

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07205

研究課題名(和文) 多種癌での免疫チェックポイント分子高発現を来すゲノム構造異常の同定と検出法の確立

研究課題名(英文) Identification of genomic structural variations leading to high expression of immune checkpoint molecules in cancer cells and establishment of detection method

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：PD-L1強発現あるいは異常発現を示すがん腫に、PD-L1遺伝子構造異常が高頻度に認められた。また、PD-L1強発現あるいは異常発現を示すリンパ腫17検体、大腸癌1検体、婦人科癌1検体に、PD-L1遺伝子の3'非翻訳領域の変異を同定した。PD-L2高発現はリンパ腫13検体に認められ、それらすべてに異常シグナルが観察された。現在、発現解析によるPD-L1遺伝子3'非翻訳領域変異の検出法を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PD-L1遺伝子の増幅や構造異常に伴う3'非翻訳領域の変異がPD-L1過剰発現をきたすメカニズムとして知られており、免疫チェックポイント分子自体の遺伝子異常が免疫チェックポイント阻害薬の治療効果を予測するバイオマーカーになりうると考えられている。腫瘍細胞の本質的な免疫チェックポイント分子の過剰発現をきたす遺伝子構造異常を念頭に置き、PD-L1の発現強度や発現パターンを加味し評価することでPD-L1発現をきたす遺伝子構造異常陽性例の同定が可能であり、治療効果の高い症例の検出へとつながりうる結果であった。

研究成果の概要(英文)：Structural variations of the PD-L1 gene were frequently observed in cancers showing strong or abnormal expression of PD-L1 by immunostaining. We identified disruption of the PD-L1 3'-untranslated region (3'-UTR) in 17 lymphoma samples, 1 colon cancer sample, and 1 gynecologic cancer sample. We found PD-L2 high expression in 13 lymphoma specimens by immunohistochemistry, and abnormal signals were observed in all of them by fluorescence in situ hybridization. We are investigating the detection method of disruption of the PD-L1 3'-UTR by expression analysis.

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。免疫チェックポイント分子の一つとして、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)、programed death ligand-2 (PD-L2)が代表的なものと知られている。PD-1はT細胞に発現しており、PD-L1やPD-L2と結合することで免疫応答を負に調節している。がん細胞はPD-L1を発現することで免疫機構を回避し、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ている。

PD-1とPD-L1経路の阻害薬である抗PD-L1抗体薬および抗PD-1抗体薬が、様々ながん腫で治療効果を示すことが明らかになっている。抗PD-1抗体薬は、進行性の悪性黒色腫で31-44%、非小細胞性肺癌で19-20%、腎癌で22-25%の奏効率が見られ、また既存の治療よりも予後が延長したことが示されている。膀胱癌やホジキンリンパ腫、頭頸部癌でも同様の結果となることが報告され、異なる2種の抗PD-1抗体薬、1種の抗PD-L1抗体薬が臨床応用されている。免疫チェックポイント阻害薬は高額で、すべての症例に有効でなく、自己免疫疾患に類似した副作用などが見られる症例があることから、治療選択となるバイオマーカーが必要である。治療効果予測として、免疫染色によるPD-L1発現が用いられているが、必ずしも治療効果と直結しない。そのため、精度の高い治療効果予測マーカーが望まれている。

PD-L1遺伝子のコピー数の増幅により、PD-L1が高発現する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抗体薬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を予測するバイオマーカーとなることが考えられている。2016年には、遺伝子構造異常に伴うPD-L1遺伝子の3'非翻訳領域の変異がPD-L1タンパクの顕著な発現上昇を誘導することが報告された。PD-L1遺伝子の3'非翻訳領域の変異は、様々な悪性腫瘍でみられ、3'非翻訳領域の変異例ではPD-L1の過剰発現が認められた。In vivoにおいて、3'非翻訳領域の変異によりPD-L1タンパクを過剰発現したがん細胞が免疫機構を回避し、抗PD-L1抗体薬によって免疫回避や増殖を阻害したことが示され、PD-L1の過剰発現をきたす3'非翻訳領域の変異が抗PD-1/PD-L1抗体薬の効果予測マーカーとして期待されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腫瘍細胞における抑制性免疫チェックポイント分子の発現上昇をきたす遺伝子構造異常の同定とその検出法を確立させることである。PD-L1過剰発現をきたすPD-L1遺伝子自体の異常が免疫チェックポイント阻害薬の治療効果を予測するバイオマーカーとなる可能性があり、その検出法を確立させることで免疫チェックポイント阻害薬に著効を示す症例の同定へとつなげる。

