

進行・再発非小細胞肺癌において腫瘍微小環境と免疫チェックポイント阻害剤による治療効果との関連性を検討する多施設後向き観察研究

大阪市立大学大学院医学研究科 呼吸器内科学
中濱 賢治

1. 諸言

肺癌は本邦で最も死亡者数が多い癌であり、特に進行期肺癌患者の予後は不良で、長期生存の指標となる5年生存率は非小細胞肺癌で約5%、小細胞肺癌で約3%と著しく低かったと報告されている¹⁾。近年、免疫チェックポイント阻害剤（immune-checkpoint inhibitor：ICI）が登場し、従来の殺細胞性抗がん剤と比較して生存期間の延長が得られるようになった。一部の患者では奏効が持続し長期生存が得られる患者の割合が増加しており、特にprogrammed death ligand 1（PD-L1）が強陽性を示す患者では5年生存率が23%であったとの報告がある²⁾。また、化学療法と併用することにより、さらなる生存期間の延長が期待されている³⁾。ただし、ICIの恩恵を受ける患者は一部であり、依然として長期生存を達成できる割合は限られている。

治療前にICIの効果を予測するためのマーカーとして、PD-L1の免疫染色が実臨床で最も用いられているが、その予測精度は十分ではなく、PD-L1発現が強陽性の患者で奏効が得られないこともあれば、PD-L1発現が陰性の患者で奏効が得られることもある。

現在主に使用されているICIは、PD-1/PD-L1経路を阻害することによって、抑制されたT細胞を活性化し、抗腫瘍効果を得るものである。しかし、抗腫瘍免疫にはPD-1/PD-L1だけでなく、様々な因子が影響していることが報告されている。

たとえば、腫瘍微小環境においては血管新生が腫瘍の進行に重要であることが報告されており、血管新生を阻害する薬剤が開発されている⁴⁾。血管新生にはvascular endothelial growth factor（VEGF）およびvascular endothelial growth factor receptor（VEGFR）経路が重要であり、それらをターゲットとした薬剤はICIと相乗効果をもたらす可能性があると考えられている。

また、非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer：NSCLC）において主に腺癌のマーカーとして臨床でよく用いられるTTF-1は、腫瘍免疫との関連性も示唆されているが⁵⁾、実際に臨床でICIによる治療成績との相関を詳しく解析・報告したものはいまだにない。

また、抗PD-L1抗体としては現在22C3とSP142の二つの抗体がコンパニオン新薬と

して承認されているが、それらの抗体による免疫染色の結果は必ずしも一致しないことが報告されている⁶⁾。その結果の差異が、ICI による治療効果とどのように関連するかは不明である。

ICI の効果予測精度を向上させることは臨床での治療選択において非常に重要であり、ICI の効果に影響を与える因子を明らかにすることは肺癌における将来の治療戦略を発展させる上でも重要である。

本研究では、腫瘍微小環境に関係するとされている VEGFR2 と TTF-1 について、その発現が ICI の治療効果と関連するかを解析した。また、2 種類の PD-L1 抗体である 22C3 と SP142 を用いて免疫染色を行い、治療効果との関連性を評価した。

2.方法

2015 年 12 月 17 日～2020 年 7 月 31 日の期間に、大阪市立大学医学部附属病院呼吸器内科、石切生喜病院呼吸器内科、ベルランド総合病院呼吸器内科において進行・再発肺癌に対して免疫チェックポイント阻害剤を投与された患者について、既存の肺癌組織検体を用いて組織マイクロアレイを作成する。作成した組織マイクロアレイ (tissue microarray : TMA) を用いて、VEGFR2、22C3、SP142 の発現を免疫染色で評価した。免疫染色の結果から各蛋白の発現の有無を判定し、治療効果を含めた臨床情報との関連性について検討を行った。

2.1 TMA の作成について

フナコシ社の手動マイクロアレイを用いて、各症例のホルマリン固定・パラフィン包埋組織 (FFPE) から代表的な部位を径 2 mm コアで抽出し、レシピエントブロックに埋め込むことで作成し、計 10 ブロックを作成した。

