

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10776

研究課題名(和文) 神経膠腫における免疫逃避機序と遺伝子変異・予後との関係の解明

研究課題名(英文) Assessment of immune resistant mechanism in malignant glioma

研究代表者

大野 誠 (Ohno, Makoto)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医師

研究者番号：70598648

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)：悪性神経膠腫における免疫逃避機構を明らかにするために、臨床検体を用いてPD-L1 (Programmed cell death ligand -1)発現およびリンパ球、マクロファージの腫瘍組織内浸潤を評価した。PD-L1発現例は21.1%で、PD-L1発現とリンパ球浸潤の相関を認めた。PD-L1発現と免疫細胞浸潤有無により分類するとPD-L1陽性で免疫細胞浸潤を認める例は22.7%、PD-L1陰性で免疫細胞浸潤を認める例は45.5%を占めることが明らかとなり、それぞれの群における免疫逃避機序の違いを考慮した治療開発が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義として悪性神経膠腫におけるPD-L1発現、腫瘍内浸潤リンパ球、マクロファージ、悪性神経膠腫の遺伝子変異との関係を検討し、悪性神経膠腫をPD-L1発現と免疫細胞浸潤有無により分類し、その割合と予後を明らかにしたことが挙げられる。PD-L1発現と免疫細胞浸潤有無により異なる免疫逃避機序を理解することで、悪性神経膠腫における免疫逃避機序を標的とした治療開発の基盤となり治療効果を予測するバイオマーカーの同定に寄与できることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed PD-L1 (Programmed cell death ligand -1) and various tumor infiltrating lymphocytes (CD4+, CD8+) and macrophages (CD68+, CD204+) immunohistochemically in 71 samples of patients with newly diagnosed malignant glioma. PD-L1 expression was observed in 21.1% of 71 samples. CD4+ and CD8+ cells were significantly associated with PD-L1 expression but not with IDH (isocitrate dehydrogenase) 1/2 mutation status and MGMT (O-6-methylguanine DNA methyltransferase) promoter methylation status. Among 44 patients with glioblastoma, IDH-wildtype, PD-L1+/immune cell+ group consisted of 10 cases (22.7%), whose median overall survival (MST) was 21.3 months. PD-L1-/immune cell+ group consisted of 20 cases (45.5%), and the MST was 12.5 months, which was shorter than that of PD-L1+/immune cell+ group. This study might contribute to develop new therapeutic approaches according to the different immune resistant mechanism.

研究分野：脳神経外科

キーワード：悪性神経膠腫 免疫逃避機序 PD-L1 リンパ球 マクロファージ MGMT IDH1/2

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は最も頻度の高い悪性脳腫瘍であり、特に膠芽腫 (Glioblastoma, GBM)は標準治療である放射線治療併用テモゾロミド療法を行っても生存期間中央値は 1.5-2 年と極めて予後不良な疾患である¹。2005 年のテモゾロミド登場以降様々な抗がん剤や分子標的薬を用いた治療開発が試みられたが、いずれも放射線併用テモゾロミド療法と比較して生存期間の延長効果は得られておらず^{2,3}、新たな治療手段の開発が必要である。

悪性神経膠腫においても PD-L1 (Programmed cell death ligand -1)の発現等を介した免疫逃避機序が存在することから、チェックポイント阻害剤等の免疫逃避機構を標的とした治療開発が期待され、初発および再発膠芽腫を対象に抗 PD-1 (Programmed cell death-1)抗体を用いた臨床試験が開始された⁴。

しかし、細胞障害性 T 細胞やヘルパー T 細胞の機能は PD-1 以外にも多数のチェックポイント分子によって制御されていること⁵や、癌種によって微小環境が異なることから、悪性神経膠腫において抗 PD-1 抗体により悪性黒色腫や非小細胞肺癌と同様の治療効果が得られるかどうかは不明であった。また悪性神経膠腫においては腫瘍組織内への T 細胞の浸潤が少ないことも報告されており⁵、他の癌種とは異なる悪性神経膠腫特有の免疫逃避機序が存在する可能性もある。また PD-L1 発現と腫瘍組織内浸潤リンパ球やマクロファージの関係も明らかではなかった⁶。

2. 研究の目的

本研究は悪性神経膠腫組織中に発現する PD-L1 分子の発現、腫瘍組織内リンパ球、マクロファージの浸潤を解析し、悪性神経膠腫の遺伝子異常や予後との関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 組織サンプル

