

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462144

研究課題名(和文)呼吸器悪性腫瘍における免疫チェックポイント分子の発現解析と臨床病理学的意義の解明

研究課題名(英文)Clinicopathological analysis of expression of immune checkpoint molecules in patient with resected lung cancer

研究代表者

竹之山 光広(Mitsuhiro, Takenoyama)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・呼吸器腫瘍科部長

研究者番号：10309966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：免疫チェックポイント阻害薬は、新たな免疫治療として進行肺癌の標準治療となってきたが、肺癌の微小環境における免疫チェックポイント分子PD-L1の意義を検討するため、同分子を分子標的薬のターゲットである癌遺伝子異常とともに、I期肺腺癌手術症例で解析したところ、PD-L1分子は32%に高発現を認め、EGFR変異陽性のない肺腺癌においてPD-L1発現が予後不良因子であった。またI期の中でも進行したIB期においてPD-L1発現が独立した予後不良因子であった。

研究成果の概要(英文)：A new immunological therapy using by immune checkpoint inhibitors has developed as a standard therapy against advanced non-small cell lung cancer recently. In this study, to elucidate the clinicopathological significance of PD-L1 expression in lung cancer tissues, its expression was analyzed together with oncogenic drivers such as EGFR and EML4-ALK in the resected specimens from patients with p-stage I adenocarcinoma. Higher expression of PD-L1 was found in 32% out of 228 patients. Low expression of PD-L1 is a poor prognostic marker in patients with EGFR wild type, and is an independent poor prognostic marker in patients with stage IB.

研究分野：呼吸器外科、胸部外科

キーワード：免疫チェックポイント 呼吸器悪性腫瘍 PD-1 driver mutation

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 肺癌における癌特異的免疫応答の検出

肺癌に対する特異的免疫応答の報告は少なく、肺癌の免疫原性が低いためと理解されていた。申請者らは、肺癌細胞株樹立と同一症例のリンパ球から構築した autologous の実験系を用いて、自己肺癌特異的な CTL (cytotoxic T lymphocyte) が誘導可能なことを見いだしてきた。通常の培養系では CTL の誘導は困難であるが、肺癌細胞株に T 細胞の共刺激分子である CD80 分子 (B7-1) を遺伝子移入することにより、多くの症例において自己腫瘍特異的 CTL の誘導が可能であった (Chest 122:282-8, 2002, Jpn J Cancer Res 92:309-5, 2001)。これらの CTL と cDNA 発現クローニング法により、肺癌においても変異抗原 (Int J Cancer 118:1992-71, 2006, J Immunol 172:4844-50, 2004)、癌精巢抗原 (Cancer Res 66:4922-8, 2006)、過剰発現抗原 (Clin Cancer Res 11:5265-72, 2005, Int J Cancer 120:1055-62, 2007, Cancer Sci 101:46-53, 2010) が存在し自己の CTL が認識する抗原として報告し、多くの肺癌症例において腫瘍抗原を認識する CTL 前駆細胞が存在することを証明してきた。

### (2) 肺癌の免疫逃避機構

これまでに 1150 例の肺癌切除症例の新鮮腫瘍組織から肺癌細胞株樹立を試み、このうち 32 例の肺癌細胞株を樹立した。その約半数に、HLA class I の haplotype loss や、細胞表面の HLA class I の欠失を認めた。Haplotype loss の肺癌細胞株に欠失した HLA class I を移入もしくは、tap 遺伝子異常を認めた株に正常の tap 遺伝子を移入することにより、class I の再構築が可能であり、再構築した HLA 拘束性に CTL の誘導が可能であることを示した (Cancer Res 65:5945-52, 2005, Cancer Sci 98:1795-802, 2007)。このことは、肺癌細胞は当初は in vivo で MHC class I を発現していたが、CTL の attack から逃避し、HLA haplotype loss や total loss といった腫瘍細胞の免疫逃避が起こった傍証と考えられる。

