

Investigation of immune condition in patients with advanced bone and soft tissue sarcoma

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2020-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Miwa, Shinji メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00059774

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



【受賞研究紹介】

第33回北國がん基金 研究活動助成

肉腫における腫瘍免疫状態の解明と新規治療法の開発

Investigation of immune condition in patients with advanced bone and soft tissue sarcoma

金沢大学医薬保健研究域医学系 機能再建学
三 輪 真 嗣

はじめに

近年、がん研究において免疫療法の臨床試験が行われ、一部の腫瘍においてその有効性が示されている¹⁻⁹⁾。また、免疫チェックポイント阻害薬など腫瘍免疫を標的とした新規治療薬が開発され、多くの癌腫において有効性を示している¹⁰⁻¹³⁾。一方、近年の癌の治療において、個々の患者における腫瘍の遺伝子変異や分子発現を調べることににより最適な治療を選択する、「precision medicine」という治療アプローチが広まってきている。骨軟部肉腫における腫瘍免疫やprecision medicineに関する研究はわずかであり、肉腫においても免疫状態の評価や免疫チェックポイント阻害薬の有効性評価が必要と考えられる。

当科では、標準的治療に抵抗性の肉腫患者に対して、樹状細胞を用いた免疫療法を臨床試験として行い、その安全性、有効性を評価してきた⁵⁾。その結果として、樹状細胞療法は一部の患者において強い免疫反応を認めたものの、全体的としては、「骨軟部肉腫における樹状細胞療法は、重篤な有害事象はないものの、有効性は一部の症例に限られる」という結果であった。これまでも様々な癌腫において樹状細胞療法が行われ、一部の患者で有効性を示すことが報告されてきたが、無効例においてどのような治療阻害因子が関与しているのかは不明である。免疫療法における治療阻害因子を探索することにより、高い治療効果の予想される患者を選択できること、新たな治療標的の発見につながることを期待できる。

本研究では、樹状細胞療法の効果に影響する因子を明らかにするために、樹状細胞療法を受けた症例について、腫瘍標本におけるPD-L1、PD-L2、およびHLA class Iの発現と、樹状細胞療法後の免疫反応、治療効果、腫瘍学的転帰の相関を評価・検討した。

方 法

1. 対象

樹状細胞療法を受けた難治性骨軟部肉腫患者37例のうち、腫瘍検体におけるPD-L1、PD-L2、およびHLA class Iの発現評価が可能であった35例を対象とした。樹状細胞療法の方法として、患者から採取した末梢血単核細胞をIL-4、granulocyte colony-stimulating factorで刺激し、

さらにtumor lysate, tumor necrosis factor- α , OK-432で処理することにより分化・成熟を誘導した。これらの刺激で得られた細胞を腋窩または鼠経の皮下に注射するという治療を毎週、計6回行った。免疫応答の評価として、樹状細胞療法前後にIFN- γ およびIL-12を測定した。臨床効果はResponse Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) により評価した。評価可能であった33例中1例で部分奏効 (PR)、5例で安定 (SD)、27例で進行 (PD) を認めたが、完全奏効 (CR) を認めた例は認めなかった。

2. 免疫組織学的評価

腫瘍切除時に採取し、ホルマリン固定、パラフィン包埋の腫瘍組織を評価した。これらの腫瘍組織を抗PD-L1 (SP263, Ventana Medical Systems)、抗PD-L2 / B7-DC (clone 176611, R & D Systems, Minneapolis, USA)、抗HLA class I (EMR8-5, Hokudo, Sapporo, Japan) を用いて染色し、Ventana Autostainer automat (Ventana Medical Systems, Oro Valley, USA) によって評価した。それぞれの発現のカットオフ値として、PD-L1 \geq 25%、PD-L2 \geq 50%、HLA class I \geq 50%の場合に陽性と判定した (図1)¹⁴⁻¹⁶⁾。

3. 統計学的評価

腫瘍標本におけるPD-L1、PD-L2、HLA class Iの発現と、樹状細胞療法後の病勢コントロール (CR+PR+SD) の相関を調査した。また、樹状細胞療法後のIFN- γ 、IL-12の上昇とPD-L1、PD-L2、HLA class Iの発現との相関を、Student's t-testで評価した。PD-L1、PD-L2、HLA class I発現と無増悪生存期間 (PFS) および全生存期間 (OS) との相関を、log-rank testを用いたKaplan-Meier法で評価した。PFSは、樹状細胞療法開始から腫瘍の進行または最終経過観察までの期間とし、OSは、樹状細胞療法開始から腫瘍による死亡または最終経過観察までの期間とした。P値 < 0.05を統計学的有意と判定した。統計にはEZR統計ソフトウェア (Jichi Medical University, Saitama, Japan) を使用した。