解析には 1996 年 10 月から 2012 年 4 月までに当院で治療を行なった 100 例の悪性神経膠腫を用いて作成した組織マイクロアレイを用いた。5 サンプルは免疫染色不良のため解析から除外し、残りの 95 例中初回手術サンプルである 71 例を解析対象とした。

(2) 免疫組織化学

PD-L1 は抗 PD-1 抗体 (Cell Signaling, E1L3N, 1:200) を用いて免疫組織化学染色を行い細胞膜もしくは細胞質が染色されるものを陽性と判断した。リンパ球は抗 CD-4 抗体 (Leica, 1:50)、抗 CD-8 抗体 (Leica, 1:50)、マクロファージは抗 CD-68 抗体 (Dako, 1:400)、抗 CD-204 抗体 (TransGenic, 1:200) を用いて免疫組織化学染色を行い、画像解析ソフト (Patholoscope (三谷商事)) を用いて陽性細胞を定量評価した。

(3) 遺伝子変異解析

IDH (isocitrate dehydrogenase)1/2 遺伝子変異および *MGMT* (O-6-methylguanine DNA methyltransferase) プロモーター領域のメチル化は pyrosequencing を用いて検討し、*MGMT* プロモーター領域のメチル化は 16% を cutoff 値とし hypermethylation, hypomethylation の分類を行なった。

(4) 統計解析

全生存期間は初回手術日から死亡までの期間とした。無増悪生存期間は初回手術日から死亡もしくは再発までの期間とした。全生存期間および無増悪生存期間は Kaplan-Meier 法を用いて算出し log-rank テストを用い 2 群比較を行なった。リンパ球数およびマクロファージ数は CD4, CD8, CD68, CD204 陽性細胞の中央値を cutoff とし高・低浸潤に分類した。

4. 研究成果

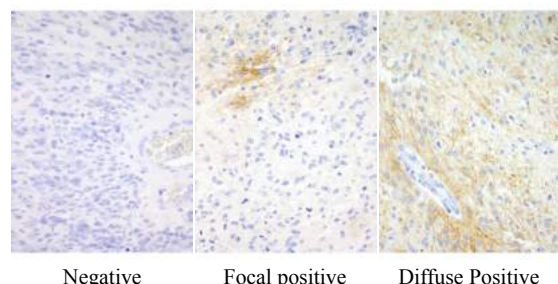
(1) 患者背景

症例は男性 31 例 (43.7%)、女性 40 例 (56.3%)、年齢中央値 64 歳 (29-86 歳)、診断は Glioblastoma, *IDH*-wildtype 44 例、Glioblastoma, *IDH*-mutant 4 例、Glioblastoma, NOS (not otherwise specified) 20 例、Anaplastic astrocytoma, NOS 1 例、Anaplastic oligodendroglioma, *IDH*-mutant and 1p/19q codeleted 2 例であった。MGMT プロモーター領域のメチル化の hypermethylation は 20 例 (28.2%)、hypomethylation は 35 例 (49.3%) であった。

(2) PD-L1 発現と *IDH1/2* 遺伝子変異、MGMT プロモーター領域のメチル化との関係

PD-L1 の免疫組織化学染色では細胞膜または細胞質が染色されないもの (Negative)、細胞膜または細胞質が染色され組織中の一部に陽性細胞が見られるもの (Focal positive)、広い範囲に陽性細胞が見られるもの (Diffuse positive) が見られた (図 1)。Focal positive と Diffuse positive を PD-L1 発現陽性とし、Negative を PD-L1 発現陰性とする。PD-L1 発現陽性は 15 例 (21.1%)、PD-L1 発現陰性は 56 例 (78.9%) であった。PD-L1 発現と *IDH1/2* 遺伝子変異、MGMT プロモーター領域のメチル化との相関関係は明らかではなかった。

図 1



Negative

Focal positive

Diffuse Positive

(3) リンパ球、マクロファージの定量化と PD-L1 発現、IDH1/2 遺伝子変異、MGMT プロモーター領域のメチル化との関係

CD4, CD8, CD68, CD204 陽性細胞数の 1mm²あたりの中央値はそれぞれ、7.3, 8.6, 196.4, 353.2 であった (図 2, 表 1)。PD-L1 陽性例 (15 例) では CD4, CD8 陽性細胞数中央値が 1mm²あたり 24.5 個、19.8 個であったのに対し PD-L1 陰性例 (56 例) では 5.3 個、6.3 個と PD-L1 陽性例で CD4, CD8 陽性リンパ球の浸潤が有意に増加していた (p= 0.026, 0.011)。CD68 と CD204 陽性細胞数中央値は PD-L1 陽性例が 263.9, 512.6、PD-L1 陰性例が 165.7 個、332.7 個で PD-L1 陽性例で増加していたが有意差は認めなかった (p=0.056, p=0.19)。

