 、IL-6、IL-18、TNF- α に正の相関があるとの報告もある^[20-23, 36]。本研究では、ICI 治療前 NETs 濃度が IL-6,-8 濃度と正の相関があると示したが、IL-6,-8 は ICI 治療効果予測に有用と報告もあるため^[34-37]、IL-6, -8 が NETs 放出を促すことで ICI の治療効果に影響していると考えられる。また、PBMC の発現遺伝子解析により、ICI 治療前 NETs 濃度と NETs 形成の要因である好中球脱顆粒経路に相関関係が示され、がん患者の炎症環境自体が好中球を活性化し NETs 放出を促すことで、ICI 治療抵抗性をきたしている可能性もある。

本研究では、血漿 NETs 濃度と ICI 治療適応の NSCLC 患者における予後に正の相関が認められた。サブグループ解析においても、NETs 濃度の臨床的重要性は他の因子による影響を受けないことが実証されたため、我々の結果の信

頼性と妥当性を裏付けるものと考えられる。がん患者体内の炎症環境による好中球活性化が NETs 放出を誘発し、NSCLC 患者における ICI 治療抵抗性を来すと考えられ、NETs が ICI 治療の有効性を予測するマーカーになり得る可能性が示唆された。

引用文献

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 2021;71:209-49. doi: 10.3322/caac.21660.
2. Thai AA, Solomon BJ, Sequist LV, Gainor JF, Heist RS. Lung cancer. *Lancet* 2021;398:535-54. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00312-3.
3. Ettinger DS, Wood DE, Aisner DL, Akerley W, Bauman JR, Bharat A, et al. Non-Small Cell Lung Cancer, Version 3.2022, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2022;20:497-530. doi: 10.6004/jnccn.2022.0025.
4. Rizvi NA, Mazières J, Planchard D, Stinchcombe TE, Dy GK, Antonia SJ, et al. Activity and safety of nivolumab, an anti-PD-1 immune checkpoint inhibitor, for patients with advanced, refractory squamous non-small-cell lung cancer (CheckMate 063): a phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol* 2015;16:257-65. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70054-9.
5. Gettinger SN, Horn L, Gandhi L, Spigel DR, Antonia SJ, Rizvi NA, et al. Overall

- Survival and Long-Term Safety of Nivolumab (Anti-Programmed Death 1 Antibody, BMS-936558, ONO-4538) in Patients With Previously Treated Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* 2015;33:2004-12. doi: 10.1200/JCO.2014.58.3708.
6. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 2016;387:1540-50. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01281-7.
 7. Rittmeyer A, Barlesi F, Waterkamp D, Park K, Ciardiello F, von Pawel J, et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): a phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2017;389:255-65. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32517-X.
 8. Grant MJ, Herbst RS, Goldberg SB. Selecting the optimal immunotherapy regimen in driver-negative metastatic NSCLC. *Nat Rev Clin Oncol* 2021;18:625-44. doi: 10.1038/s41571-021-00520-1.
 9. Rebutuzzi SE, Prelaj A, Friedlaender A, Cortellini A, Addeo A, Genova C, et al. Prognostic scores including peripheral blood-derived inflammatory indices in patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors. *Crit Rev Oncol Hematol* 2022;179:103806. doi: 10.1016/j.critrevonc.2022.103806.
 10. Aloe C, Wang H, Vlahos R, Irving L, Steinfort D, Bozinovski S. Emerging and multifaceted role of neutrophils in lung cancer. *Transl Lung Cancer Res* 2021;10:2806-18. doi: 10.21037/tlcr-20-760.
 11. Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat*

- Rev Immunol 2018;18:134-47. doi: 10.1038/nri.2017.105.
12. Adrover JM, McDowell SAC, He XY, Quail DF, Egeblad M. NETworking with cancer: The bidirectional interplay between cancer and neutrophil extracellular traps. *Cancer Cell* 2023 doi: 10.1016/j.ccell.2023.02.001.
 13. Demkow U. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Cancer Invasion, Evasion and Metastasis. *Cancers (Basel)* 2021;13. doi: 10.3390/cancers13174495.
 14. Zhang Y, Guo L, Dai Q, Shang B, Xiao T, Di X, et al. A signature for pan-cancer prognosis based on neutrophil extracellular traps. *J Immunother Cancer* 2022;10. doi: 10.1136/jitc-2021-004210.
 15. Zhang Y, Hu Y, Ma C, Sun H, Wei X, Li M, et al. Diagnostic, Therapeutic Predictive, and Prognostic Value of Neutrophil Extracellular Traps in Patients With Gastric Adenocarcinoma. *Front Oncol* 2020;10:1036. doi: 10.3389/fonc.2020.01036.
 16. Masucci MT, Minopoli M, Del Vecchio S, Carriero MV. The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Tumor Progression and Metastasis. *Front Immunol* 2020;11:1749. doi: 10.3389/fimmu.2020.01749.
 17. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods* 2017;14:417-19. doi: 10.1038/nmeth.4197.
 18. Sonesson C, Love MI, Robinson MD. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Res* 2015;4:1521. doi: 10.12688/f1000research.7563.2.
 19. Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level

