

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401  
 研究種目：若手研究  
 研究期間：2020～2021  
 課題番号：20K18113  
 研究課題名(和文) 癌ゲノム・タンパク統合解析による腎癌PD-L1発現機構解明と治療選択マーカー確立

研究課題名(英文) Elucidation of PD-L1 expression mechanism and establishment as a therapeutic selection marker for renal cell carcinoma by integrated analysis of cancer genomics and proteomics

研究代表者  
 洪 陽子 (Koh, Yoko)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70824754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：既存の4つのPD-L1免疫組織化学染色(IHC)検査(22C3、28-8、SP142、SP263)を用い、腎癌症例300例から作製した組織マイクロアレイにおけるPD-L1発現を評価した。SP142によるPD-L1陽性率は極端に低く、28-8によるPD-L1発現は22C3、SP263と適度に相関を示した。また次世代シーケンス解析を行い、IHCの抗体結合部位に影響を及ぼしうるPD-L1タンパクの構造異常を探索したが検出することはできなかった。PD-L1のmRNA発現は予後との相関を示さなかったものの、22C3、28-8、SP263によるタンパク発現は腎癌の予後と有意に相関することを見出した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

予後不良である進行性腎癌に対し、免疫チェックポイント阻害剤が適応となったものの、奏功症例は限定的である。組織中のPD-L1発現は最も確立されたバイオマーカーであるが、腎癌での有用性は明確ではなく、その評価体系には多くの問題点が指摘されている。我々は、多検体を用いたPD-L1タンパク発現の評価および次世代シーケンス解析を行い、既存のPD-L1免疫組織化学染色検査によるタンパク発現はアッセイ間で完全には一致せず、特定のアッセイにおいて予後との相関を示した。これらのアッセイは腎癌における免疫チェックポイント阻害剤の治療選択マーカーとしての有用な可能性があり、学術的意義を有するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We evaluated PD-L1 expression in tumor microarrays generated from 300 renal cell carcinoma using four PD-L1 immunohistochemical staining (IHC) assays. Although PD-L1 positivity by SP142 was extremely low, PD-L1 expression assessed with 28-8 correlated with 22C3 and SP263. Next-generation sequencing analysis was performed to investigate structural aberrations of PD-L1 protein that could affect the antibody binding site of IHC but we could not detect any variants. PD-L1 mRNA expression did not correlate with clinical prognosis, however PD-L1 protein expression assessed by 22C3, 28-8 and SP263 showed a significant correlation with prognosis.

研究分野：泌尿器科癌

キーワード：腎細胞癌 PD-L1 免疫チェックポイント阻害剤 免疫組織化学染色 次世代シーケンス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

予後不良である進行性腎癌に対し、2016年に免疫チェックポイント阻害剤(ICI)が適応となり、進行性腎癌に対する治療体系は大きく変遷しつつある。しかしながら、奏功例は非常に限定的であり、治療効果を予測するバイオマーカーの確立は喫緊の課題である。免疫組織化学染色(IHC)アッセイによる組織におけるPD-L1発現はICI治療選択マーカーとして最も確立されたものであるが、腎癌での有用性は明確ではない。PD-L1 IHCアッセイはそれぞれのICIの臨床試験において独自に開発されてきた経緯があり、評価体系が統一されておらず、アッセイ間でのPD-L1陽性率が一致しないことが報告されている。近年、癌組織におけるPD-L1タンパクの構造異常やバリエーションの存在が報告され、これらの異常がIHCアッセイの抗体の認識部位に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究では、腎癌組織におけるPD-L1発現機構に着目し、次世代シーケンス解析によりそのメカニズムを解明することを目的とする。それにより既存のPD-L1 IHCアッセイの問題点を解決し、腎癌における組織中PD-L1発現のICI治療選択バイオマーカーとしての確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) IHCによる腎癌組織におけるPD-L1発現の評価

本学附属病院での腎癌手術症例300例のホルマリン固定パラフィン包埋標本より組織マイクロアレイを作製した。4つのPD-L1 IHC検査アッセイ(PD-L1 IHC 22C3 pharmDx「ダコ」、PD-L1 IHC 28-8 pharmDx「ダコ」、ベンタナ OptiView PD-L1 (SP142)、VENTANA PD-L1(SP263) Rabbit Monoclonal Primary Antibody)によるPD-L1発現を評価し、アッセイ間での比較を行った。

