

令和 5 年 10 月 26 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07399

研究課題名（和文）構造異常とスプライシング異常に着目したPD-L1/PD-L2の分子病理学的判定法

研究課題名（英文）Molecular pathology evaluation method of PD-L1/PD-L2 focusing on structural and splicing abnormalities

研究代表者

坂田 征士（SAKATA, Seiji）

公益財団法人がん研究会・がん研究所 分子標的病理プロジェクト・研究員

研究者番号：00617433

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：PD-L1高発現リンパ腫検体のターゲットキャプチャーシーケンスのデータと、それらの免疫染色によるPD-L1発現パターンおよびFISH所見を詳細に検討した。ターゲットキャプチャーシーケンスでPD-L1ゲノム構造異常が検出された検体は、FISHでも高率に異常なシグナルパターンが確認された。免疫染色でPD-L1の異常な発現パターンを示す検体では、ほぼ全てにPD-L1ゲノム構造異常が認められた。免疫染色とFISHの結果を組み合わせることで、PD-L1ゲノム構造異常を高率に検出できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム構造異常に伴うPD-L1遺伝子の3'非翻訳領域の変異の検索には、一般的にターゲットキャプチャーシーケンスでの検索が必要となるが、経験やスキルが必要で費用が高く、利用可能な機関に限られる。免疫染色およびFISHはより簡便に行うことができ、検体量の少ない場合でも検索可能なため、ゲノム構造異常に伴うPD-L1遺伝子の3'非翻訳領域の変異の検索に免疫染色とFISHが有用であったことは社会的に意義がある。

研究成果の概要（英文）：Targeted capture sequencing data of lymphoma specimens with high PD-L1 expression, their PD-L1 expression patterns by immunohistochemistry, and FISH findings were examined in detail. Samples in which PD-L1 genomic structural abnormalities were detected by targeted capture sequencing had a high rate of abnormal signal patterns by FISH. Almost all of the specimens that showed an abnormal expression pattern of PD-L1 by immunohistochemistry showed PD-L1 genomic structural abnormalities. Combined search of immunohistochemistry and FISH results showed a high detection rate of PD-L1 genomic structural aberrations.

研究分野：人体病理学

キーワード：バイオマーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

T 細胞を介したシグナル伝達は活性化および抑制性免疫チェックポイント分子により制御され、免疫応答が調節されている。B7 ファミリーは免疫チェックポイント分子の一つで、受容体である programmed cell death-1 (PD-1) とそのリガンドである programmed cell death-ligand 1 (PD-L1、別名 B7-H1)、programmed cell death-ligand 2 (PD-L2、別名 B7-DC) が代表的なものとして知られており、PD-1 と PD-L1、PD-L2 が結合することで免疫応答を負に調節している。2002 年に PD-L1 を発現しているがん細胞が免疫機構を回避し、さらに PD-1 と PD-L1 の結合を阻害することで腫瘍免疫が活性化し抗腫瘍効果を示すことが報告された。様々な固形癌で PD-L1 の発現が上昇していることが明らかになり、2010 年に臨床試験によって治療不応性固形癌に対する抗 PD-1 抗体薬の治療効果が示された。2014 年に悪性黒色腫に対し抗 PD-1 抗体薬が承認され、現在までに抗 PD-1 抗体と抗 PD-L1 抗体が様々ながん腫で適応拡大されている。