2.2 免疫染色および結果の判定について

VEGFR2 の染色には Abcam 社の抗 VEGFR2 抗体を用いた (polyclonal, ab2349, 1:200; Abcam, Cambridge, UK, RRID: AB_302998)。VEGFR2 の発現については腫瘍細胞、免疫細胞をそれぞれ分けて評価し、「TC-VEGFR2」「IC-VEGFR2」として評価した。それぞれ、1 つでも陽性細胞を認めた場合に「陽性」と定義した。抗 PD-L1 抗体である 22C3 (Merck; Kenilworth, NJ, US) と SP142 (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA) を用いて、定められた方法に従って染色・判定を行った。22C3 の評価方法としては、腫瘍細胞のうち染色されている細胞の割合を tumor proportion score (TPS) として測定し、TMA 検体を用いた場合の結果を「22C3(TMA)」と表記した。22C3 については、臨床において報告されている結果も収集し、TPS の結果を「22C3(C)」と表記した。SP142 は、腫瘍細胞の染色されている割合が 50%以上であれば TC3、5%以上であれば TC2、1%以上であれば TC1、1%未満であれば TC0、免疫細胞の染色されている割合が 10%以上であれば IC3、5%以上であれば IC2、

1%以上であれば IC0、1%未満であれば IC0 と判定した。TTF-1 については、臨床の病理報告書から結果を収集し、TTF-1 の染色が確認された旨の記載をもって陽性と判定した。

2.3 解析方法

それぞれの蛋白の発現結果を、ICI の治療成績との関連性について比較した。無増悪生存期間（progression-free survival：PFS）は、ICI 投与開始から腫瘍増悪もしくは死亡までの日数とし、全生存期間（overall survival：OS）は、ICI 投与開始日からあらゆる理由による死亡日と定義した。奏効率（objective response rate：ORR）は、RECIST ver1.1 に従って判定した。患者背景や ORR のようなカテゴリカル変数の比較には Fisher の直接検定を、生存曲線の記載には Kaplan-Meier 法を、生存期間の比較には log-rank 法を用いた。多変量解析には Cox の比例ハザード法を用いた。P<0.05 をもって有意と判定した。

3.結果

3.1 VEGFR2 の発現と ICI との関連性について

ICI 治療を受けた NSCLC 患者で、VEGFR2 の免疫染色が評価可能であった 364 人が対象となった。10%が IC-VEGFR2 陽性であり、45%が TC-VEGFR2 陽性であった（表 1）。

表 1 VEGFR2 発現状態別の患者背景

		VEGFR2 positive in immune cells (n=37)	VEGFR2 negative in immune cells (n=327)	VEGFR2 positive in tumor cells (n=165)	VEGFR2 negative in tumor cells (n=199)
Age	Median (range)	72 (33-84)	71 (38-90)	72 (33-87)	71 (38-90)
Sex	Male	27 (73)	251 (77)	123 (75)	155 (78)
	Female	10 (27)	76 (23)	42 (25)	44 (22)
Smoking status	Current or former smoker	34 (92)	277 (85)	141 (85)	170 (85)
	Never smoker	3 (8)	46 (14)	23 (14)	26 (13)
	Unknown	0 (0)	4 (1)	1 (1)	3 (2)
ECOG PS	0 - 1	30 (81)	274 (84)	137 (83)	167 (84)
	≥2	7 (19)	53 (16)	28 (17)	32 (16)
TNM Stage	Stage III	10 (27)	70 (21)	35 (21)	45 (23)
	Stage IV or recurrent	27 (73)	257 (79)	130 (79)	154 (77)
Histological type	Adenocarcinoma	18 (49)	187 (57)	88 (53)	117 (59)
	Squamous cell carcinoma	13 (35)	113 (35)	62 (38)	64 (32)

	Other	6 (16)	27 (8)	15 (9)	18 (9)
EGFR mutation status	Wild type	27 (73)	198 (61)	106 (64)	119 (60)
	Mutant	0 (0)	20 (6)	4 (2)	16 (8)
	Unknown	10 (27)	109 (33)	55 (33)	64 (32)
Treatment	ICI monotherapy	30 (81)	234 (72)	108 (65)	156 (78)
	ICI concurrent with chemotherapy	7 (19)	93 (28)	57 (35)	43 (22)
Anti-angiogenic agents	Administered in any treatment period	7 (19)	86 (26)	30 (18)	63 (32)
	No use in any treatment period	30 (81)	241 (74)	135 (82)	136 (68)
ICI administration line	1	19 (51)	188 (57)	110 (67)	97 (49)
	≥2	18 (49)	139 (43)	55 (33)	102 (51)
TPS of PD-L1	<1%	4 (11)	56 (17)	26 (16)	34 (17)
	≥1%	29 (78)	216 (66)	122 (74)	123 (62)
	Unknown	4 (11)	55 (17)	17 (10)	42 (21)
VEGFR2 in immune cells	Positive	37 (100)	0 (0)	31 (19)	6 (3)
	Negative	0 (0)	327 (100)	134 (81)	193 (97)
VEGFR2 in tumor cells	Positive	31 (84)	134 (41)	165 (100)	0 (0)
	Negative	6 (16)	193 (59)	0 (0)	199 (100)