### (3) 免疫チェックポイント分子の阻害による新たな免疫治療

近年免疫チェックポイント分子の阻害を標的とした新たな免疫抗体療法では、肺癌でも驚くべき臨床効果が報告されている。細胞障害性 T 細胞抗原 4 (CTLA-4) は T 細胞の活性化で誘導される表面分子で、T 細胞の過剰な活性化を調整している。抗 CTLA-4 抗体である ipilimumab による未治療 IIIB/IV 期非小細胞肺癌を対象とした第 II 相試験では、ipilimumab とパクリタキセル/カルボプラチンの順次投与群において、有意な予後延長が報告された (J Clin Oncol 30:2046-54, 2012)。PD-1 (Programmed cell death-1) は、抗原提示細胞に発現する PD-1 リガンド (PD-L1, PD-L2) と結合することにより、抑制性シグナルが伝達されリンパ球の活性化状態を抑

制する。Topalian ら (N Engl J Med 366:2443-54, 2012) により、抗 PD-1 抗体単独療法として phase I 試験が行われ、非小細胞肺癌においては、76 例中 14 例 (18%) に奏功を示した。更に、腫瘍組織の PD-L1 の発現解析では、PD-L1 陰性であった 17 例では奏効率 0% に対し、PD-L1 陽性の 25 例中 9 例 (36%) に奏功が認められた。これらの結果は、腫瘍局所で抑制された抗腫瘍免疫応答の免疫抑制解除により、本来の生体防御機構が生じて臨床効果が得られていると考えられている。

本研究では、腫瘍局所における免疫チェックポイント分子の発現意義、EGFR 遺伝子変異、ALK 融合遺伝子をはじめとした driver mutation の発現と、免疫抑制分子の相関解析、臨床病理学的因子、無再発生存率、全生存率との相関を解析する。また、予後不良な呼吸器悪性腫瘍の微小環境における宿主側・腫瘍側の免疫制御に関わる分子と、肺癌の臨床病理学的特徴の相関を解明し、免疫逃避メカニズムの解明とそれに基づく治療法の開発につながると思われる。

## 2. 研究の目的

呼吸器悪性腫瘍の中で、肺癌、悪性胸膜中皮腫は、手術療法・化学療法・放射線療法をもってしても未だ予後不良の悪性腫瘍である。免疫療法は臨床評価に耐えうるだけの有効な治療効果を示せなかったが、近年、免疫チェックポイント分子の阻害を標的とした新たなアプローチによる免疫療法の有効性が報告され、腫瘍局所における免疫抑制の解除の重要性が認識されるようになった。本研究では、肺癌をはじめとした呼吸器悪性腫瘍の微小環境における宿主側・腫瘍側の免疫制御に関わる分子と、肺癌の治療ターゲットでありかつ治療予測因子である oncogenic driver をはじめとした臨床病理学的特徴との相関を解析することにより、免疫逃避メカニズムの解明とそれに基づく治療法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

当科で手術を施行した非小細胞肺癌病理病期 I 期完全切除例の内、解析可能であった 228 例を対象とした。oncogenic driver として、EGFR (direct sequence), K-ras (PCR-based RFLP), EML4-ALK (multiplex RT-PCR) の解析を行った。同症例で抗 PD-1 抗体 LS-B480 (Lifespan bioscience) で免疫組織化学染色を行い、発現強度および癌細胞での陽性率を評価し、高発現群と低発現群に分け、臨床病理学的因子、無再発生存率、全生存率との相関を解析した。

## 4. 研究成果

### 結果

228 例の内、EGFR 遺伝子変異陽性が 106 例 (46.5%)、K-ras 変異陽性 11 例 (4.8%)、ALK 融合遺伝子 41 例解析中 3 例 (7.3%) に認めら

れた。PD-L1 高発現を 73 例 (32%) み認め、PD-L1 の発現と臨床病理学的因子 (年齢、性別、oncogenic driver の発現、pT、喫煙歴、術式) との相関を検討したところ有意な差は認められなかったが、EGFR wild type 122 例においては、PD-L1 高発現を T1 症例に有意に多く認めた。病理病期 I 期全症例で、PD-L1 発現は全生存率 (OS) および無再発生存率 (DFS) と相関はなかったが、EGFR wild type 症例では PD-L1 低発現が有意に予後不良であった。また腫瘍サイズと PD-L1 の発現が逆相関を示した。Stage IB 症例における解析では PD-L1 低発現が独立した予後因子であった。

