

多発肺がん検体を用いた腫瘍周囲免疫環境と 環境因子や遺伝子変異との関係性についての検討

大阪市立大学大学院医学研究科 呼吸器内科学
泉 源浩

1.緒言

近年、免疫療法の発展に伴い肺がんの予後の改善を認めている。PD-L1 発現割合は免疫療法の効果予測因子の一つと考えられているが、完全なバイオマーカーとはいえず、腫瘍浸潤リンパ球や制御性 T 細胞などが免疫療法の治療効果に影響していることが報告されている¹⁾。喫煙は肺がんの主要な原因であり、喫煙と PD-L1 発現の関連性が示唆されているが、一定の見解を得られていない²⁾。近年肺がんの発生に関わる様々なドライバー遺伝子が明らかになっている。EGFR 遺伝子変異陽性肺癌は免疫チェックポイント阻害剤の効果が乏しいとされている³⁾。STK11 や KEAP1 遺伝子の存在は免疫療法不応の要因となり、遺伝子変異も腫瘍免疫に関与している。さらに組織学的サブタイプによって腫瘍周囲微小免疫環境が異なることが報告されている⁴⁾。異なる患者間では免疫応答など全身の免疫状態および発癌リスク因子が異なり、喫煙などの環境因子、遺伝子変異、組織型など複数の因子が、様々な免疫関連細胞で構成される腫瘍周囲微小免疫環境に与える影響を証明することは困難である。本研究では同一背景下で発生した多発肺癌に着目した。特定の環境因子によって多発病変に同様の腫瘍免疫の変化を起こすのか、遺伝子プロファイルや組織学的サブタイプの違いによって同一症例であっても異なる腫瘍周囲微小免疫環境を示すのかを検討した。

2.方法

2007年5月～2019年3月に大阪市立大学医学部附属病院で外科的切除された肺癌症例の中から、呼吸器内科、呼吸器外科および放射線科で構成されるカンサーボードにて、臨床経過、画像所見、病理所見をもとに多発肺がんとして診断された症例を対象とした。PD-L1 抗体 (clone 28-8, ab205921; Abcam) を用いて腫瘍細胞における PD-L1 発現、腫瘍内および腫瘍周囲間質における免疫細胞の PD-L1 発現割合を評価した。また腫瘍浸潤リンパ球を評価するため CD3 抗体 (clone F7.2.38; Agilent Technologies)、CD8 抗体 (clone C8/144B; Agilent Technologies)、FOXP3 抗体 (clone 236A/E7; Abcam) を用いて免疫染色を行った。組織学的サブタイプによって非浸潤部 (上皮内腺癌、微小浸潤性腺癌、置換型腺癌) と浸潤部 (その

他の腺房型腺癌、乳頭型腺癌、充実型腺癌、腺扁平上皮癌、扁平上皮癌など) にわけ、それぞれランダムに 4 か所ずつ腫瘍浸潤リンパ球をカウントした。カットオフ値は過去の報告⁴⁾をもとに図 1 のように定義した。

FFPE 検体から DNA を抽出し、シーケンス解析可能な検体に対して、409 遺伝子を対象とした Comprehensive Cancer Panel を用いて次世代シーケンサー (Ion Gene Studio S5) で網羅的遺伝子変異解析を行った。シーケンス解析不可検体のうち、臨床でコバス EGFR 変異検出キット v2 を用いて EGFR 変異検索を行った病変も解析対象とした。背景因子(年齢、性別、喫煙)、遺伝子プロファイル、病理学的サブタイプが腫瘍周囲微小免疫環境 (PD-L1 発現、CD3 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、FOXP3 陽性 T 細胞) に与える影響についてカイ 2 乗検定を用いて統計学的に解析した。P 値が 0.05 未満を統計学的有意と定義した。