IC-VEGFR2(+)群は、IC-VEGFR2(-)群と比較して有意に ICI 単剤療法による奏効率が低い結果であった（10% vs 30%、 $p=0.028$ ）（図 1）。

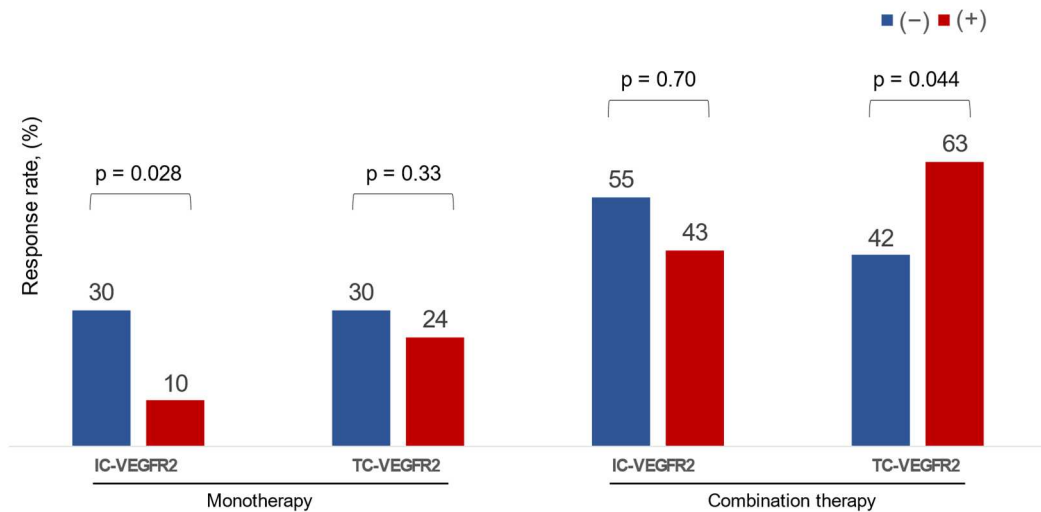


図 1 VEGFR2 発現状態別奏効率

IC-VEGFR2(+)群は、IC-VEGFR2(-)群と比較して有意にICI 単剤療法の PFS と OS が不良であった（2.2 vs 3.7 カ月、 $p=0.012$ 、7.9 vs 17.0 カ月、 $p=0.049$ ）（図 2）。