一方 IDH1/2 遺伝子変異と CD4, CD8, CD68 陽性細胞数との有意な関係は認めなかった (p=0.24, 0.30, 0.15) が、CD204 陽性細胞数は IDH-WT で有意に増加していた (p=0.0069)。MGMT プロモーター領域のメチル化状態と CD4, CD8, CD68, CD204 陽性細胞数との有意な関係は認めなかった (p=0.67, 0.30, 0.97, 0.44) (表 1)。

図2

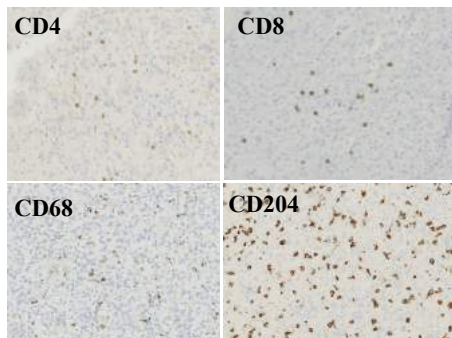


表1

	All		PD-L1		IDH1/2 status		MGMT status			
		Negative (N=56)	Positive (N=15)	p value	Mutant (N=6)	Wildtype (N=44)	p value	Hyper (N=20)	Hypo (N=35)	p value
CD4+	7.3 (0-393.5)	5.3 (0-393.5)	24.5 (0-352.5)	0.026*	2.0 (0.7-68.1)	11.2 (0-393.5)	0.24	4.3 (0-393.5)	11.2 (0-192.5)	0.67
CD8+	8.6 (0-111.8)	6.3 (0-111.8)	19.8 (1.3-111.8)	0.011*	4.0 (0-49.6)	9.9 (0-111.8)	0.30	8.6 (0-62.2)	10.6 (0-111.8)	0.30
CD68+	196.4 (4.0-1258.6)	165.7 (4.0-1258.6)	263.9 (51.6-957)	0.056	78 (25.1-492.1)	187.8 (4-1258.6)	0.15	197.5 (51.6-1037.7)	176.6 (4-1258.6)	0.97
CD204+	353.2 (24.5-1545.0)	332.7 (24.5-1545)	512.6 (29.8-1415.3)	0.19	99.6 (29.8-484.8)	508.9 (25.8-1545)	0.0069*	399.9 (29.8-1415.3)	392.2 (25.8-1545)	0.44

(4) PD-L1 発現、リンパ球、マクロファージ浸潤と GBM, IDH-WT の予後の関係

GBM, IDH-WT 44 例を対象として PD-L1 発現、リンパ球、マクロファージ浸潤と予後の関係を検討した。PD-L1 陽性例 (N=12) の全生存期間中央値 (median survival time: MST), および無増悪生存期間中央値 (median progression free survival: mPFS) は 19.2 ヶ月、9.6 ヶ月で PD-L1 陰性例 (N=32) の MST は 14.9 ヶ月、mPFS は 8.1 ヶ月で両群において有意差を認めなかった (p=0.39, 0.380)。同様に、CD4, CD8, CD68, CD204 の高浸潤例と低浸潤例で MST, mPFS を比較したところいずれも両群における有意差を認めなかった。

(5) PD-L1 発現と免疫担当細胞浸潤に基づく 4 群分類と GBM, IDH-WT の予後の関係

Glioblastoma, IDH-wildtype 44 例を対象として、CD4, CD8, CD68, CD204 陽性細胞がいずれも低浸潤であるものを免疫細胞浸潤なし、いずれか一つでも高浸潤であるものを免疫細胞浸潤ありとし、PD-L1 発現有無で 4 群に分類し予後の関係を検討した。PD-L1 陽性/免疫細胞浸潤あり群は 10 例 (22.7%)、PD-L1 陽性/免疫細胞浸潤なし群は 2 例 (4.5%)、PD-L1 陰性/免疫細胞浸潤あり群は 20 例 (45.5%)、PD-L1 陰性/免疫細胞浸潤なし群は 12 例 (27.3%) であった (表 2)。MST は PD-L1 陽性/免疫細胞浸潤あり群は 21.3 ヶ月、PD-L1 陽性/免疫細胞浸潤なし群は 11.5 ヶ月、PD-L1 陰性/免疫細胞浸潤あり群は 12.5 ヶ月、PD-L1 陰性/免疫細胞浸潤なし群は 19.1 ヶ月で、PD-L1 陽性/免疫細胞浸潤あり群は PD-L1 陰性/免疫細胞浸潤あり群と比較して MST が有意に延長していた (p=0.022) (図 3A, 表 3)。mPFS は PD-L1 陽性/免疫細胞浸潤あり群は 13.1 ヶ月、PD-L1 陽性/免疫細胞浸潤なし群は 4.6 ヶ月、PD-L1 陰性/免疫細胞浸潤あり群は 18.1 ヶ月、PD-L1 陰性/免疫細胞浸潤なし群は 12.5 ヶ月であった (図 3B, 表 3)。