3. 研究の方法

(1) 免疫染色

PD-L1遺伝子の3'非翻訳領域の変異をきたす遺伝子構造異常には、PD-L1タンパクのC末端を含む異常があるため、細胞外ドメインとC末端を認識する2種類の抗PD-L1抗体を用いた。マクロファージと同等以上の染色強度を強発現とし、それぞれの抗体での発現を評価した。PD-L2についても、1種類の抗PD-L2抗体を使用しスクリーニングを行った。スクリーニングには tissue micro array を使用した。

(2) 遺伝子構造異常の検索

a) Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Bacterial artificial chromosome クローンから作製したPD-L1遺伝子領域とPD-L2遺伝子領域に特異的なDNAプローブを使用し、シグナル増幅、シグナルサイズの増大、splitシグナルなどを評価した。

b) 3'非翻訳領域変異の同定

凍結検体が保存されていた候補例に対し、targeted-capture sequencingにより検索した。また、ホルマリン固定パラフィン包埋検体 (FFPE) を利用した発現解析での検出法も検討した。

4. 研究成果

(1)免疫染色でのスクリーニング

2種の抗PD-L1抗体による免疫染色では、リンパ腫1,051検体中、105検体(10.0%)、大腸癌1,382検体中7検体(0.5%)、婦人科癌607検体中11検体(1.8%)が、2種の抗PD-L1抗体ともに強発現であった(図1)。PD-L1細胞外ドメイン認識抗体のみ陽性の異常発現は、リンパ腫3検体(0.3%)、大腸癌1検体(0.1%)、婦人科癌1検体(0.1%)であった(図1)。

抗PD-L2抗体での免疫染色では、リンパ腫13検体(1.2%)で陽性が見られ、6検体はPD-L1と共陽性を示し、7検体はPD-L2のみ陽性であった(図2)。大腸癌、婦人科癌にPD-L2高発現を示す検体は認められなかった。

(2) 遺伝子構造異常の検索

2種の抗PD-L1抗体とも強発現あるいはPD-L1細胞外ドメイン認識抗体のみ陽性の異常発現を示したリンパ腫108検体中104検体がFISH検索可能で、そのうち89検体(85.6%)に異常シグナルが認められた(図1)。大腸癌では8検体中6検体(75.0%)、婦人科癌では12検体中7検体(58.3%)に明らかな異常シグナルが観察された。PD-L2高発現リンパ腫検体では、13例すべてに異常シグナルが見られた(図2)。

リンパ腫82検体、大腸癌5検体、婦人科癌11検体に対し、targeted-capture sequencingを行い、リンパ腫17検体、大腸癌1検体、婦人科癌1検体にPD-L1遺伝子3'非翻訳領域の変異が認められた。

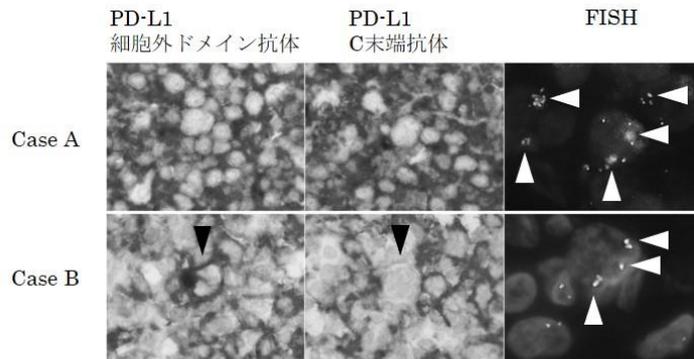


図1. PD-L1遺伝子3'非翻訳領域変異陽性例
黒矢印：腫瘍細胞、白矢印：異常シグナル

(3) PD-L1 遺伝子 3'非翻訳領域変異陽性検体の分子病理学的所見

PD-L1遺伝子の3'非翻訳領域変異陽性19検体では、2種の抗PD-L1抗体とも強発現が15検体(リンパ腫14検体、婦人科癌1検体)、PD-L1細胞外ドメイン認識抗体のみ陽性の異常発現が4検体であった(リンパ腫3検体、大腸癌1検体)。

