

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16837

研究課題名(和文)ポリオウイルスレセプターを標的とした非小細胞肺癌に対する新規複合免疫療法の開発

研究課題名(英文) Novel Combination Immunotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer Targeting Poliovirus Receptor

研究代表者

高田 和樹 (TAKADA, Kazuki)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：50806495

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)：肺扁平上皮癌264例において、無再発生存、全生存ともにCD155高発現は予後不良であった($p=0.0164$, $p=0.0023$)。肺腺癌363例において、CD155高発現は無再発生存で予後不良($p=0.0188$)、全生存では有意差を認めなかった($p=0.0531$)。EGFR変異型において、CD155発現による予後の差は認められなかったが、EGFR野生型において、CD155高発現は予後不良であった(無再発生存 $p=0.0253$, 全生存 $p=0.0225$)。肺扁平上皮癌およびEGFR野生型肺腺癌においてCD155高発現は予後不良であり、CD155発現が腫瘍細胞増殖に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非小細胞肺癌(NSCLC)において、薬剤耐性化克服や治療効果増強を目的に、既存の免疫チェックポイント阻害薬と新規薬剤との併用療法が多く検討されている。CD155はPD-L1同様に腫瘍細胞に発現し、免疫療法の標的として注目されている。本研究から、NSCLCにおいてCD155発現はPD-L1発現と関連があり、肺扁平上皮癌及びEGFR野生型肺腺癌においてCD155高発現は予後不良因子であった。以上から、肺扁平上皮癌及びEGFR野生型肺腺癌において、PD-1/PD-L1及びCD155/TIGITシグナル同時阻害の有効性を検証する価値があると思われる、新規複合免疫療法開発に向けた足がかりになると考える。

研究成果の概要(英文)：In 264 squamous cell carcinoma of the lung, high CD155 expression was associated with poor prognosis in both recurrence-free survival (RFS) and overall survival (OS) ($p=0.0164$, $p=0.0023$). In 363 lung adenocarcinoma of the lung, high CD155 expression was associated with poor prognosis for RFS ($p=0.0188$) and no significant difference for OS ($p=0.0531$). In EGFR mutant patients, there was no prognostic difference by CD155 expression, but in EGFR wild-type patients, high CD155 expression was associated with poor prognosis (RFS $p=0.0253$, OS $p=0.0225$). In squamous cell carcinoma of the lung and EGFR wild-type lung adenocarcinoma, high CD155 expression was associated with poor prognosis, suggesting that CD155 expression may be involved in tumor cell growth.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：非小細胞肺癌 免疫療法 予後因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌だけでなく悪性腫瘍における第 4 の治療法として免疫療法が脚光を浴びており、中でも programmed cell death-1(PD-1)や programmed cell death-ligand 1(PD-L1)を標的とした免疫チェックポイント阻害薬は、非小細胞肺癌における標準治療として確立した。しかし、薬剤耐性化克服やさらなる治療効果増強を目的に、既存の免疫チェックポイント阻害薬と新規薬剤との併用療法が数多く検討されている。

Polio virus receptor(PVR/CD155)は PD-L1 同様に腫瘍細胞に発現し、T 細胞上に発現した T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains(TIGIT)と結合することで T 細胞の活性化を抑制し、免疫チェックポイントとして機能している。悪性黒色腫や神経膠腫において、PD-1/PD-L1 シグナルと CD155/TIGIT シグナルを同時に阻害することで、抗腫瘍効果が増強することが報告されており、非小細胞肺癌においても同様に、PD-1/PD-L1 シグナルと CD155/TIGIT シグナルを同時に阻害することによる抗腫瘍効果増強が期待されると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は非小細胞肺癌において、免疫チェックポイント因子である CD155 発現の意義を明らかにし、CD155 および PD-L1 の両者を標的とした新規複合免疫療法開発に向けた基礎的検討を行うものである。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、具体的に以下の検討項目を計画した。実際に行った内容を下記に記載する。

- (1) 非小細胞肺癌切除検体における CD155 発現を解析し、臨床病理学的因子、PD-L1 発現、腫瘍浸潤リンパ球、遺伝子解析結果、予後との関係を明らかにする(図 1)。

