

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17169

研究課題名（和文）Dynamic MRIを用いたニボルマブに対する治療効果判定の指標の確立

研究課題名（英文）Establish indicators of therapeutic effect judgment for Nivolumab using Dynamic MRI

研究代表者

藤田 麻里子（FUJITA, MARIKO）

岡山大学・歯学部・客員研究員

研究者番号：90714535

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により、口腔癌のDynamic contrast enhanced MRI（DCE-MRI）から解析されたいくつかのClcurveパラメータとPD-L1の発現率に有意な相関が認められた。また、PD-L1の発現率の多寡により、高陽性群、低陽性群、陰性群の3群に分けて比較を行ったところ、高陽性群とClcurveパラメータとの間により強い相関関係が認められ、高陽性群と陰性群との間には明らかな有意差を認めた。また、DCE-MRIパラメータと微小血管密度との比較においても、微小血管密度を高発現群と低発現群に分けた際、高発現群とClcurveパラメータとの相関の方が低発現群より強く認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍の治療方法は免疫チェックポイント阻害剤の出現により劇的に変化してきている。頭頸部癌に使用が認可されている抗PD-1抗体のニボルマブはPD-L1の発現の多寡により奏効率が高くなることが知られている。本研究の目的は、MRI検査におけるDCE-MRIから解析されたClcurveパラメータを使用して、造影性の推移とPD-L1の発現率との相関を評価することで、頭頸部癌のニボルマブに対する効果判定予測の指標を確立することとしていた。今回の研究により、ClcurveのいくつかのパラメータとPD-L1の発現率との相関を確認できたことで、術前検査においてニボルマブの効果が予測できる可能性が示唆できた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found a correlation between the Cl curve parameters analyzed by Dynamic contrast enhanced MRI（DCE-MRI）of oral squamous cell carcinoma and the expression of PD-L1. In addition, when the PD-L1 expression rate was divided into three groups, a high-positive group, a low-positive group, and a negative group, a stronger correlation was found between the high-positive group and the Clcurve parameters. And, a clear significant difference was observed between the high positive group and the negative group. Also, in the comparison between the Clcurve parameters and the microvessel density, the microvessel density was divided into a high expression group and a low expression group. Then, we observed that the correlation between the high expression group and the Clcurve parameter was higher than that of the low expression group.

研究分野：歯科放射線学分野

キーワード：頭頸部癌 扁平上皮癌 DCE-MRI PD-L1 免疫組織化学染色

1. 研究開始当初の背景

抗 PD-1 抗体ニボルマブ (商品名: オプジーボ, 以下ニボルマブ) は、免疫チェックポイント阻害剤として 2017 年 3 月に「再発又は遠隔転移を有する頭頸部癌」に対して使用が認可された。

ニボルマブは PD-1 と PDL-1 および PDL-2 との結合を阻害し、癌抗原特異的 T 細胞活性化と細胞障害活性増強などにより腫瘍増殖を抑制する。PD-1 と PDL-1/PDL-2 との結合を阻害する抗 PD-1/PD-L1 抗体薬は、その薬効メカニズムから、腫瘍組織の免疫染色による PDL-1 発現が効果予測因子として広く用いられている。頭頸部癌で最も好発現の扁平上皮癌においても PD-L1 の発現が 1% 以上みられるもののほうが、ニボルマブの奏効率が高いことが知られている。しかしながら、術前に PD-L1 の発現を調べるためには生検が必要となり、患者の身体的負担が強い。また、PD-L1 の発現は同一腫瘍内でも分布が異なっており、必ずしも生検部が病変全体の PD-L1 の発現量を反映しているとはいえないため、術前の奏効率を予測するための確実な方法としては確立されておらず、使用前の必須検査には至っていない。ニボルマブは頭頸部癌に対し、使用が再発例に限定されているため、患者の体力面での負担を考慮すると、術前に比較的低侵襲な方法で治療効果を予測することが理想的である。岡山大学病院では多くの頭頸部癌患者が術前検査として MRI を撮像している。MRI のモダリティの中でも、造影剤注入後から、15 秒毎、複数回の連続撮像を行う Dynamic contrast enhanced MRI (DCE-MRI) では、病変内部の造影剤の経時的変化を評価することが可能であり、内部の質的診断に有用である。病変内部の経時的変化については、DCE-MRI 撮像後、病変内部に関心領域をとり、関心領域内の信号強度 (SI) を各撮像時間毎に測定、造影効果である Contrast Index (CI) を算出 ($CI = \frac{\text{造影後の SI} - \text{造影前の SI}}{\text{造影前の SI}}$) し、造影効果曲線 (CI curve) を描くことで造影剤の取り込み率における経時的変化の評価を行う。