#### (2) 次世代シーケンス解析

腎癌・正常腎凍結組織より抽出したRNA、および腎癌凍結組織・血液より抽出したDNAを用い、それぞれRNAシーケンス(112例)および全エクソームシーケンス(113例)を行った。

#### (3) PD-L1発現機構の解明

次世代シーケンスの結果から、マッピングデータ解析によるPD-L1構造異常の検出やバリエーションの検出を行った。また、PD-L1 mRNA発現を評価し、IHCアッセイによるPD-L1タンパク発現との相関を検討した。

#### (4) 組織中のPD-L1発現のICI治療効果予測マーカーへの応用と確立

(1)から(3)で得られたPD-L1タンパク発現およびmRNA発現と臨床情報を統合的に解析し、最適なPD-L1発現評価方法を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) IHCによる腎癌組織におけるPD-L1発現の評価

まずは、4つのPD-L1 IHCアッセイ独自の評価基準でPD-L1発現を評価した(右図に腎癌組織マイクロアレイにおけるPD-L1染色例を示す)。腫瘍細胞を評価対象とする28-8およびSP142でのPD-L1陽性率は非常に低かった(表1)。またアッセイ間の一致度については係数を算出することにより評価したが、一致度はそれほど高くなかった。次に、評価基準を統一してPD-L1を評価した。腫瘍領域に対するPD-L1陽性腫瘍細胞および免疫細胞を評価した場合、PD-L1陽性率は、22C3で15.7%、28-8で17.5%、SP142で2.8%、SP263で16.1%であった(表2)。アッセイ間の一致度については、28-8と22C3、28-8とSP263の間では適度に相関を認めた。表3、4に腫瘍細胞のみ、免疫細胞のみを評価対象とした結果を示す。

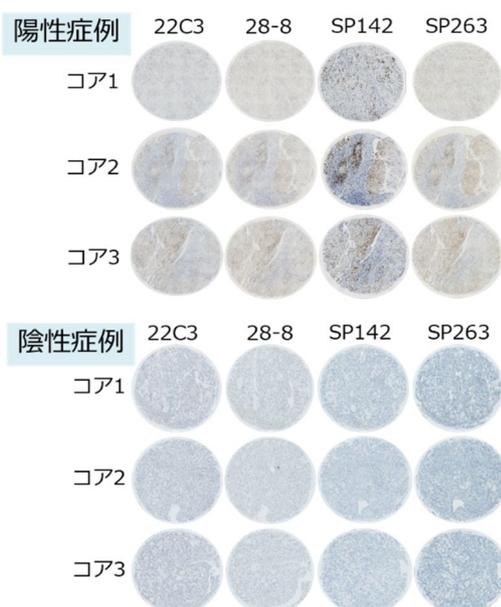


表1

	22C3	28-8	SP142	SP263
評価基準	PD-L1+全細胞 全腫瘍細胞	PD-L1+腫瘍細胞 全腫瘍細胞	PD-L1+免疫細胞 腫瘍領域	PD-L1+免疫細胞 腫瘍領域
PD-L1陽性率(%)	18.9	2.1	2.1	15.0
PD-L1 status concordance : κ係数				
	22C3	28-8	SP142	SP263
22C3	-	0.23	0.17	0.29
28-8	-	-	0.11	0.13
SP142	-	-	-	0.13
SP263	-	-	-	-

表2

	22C3	28-8	SP142	SP263
評価基準	PD-L1+全細胞 腫瘍領域	PD-L1+全細胞 腫瘍領域	PD-L1+全細胞 腫瘍領域	PD-L1+全細胞 腫瘍領域
PD-L1陽性率(%)	15.7	17.5	2.8	16.1
PD-L1 status concordance : (κ係数)				
	22C3	28-8	SP142	SP263
22C3	-	0.53	0.15	0.31
28-8	-	-	0.17	0.50
SP142	-	-	-	0.18
SP263	-	-	-	-