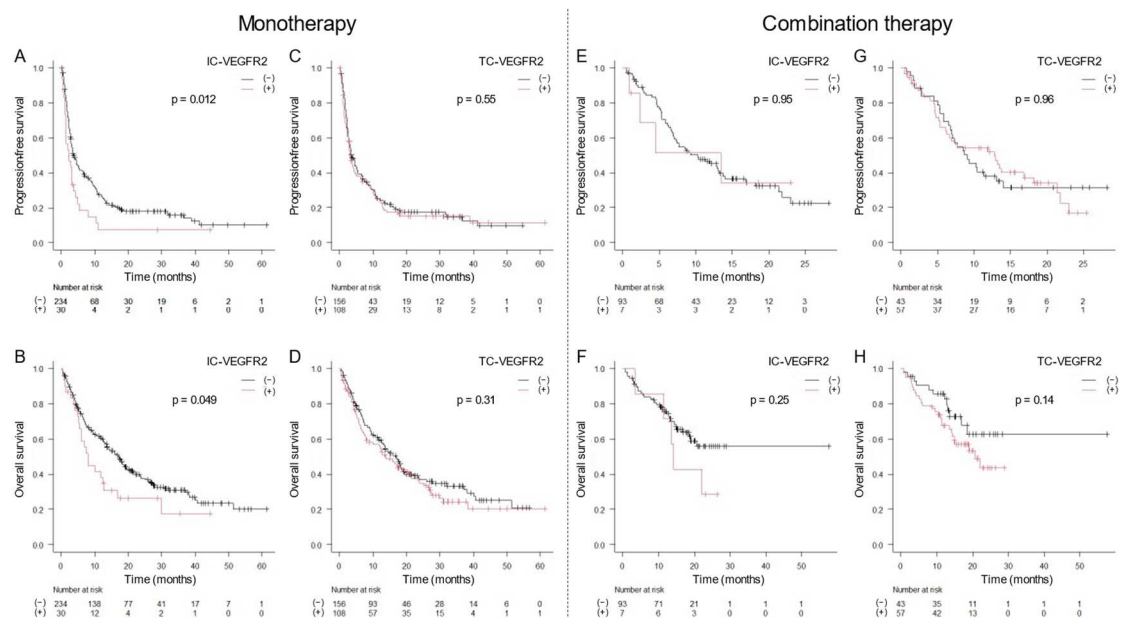


図 2 VEGFR2 発現状態別 PFS・OS

3.2 TTF-1 発現と ICI 治療効果の関連性について

表 2 は患者背景である。TTF-1 と PD-L1（臨床での結果）が確認可能であった肺腺癌患

者で、ICI 単剤療法を受けた 108 例が対象となった。83 人 (77%) が TTF-1 陽性であった。TTF-1 陽性群は、陰性群と比較して有意に PD-L1-TPS $\geq 1\%$ 、 $\geq 50\%$ の割合が多かった (88% vs 60%、 $p=0.003$ 、65% vs 24%、 $p<0.001$)。

表 2 TTF-1 発現状態別の患者背景

		TTF-1 positive (n=83)	TTF-1 negative (n=25)
Age	Median (range)	73 (33-87)	70 (52-84)
Sex	Male	60 (72)	14 (56)
	Female	23 (28)	11 (44)
Smoking status	Current or former smoker	70 (85)	16 (67)
	Never smoker	12 (15)	8 (33)
	Unknown	1 (1)	1 (4)
ECOG performance status score	0 - 1	65 (78)	20 (80)
	2 $\leq$	18 (22)	5 (20)
Stage	Stage III	17 (20)	0 (0)
	Stage IV	59 (71)	22 (88)
	Postoperative recurrence	5 (6)	3 (12)
	Post-radiotherapy recurrence	2 (2)	0 (0)
EGFR mutation status	Wild-type	73 (88)	21 (84)
	Mutant	8 (10)	4 (16)
	Unknown	2 (2)	0 (0)
Type of ICI	Pembrolizumab	67 (81)	11 (44)
	Nivolumab	6 (7)	7 (28)
	Atezolizumab	10 (12)	7 (28)
ICI administration line	1	49 (59)	6 (24)
	2	22 (27)	10 (40)
	3 $\leq$	12 (14)	9 (36)
PD-L1 tumor proportion score	$\geq 1\%$	73 (88)	15 (60)
	$<1\%$	10 (12)	10 (40)

	≥50%	54 (65)	6 (24)
	<50%	29 (35)	19 (76)

図 3 に TTF-1 発現と奏効率の関係を示す。TTF-1 陽性群は、TTF-1 陰性群と比較して有意に ICI 単剤療法の奏効率が高い結果であった（38% vs 8%、 $p=0.003$ ）。