FISHでは、強発現15検体中15検体、異常発現4検体中2検体に異常所見が認められ、そのうち11検体がtargeted-capture sequencingで同定された構造異常に一致した所見であった。残りのPD-L1異常発現陽性婦人科癌1検体は、targeted-capture sequencingで3'非翻訳領域の変異が検出されなかったが、FISHで異常シグナルが観察され3'非翻訳領域の変異陽性と考えられた。

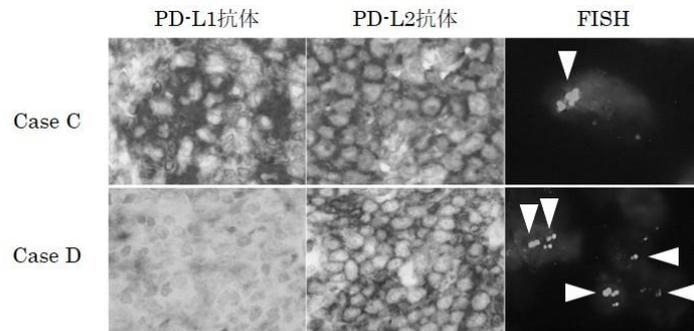


図2. PD-L2陽性例 (白矢印：異常シグナル)

3'非翻訳領域変異陽性の大腸癌1検体、婦人科癌2検体には、同一腫瘍内にPD-L1強発現領域とPD-L1発現陰性の領域が認められた。いずれも、PD-L1強発現領域でのPD-L1発現強度は均一であり、FISHではPD-L1陽性腫瘍細胞に異常所見が観察された。

(4) 発現解析による3'非翻訳領域変異の検出

認識部位の異なる抗体を併用した免疫染色とFISHでの検索により、3'非翻訳領域の変異を伴う遺伝子構造異常を同定できた。しかし、FISHの検索では3'非翻訳領域の変異の有無の評価が不十分なため、発現解析での検出法も検討した。PD-L1遺伝子の3'非翻訳領域変異陽性検体および遺伝子増幅検体の検討では、FFPE検体から抽出したmRNAでの解析で3'非翻訳領域変異陽性検体において3'非翻訳領域の発現量が低下しており、検出が可能と考えられた(図3)。

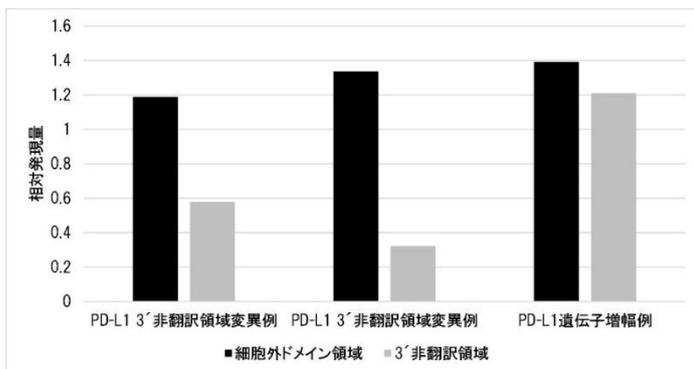


図3. PD-L1 mRNAの発現解析

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 2件）

| | |
|---|--------------------------|
| 1. 著者名 Gong B, Kiyotani K, Sakata S, Nagano S, Kumehara S, Baba S, Besse B, Yanagitani N, Friboulet L, Nishio M, Takeuchi K, Kawamoto H, Fujita N, Katayama R. | 4. 巻 216 |
| 2. 論文標題 Secreted PD-L1 variants mediate resistance to PD-L1 blockade therapy in non-small cell lung cancer | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Experimental Medicine | 6. 最初と最後の頁 982 ~ 1000 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20180870 | 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 Kataoka K, Miyoshi H, Sakata S, Dobashi A, Couronne L, et al | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 Frequent structural variations involving programmed death ligands in Epstein-Barr virus-associated lymphomas | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Leukemia | 6. 最初と最後の頁 1687-1699 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41375-019-0380-5 | 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 - |

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|