肺扁平上皮癌

1990 年から 2015 年までに九州大学大学院消化器・総合外科で切除された肺扁平上皮癌切除検体 264 例を使用し、免疫組織化学染色にて CD155 発現、PD-L1 発現、腫瘍浸潤リンパ球(CD3、CD4、CD8)を解析した。臨床病理学的因子および予後は、電子カルテから情報入手後に九州大学大学院消化器・総合外科で管理されているデータベースを使用した。

肺腺癌

2006 年から 2015 年までに九州大学大学院消化器・総合外科で切除された肺腺癌切除検体 363 例を使用し、免疫組織化学染色にて CD155 発現、PD-L1 発現を解析した。臨床病理学的因子、遺伝子解析結果(EGFR 遺伝子変異)および予後は、電子カルテから情報入手後に九州大学大学院消化器・総合外科で管理されているデータベースを使用した。

使用した抗体は以下である。

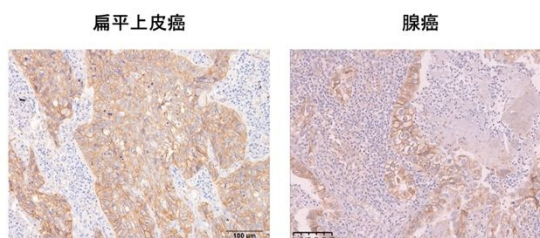
CD155: Rabbit monoclonal, clone D8A5G

PD-L1: Rabbit monoclonal, clone SP142

CD3: Mouse monoclonal, clone PS1

CD4: Mouse monoclonal, clone 4B12

CD8: Mouse monoclonal, clone 1A5



CD155 免疫組織化学染色

図 1

- (2) 遺伝子変異を有する肺癌細胞株を用いて、CD155 発現誘導機序において driver oncogene が関与しているかを検討する。

九州大学大学院消化器・総合外科が保有している代表的な肺癌細胞株(A549、H1975、H2228、HCC4006)における CD155、PD-L1、PD-L2 の mRNA 発現を半定量的 RT-PCR で、タンパク発現をフローサイトメトリーで測定した。さらに、細胞株 HCC4006 における定常時および EGFR 阻害薬エルロチニブ投与時の CD155 タンパク発現をウェスタンブロット、フローサイトメトリーで測定した。

用いた肺癌細胞株が有する遺伝子変異は以下である。

A549: Kras

H1975: EGFR L858R, T790M

- (3) ルイス肺癌マウスモデルを用いて、CD155 および PD-L1 の両者を標的として新規複合免疫療法の抗腫瘍効果を検証し、治療モデルを確立する。
未実施

4. 研究成果

- (1) 肺扁平上皮癌 264 例において、CD155 発現、PD-L1 発現、腫瘍浸潤リンパ球 (CD3、CD4、CD8) を解析した。CD155 発現の評価については、intensity score 0(negative)-3(strong) の 4 段階に分け、score 2 or 3 の腫瘍細胞が、全腫瘍細胞の 50%以上認める場合、高発現とした。PD-L1 発現については tumor proportion score 1%以上を陽性とし、腫瘍浸潤リンパ球 (CD3、CD4、CD8) の評価については、中央値を低浸潤/高浸潤のカットオフ値とした。CD155 高発現は 137 例 (51.9%)、PD-L1 陽性は 152 例 (57.6%) であった。腫瘍浸潤リンパ球の中央値は CD3 111(0-388)/HPF、CD4 30(0-158)/HPF、CD8 8(0-138)/HPF であった。CD155 高発現は、胸膜浸潤 (+) ($p=0.0154$)、血管侵襲 (+) ($p=0.0167$)、PD-L1 陽性 ($p=0.0011$)、腫瘍浸潤リンパ球高浸潤 (CD3; $p=0.0193$, CD4; $p=0.0197$, CD8; $p=0.0400$) と関連があった。また、無再発生存、全生存ともに CD155 高発現は予後不良であった ($p=0.0164$, $p=0.0023$; 図 2)。さらに全生存の多変量解析で、CD155 高発現は独立した予後不良因子であった ($p=0.0061$)。