悪性腫瘍において、病変内の血管新生 (微小血管密度) は腫瘍の増大や悪性を評価する指標としても有効であるとする報告があり、頭頸部領域の扁平上皮癌の微小血管密度は CI curve のパラメータである、最大の造影効果増加率を示す CI gain と正の相関があると報告されている。

また、腫瘍組織において、微小血管密度と PD-L1 の発現は正の相関があることが報告されている。しかしながら、PD-L1 の発現量と DCE-MRI から解析された CI curve パラメータとの相関を評価した報告はこれまでにない。そこで申請者は、PD-L1 の発現量と微小血管密度の相関を評価し、CI curve パラメータとの相関を評価することにより、ニボルマブの治療効果判定の指標を作ることができるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、DCE-MRI から解析された CI curve パラメータによる抗 PD-1 抗体の治療効果予測の指標を確立することを目的とした。

3 . 研究の方法

本申請研究課題では、頭頸部領域の扁平上皮癌を有する患者の中から術前に DCE-MRI を撮像し、腫瘍切除術を受けた症例に対し、切除切片を用いて以下の 3 点を明らかにした。

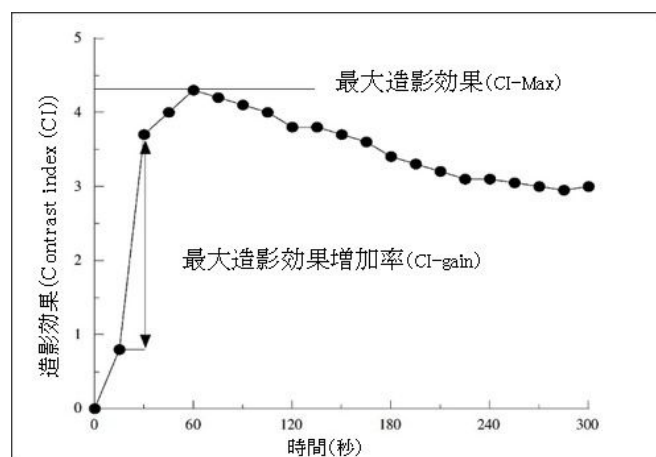
DCE- MRIを撮像した扁平上皮癌患者のリスト作成・CI curveの評価。

腫瘍内のPD-L1の発現・微小血管密度を免疫染色により評価。

CI curve・PD-L1・微小血管密度、それぞれの相関の評価。

DCE- MRIを撮像した扁平上皮癌患者のリスト作成・CI curveの評価

頭頸部領域の扁平上皮癌を有する患者の中で、術前に Siemens 社の MAGNETOM skyra 3T で DCE-MRI を撮像された患者を抽出する。病変の TNM 分類は、DCE-MRI での関心領域が取得可能な T1 ~ T3 とした。(T4 は周囲組織への浸潤により、組織の正しい信号を評価できない可能性があるため。)その中から当院で切除術を受け、切除切片が保管されているものを対象とし、リストを作成。



最大造影効果増加率と微小血管密度は相関がある

DCE-MRI の画像上で、病変内部に関心領域をとり、関心領域内の信号強度である Signal Intensity(SI)を元に CI を算出 ($CI = \frac{\text{造影後の SI} - \text{造影前の SI}}{\text{造影前の SI}}$) し、造影効果曲線 (CI curve)を描くことで造影剤の取り込み率における経時的変化の評価を行った。パラメータは最大造影効果率(CI-gain)、最大造影効果 (CI-max)、CI max 到達時間 (T-max)、最大造影効果 × 90% で算出される CI-peak を用いた。