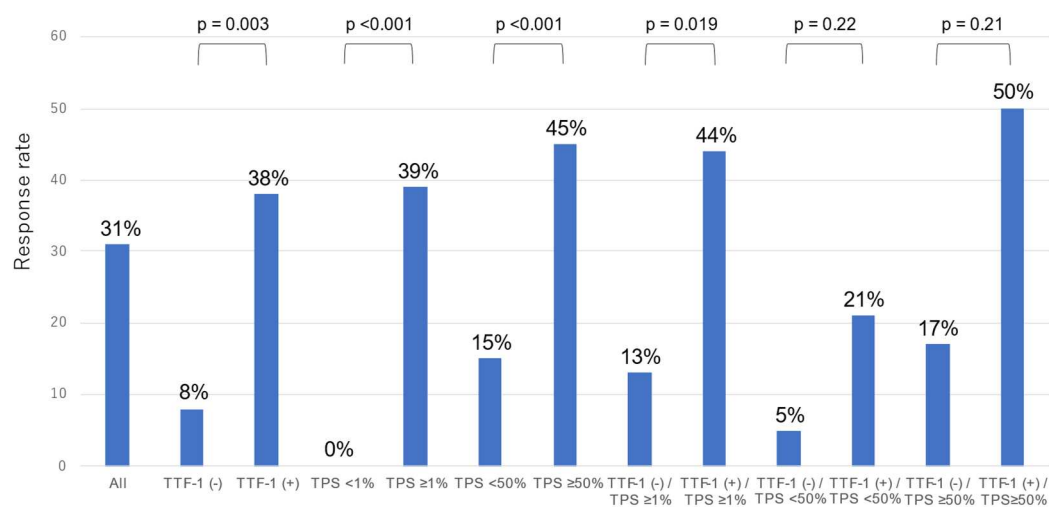


図 3 TTF-1 と PD-L1 の発現状態別奏効率

図 4 は、TTF-1 の発現別に PFS と OS を比較したものである。TTF-1 陽性群は、TTF-1 陰性群と比較して有意に PFS、OS が良好であった（5.4 vs 1.6 カ月、 $p<0.001$ 、18.9 vs 8.0 カ月、 $p=0.005$ ）。

また、PD-L1 TPS ≥50%に限った集団においても、TTF-1 陽性群は TTF-1 陰性群と比較して有意に PFS が良好であった（8.4 vs 2.3 カ月、 $p=0.012$ ）。

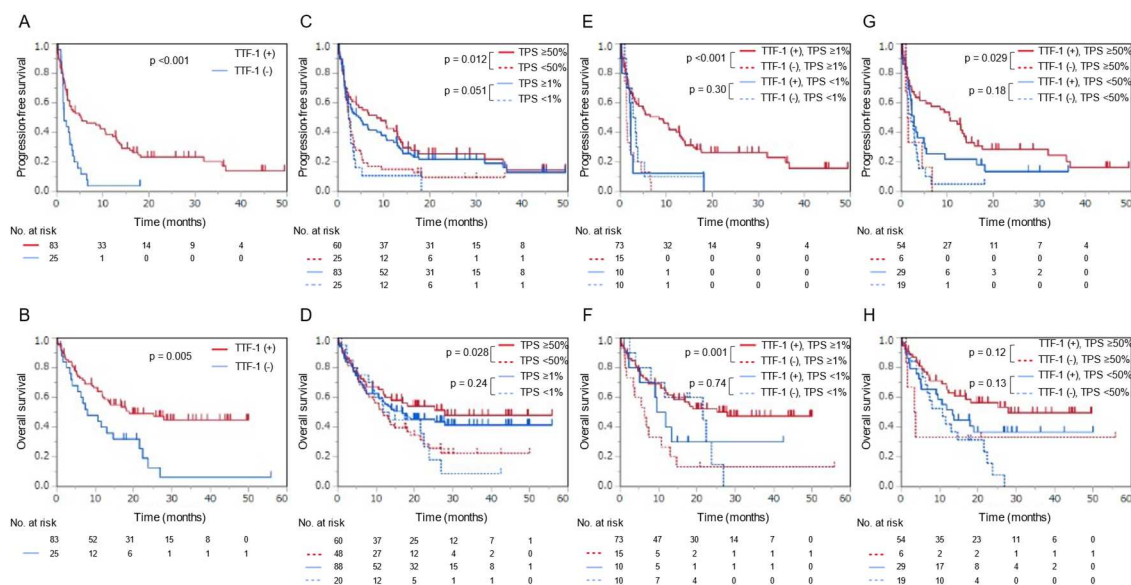


図 4 TTF-1 と PD-L1 の発現状態別 PFS・OS

3.2 22C3 と SP142 の発現結果について

表 3 に患者背景を示す。ICI 治療を受けた NSCLC のうち、TMA で 22C3 と SP142 がともに評価可能であった 288 例が対象となった。臨床での 22C3 結果が得られたのは 84% であった。