- datasets. *Nat Commun* 2019;10:1523. doi: 10.1038/s41467-019-09234-6.
20. Teijeira Á, Garasa S, Gato M, Alfaro C, Migueliz I, Cirella A, et al. CXCR1 and CXCR2 Chemokine Receptor Agonists Produced by Tumors Induce Neutrophil Extracellular Traps that Interfere with Immune Cytotoxicity. *Immunity* 2020;52:856-71 e8. doi: 10.1016/j.immuni.2020.03.001.
 21. de Andrea CE, Ochoa MC, Villalba-Esparza M, Teijeira Á, Schalper KA, Abengozar-Muela M, et al. Heterogenous presence of neutrophil extracellular traps in human solid tumours is partially dependent on IL-8. *J Pathol* 2021;255:190-201. doi: 10.1002/path.5753.
 22. Teijeira A, Garasa S, Ochoa MC, Villalba M, Olivera I, Cirella A, et al. IL8, Neutrophils, and NETs in a Collusion against Cancer Immunity and Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2021;27:2383-93. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-1319.
 23. Li B, Liu Y, Hu T, Zhang Y, Zhang C, Li T, et al. Neutrophil extracellular traps enhance procoagulant activity in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2019;145:1695-707. doi: 10.1007/s00432-019-02922-2.
 24. Thålin C, Lundström S, Seignez C, Daleskog M, Lundström A, Henriksson P, et al. Citrullinated histone H3 as a novel prognostic blood marker in patients with advanced cancer. *PLoS One* 2018;13:e0191231. doi:10.1371/journal.pone.0191231.
 25. Zhang L, Yi H, Chen J, Li H, Luo Y, Cheng T, et al. Neutrophil Extracellular Traps Facilitate A549 Cell Invasion and Migration in a Macrophage-Maintained Inflammatory Microenvironment. *Biomed Res Int* 2022;2022:8316525. doi: 10.1155/2022/8316525.
 26. Albregues J, Shields MA, Ng D, Park CG, Ambrico A, Poindexter ME, et al.

- Neutrophil extracellular traps produced during inflammation awaken dormant cancer cells in mice. *Science* 2018;361. doi: 10.1126/science.aao4227.
27. Park J, Wysocki RW, Amoozgar Z, Maiorino L, Fein MR, Jorns J, et al. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci Transl Med* 2016;8:361ra138. doi: 10.1126/scitranslmed.aag1711
 28. Xiao Y, Cong M, Li J, He D, Wu Q, Tian P, et al. Cathepsin C promotes breast cancer lung metastasis by modulating neutrophil infiltration and neutrophil extracellular trap formation. *Cancer Cell* 2021;39:423-37 e7. doi: 10.1016/j.ccell.2020.12.012.
 29. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, et al. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest* 2013;123:3446-58. doi: 10.1172/JCI67484.
 30. Yang L, Liu Q, Zhang X, Liu X, Zhou B, Chen J, et al. DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25. *Nature* 2020;583:133-38. doi: 10.1038/s41586-020-2394-6.
 31. Zhang Y, Chandra V, Riquelme Sanchez E, Dutta P, Quesada PR, Rakoski A, et al. Interleukin-17-induced neutrophil extracellular traps mediate resistance to checkpoint blockade in pancreatic cancer. *J Exp Med* 2020;217. doi: 10.1084/jem.20190354.
 32. Zhang H, Wang Y, Onuma A, He J, Wang H, Xia Y, et al. Neutrophils Extracellular Traps Inhibition Improves PD-1 Blockade Immunotherapy in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* 2021;13. doi: 10.3390/cancers13215333.
 33. K Kaltenmeier C, Yazdani HO, Morder K, Geller DA, Simmons RL, Tohme S. Neutrophil Extracellular Traps Promote T Cell Exhaustion in the Tumor

Microenvironment. *Front Immunol* 2021;12:785222. doi:

10.3389/fimmu.2021.785222.

34. Schalper KA, Carleton M, Zhou M, Chen T, Feng Y, Huang SP, et al. Elevated serum interleukin-8 is associated with enhanced intratumor neutrophils and reduced clinical benefit of immune-checkpoint inhibitors. *Nat Med* 2020;26:688-92. doi: 10.1038/s41591-020-0856-x.
35. Yuen KC, Liu LF, Gupta V, Madireddi S, Keerthivasan S, Li C, et al. High systemic and tumor-associated IL-8 correlates with reduced clinical benefit of PD-L1 blockade. *Nat Med* 2020;26:693-98. doi: 10.1038/s41591-020-0860-1.
36. Keegan A, Ricciuti B, Garden P, Cohen L, Nishihara R, Adeni A, et al. Plasma IL-6 changes correlate to PD-1 inhibitor responses in NSCLC. *J Immunother Cancer* 2020;8. doi: 10.1136/jitc-2020-000678.
37. Liu C, Yang L, Xu H, Zheng S, Wang Z, Wang S, et al. Systematic analysis of IL-6 as a predictive biomarker and desensitizer of immunotherapy responses in patients with non-small cell lung cancer. *BMC Med* 2022;20:187. doi: 10.1186/s12916-022-02356-7.