表3

	22C3	28-8	SP142	SP263
評価基準	PD-L1+腫瘍細胞 腫瘍領域	PD-L1+腫瘍細胞 腫瘍領域	PD-L1+腫瘍細胞 腫瘍領域	PD-L1+腫瘍細胞 腫瘍領域
PD-L1陽性率(%)	1.4	2.1	1.0	1.7
PD-L1 status concordance : (κ係数)				
	22C3	28-8	SP142	SP263
22C3	-	0.80	0.57	0.66
28-8	-	-	0.44	0.72
SP142	-	-	-	0.24
SP263	-	-	-	-

表4

	22C3	28-8	SP142	SP263
評価基準	PD-L1+免疫細胞 腫瘍領域	PD-L1+免疫細胞 腫瘍領域	PD-L1+免疫細胞 腫瘍領域	PD-L1+免疫細胞 腫瘍領域
PD-L1陽性率(%)	14.7	16.1	2.1	15.0
PD-L1 status concordance : (κ係数)				
	22C3	28-8	SP142	SP263
22C3	-	0.52	0.14	0.27
28-8	-	-	0.16	0.46
SP142	-	-	-	0.13
SP263	-	-	-	-

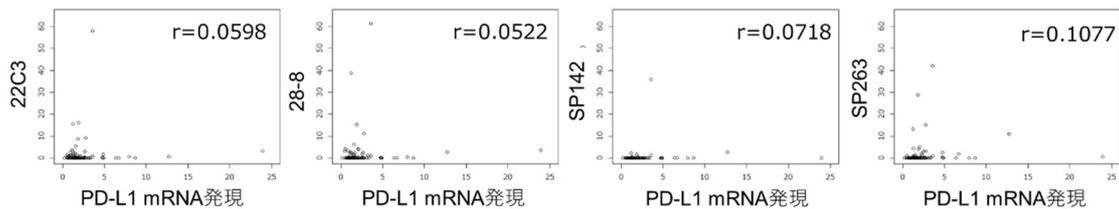
(2) 次世代シーケンス解析

RNA シーケンスおよび全エクソームシーケンスはそれぞれ TruSeq stranded mRNA と SureSelect XT DNA キャプチャライブラリ調整キット (Human All Exon V6+UTR) を利用し、NovaSeq6000 (イルミナ社) により解析した。Genomon パイプラインを用い、DNA 解析および RNA 解析を行った。

(3) PD-L1 発現機構の解明

PD-L1 構造異常やバリエーションについては、今回用いた検体ではいずれも検出することができなかった。PD-L1 mRNA 発現と4つの IHC アッセイによる PD-L1 タンパク発現との関連を検討したが相関はどのアッセイでも認めなかった (図1)。

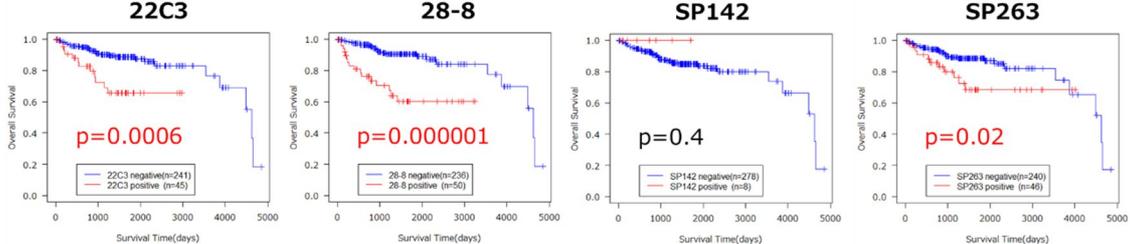
図1



(4) 組織中の PD-L1 発現の ICI 治療効果予測マーカーへの応用と確立

予後との相関を Kaplan-Meier 法により解析したところ、PD-L1 mRNA 発現は全生存率と相関は示さず、28-8、22C3、SP263 による PD-L1 タンパク発現と全生存率との間に有意に相関を認めた (図2)。

図2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 洪陽子
2. 発表標題 腎癌における異なるクローンをを用いたPD-L1免疫染色と予後との関連性の検討
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------