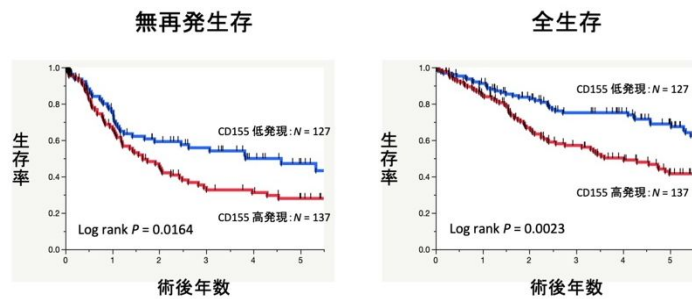


図 2

- (2) 肺腺癌 363 例において、CD155 発現、PD-L1 発現を解析した。CD155 発現の評価については、intensity score 0(negative)-3(strong) の 4 段階に分け、score 2 or 3 の腫瘍細胞が、全腫瘍細胞の 5%以上認める場合、高発現とした。PD-L1 発現については tumor proportion score 1%以上を陽性とした。CD155 高発現は 103 例 (28.4%)、PD-L1 陽性は 110 例 (30.3%) であった。CD155 高発現は胸膜浸潤 (+) ($p<0.0001$)、血管侵襲 (+) ($p=0.0376$)、PD-L1 陽性 ($p=0.0145$)、EGFR 野生型 ($p=0.0058$) と関連があった。また、CD155 高発現は無再発生存で予後不良 ($p=0.0188$)、全生存では有意差を認めなかった ($p=0.0531$) (図 3)。EGFR 変異型において、CD155 発現による予後の差は認められなかったが (無再発生存 $p=0.3104$, 全生存 $p=0.7460$)、EGFR 野生型において、CD155 高発現は予後不良であった (無再発生存 $p=0.0253$, 全生存 $p=0.0225$; 図 4)。

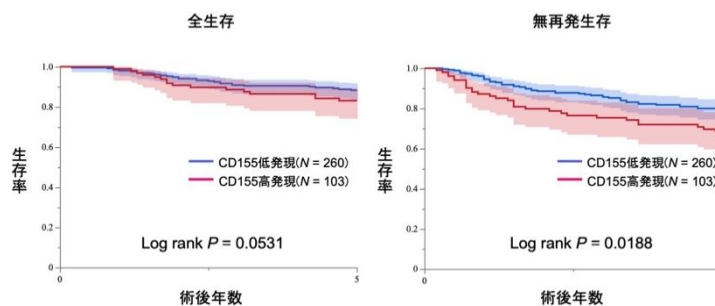


図 3

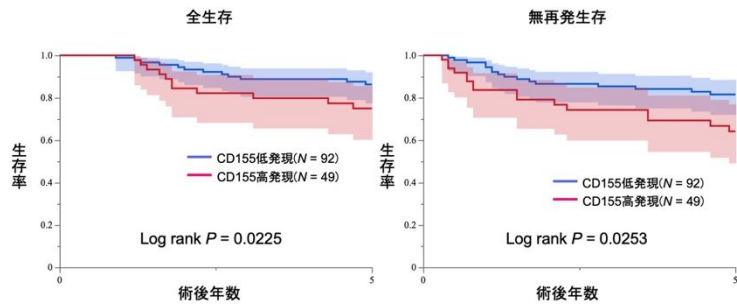


図 4

- (3) 以上、ヒト組織検体を用いた解析から、肺扁平上皮癌および EGFR 野生型肺腺癌において CD155 高発現は予後不良であり、CD155 発現が腫瘍細胞増殖に関与している可能性が示唆された。
- (4) 肺癌細胞株を用いて CD155、PD-L1、PD-L2 の mRNA 発現を半定量的 RT-PCR で、タンパク発現をフローサイトメトリーで測定した。mRNA 発現については、CD155 は H2228 で、PD-L1 は HCC4006 で、PD-L2 は H2228 で発現が高かった (図 5)。タンパク発現については、4 つの細胞株全てで CD155 発現は高かった (図 6)。EGFR 阻害剤投与による CD155 発現の変化を検討するために、細胞株 HCC4006 における定常時およびエルロチニブ投与時の CD155 発現をウェスタンブロットとフローサイトメトリーで調べた。エルロチニブ投与後 24h、48h で CD155 発現の低下を認めたと (図 7)。しかし、再現性が綺麗に取れず実験系確立に難渋し、十分な結果が得られず、断念した。

