

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10415

研究課題名（和文）放射線治療により誘導されるPD-L1発現亢進機序の次世代シーケンサーを用いた解析

研究課題名（英文）Analysis of PD-L1 up-regulation mechanism induced by radiotherapy using a next-generation sequencer

研究代表者

真砂 勝泰（Masago, Katsuhiko）

愛知県がんセンター（研究所）・がん病態生理学分野・研究員

研究者番号：80338160

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：進行非小細胞肺癌の治療において、PD1-PD-L1経路の阻害が新たな治療選択肢の一つとなっているが、腫瘍形成における同経路の活性化の仕組みは未だ不明な点が多い。そこで、今回我々は、術前治療として放射線治療が行われた根治的手術症例において、放射線照射前及び照射後の腫瘍検体を用いて遺伝解析及び遺伝子発現解析を行うことで同経路に関わる因子の解析を行った。治療後の検体では、欠失変異・単塩基変異が増加し、発現解析では明らかな差は認められなかった。これらの結果から、再発時にも同様の解析を行うことにより、術前治療により影響を受けた残存腫瘍サブクローンの解析が重要な意義をもつ可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非小細胞肺癌の治療において、放射線治療は根治的及び対症療法的にも多く用いられる。しかし、同治療が腫瘍細胞に与える影響に関しては不明な点が多いとされていた。今回の結果から、放射線照射によるPD-L1の低下によって内因性の抗腫瘍免疫の増加が治療効果に寄与していることが推定された。また、放射線照射による腫瘍細胞遺伝子の遺伝子変異の増加によって、再発時の免疫チェックポイント阻害剤の潜在的な効果も予想される結果であった。

研究成果の概要（英文）：In the treatment of advanced non-small cell lung cancer, inhibition of the PD1-PD-L1 axis has become one of the novel treatment options, but the mechanism of activation of this pathway in tumorigenesis remains unclear. Therefore, in this study, we conducted a genetic analysis and gene expression analysis using pre-irradiation and post-irradiation tumor specimens in radical surgery cases where radiation therapy was performed as preoperative treatment, thereby determining the factors involved in this pathway. After radiotherapy, PD-L1 expression decreased by IHC and deletion mutations and single nucleotide mutations increased by genomic analysis. These results suggest that the genetic analysis of residual tumor subclones affected by preoperative treatment may also have important significance at the time of recurrence.

研究分野：がんゲノム解析

キーワード：次世代シーケンサー 放射線照射 非小細胞肺癌 腫瘍遺伝子変異量 PD-L1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

【非小細胞肺癌と免疫チェックポイント阻害薬について】

肺癌は癌死の原疾患としては最も多く、2014年には本邦で75396名が亡くなっている。肺癌は、組織型から腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌、小細胞癌の4つに分類され、他の3者と使用する抗がん剤や治療方針が大きく異なることから、上記のうち小細胞肺癌を除いた腺癌・扁平上皮癌・大細胞癌を非小細胞肺癌と呼ぶ。

各種癌に対する免疫療法は、1980年代後半のインターロイキン2の臨床応用以来、様々な方法で検討されてきたが、効果は限定的であった。しかし、2010年代に悪性黒色腫に対する抗細胞傷害性Tリンパ抗原4 cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4(CTLA4)抗体の有効性が報告され、2012年には非小細胞肺癌に対する抗programmed cell death 1(PD1)あるいはその受容体であるPDL1 ligand 1(PDL1)抗体の有効性が報告され、特にドライバー遺伝子変異を有さない非小細胞肺癌において有望な治療選択肢の一つと考えられるようになった。

【非小細胞肺癌におけるPD1-PDL1経路について】

癌免疫においては、リンパ節における樹状細胞によるTリンパ球への抗原提示とTリンパ球の活性化、腫瘍局所におけるTリンパ球による腫瘍細胞の除去、腫瘍細胞による免疫寛容の獲得という経過をとるため、最終的には腫瘍細胞は免疫システムの監視を逃れ増殖に至る。これまでの免疫療法の主体は、エフェクター細胞の活性化に主眼が置かれていたが、近年、免疫回避を誘導する免疫チェックポイントの一つであるPD1-PDL1による免疫寛容が、非小細胞肺癌における腫瘍増殖に大きく関与することが明らかになり、マウスモデルでは放射線照射が腫瘍細胞におけるPDL1の発現を亢進させる因子として報告された。

【免疫チェックポイント阻害薬の有効性の予測因子について】

当時、臨床試験の行われている免疫チェックポイント阻害剤として、抗PD1抗体であるニボルマブ、Pembrolizumab、抗PDL1抗体としてMEDI4736、MPDL3280Aがあった。第I/II相の臨床試験における奏効率は20%程度と報告されており、その効果予測因子として腫瘍細胞におけるPDL1の発現が有力視されていた。しかし、PDL1陰性例での有効例やPDL1強発現例での無効例はしばしば認められ、EGFR遺伝子変異症例に対する有効例が少ないなど、当初予想されていたPDL1誘導因子としてのEGFR遺伝子変異の機序とは逆の現象も観察されており、新たなバイオマーカーの探索、及びヒトの生体内におけるPD1・PDL1経路の亢進に至る分子生物学的な機序の解明が急務であると考えられていた。

