

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07387

研究課題名（和文）非小細胞肺癌における免疫化学併用療法の新規治療効果予測・標的因子の病理学的探索

研究課題名（英文）The exploration of a novel predictor of immune-checkpoint inhibitor treatment efficacy in non-small cell lung carcinoma

研究代表者

小山 涼子（齋藤涼子）（Saito-Koyama, Ryoko）

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：30733349

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）：肺扁平上皮癌において核異型、特に核形不整を示す形態学的要素がPD-L1発現予測因子になり得ること、核異型・PD-L1 high群の症例ではlow群に比してC10orf71, COL14A1の変異が多く見られることが明らかとなった。

免疫チェックポイント阻害薬単独療法の治療決定には腫瘍細胞のPD-L1発現が重要であるが、小検体では heterogeneityによりPD-L1偽陰性が起こり得る。適切な治療機会を逃さないために、核形不整の高度な肺扁平上皮癌ではPD-L1発現について十分な検討を行うべきであり、C10orf71, COL14A1の肺扁平上皮癌における機能解明により治療の発展が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核形不整の有無が免疫チェックポイント阻害薬の治療適応決定の一助となる可能性がある。また、C10orf71, COL14A1の肺SCCにおける機能を明らかにすることで治療の発展が期待される。例えば、治療感受性を低下させるC10orf71変異をターゲットとした治療の開発により、ICI+化学療法併用療法の治療効果を改善させることが可能になるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：This study reveals that nuclear shape irregularity-related factors represented by aspect ratio, circularity, roundness and solidity, are significantly associated with PD-L1 expression in lung squamous cell carcinoma (LUSQ). In addition, LUSQ cases with high PD-L1 expression and severe nuclear atypia demonstrate C10orf71 and COL14A1 mutations more frequently. Practically, immunohistochemical expression level of PD-L1 in tumor is the most important methods for the determination of immune-checkpoint inhibitor (ICI) treatment. However, tiny specimens can be falsely evaluated as negative due to the heterogeneity of PD-L1 expression. When LUSQ tumor cells show severe nuclear shape irregularity, even if the first examination resulted in PD-L1 expression negativity, it may be worthy trying another examination using other specimens. Furthermore, examination about the function of COL14A1 and C10orf71 will be required in order to elucidate the significance of these extracted factors in LUSQ.

研究分野：Pulmonary pathology

キーワード：肺癌 扁平上皮癌 核異型 PD-L1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

私は肺癌の病理診断に従事する中で、併用療法に対するさらなる治療効果予測因子が必要とされていることを実感していた。腫瘍の遺伝子検査がクローズアップされる昨今、そのコストの高さや煩雑性が問題となっているが、ターゲット遺伝子によっては免疫染色による簡便かつ低コストなスクリーニングが可能であり、病理組織学的検討が個別化医療に大きく貢献している。

さらに私は日々の病理診断業務の中で、非小細胞性肺癌において腫瘍細胞の核異型度が PD-L1 の発現と相関している可能性があることに着眼していた。そこで画像解析ソフトを用いて核異型の程度を数値化し予備検討を行ったところ、肺扁平上皮癌において核の面積、アスペクト比、円形度が PD-L1 発現と有意に強い相関を示すことを明らかにした。

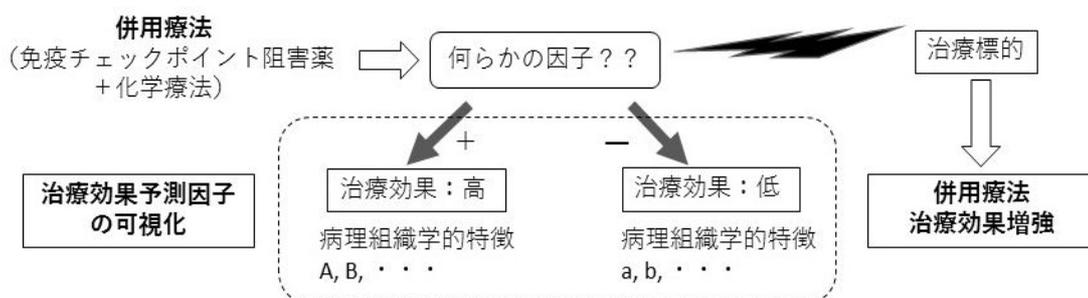
以上より、病理形態に基づく検討を多く経験し、併用療法の治療効果予測因子の動態を形態学的に捉えることは可能であり、これこそが病理医の役割であると着想するに至った。病理組織検査という簡便かつ汎用性を有する方法による治療予測により適切かつ迅速な治療選択が可能となり、併用療法感受性関連因子を標的とした治療を加えることでさらなる治療成績の向上が期待される。