数種の免疫チェックポイント阻害薬が様々ながん種で臨床応用されているが、治療効果の高い症例に対し適切に行うための有効な治療効果マーカーやその診断法は確立されていない。リンパ腫では、コピー数の増幅が PD-L1 高発現をきたすことが知られている。コピー数の増幅が高頻度に見られるホジキンリンパ腫では、抗 PD-1 抗体が著効することが示されており、免疫チェックポイント分子自体の遺伝子異常が治療効果マーカーとなることが考えられている。近年、ゲノム構造異常に伴う *PD-L1* 遺伝子の 3' 非翻訳領域の変異が PD-L1 の高発現のメカニズムの一つとして明らかにされ、その異常はバイオマーカーとして期待されている。リンパ腫では、*PD-L1* 遺伝子や *PD-L2* 遺伝子を含む 9p24 領域の異常が、節外性 NK/T 細胞性リンパ腫を含む EBV 関連のリンパ腫に多くみられることが報告されている。そして、再発・治療抵抗性 NK/T 細胞性リンパ腫に対する抗 PD-1 抗体薬治療の報告では、7 例中 7 例で奏効したことが示されている。固形癌においても、*PD-L1* 遺伝子や *PD-L2* 遺伝子を含む 9p24 領域のコピー数増幅 9 例中 6 例 (66.7%) と、3' 非翻訳領域の変異例 1 例に治療効果が見られたことが報告されている。ゲノム構造異常の他、数種の分泌型 PD-L1 スプライシングバリエントが報告されている。In vivo において、分泌型 PD-L1 スプライシングバリエントが抗 PD-L1 抗体薬と競合し治療効果を減弱し、T 細胞の再活性化を抑制することが示されており、それらも治療効果に関与している可能性がある。

## 2. 研究の目的

腫瘍細胞における免疫チェックポイント分子の①発現上昇をきたす遺伝子構造異常、②スプライシング異常の検出法を確立し、臨床応用する、ことである。

## 3. 研究の方法

非ホジキンリンパ腫 (NHL) およびホジキンリンパ腫 (HL) を合わせた約 1,000 検体のリンパ腫サンプルを対象とし、免疫染色により PD-L1 高発現検体を抽出した。PD-L1 高発現検体にターゲットキャプチャーシーケンスを用いて *PD-L1* 遺伝子のゲノム構造異常を検索し、そのデータを基に、免疫染色および *PD-L1* 遺伝子領域の fluorescence in situ hybridization (FISH) を詳細に検討した。*PD-L1* ゲノム構造異常には、転座、欠失、タンDEM重複、逆位など様々な変異が認められているため、それらの変異に合わせ FISH プローブを設計し、評価方法を検討した。

*MET*増幅と抗 PD-1 抗体薬の有効性との関連を検討するため、抗 PD-1 抗体薬で治療された頭頸部扁平上皮癌例を対象に、FISH を用いて *MET* 遺伝子の増幅を評価した。

#### 4. 研究成果

##### a. *PD-L1* ゲノム構造異常の分子病理学的検出

FISH では、評価可能なすべての PD-L1 高発現検体に、異常なシグナルパターン、数的異常所見、もしくはその両方が認められた。ターゲットキャプチャーシーケンスで *PD-L1* ゲノム構造異常が検出された検体は、FISH でも高率に異常なシグナルパターンが確認された。免疫染色で PD-L1 の異常な発現パターンを示す検体では、1 例を除きすべてに *PD-L1* ゲノム構造異常が認められた。免疫染色と FISH の結果を組み合わせた *PD-L1* ゲノム構造異常の検出は、陽性予測値、陰性予測値ともに 90%以上と有用であった。

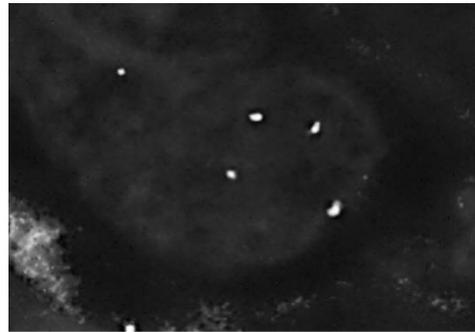


図1. ゲノム構造異常陽性例のFISH

##### b. 分泌型 PD-L1 スプライシングバリエントの検出

共同研究者として、in vitro および in vivo モデルを用いて、PD-L1 のスプライシングバリエントである PD-L1-vInt4 が抗 PD-L1 抗体治療のデコイとして働き、抗 PD-L1 抗体治療に抵抗性を示すことを報告した。PD-L1-vInt4 は臨床検体においても検出され、免疫染色で可視化が可能であった。現在、抗体を用いた PD-L1 バリエントの検出についてさらなる検討を行っている。