<図 1 >

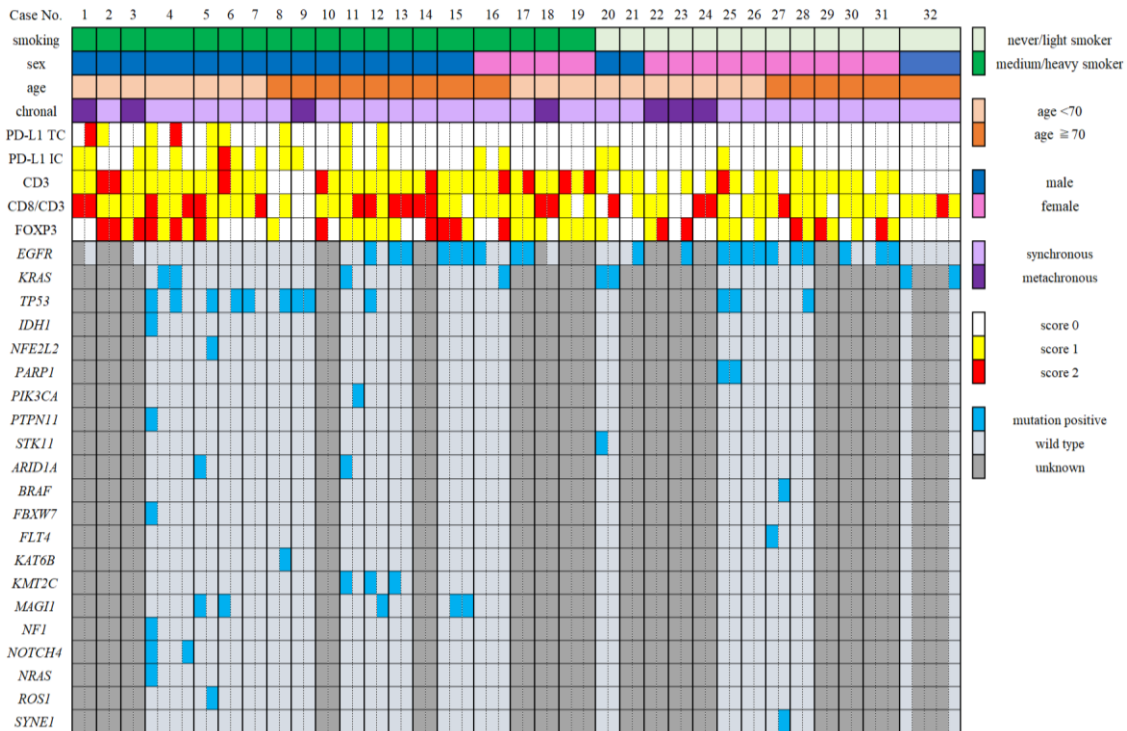
	PD-L1 in TCs (%)	PD-L1 in ICs (%)	CD3-positive TILs (cells/HPF)	CD8/CD3 ratio (%)	FOXP3-positive TILs (cells/HPF)
0	< 1	< 1	< 50	< 40	< 10
1	1 - 49	1 - 9	50 - 149	40 - 60	10 - 19
2	≥ 50	≥ 10	≥ 150	> 60	≥ 20