2. 研究の目的

近年、肺癌領域においては分子標的治療薬の開発が飛躍的に進んでいるが、増殖シグナルの遺伝子異常を標的とした治療薬が適応となる症例は腺癌症例の約 60%に過ぎない。その他の腺癌および扁平上皮癌をはじめとする進行期の非小細胞肺癌症例では、初回治療として免疫チェックポイント阻害薬と化学療法の併用療法が推奨されている。この最新の現状を踏まえ、以下の2点を明らかにするために本研究を行った。

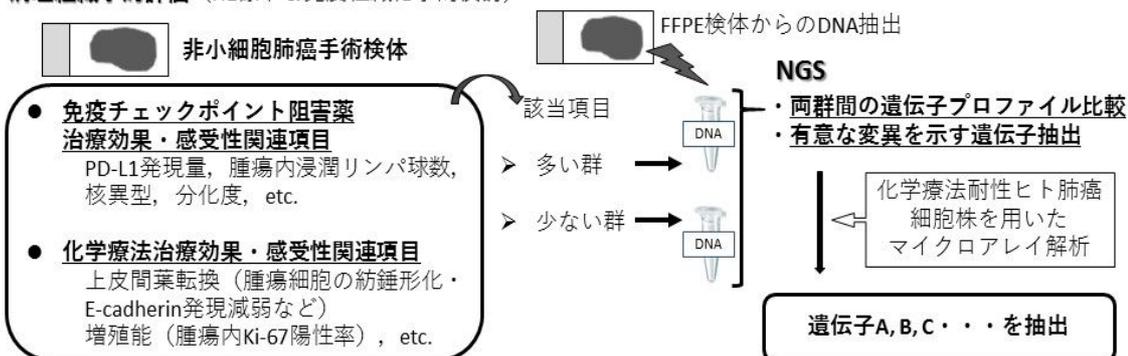
(1) 新規治療効果予測因子の同定およびそれらの病理組織学的可視化

(2) 併用療法の新規治療効果増大因子の同定



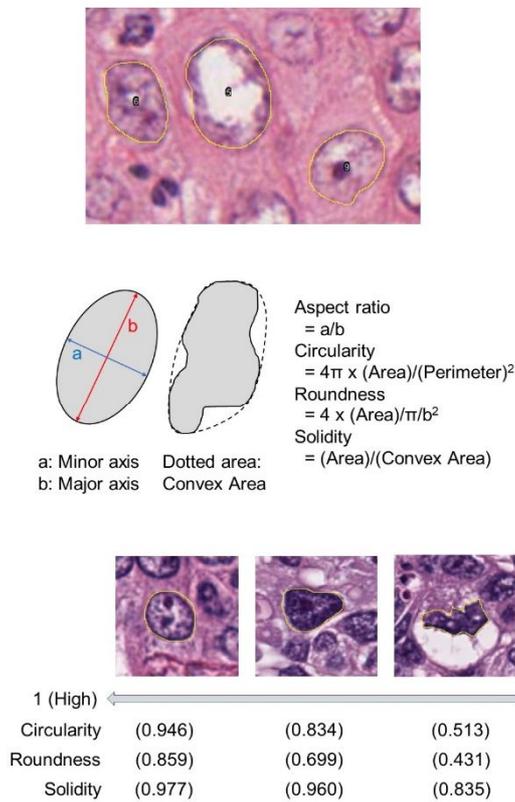
3. 研究の方法

病理組織学的評価 (HE標本 & 免疫組織化学的検討)