表2

	Immune cell+	Immune cell-
PD-L1+	10 (22.7%)	2 (4.5%)
PD-L1-	20 (45.5%)	12 (27.3%)

表3

	Median progression free survival (months)	Median survival time (months)
PD-L1+, Immune cell+ (N=10)	13.1	21.3
PD-L1-, Immune cell- (N=12)	12.5	19.1
PD-L1+, Immune cell- (N=2)	4.6	11.5
PD-L1-, Immune cell+ (N=20)	8.1	12.5

図3A

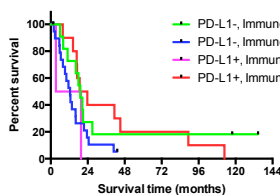
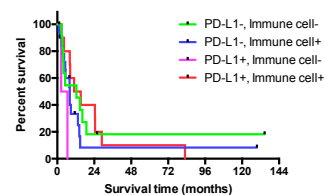


図3B



考察

本研究結果からは以下の 4 点について考察を行った。

(1) 本研究では 71 例の初発悪性神経

膠腫の 21.1% に PD-L1 の発現を認めた。過去の報告では、悪性神経膠腫における PD-L1 の発現は 6.1-84.6% とばらつきがあり、これは使用する抗 PD-L1 抗体や陽性の判定基準の違いに影響されるとされている⁶。Lee らは本研究と同じ抗 PD-L1 抗体を使用し、115 例の初発膠芽腫 32.2% で

PD-L1 陽性であったと報告しており⁷、我々の 21.1%とほぼ同程度の陽性割合と考えられた。本研究では PD-L1 発現と *IDH1/2* 遺伝子変異、*MGMT* プロモーター領域のメチル化には明らかな相関関係は認めなかった。過去の報告では *IDH1/2* 遺伝子変異例において PD-L1 発現が少ない⁸とされており本研究とは異なる結果であった。しかし本研究では *IDH1/2* 遺伝子変異例が 6 例と少なく、多くの症例数を検討すると結果が異なる可能性も考えられた。Lee らは *MGMT* プロモーター領域のメチル化と PD-L1 発現を検討し、メチル化例での PD-L1 陽性割合が 26.1%、非メチル化例での PD-L1 陽性割合が 32.7%で *MGMT* プロモーター領域のメチル化と PD-L1 発現の明らかな相関はなかったとしており⁷、本研究と同様の結果であった。

(2) 本研究では PD-L1 発現例において CD4、CD8 陽性細胞が有意に多くみられた。PD-L1 は腫瘍に浸潤した免疫担当細胞が産生する IFN- γ などのケモカインやサイトカインにより誘導されるため⁶、PD-L1 陽性細胞と CD4、CD8 陽性細胞が相関すると考えられた。Lee らは PD-L1 陽性例において PD-L1 陰性例と比較し CD3 陽性 T 細胞浸潤が有意に多かったことを報告しており⁷ 本研究結果を支持するものと考えられた。一方、*IDH1/2* 遺伝子変異、*MGMT* プロモーター領域のメチル化と CD4、CD8 陽性細胞との関係は認めず、これらの遺伝子変異と T 細胞浸潤との相関は明らかではなかった。

(3) 44 例の glioblastoma, *IDH*-wildtype において PD-L1 陽性群と陰性群で PFS、OS との相関を認めなかった。悪性神経膠腫において PD-L1 発現と予後の関係は PD-L1 発現例は予後が不良であるという報告と、PD-L1 発現と予後は相関しないという報告がなされており、議論の分かれるところである⁶。また CD4、CD8、CD68、CD204 陽性細胞浸潤と PFS、OS との相関を認めなかった。これらの結果からは悪性神経膠腫における抗腫瘍免疫は PD-L1、CD4、CD8、CD68、CD204 などの因子が複雑に関与しているため単一の因子のみでは予後の差が認められないと考えられた。