TCs, tumour cells; ICs immune cells; TILs, Tumour infiltrating lymphocytes

3.結果

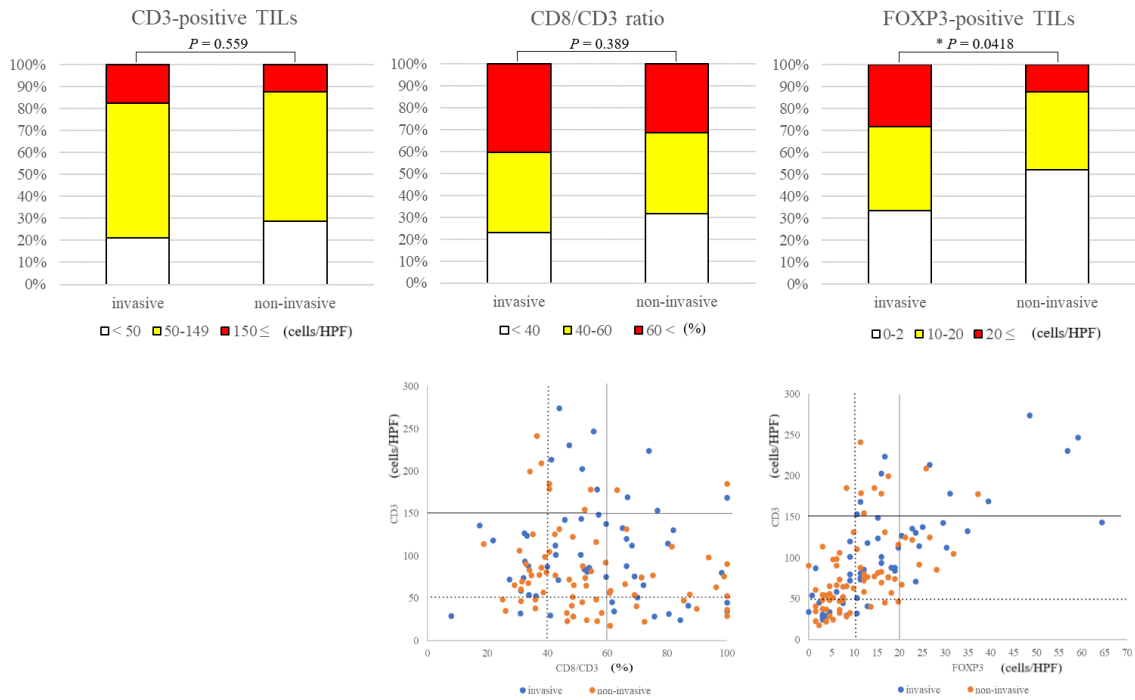
34 症例 78 病変が多発肺がんと診断され外科的切除された。腫瘍割合がごく少量の検体を除外し、32 症例 73 病変に対して免疫染色による腫瘍周囲微小免疫環境の評価が可能であった。腫瘍割合が 10%以上の FFPE 検体から DNA を抽出後、DNA 分解度を確認し、解析可能な 17 症例 38 病変に対して次世代シーケンサーによる遺伝子変異解析を行った。各症例の背景因子、スコアリング結果および遺伝子プロファイルを図 2 に示す。

< 図 2 >



腫瘍細胞の PD-L1 発現陽性が 9 病変 (12.3%)、多発病変間の PD-L1 発現一致率は 75.0% であり、同時性多発肺がんとは異時性多発肺がんでは一致率に有意差を認めなかった。PD-L1 陽性腫瘍細胞は男性、既喫煙者で有意に多く認めた (性別; $P = 0.0082$ 、喫煙; $P = 0.0086$)。腫瘍細胞および免疫細胞の PD-L1 陽性の頻度は EGFR 変異陽性の方が野生型より有意に低かった (腫瘍細胞; $P = 0.0017$ 、免疫細胞; $P = 0.038$)。KRAS 変異や TP53 変異と腫瘍免疫の間に関係性を認めなかった。同一症例に発生した多発病変のうち、片方の腫瘍が EGFR 変異陽性、もう一方の腫瘍は EGFR 野生型の症例は、EGFR 陽性肺癌は PD-L1 陰性、EGFR 野生型肺癌は PD-L1 陽性であった。また片方が KRAS 変異のみ陽性でもう一方が KRAS および TP53 が共同変異を起こしている症例 (Case 4)、片方が KRAS 変異のみ陽性でもう一方が KRAS および STK11 が共同変異を起こしている症例 (Case 20) では、同一症例における多発病変間で異なる腫瘍周囲微小免疫環境を示した。病理学的サブタイプにおいて、浸潤部の方が非浸潤部より FOXP3 陽性 T 細胞が有意に多く、CD3 陽性 T 細胞や CD8/CD3 比に有意な関係性を認めなかった (図 3)。