結 果

1. PD-L1、PD-L2、HLA class Iの発現

PD-L1(+)例は35例中6例 (17%)、PD-L2(+)例は15例 (43%)、HLA class I(+)例は6例 (17%) であった (表1)。

2. 樹状細胞療法後の免疫反応

樹状細胞療法を施行した30例で免疫反応を評価した(図2)。IFN- γ はPD-L1(-)例で 12.6 ± 24.1 IU/mL, PD-L1(+)例で 19.7 ± 28.3 IU/mLの上昇を認めた。IL-12はPD-L1(-)例で 6.8 ± 26.3 pg/mL, PD-L1(+)例で 29.4 ± 50.9 pg/mL上昇していた。PD-L1(+)例のうち、免疫反応を評価できたのは3例のみであり、PD-L1発現と免疫反応の相関は見られなかった。PD-L2(+)例はPD-L2(-)例に比べて樹状細胞療法後のIFN- γ , IL-12上昇が少ない傾向を示し、IFN- γ はPD-L2(-)例で 19.1 ± 24.9 IU/mL, PD-L2(+)例で 4.7 ± 20.9 IU/mLの上昇を認めた。IL-12はPD-L2(-)例で 14.8 ± 19.4 pg/mL, PD-L2(+)例で 0.4 ± 38.9 pg/mLの上昇を認めた。HLA class Iの発現と免疫反応の関係では、HLA class I(-)例で 13.0 ± 25.0 IU/mL, HLA class I(+)例で 15.0 ± 21.1 IU/mLのIFN- γ 上昇を認め、また、HLA class I(-)例で 6.9 ± 27.3 pg/mL, HLA class I(+)例で 19.9 ± 38.5 pg/mLのIL-12上昇を認めた。

3. 樹状細胞療法の治療効果

病勢コントロールはPD-L1(-)例では27例中6例(22%)で得られ、PD-L1(+)例では6例中0例(5%)であった(表1)。また、PD-L2(-)例では18例中4例で病勢コントロールが得られ、PD-L2(+)例では15例中2例(13%)で得られた。HLA class I(-)例での病勢コントロールは7例中1例(17%), HLA class I(+)例での病勢コントロールは27例中5例(19%)であった。

4. 腫瘍学的転帰

PD-L1(+)の患者6例中6例で、樹状細胞療法後に腫瘍の増悪を認めた。また、有意差はなかったものの、PD-L1の発現はPFSを悪化させる傾向を認めた(図3)。また、PD-L1(+)例は、PD-L1(-)例に比べて有意に低いOSを示した。一方、PD-L2、HLAクラスIの発現と腫瘍学的転帰との相関は見られなかった。

考 察

近年、様々な免疫療法が開発され、一部の腫瘍では標準的治療となってきた。免疫療法で有効性がみられるのは一部の患者に限られるが、免疫療法では高額な費用が問題となる。免疫療法の治療成績向上、医療費高騰の抑制には治療予測バイオマーカーの特定が求められる。本研究では、骨軟部肉腫患者におけるPD-L1, PD-L2, HLA class Iの発現と、樹状細胞療法後の免疫反応、治療効果、転帰の相関を調査した。

PD-L1は、一般的にT細胞, B細胞, マクロファージ, および樹状細胞に発現している¹⁷⁾。PD-L1の高発現は、T細胞の不活化および免疫応答の低下に関与するといわれている^{18,19)}。過去の報告では、軟部肉腫の12~58%でPD-L1の高発現がみられ、PD-L1の高発現が予後不良因子となることが報告されている^{20,21)}。本研究では、PD-L1(+)例は樹状細胞療法による病勢コントロールがみられなかったのに対し、PD-L1(-)例の22%で免疫療法後の

病勢コントロールがみられた。PD-L1の発現が樹状細胞療法に対してどのように影響を与えたかは不明であるが、PD-L1(+)例はPD-L1(-)例よりも有意に短いOSを示した。これらの結果は、PD-L1阻害薬がPD-L1(+)例において樹状細胞療法の効果を改善させる可能性があること、樹状細胞療法単独治療はPD-L1(+)例では効果が期待しにくいことを示唆している。

腫瘍細胞におけるPD-L2高発現は、固形がん患者の転帰促進、不良予後と相関することが報告されているが²²⁻²⁴⁾。本研究では、PD-L2(+)例は病勢コントロール率、免疫学的反応が低い(IFN- γ およびIL-12)ことが示された。