表 3 患者背景

N = 288		
Age	Median (range)	71 (33 -87)
Sex		228 (79)
	Male	
	Female	60 (21)
Smoking status		245 (85)
	Current or former smoker	
	Never smoker	40 (14)
	Unknown	3 (1)
ECOG PS	0 - 1	239 (83)
	≥2	49 (17)
Stage	Stage III	55 (19)
	Stage IV or recurrent	233 (81)
Sample	Resection	83 (29)
	Biopsy	205 (71)
Histological type	Squamous	103 (36)
	Non-squamous	185 (64)
EGFR mutation status	Wild type	176 (61)
	Mutant	17 (6)
	Unknown	95 (33)
Treatment	ICI monotherapy	205 (71)
	ICI concurrent with chemotherapy	83 (29)
ICI administration line	1	160 (56)
	≥2	128 (44)
Type of ICI	Pembrolizumab	187 (65)
	Nivolumab	69 (24)
	Atezolizumab	32 (11)
PD-L1 22C3 (clinical)	≥50%	106 (38)
	1-49%	88 (31)
	<1%	45 (16)
	Unknown	47 (16)
PD-L1 22C3 (TMA)	≥50%	50 (17)
	1-49%	75 (26)
	<1%	163 (57)
PD-L1 SP142	TC3 or IC3	43 (15)
	TC1/2 or IC1/2	67 (23)
	TC0 and IC0	178 (62)

(%)

図 5 に、各評価方法間の PD-L1 発現の一致率を示す。22C3(C) $\geq 50\%$ であった患者のうち、SP142 で TC3 or IC3 であったのは 31 名 (29%)、22C3(TMA) $\geq 50\%$ であったのは 40 名 (37%) であった。一方 22C3(C) $< 1\%$ であった患者の内、18%が SP142 で TC1/2/3 or IC1/2/3 であり、29%が 22C3(TMA) $\geq 1\%$ であった。



図 5 各アッセイの一致率

図 6 に、SP142 の結果別に ICI 単剤治療の奏効率を比較した結果を示す。22C3(C) $\geq 50\%$ 、22C3(C) $< 50\%$ 、22C3(TMA) $\geq 50\%$ 、22C3(TMA) $< 50\%$ いずれの群においても、SP142 TC3 or IC3 群は SP142 TC0/1/2 and IC0/1/2 群より奏効率が高かった。

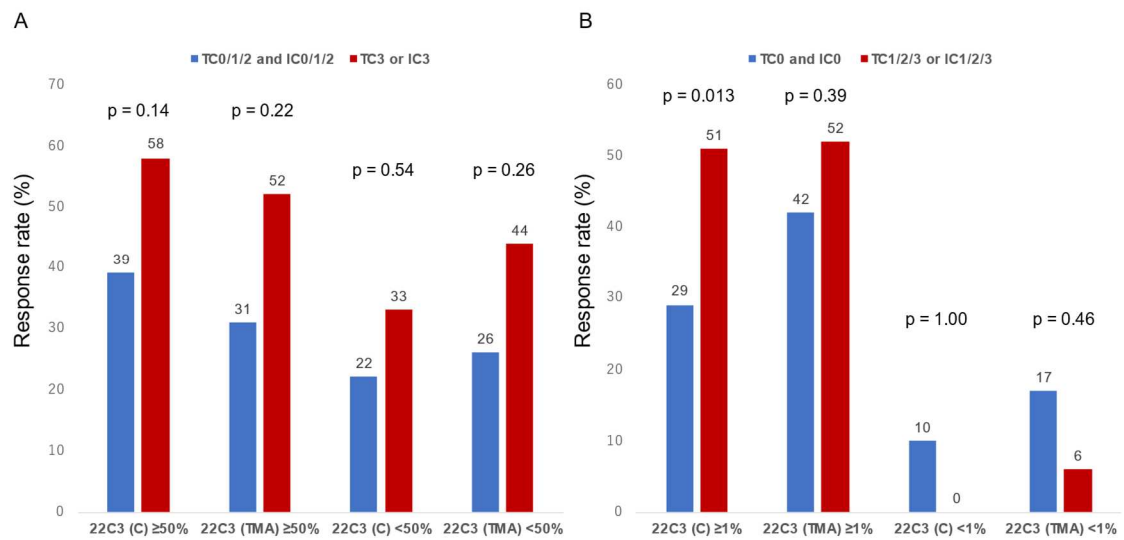
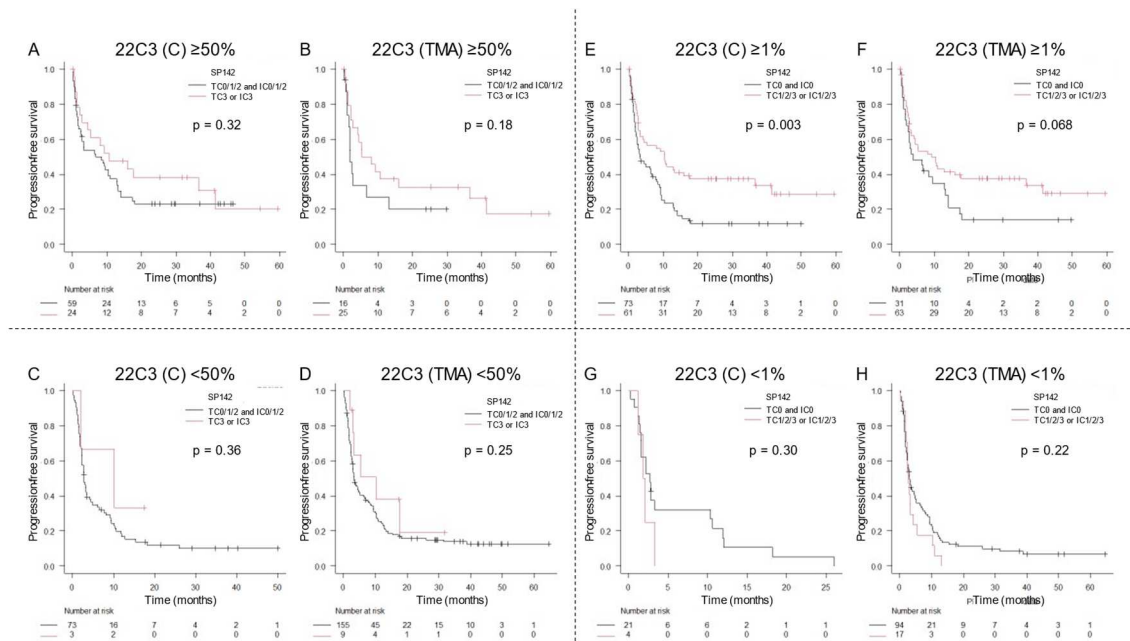