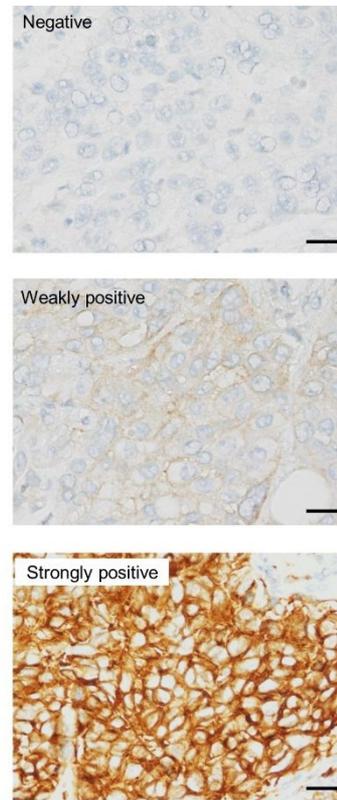


(1) 病理組織学的評価: 宮城県立がんセンター(MCC)にて外科的に切除された術前未治療の扁平上皮癌 30 例、TCGA に公開されている肺扁平上皮癌 95 例に対し、ImageJ software を用いた核異型パラメータ (Perimeter, Max diameter, Area, Aspect ratio, Solidity, Roundness) について評価を行った (図 1)。評価を行った 1 症例あたりの腫瘍細胞数は TCGA 症例: 20 個、MCC: 100 個である。PD-L1 発現量については、TCGA 症例については RNA-seq を用い、MCC 症例については免疫組織化学による検討を行った (図 2)。さらにこれらのパラメータについて非腫瘍性の扁平上皮化生 3 例を用い腫瘍細胞の比較を行った。

(図 1 : 核異型パラメータ測定方法)

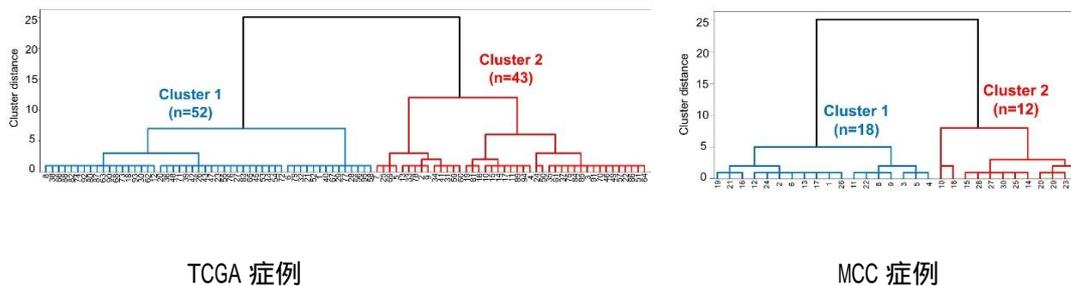


(図 2 : PD-L1 免疫組織化学)



(2) 新規治療効果関連因子の同定 : MCC 症例 30 例、TCGA 症例 95 例それぞれを ward 法によって「PD-L1 高発現かつ核形不整高度群」「PD-L1 低発現かつ核形不整軽度群」の二群に分類した(図 3)。MCC 症例の各群から 3 例ずつ計 6 例を選択し NGS による全エクソーム解析を行い、さらに TCGA 症例において二群間での遺伝子変異の比較を行った。

(図 3 : クラスタ解析)



4. 研究成果

(1) 表 1 に示す通り、核異型の中でも特に核形不整に関連する因子(aspect ratio, circularity, roundness and solidity) が異常であるほど PD-L1 の発現が高いことが明らかとなった。さらに、日常診療で用いられている免疫組織化学的な PD-L1 の評価方法とも有意な相関もしくは傾向を示すことが明らかとなり、臨床に資する結果が得られた。

さらに、MCC 症例における腫瘍細胞の aspect ratio, circularity, roundness and solidity はいずれも非腫瘍性扁平上皮化生細胞に比して有意に高度であることを確認した ($p = 0.018, 0.003, 0.006$ and 0.002)。

(2) MCC 症例、TCGA 症例いずれにおいても、PD-L1 高発現かつ核形不整高度群では *C10orf71*, *COL14A1* の変異が多いことが明らかとなった (図 4)