本研究の結果から、PD-L1, PD-L2の発現が樹状細胞療法の効果予測におけるバイオマーカーとなる可能性、また、免疫チェックポイント阻害薬との併用が樹状細胞療法の効果を増強させる可能性が示唆された。今後も免疫療法の有効症例の選択方法、免疫療法の効果を高める方法を探索することにより肉腫治療の発展に貢献したい。

謝 辞

最後に、今回の研究助成受領にあたり、ご推薦いただきました土屋弘行教授、研究についてご指導、ご鞭撻いただきました野島孝之客員教授、教室の先生方、共同研究者の先生方に深謝いたします。また、今回の寄稿の機会を与えて下さいました金沢大学十全医学会の皆様へ御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Ben-Ami E, Barysaukas CM, Solomon S, Tahlil K, Malley R, Hohos M, Polson K, Loucks M, Severgnini M, Patel T, Cunningham A, Rodig SJ, Hodi FS, Morgan JA, Merriam P, Wagner AJ, Shapiro GI, George S. Immunotherapy with single agent nivolumab for advanced leiomyosarcoma of the uterus: results of a phase 2 study. *Cancer*. 2017; 123: 3285-3290.
- 2) Tawbi HA, Burgess M, Bolejack V, Van Tine BA, Schuetze SM, Hu J, D' Angelo S, Attia S, Riedel RF, Priebe DA, Movva S, Davis LE, Okuno SH, Reed DR, Crowley J, Butterfield LH, Salazar R, Rodriguez-Canales J, Lazar AJ, Wistuba II, Baker LH, Maki RG, Reinke D, Patel S. Pembrolizumab in advanced soft-tissue sarcoma and bone sarcoma (SARC028): a multicentre, two-cohort, single-arm, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017; 18: 1493-1501.
- 3) Toulmonde M, Penel N, Adam J, Chevreau C, Blay JY, Le Cesne A, Bompas E, Piperno-Neumann S, Cousin S, Grellety T, Rycckewaert T, Bessede A, Ghiringhelli F, Pulido M, Italiano A. Use of PD-1 targeting, macrophage infiltration, and IDO pathway activation in sarcomas: a phase 2 clinical trial. *JAMA Oncol*. 2018; 4: 93-97.
- 4) D'Angelo SP, Mahoney MR, Van Tine BA, Atkins J, Milhem MM, Jahagirdar BN, Antonescu CR, Horvath E, Tap WD, Schwartz GK, Streicher H. Nivolumab with or without ipilimumab treatment for metastatic sarcoma (Alliance A091401): two open-label, non-comparative, randomised, phase 2 trials. *Lancet Oncol*. 2018; 19: 416-426.
- 5) Miwa S, Nishida H, Tanzawa Y, Takeuchi A, Hayashi K, Yamamoto N, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S, Tsuchiya H.

Phase 1/2 study of immunotherapy with dendritic cells pulsed with autologous tumor lysate in patients with refractory bone and soft tissue sarcoma. *Cancer*. 2017, 123: 1576-1584.

6) Merchant MS, Bernstein D, Amoako M, Baird K, Fleisher TA, Morre M, Steinberg SM, Sabatino M, Stronck DF, Venkatasan AM, Wood BJ, Wright M, Zhang H, Mackall CL. Adjuvant immunotherapy to improve outcome in high-risk pediatric sarcomas. *Clin Cancer Res*. 2016, 22: 3182-3191.

7) Ahmed N, Brawley VS, Hegde M, Robertson C, Ghazi A, Gerken C, Liu E, Dakhova O, Ashoori A, Corder A, Gray T, Wu MF, Liu H, Hicks J, Rainusso N, Dotti G, Mei Z, Grilley B, Gee A, Rooney CM, Brenner MK, Heslop HE, Wels WS, Wang LL, Anderson P, Gottschalk S. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) -specific chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of HER2-positive sarcoma. *J Clin Oncol*. 2015, 33: 1688-1696.

8) Robbins PF, Kassim SH, Tran TL, Crystal JS, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Dudley ME, Wunderlich JR, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Restifo NP, Raffeld M, Lee CC, Li YF, El-Gamil M, Rosenberg SA. A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response. *Clin Cancer Res*. 2015, 21: 1019-1027.

9) Himoudi N, Wallace R, Parsley KL, Gilmour K, Barrie AU, Howe K, Dong R, Sebire NJ, Michalski A, Thrasher AJ, Anderson J. Lack of T-cell responses following autologous tumour lysate pulsed dendritic cell vaccination, in patients with relapsed osteosarcoma. *Clin Transl Oncol*. 2012, 14: 271-279.