図 6 各 22C3 結果における SP142 の結果別奏効率

SP142 の結果別に、ICI 治療による PFS (図 7 上) と OS (図 7 下) を比較した。22C3(C) ≥1% 群において、SP142 が TC1/2/3 or IC 1/2/3 であった群は、TC0 and IC0 の群よりも有意に ICI 単剤療法の PFS および全患者の OS が良好であった (10.4 vs 3.3 カ月、 $p=0.003$ 、30.9 vs 14.8 カ月、 $p=0.002$)。



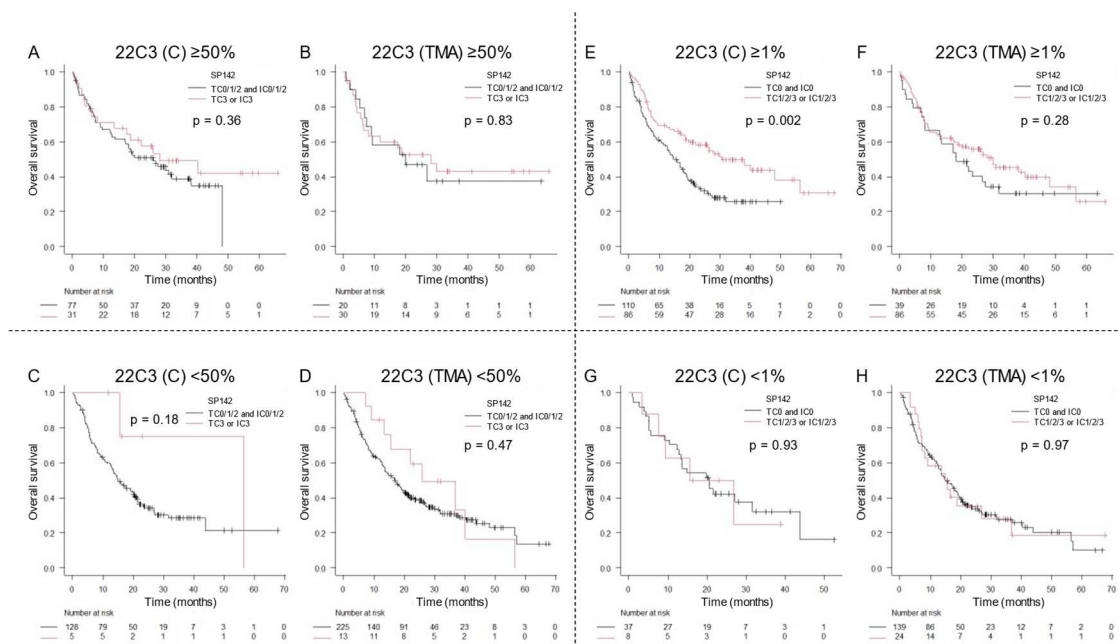


図7 各 22C3 結果における SP142 の結果別 PFS・OS

4.考察

3.1 の結果においては、VEGFR2 が免疫細胞において発現していると有意に ORR、PFS、OS が不良であった。VEGF/VEGFR は、腫瘍免疫環境においても重要な経路と考えられており、その発現は ICI の治療効果と関連していることが、実際に治療を受けた NSCLC 患者の臨床データを用いて示された。VEGFR2 は、腫瘍免疫および ICI の治療効果に関連を持つと考えられ、とくに IC-VEGFR2 陽性患者においてはさらなる治療法の開発が望まれる。

3.2 の結果において、TTF-1 は PD-L1 の発現とよく相関しており、さらに TTF-1 が陽性であると有意に ICI の治療成績がよいことが示された。TTF-1 が陰性である場合、PD-L1 が 50%以上と強発現であった場合でも治療成績が不良であったため、TTF-1 陰性患者において ICI を使用する場合は注意が必要である。TTF-1 は、日常臨床で評価可能な蛋白であり、ICI の治療方針を決定するにあたり重要な参考所見になると考えられる。

3.3 の結果 3.3 において、22CC-TPS $\geq$ 1%群において、SP142 でも評価を加えることで ICI の治療予測精度が有意に上昇することが観察された。22C3、SP142 はいずれも保険診療で評価可能な抗体であり、臨床で用いることができる。ICI の有効性予測の精度が向上すれば、1st line の治療において ICI の投与方法を単剤にするか、化学療法との併用にするかを決定する際に役立つと思われる。また、ICI のリスクがある症例（自己免疫性疾患や間質性肺炎を有している人など）において、ICI を投与するかどうかの参考にもなるだろう。

5.結語

われわれの研究において、ICI 治療に対する反応性を予測する上で、IC-VEGFR2 は予後不良因子であり、TTF-1 は予後良好因子であった。また、PD-L1 発現の評価において、22C3 に SP142 を加えることで ICI の治療反応予測の精度が向上することが示された。

ICI の効果が得られる患者とそうでない患者を治療前に予測することは、臨床において非常に重要であり、様々な評価方法を用いて、予測精度を可能な限り高めていくことには大きな意義がある。

6.文献

- 1) Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
- 2) Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csoszi T, Fulop A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1823-1833.
- 3) Socinski MA, Jotte RM, Cappuzzo F, Orlandi F, Stroyakovskiy D, Nogami N, et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med.* 2018;378(24):2288-2301.
- 4) Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2006;355(24):2542-50.
- 5) Tanaka I, Dayde D, Tai MC, Mori H, Solis LM, Tripathi SC, et al. SRGN-Triggered Aggressive and Immunosuppressive Phenotype in a Subset of TTF-1-Negative Lung Adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 2022;114(2):290-301.
- 6) Ramm DL, Han G, Taube JM, Yi ES, Bridge JA, Flieder DB, et al. A Prospective, Multi-institutional, Pathologist-Based Assessment of 4 Immunohistochemistry Assays for PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *JAMA oncology.* 2017;3(8):1051-1058.

7.成果発表

雑誌論文

TTF-1 の研究について、*Thoracic Cancer.* 2022 Aug;13(16):2309-2317. doi: 10.1111/1759-7714.14560. に掲載された。VEGFR2 の研究について、*Cancer Science.* 2022 Jun 20. doi: 10.1111/cas.15464. Online ahead of print.に掲載された。22C3 と SP142 についての研究は現在投稿中である。

学会発表

IASLC 2022 Asia Conference on Lung Cancer (2022 年 10 月)、第 6 回国際がん研究シンポジウム (2023 年 1 月) で発表予定である。