< 図 3 >



4. 考察

本研究は多発肺がんにおける腫瘍周囲微小免疫環境を比較することで、性別や喫煙状況が PD-L1 発現に影響し、遺伝子プロファイルや組織学的サブタイプに違いによって同一個人内であっても異なる腫瘍周囲微小免疫環境を示すことを明らかにした。本研究では中～重喫煙者で PD-L1 発現陽性腫瘍の頻度が高かったが、同一症例におけるすべての多発病変で PD-L1 陽性の症例はなく、喫煙による PD-L1 発現への影響は不均一であると考えられた。実臨床では、EGFR 変異陽性肺癌は PD-L1 発現の頻度が低く、免疫療法の効果が期待できないことが示されている。本研究において EGFR 変異陽性肺癌すべてが PD-L1 発現陰性であった。同一症例の同一肺区域内に EGFR 変異陽性と陰性の 2 つの腫瘍が隣接して発生した症例で、PD-L1 発現に違いがあったことから、EGFR 変異は単独の変異で PD-L1 発現に大きく影響することを証明した。KRAS 変異は共同変異によって腫瘍免疫が異なり、KRAS と STK11 の共同変異では CD3 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の浸潤が少なく免疫療法抵抗性を示し、一方、KRAS 異と TP53 の共同変異では PD-L1 発現割合が高く、CD3 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の浸潤が多いことが報告されている^{5),6)}。本研究では KRAS 変異や TP53 変異に関して、単独の変異では腫瘍周囲微小免疫環境との関係性を認めなかったが、KRAS 変異のみと KRAS と STK11 の共同変異の多発肺がん症例、KRAS 変異のみと KRAS と TP53 の共同変異の多発肺がん症例では異なる腫瘍周囲微小免疫環境を示した。過去の報告とも一致し、免疫療法の効果予測のために遺伝子プロファイルの重要性が示唆された。肺腺癌は組織学的サブタイプによって予後が異なり、置換型は低グレード、腺房型や乳頭型、充実型

などは高グレードに分けられる。本研究で組織学的サブタイプによって浸潤部と非浸潤部にわけて解析したところ、浸潤部で FOXP3 陽性細胞が多かったことから、予後の違いや免疫療法の効果の不均一性に関与する可能性が考えられた。本研究の limitation としてサンプルサイズが小さいこと、レトロスペクティブ研究であることなどが挙げられ、今後さらなる検討が必要である。

5.結語

多発肺がんの腫瘍周囲微小免疫環境を評価し、喫煙と性別は PD-L1 発現へ関与し、遺伝子変異プロファイルは免疫療法の効果予測のために重要であることが示唆された。組織学的サブタイプによる制御性 T 細胞数の違いが免疫療法の効果に影響する可能性が示された。

6.文献

- 1) Kim H, Kwon HJ, Han YB, et al. Increased CD3+ T cells with a low FOXP3+/CD8+ T cell ratio can predict anti-PD-1 therapeutic response in non-small cell lung cancer patients. *Mod Pathol* 2019;32(3):367-75.
- 2) Norum J, Nieder C. Tobacco smoking and cessation and PD-L1 inhibitors in non-small cell lung cancer (NSCLC): a review of the literature. *ESMO Open* 2018;3(6):e000406.
- 3) Dong ZY, Zhang JT, Liu SY, et al. EGFR mutation correlates with uninflamed phenotype and weak immunogenicity, causing impaired response to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* 2017;6(11):e1356145.
- 4) Kurebayashi Y, Emoto K, Hayashi Y, et al. Comprehensive Immune Profiling of Lung Adenocarcinomas Reveals Four Immunotypes with Plasma Cell Subtype a Negative Indicator. *Cancer Immunol Res* 2016;4(3):234-47.
- 5) Skoulidis F, Byers LA, Diao L, et al. Co-occurring genomic alterations define major subsets of KRAS-mutant lung adenocarcinoma with distinct biology, immune profiles, and therapeutic vulnerabilities. *Cancer Discov* 2015;5(8):860-77.
- 6) Skoulidis F, Goldberg ME, Greenawalt DM, et al. STK11/LKB1 Mutations and PD-1 Inhibitor Resistance in KRAS-Mutant Lung Adenocarcinoma. *Cancer Discov* 2018;8(7):822-35.