## 考察

肺癌細胞の PD-L1 発現と oncogenic driver との相関はなかったが、EGFR wild type 病理病期 I 期完全切除例という比較的均一な集団においては PD-L1 低発現が予後不良であった。さらに T2 では PD-L1 発現が低下していることより、比較的早期の方が免疫監視機構からエスケープした PD-L1 陽性細胞が多いが、その免疫寛容の中での腫瘍の進展には PD-L1 発現維持は必須でない可能性も考えられた。

特に病期 I 期の中でも進展した T2 症例 (IB 期) では PD-L1 高発現例が独立した予後良好因子であり、より癌特異的免疫応答の強さを反映しているのかもしれない。今後はさらに症例蓄積するとともに、再発症例における免疫チェックポイント阻害薬の効果も含めて評価が必要と思われる。

### 5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Hirai F, Takeyama M, Taguchi K, Toyozawa R, Inamasu E, Toyokawa G, Yoshida T, Shiraishi Y, Takenaka T, Yamaguchi M, Ushijima C, Seto T, Takeo S, Ichinose Y: Experience with erlotinib in lung adenocarcinoma harboring a coexisting KIF5B-RET fusion gene and EGFR mutation: report of a rare case. J Thorac Oncol. 査読有 9(5):e37-39,2014
2. Kohno M, Okamoto T, Suda K, Shimokawa M, Kitahara H, Shimamatsu S, Konishi H, Yoshida T, Takeyama M, Yano T, Maehara Y: Prognostic and therapeutic implications of aromatase expression in lung adenocarcinomas with EGFR mutations. Clin Cancer Res. 査読有 20(13):3613-3622,2014.
3. Toyokawa G, Hirai F, Inamasu E, Yoshida T, Nosaki K, Takenaka T, Yamaguchi M, Seto T, Takeyama M, Ichinose Y. Secondary Mutations at I1171 in the ALK Gene Confer Resistance to Both Crizotinib and Alectinib. J Thorac Oncol. 査読有 9(12):e86-87,2014.
4. Morodomi Y, Okamoto T, Takeyama M, Takada K, Katsura M, Suzuki Y, Fujishita T, Kitahara H, Shimamatsu S, Kohno M, Tagawa T, Okano S, Taguchi K, Ichinose Y, Maehara Y. Clinical significance of detecting somatic gene mutations in surgically resected adenosquamous cell carcinoma of the lung in Japanese patients. Ann Surg Oncol. 査読有 22(8):2593-2598,2015.
5. Takenaka T, Takeyama M, Yamaguchi M, Toyozawa R, Inamasu E, Kojo M, Toyokawa G, Yoshida T, Shiraishi Y, Morodomi Y, Hirai F, Taguchi K, Shimokawa M, Seto T, Ichinose Y. Impact of the epidermal growth factor receptor mutation status on the post-recurrence survival of patients with surgically resected non-small-cell lung cancer. Eur J Cardiothorac Surg. 査読有 47(3):550-555,2015.
6. Ohba T, Toyokawa G, Osoegawa A, Hirai F, Yamaguchi M, Taguchi K, Seto T, Takeyama M, Ichinose Y, Sugio K. Mutations of the EGFR, K-ras, EML4-ALK, and BRAF genes in resected pathological stage I lung adenocarcinoma. Surg Today. 査読有 46:1091-8, 2016.
7. Takenaka T, Inamasu E, Yoshida T, Toyokawa G, Nosaki K, Hirai F, Yamaguchi M, Seto T, Takeyama M, Ichinose Y. Post-recurrence survival of elderly patients 75 years of age or older with surgically resected non-small cell lung cancer. Surg Today. 査読有 46:430-6, 2016.
8. Yamaguchi M, Edagawa M, Suzuki Y, Toyozawa R, Hirai F, Nosaki K, Seto T, Takeyama M, Ichinose Y. Pulmonary resection for synchronous M1b-cstage IV non-small cell lung cancer patients. Ann Thorac Surg. 査読有 103(5):1594-1599,2016.
9. 竹之山光広, 一瀬幸人  
Current Organ Topics Thorax/Lung and Mediastinum: Pleura Cancer 肺癌 肺腺癌の T 因子 総括. 癌と化学療