##### c. 頭頸部癌における *MET* 遺伝子増幅と抗 PD-1 抗体薬治療に対する予測値

抗 PD-1 抗体薬で治療された頭頸部扁平上皮癌 62 例中 7 例(11.3%)に、*MET* 遺伝子の増幅が認められた。抗 PD-1 抗体薬治療による予後は、OS 中央値が *MET* 遺伝子増幅陽性例で 15.3 カ月 (95%CI : 0.42-30.1)、*MET* 遺伝子陰性例で 12.7 カ月 (95%CI: 7.0-18.3) (p=0.709) 、PFS 中央値が *MET* 遺伝子増幅陽性例で 6.6 カ月 (95%CI : 0.0-22.7)、*MET* 遺伝子陰性例では 3.6 カ月 (95%CI : 2.6-4.6 )

(p=0.304 )と、いずれも *MET* 遺伝子増幅陽性例で抗 PD-1 抗体薬治療の予後が長い傾向にあったが、統計的有意性は示されなかった。今後、症例数を増やしさらに検討する予定である。

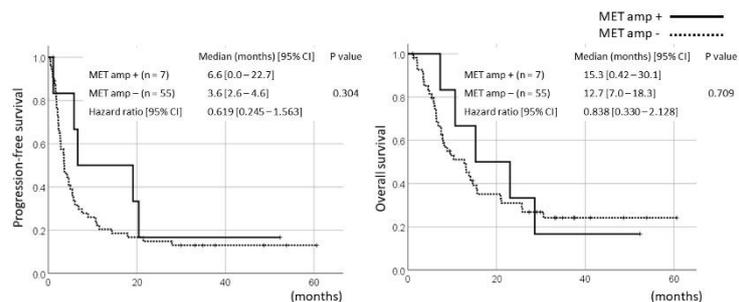


図2. Survival curves on Nivolumab with or without MET amp

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Sagawa Ray, Sakata Seiji, Gong Bo, Seto Yosuke, Takemoto Ai, Takagi Satoshi, Ninomiya Hironori, Yanagitani Noriko, Nakao Masayuki, Mun Mingyon, Uchibori Ken, Nishio Makoto, Miyazaki Yasunari, Shiraishi Yuichi, Ogawa Seishi, Kataoka Keisuke, Fujita Naoya, Takeuchi Kengo, Katayama Ryohei	4. 巻 7
2. 論文標題 Soluble PD-L1 works as a decoy in lung cancer immunotherapy via alternative polyadenylation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.153323	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 Haraguchi Mizuki, Kiyotani Kazuma, Tate Tomohiro, Sakata Seiji, Sagawa Ray, Takagi Satoshi, Nagayama Satoshi, Takeuchi Kengo, Takahashi Kazuhisa, Katayama Ryohei	4. 巻 72
2. 論文標題 Spatiotemporal commonality of the TCR repertoire in a T-cell memory murine model and in metastatic human colorectal cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 2971 ~ 2989
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00262-023-03473-9	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤靖祥、坂田征士、佐藤由紀子、福田直樹、王晓斐、浦崎哲也、大本晃弘、林直美、仲野兼司、小野麻紀子、友松純一、三谷浩樹、高橋俊二
2. 発表標題 ニボルマブ療法におけるPD-L1発現および好中球/リンパ球比（NRL）のバイオマーカーとしての有用性
3. 学会等名 頭頸部癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenji Nakano, Seiji Sakata, Yasuyoshi Sato, Xiaofei Wang, Naomi Hayashi, Hirotaka Suto, Ryosuke Oki, Naoki Fukuda, Tetsuya Urasaki, Makiko Ono, Junichi Tomomatsu, Hiroki Mitani and Shunji Takahashi
2. 発表標題 MET amplification in head and neck cancer: the frequency and predictive value for immune checkpoint inhibitor therapy
3. 学会等名 日本臨床腫瘍学会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------