(表 1 : PD-L1 発現量と核異型パラメータの相関)

| | Cohort 1 (TCGA database) | | | Cohort 2 (MCC) | | |
|---------------------|--------------------------|-----------------|---------|----------------|----------------|---------|
| | PD-L1 RNA-seq | | p value | PD-L1 H-score | | p value |
| | Low (n=70) | High (n=25) | | Low (n=17) | High (n=13) | |
| Area | 6.294 ± 2.533 | 6.178 ± 2.729 | 0.848 | | | |
| Small | 42 (60) 0.0 | 15 (60) 0.0 | 1.00 | | | |
| Large | 28 (40) 0.0 | 10 (40) 0.0 | | | | |
| Perimeter | 2.591 ± 0.507 | 2.620 ± 0.591 | 0.815 | | | |
| Short | 41 (59) 0.6 | 13 (52) -0.6 | 0.569 | | | |
| Long | 29 (41) -0.6 | 12 (48) 0.6 | | | | |
| Max diameter | 2.762 ± 0.562 | 2.842 ± 0.591 | 0.545 | | | |
| Short | 40 (57) 0.8 | 12 (48) -0.8 | 0.430 | | | |
| Long | 30 (43) -0.8 | 13 (52) 0.8 | | | | |
| Aspect ratio | 1.661 ± 0.205 | 1.742 ± 0.212 | 0.095 | 1.525 ± 0.186 | 1.609 ± 0.170 | 0.216 |
| Low | 41 (59) 0.9 | 12 (48) -0.9 | 0.361 | 11 (65) 1.4 | 5 (38) -1.4 | 0.153 |
| High | 29 (41) -0.9 | 13 (52) 0.9 | | 6 (35) -1.4 | 8 (62) 1.4 | |
| Circularity | 0.821 ± 0.046 | 0.797 ± 0.048 | 0.037* | 0.741 ± 0.060 | 0.718 ± 0.057 | 0.295 |
| High | 40 (57) 1.8 | 9 (36) -1.8 | 0.069 | 12 (71) 2.2 | 4 (31) -2.2 | 0.030* |
| Low | 30 (43) -1.8 | 16 (64) 1.8 | | 5 (29) -2.2 | 9 (69) 2.2 | |
| Roundness | 0.640 ± 0.067 | 0.611 ± 0.060 | 0.058 | 0.703 ± 0.041 | 0.680 ± 0.056 | 0.212 |
| High | 40 (57) 1.8 | 9 (36) -1.8 | 0.069 | 12 (71) 2.2 | 4 (31) -2.2 | 0.030* |
| Low | 30 (43) -1.8 | 16 (64) 1.8 | | 5 (29) -2.2 | 9 (69) 2.2 | |
| Solidity | 0.947 ± 0.014 | 0.940 ± 0.019 | 0.060 | 0.960 ± 0.014 | 0.949 ± 0.017 | 0.077 |
| High | 41 (59) 1.6 | 10 (40) -1.6 | 0.110 | 14 (82) 2.5 | 5 (38) -2.5 | 0.013* |
| Low | 29 (41) -1.6 | 15 (60) 1.6 | | 3 (18) -2.5 | 8 (62) 2.5 | |

(図 4 : MCC 症例を用いた遺伝子変異解析)

| | | | Cluster 1 | Cluster 2 |
|-----------------|-----------|---------|-----------|-----------|
| C10orf71 | c.2365G>A | p.A789T | | |
| COL14A1 | c.2564C>T | p.P855L | | |
| LILRA4 | c.1436A>G | p.Q479R | | |
| MROH8 | unknown | unknown | | |
| UGT3A1 | c.1567A>T | p.T523S | | |

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 Saito-Koyama Ryoko, Tamai Keiichi, Yasuda Jun, Okamura Yasunobu, Yamazaki Yuto, Inoue Chihiro, Miki Yasuhiro, Abe Jiro, Oishi Hisashi, Sato Ikuro, Sasano Hironobu | 4. 巻 484 |
| 2. 論文標題 Morphometric analysis of nuclear shape irregularity as a novel predictor of programmed death-ligand 1 expression in lung squamous cell carcinoma | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Virchows Archiv | 6. 最初と最後の頁 609 ~ 620 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-023-03548-z | 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 齊藤 涼子 |
| 2. 発表標題 The exploration of significance of nucleus atypia as a predictor of immunotherapy in lung squamous cell carcinoma |
| 3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|----------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 齊藤 涼子 |
| 2. 発表標題 ヒト非小細胞肺癌細胞におけるPD-L1発現予測因子としての病理学的核形態の探索 |
| 3. 学会等名 第109回日本病理学会総会 |
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|