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 稲益英子、豊澤亮、豊川剛二、白石祥理、竹中朋祐、平井文彦、山口正史、瀬戸貴司、竹之山光広、一瀬幸人：胸腔鏡下肺部分切除により c kit 遺伝子変異が確認された胸腺癌の一例。第 37 回日本呼吸器内視鏡学会，京都，2014 年 4 月 14-15 日。
2. 稲益 英子、吉田 月久、豊川 剛二、野崎 要、竹中 朋祐、平井 文彦、山口 正史、瀬戸 貴司、竹之山 光広、一瀬 幸人：遺伝子変異検索を目的とした手術の検討。第 31 回日本呼吸器外科学会，東京，2014 年 5 月 29-30 日
3. 竹中 朋祐、稲益 英子、吉田 月久、豊川 剛二、野崎 要、平井 文彦、山口 正史、瀬戸 貴司、竹之山 光広、一瀬 幸人：75 歳以上高齢者非小細胞肺癌術後再発症例の治療成績。第 31 回日本呼吸器外科学会，東京，2014 年 5 月 29-30 日
4. 豊川剛二、稲益栄子、吉田月久、野崎要、竹中朋祐、平井文彦、山口正史、瀬戸貴司、竹之山光広、一瀬幸人：ALK 阻害剤に対する耐性獲得症例の検討。第 55 回日本肺癌学会総会，京都，2014 年 11 月 14-16 日
5. 諸富洋介、岡本龍郎、高田和樹、桂正和、鈴木雄三、藤下卓才、北原大和、島松晋一郎、田川哲三、岡野慎士、田口健一、竹之山光広、一瀬幸人、前原喜彦：悪性胸膜中皮腫における線溶系分子の発現と臨床病理学的因子に関する検討。第 55 回日本肺癌学会総会，京都，2014 年 11 月 14-16 日
6. 和田龍昇、淵脇菜保子、中村由美子、植村直美、沖山倫子、川上恵子、荒巻聖、花田博文、勝木成将、中村弘子、矢野智英、佐藤孝光、宅間奈緒美、北里謙二、田口健一、末廣陽子、竹之山光広、一瀬幸人、江崎泰斗：当院における免疫細胞療法（先進医療 B）を円滑に遂行するための多職種医療チームの構築。第 70 回国立病院総合医学会，沖縄，平成 28 年 11 月 11-12 日
7. 枝川真、鈴木雄三、島松晋一郎、豊澤亮、野崎要、平井文彦、山口正史、瀬戸貴司、竹之山光広、一瀬幸人：当院での Nivolumab による治療症例の検討。第 57 回日本肺癌学会学術集会，福岡，平成 28 年 12 月 19-21 日

8. 原武直紀、枝川真、島松晋一郎、豊澤亮、平井文彦、野崎要、山口正史、瀬戸貴司、竹之山光広、一瀬幸人：ニボルマブの投与後の無治療経過観察中に、長期の病状安定が得られた肺癌の一例。第 57 回日本肺癌学会九州支部学術集会，鹿児島，平成 29 年 2 月 24-25 日

9. 島松晋一郎、山口正史、枝川真、豊澤亮、野崎要、平井文彦、瀬戸貴司、竹之山光広、一瀬幸人：Nivolumab 投与で特異な免疫関連有害事象を示した肺癌 2 症例。第 57 回日本肺癌学会九州支部学術集会，鹿児島，平成 29 年 2 月 24-25 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹之山 光広 (Mitsuhiro Takenoyama)  
国立病院機構九州がんセンター  
臨床研究センター 呼吸器腫瘍科部長  
研究者番号：10309966

(2)研究分担者

一瀬 幸人 (Yukito Ichinose)  
国立病院機構九州がんセンター  
臨床研究センター 腫瘍情報研究部長  
研究者番号：00450940

(3)研究分担者

豊川 剛二 (Gouji Toyokawa)  
九州大学  
医学研究室 助教  
研究者番号：30627261