切除切片を用いて、腫瘍内のPD-L1の発現、微小血管密度を免疫染色により評価

造影効果曲線を作成した患者の摘出切片を Anti-PD-L1 抗体(ab201921)、Anti-CD31 抗体 (CD31-607-L-CE) を用いて免疫染色を行った。各々の抗体の validation は他実験において検証済みである。PD-L1 免疫染色においては染色強度を問わず 80%以上の細胞膜が染色されている腫瘍細胞を陽性としてスコアリングした。また正常細胞、間質細胞、壊死腫瘍細胞は除外し、標本全体に対する陽性腫瘍細胞の割合を ImageJ を用いて算出した。日本病理学会、厚生労働省「ニボルマブ製剤及びペムプロリズマブ製剤の最適使用推進ガイドライン」を参考に腫瘍組織中の PD-L1 発現細胞の割合で以下のようにサンプルを分類しデータベースに登録した。また CD31 発現においても腫瘍組織内における陽性細胞の割合を算出しデータベースに登録した。

PD-L1 については、発現率 1%以下の群を陰性群、1~49%の群を低発現群、50%以上の群を高発現群として 3 群に分類し、微小血管密度においては高発現群と低発現群の 2 群に分類した。

CI curve・PD-L1・微小血管密度について、それぞれの相関の評価

CI curve パラメータと PD-L1 発現率との相関関係を SPSS®を用いてノンパラメトリック検定を用い、解析を行った。また、PD-L1 の発現群により分けられた 3 群間の比較も行った。微小血管密度についても同様に、CI curve パラメータと微小血管密度との比較、発現率ごとに分けられた、2 群間の比較の相関を解析した。

4．研究成果

対象患者は合計 21 人（男性 12 名 女性 9 名） 年齢（平均 64 歳 34-87 歳）。

【DCE-MRI】

平均 CI-max: 1.45±0.64、平均 T-max : 65 秒、平均 CI-peak: 1.31±0.57、平均 CI gain: 0.97±0.57。

【免疫組織化学染色】

* 微小血管密度

CD31 染色を全例に行ったところ、CD31 陽性微小血管が癌間質領域で観察された。

平均 MVD : 51.92±24.65。低発現群 (n = 10) と高発現群 (n = 11) の 2 群に分類された。

* PD-L1

PD-L1 発現率により 3 群に分類された。陰性群 (PD-L1 発現率 1% 以下): n = 9、低陽性群 (PD-L1 発現率 1 ~ 49%): n = 6、高陽性群 (PD-L1 発現率 50% 以上): n = 6

【DCE-MRI および免疫組織化学的所見の分析】

全体の MVD は、T-max との間に統計学的有意な強い負の相関 ($r = -0.61$ 、 $P = 0.003$) を示した。また、CI-gain との間に正の相関 ($r = 0.46$ 、 $P = 0.037$) を示した。全体の PD-L1 発現は、CI-max ($r = 0.57$ 、 $P = 0.007$)、CI-peak ($r = 0.57$ 、 $P = 0.007$) および CI-gain ($r = 0.58$ 、 $P = 0.006$) との間に中程度の正の相関を示した。PD-L1 の発現と、MVD の発現との間にも強い正の相関が認められた ($r = 0.66$ 、 $P = 0.001$)。

MVD を高発現群と低発現群に分けた場合、高発現群の方が、CI-max、CI-peak、および CI-gain との相関がより強くみられた。また、高発現群では T-max が短かったのに対し、低発現群では長く認められた。特に、T-max と CI-gain のパラメータは高発現群、低発現群間で統計的に有意な差を示した ($P < 0.05$)。PD-L1 は発現率ごとに DCE-MRI パラメータと比較した際、CI-max、CI-peak、および CI-gain は、PD-L1 発現が高陽性群で相関が最も強かったのに対し、T-max は、PD-L1 発現陰性群で最も長かった。CI-max、CI-peak、および CI-gain は、特に陰性群と高陽性群との間で統計的な有意差が認められた ($P < 0.05$)。

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 1件）

1. 発表者名 Nouha Tekiki, Mariko Fujita Tatsuo Okui, Hotaka Kawai, Toshiyuki Kawazu, Miki Hisatomi, Shunsuke Okada, Yohei Takeshita, Yoshinobu Yanagi, Jun-ichi Asaumi
2. 発表標題 Dynamic contrast-enhanced MRI assessment of the therapeutic effect of immune checkpoint inhibitors in oral squamous cell carcinoma
3. 学会等名 The 23rd International Congress of DentoMaxilloFacial Radiology (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------