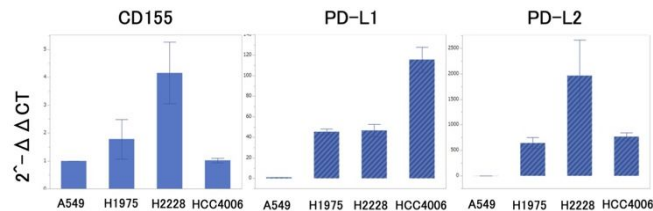


図 5

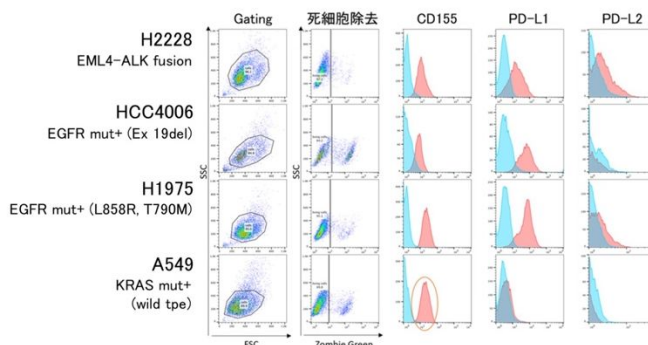


図 6

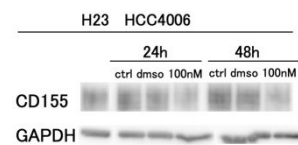


図 7

- (5) 以上から、非小細胞肺癌における CD155 発現の意義に関する解析までとなり、新規複合免疫療法開発に向けた検討までは実施できなかった。
- (6) 本研究から、非小細胞肺癌において CD155 発現は PD-L1 発現と関連があり、肺扁平上皮癌及び EGFR 野生型肺腺癌において CD155 高発現は予後不良因子であった。肺扁平上皮癌及び EGFR 野生型肺腺癌において、PD-1/PD-L1 及び CD155/TIGIT シグナル同時阻害の有効性を検証する価値があると思われ、今後の課題である。

(参考文献)

1. Borghaei H et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 1627-39.
2. Brahmer J et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 123-35.
3. Sacher AG et al. Biomarkers for the Clinical Use of PD-1/PD-L1 Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Review. *JAMA Oncol* 2016; 2: 1217-22.
4. Gao J et al. CD155, an onco-immunologic molecule in human tumors. *Cancer Sci* 2017; 108: 1934-8.
5. Inozume T et al. Melanoma Cells Control Anti-Melanoma CTL Responses via Interaction between TIGIT and CD155 in the Effector Phase. *J Invest Dermatol* 2015 (PMID 26458009).
6. Hung AL et al. TIGIT and PD-1 dual checkpoint blockade enhances antitumor immunity and survival in GBM. *Oncoimmunology* 2018; 7: e1466769.
7. Azuma K et al. Association of PD-L1 overexpression with activating EGFR mutations in surgically resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2014; 25: 1935-40.
8. Ota K et al. Induction of PD-L1 Expression by the EML4-ALK Oncoprotein and Downstream Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2015; 21: 4014-21.
9. Shibahara D et al. Intrinsic and Extrinsic Regulation of PD-L2 Expression in Oncogene-Driven Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* 2018; 13: 926-37.
10. Takada K et al. Clinical Significance of PD-L1 Protein Expression in Surgically Resected Primary Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2016; 11: 1879-90.
11. Takada K et al. The expression of PD-L1 protein as a prognostic factor in lung squamous cell carcinoma. *Lung Cancer* 2017; 104: 7-15.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高田和樹
2. 発表標題 肺扁平上皮癌切除検体におけるCD155発現解析
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高田和樹
2. 発表標題 肺扁平上皮癌におけるCD155発現の意義
3. 学会等名 第37回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥結華
2. 発表標題 肺腺癌切除症例におけるCD155発現の検討
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------