(4) Teng らは PD-L1 発現と腫瘍内リンパ球浸潤の有無で腫瘍を 4 群に分けてそれぞれの群において免疫回避機序が異なり、それぞれの群において異なる治療戦略が考えられるとしている。PD-L1 発現あり/リンパ球浸潤あり群を type I としこの群においては PD-L1 発現により T 細胞機能が抑制されており抗 PD-1/L1 抗体薬がもっとも期待できる群としている。PD-L1 発現なし/リンパ球浸潤なし群は type II とされ、この群ではリンパ球浸潤を促し浸潤リンパ球の不活化を回避する戦略が必要で、抗 CTLA-4 抗体薬と抗 PD-1 抗体薬の組み合わせが提案されている。PD-L1 発現あり/リンパ球浸潤なし群は type III とされ、抗 PD-1 抗体薬単独での効果は少なく放射線治療を併用することでリンパ球浸潤を促すことが提案されている。PD-L1 発現なし/リンパ球浸潤あり群は type IV とされ、この群においては抑制性マクロファージなど PD-L1 とは異なる免疫回避機序が存在しているとされている⁹。本研究では glioblastoma, *IDH*-wildtype において、type I は 22.7%、type II が 27.3%、type III が 4.5%、type IV が 45.5%であった。悪性黒色腫では type I が 38%、type II が 41%、type III が 1%、type IV が 20%と報告されており⁹、悪性黒色腫と比較して glioblastoma, *IDH*-wildtype では type II が少なく、type IV が多い傾向が見られた。

本研究では PD-L1 発現あり/免疫細胞浸潤あり群は PD-L1 発現なし/免疫細胞浸潤あり群と比較して OS の延長が見られたが (21.3 ヶ月 vs 12.5 ヶ月, $p=0.022$)、リンパ球抑制機序の違いによる不活性化程度の違いに起因する可能性を考えている。

結語

悪性神経膠腫における PD-L1 発現やおよびリンパ球、マクロファージなどの免疫細胞浸潤を評価することで免疫回避機序を理解し効果的な治療開発につながると考えられる。

参考文献

1. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*. 2005;352(10):987-996.
2. Chinot OL, Wick W, Mason W, et al. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014;370(8):709-722.
3. Gilbert MR, Dignam JJ, Armstrong TS, et al. A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N Engl J Med*. 2014;370(8):699-708.
4. Reardon DA, Brandes AA, Omuro A, et al. Effect of Nivolumab vs Bevacizumab in Patients With Recurrent Glioblastoma: The CheckMate 143 Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2020.
5. Jackson CM, Choi J, Lim M. Mechanisms of immunotherapy resistance: lessons from glioblastoma. *Nat Immunol*. 2019;20(9):1100-1109.
6. Chen RQ, Liu F, Qiu XY, Chen XQ. The Prognostic and Therapeutic Value of PD-L1 in Glioma. *Front Pharmacol*. 2018;9:1503.
7. Lee KS, Lee K, Yun S, et al. Prognostic relevance of programmed cell death ligand 1 expression in glioblastoma. *J Neurooncol*. 2018;136(3):453-461.
8. Berghoff AS, Kiesel B, Widhalm G, et al. Correlation of immune phenotype with IDH mutation in diffuse glioma. *Neuro Oncol*. 2017;19(11):1460-1468.
9. Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大野 誠、里見 介史、北野 滋久、吉田 朗彦、宮北 康二、高橋雅道、三木俊一郎、松下 裕子、市村 幸一、成田 善孝
2. 発表標題 悪性神経膠腫におけるPD-L1の発現とリンパ球浸潤の検討
3. 学会等名 第35回日本脳腫瘍病理学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大野 誠、里見 介史、北野 滋久、宮北 康二、高橋雅道、三木俊一郎、松下 裕子、市村 幸一、成田 善孝
2. 発表標題 悪性神経膠腫におけるProgrammed cell death ligand 1 (PD-L1)発現と腫瘍浸潤リンパ球サブタイプの関連
3. 学会等名 第15回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大野 誠	4. 発行年 2016年
2. 出版社 日本臨床社	5. 総ページ数 780 (689-694)
3. 書名 脳腫瘍学 基礎研究と臨床研究の進歩	

〔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
研究分担者	北野 滋久 (Kitano Shigehisa) (60402682)	国立研究開発法人国立がん研究センター・早期・探索臨床研究センター・医員 (82606)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	吉田 朗彦 (Yoshida Akihiko) (80574780)	国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医員 (82606)	
研究 分 担 者	里見 介史 (Satomi Kaishi) (10633977)	国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医員 (82606)	