【放射線療法とPD1/PDL1経路の活性化との関連】

マウスモデルにおいて、放射線照射は腫瘍細胞におけるPDL1の誘導因子として報告されており、実臨床におけるモデルケースとして、局所進行性の非小細胞肺癌症例における術前放射線化学療法を併用した手術治療が考えられた。同モデルケースでは、術前の生検組織と術後の放射線化学療法施行後の切除検体を比較することができるため、ヒトの生体内での腫瘍細胞に対する放射線照射のPD1・PDL1経路への機序を探索することが可能であった。そこで、該当の症例において、治療前後でのPDL1の免疫組織学的検査を施行することで、マウスモデルでの事象の検証が可能になると考えられ、放射線照射前後での腫瘍細胞の遺伝子解析により、放射線照射前後でのゲノムの変化及び遺伝子発現の変化をPDL1の発現変化と比較することで、腫瘍細胞におけるPD1・PDL1経路の活性化に至るヒト生体内での分子生物学的な機序が明らかになる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

背景にあるように、放射線治療により腫瘍細胞が獲得する遺伝子学的な変化を明らかにすることで、免疫チェックポイント阻害剤の治療に関する背景が明らかとなる可能性があり、進行期非小細胞肺癌の治療における大きな柱の一つとなることが予想される同薬剤の効果予測因子が明らかとなる点において本研究は意義のあるものと考えられた。そこで、今回、術前治療として放射線治療が行われた根治的手術症例において、放射線照射前及び照射後の腫瘍検体を用いて遺伝解析及び遺伝子発現解析を行うことで同経路に関わる因子の解析を行った。

3. 研究の方法

研究開始時は、研究期間を3年と予定していた。申請時に在籍していた先端医療センターにて術前に放射線療法が施行され、手術が行われた17症例を対象とした。術前及び術後の腫瘍検体を用い、PD-L1の免疫染色及び次世代シーケンサーを用いた遺伝子及び発現解析を施行した。

4. 研究成果

研究期間は2016年4月からの3年間を予定していたが、先端医療センターの閉鎖により研究機関の遅れが生じ、4年間を要した。SP142及びSp28-8クローンを用いたPD-L1の免疫染色により、PD-L1の発現は、術前に比し有意に低下を認めた(図1)。また、術前のPD-L1の発現が高い症例において、無再発生存期間が有意に延長する結果であり、これらの成果は、Oncology誌に

術論文として発表した (Masago K Anticancer Research 2017)。この際に用いた PD-L1 の免疫染色に用いた抗体のクローン間の差異についても併せて検討することが可能であった (Hata A, Masago K Oncotarget 2017)。

術前の生検検体の腫瘍量の問題、及びホルマリン固定パラフィン包埋の問題から、次世代シーケンサーを用いたエキソーム解析及びトランスクリプトーム解析のうち、in-silico の解析が可能であった症例は、5 症例であった。特に、術後の検体は壊死組織が多く、DNA の断片化も進んでおり、実際に解析を試みたものの、解析に耐えられる十分なリード数を得ることは困難であった。遺伝子解析の結果、治療後の検体において遺伝子変異量の有意な増加が認められ、おおよそ 1/3 が欠失変異で 2/3 は点突然変異であった。これらの結果は、研究協力者である藤田博士の解析結果と同様の結果であった (Fujita S, Masago K The British Institute of Radiology 2019)。トランスクリプトーム解析では、アクアポリン 5 の上昇を認めたが、シーケンスの質は高くないことから確定的な結論には至らなかった。また、解析の段階

で、Ion Proton System 固有の読み取りエラーであるホモポリマー領域の読み取りエラーの詳細を検討することにより、call される遺伝子変異の結果の精度を上昇させる方法も検証することが可能となった (Fujita S, Masago K Biomedical Reports 2017)。

これらの結果から、放射線治療により、PD-L1 が低下することが観察され、放射線治療により免疫チェックポイントの阻害が間接的に誘導されている可能性が示唆され、治療前の PD-L1 の高い症例において、residual tumor の除去に寄与している可能性が示唆され、無増悪生存期間の延長という結果に反映されていたものと推測された。また、放射線照射による腫瘍変異量 (tumor mutation burden : TMB) が増加していたことにより、再発時の遺伝子プロファイルが一致しているものと仮定すると、再発時の免疫チェックポイント阻害剤の効果及び術後補助療法としての免疫チェックポイント阻害剤の使用の有用性が示唆される結果であった。

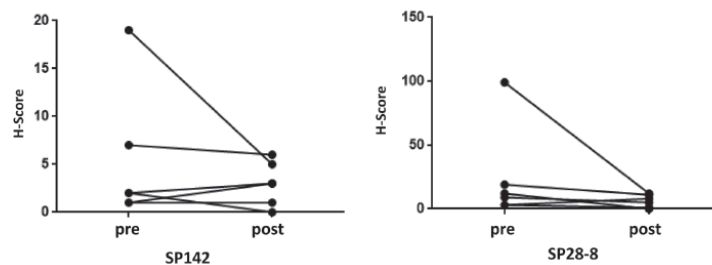


図 1 . 放射線照射により PD-L1 の発現は有意に低下した。

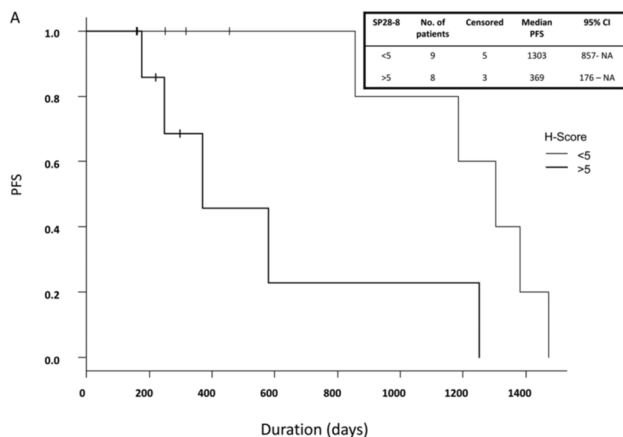


図 2 . 術前の PD-L1 の高い症例は、無増悪生存期間が長い傾向であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shiro Fujita, Katsuhiko Masago, Yasushi Yatabe	4. 巻 1
2. 論文標題 Biopsy of palliative lesions following radiotherapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The British Institute of Radiology	6. 最初と最後の頁 1,6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1259/bjro.20180025	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujita Shiro, Masago Katsuhiko, Okuda Chiyuki, Hata Akito, Kaji Reiko, Katakami Nobuyuki, Hirata Yukio	4. 巻 7
2. 論文標題 Single nucleotide variant sequencing errors in whole exome sequencing using the Ion Proton System	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 17~20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2017.911	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hata Akito, Katakami Nobuyuki, Nanjo Shigeki, Okuda Chiyuki, Kaji Reiko, Masago Katsuhiko, Fujita Shiro, Yoshida Hiroshi, Zama Kota, Imai Yukihiko, Hirata Yukio	4. 巻 111
2. 論文標題 Programmed death-ligand 1 expression and T790M status in EGFR -mutant non-small cell lung cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 182~189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lungcan.2017.07.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masago Katsuhiko, Fujita Shiro, Hata Akito, Okuda Chiyuki, Yoshizumi Yuko, Kaji Reiko, Katakami Nobuyuki, Hirata Yukio, Yatabe Yasushi	4. 巻 68
2. 論文標題 Validation of the digital PCR system in tyrosine kinase inhibitor-resistant EGFR mutant non-small-cell lung cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 167~173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12630	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katsuhiko Masago, Shiro Fujita, Akito Hata, Chiyuki Okuda, Reiko Kaji, Nobuyuki Katakami, Yukio Hirata	4. 巻 37
2. 論文標題 PD-L1 Expression in Patients with Non-small Cell Lung Cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2269 ~ 2274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.11564	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akito Hata, Nobuyuki Katakami, Shigeki Nanjo, Chiyuki Okuda, Reiko Kaji, Katsuhiko Masago, Shiro Fujita, Hiroshi Yoshida, Kota Zama, Yukihiko Imai, Yukio Hirata	4. 巻 8
2. 論文標題 Programmed Death-Ligand 1 Expression According to Epidermal Growth Factor Receptor Mutation Status in Pretreated Non-Small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 113807 ~ 113816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.22837	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Katsuhiko Masago, Yoshitsugu Horio, Shiro Fujita, Yasushi Yatabe	4. 巻 Dec;8
2. 論文標題 Minimal Residual Disease After Radical Surgery in EGFR-mutant Non-Small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transl Lung Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 S391 ~ S394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tlcr.2019.09.09	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mikubo M, Seto K, Kitamura A, Nakaguro M, Hattori Y, Maeda N, Miyazaki T, Watanabe K, Murakami H, Tsukamoto T, Yamada T, Fujita S, Masago K, Ramkissoon S, Ross JS, Elvin J, Yatabe Y	4. 巻 15
2. 論文標題 Calculating the Tumor Nuclei Content for Comprehensive Cancer Panel Testing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Thorac Oncol	6. 最初と最後の頁 130 ~ 137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jtho.2019.09.081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 真砂 勝泰, 瀬戸 克年, 北村 淳子, 中黒 匡人, 服部 行紀, 前田 永子, 宮崎 龍彦, 渡邊 和子, 村上 秀樹, 塚本 徹哉, 山田 鉄也, 藤田 史郎, 谷田部 恭
2. 発表標題 がんパネルシーケンスにおける病理所見と遺伝子変異頻度から判定した腫瘍細胞核含有量の比較
3. 学会等名 肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 藤田 史郎, 真砂 勝泰, 羽根田 正隆, 堀尾 芳嗣, 樋田 豊明, 黒田 浩章, 谷田部 恭
2. 発表標題 生検スタンプ標本からのRNA遺伝子パネル解析
3. 学会等名 肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----