10) Eggermont AMM, Blank CU, Mandala M, Long GV, Atkinson V, Dalle S, Haydon A, Lichinitser M, Khattak A, Carlino MS, Sandhu S, Larkin J, Puig S, Ascierto PA, Rutkowski P, Schadendorf D, Koornstra R, Hernandez-Aya L, Maio M, van den Eertwegh AJM, Grob JJ, Gutzmer R, Jamal R, Lorigan P, Ibrahim N, Marreaud S, van Akkooi ACJ, Suci S, Robert C. Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. *N Engl J Med*. 2018, 378: 1789-1801.

11) Nanda R, Chow LQ, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, Pusztai L, Pathiraja K, Aktan G, Cheng JD, Karantza V, Buisseret L. Pembrolizumab in patients with advanced triple-negative breast cancer: phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol*. 2016, 34: 2460-2467.

12) Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, Antonia S, Pluzanski A, Vokes EE, Holgado E, Waterhouse D, Ready N, Gainor J, Arén Frontera O, Havel L, Steins M, Garassino MC, Aerts JG, Domine M, Paz-Ares L, Reck M, Baudelet C, Harbison CT, Lestini B, Spigel DR. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015, 373: 123-135.

13) Shitara K, Özgüroğlu M, Bang YJ, Di Bartolomeo M, Mandalà M, Ryu MH, Fornaro L, Olesiński T, Caglevic C, Chung HC, Muro K, Goekkurt E, Mansoor W, McDermott RS, Shacham-Shmueli E, Chen X, Mayo C, Kang SP, Ohtsu A, Fuchs CS; KEYNOTE-061 investigators. Pembrolizumab versus paclitaxel for previously treated, advanced gastric or gastro-oesophageal

junction cancer (KEYNOTE-061): a randomised, open-label, controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2018, 392: 123-133.

14) Antonia SJ, Balmanoukian A, Brahmer J, Ou SI, Hellmann MD, Kim SW, Ahn MJ, Kim DW, Gutierrez M, Liu SV, Schöffski P, Jäger D, Jamal R, Jerusalem G, Lutzky J, Nemunaitis J, Calabrò L, Weiss J, Gadgeel S, Bhosle J, Ascierto PA, Reibelatto MC, Narwal R, Liang M, Xiao F, Antal J, Abdullah S, Angra N, Gupta AK, Khleif SN, Segal NH. Clinical activity, tolerability, and long-term follow-up of durvalumab in patients with advanced NSCLC. *J Thorac Oncol*. 2019, 14: 1794-1806.

15) Takamori S, Takada K, Toyokawa G, Azuma K, Shimokawa M, Jogo T, Yamada Y, Hirai F, Tagawa T, Kawahara A, Akiba J, Okamoto I, Nakanishi Y, Oda Y, Hoshino T, Maehara Y. PD-L2 Expression as a potential predictive biomarker for the response to anti-PD-1 drugs in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res*. 2018, 38: 5897-5901.

16) Oike N, Kawashima H, Ogoe A, Hotta T, Hatano H, Ariizumi T, Sasaki T, Yamagishi T, Umezumi H, Endo N. Prognostic impact of the tumor immune microenvironment in synovial sarcoma. *Cancer Sci*. 2018, 109: 3043-3054.

17) Yamazaki T, Akiba H, Koyanagi A, Azuma M, Yagita H, Okumura K. Blockade of B7-H1 on macrophages suppresses CD4+ T cell proliferation by augmenting IFN-gamma-induced nitric oxide production. *J Immunol*. 2005; 175: 1586-1592.

18) Hatam LJ, Devoti JA, Rosenthal DW, Lam F, Abramson AL, Steinberg BM, Bonagura VR. Immune suppression in premalignant respiratory papillomas: enriched functional CD4+Foxp3+ regulatory T cells and PD-1/PD-L1/L2 expression. *Clin Cancer Res*. 2012; 18: 1925-1935.

19) Wenjin Z, Chuanhui P, Yunle W, Lateef SA, Shusen Z. Longitudinal fluctuations in PD1 and PD-L1 expression in association with changes in anti-viral immune response in chronic hepatitis B. *BMC Gastroenterol*. 2012; 12: 109.

20) Kim JR, Moon YJ, Kwon KS, Bae JS, Wagle S, Kim KM, Park HS, Lee H, Moon WS, Chung MJ, Kang MJ, Jang KY. Tumor infiltrating PD1-positive lymphocytes and the expression of PD-L1 predict poor prognosis of soft tissue sarcomas. *PLoS One*. 2013; 8: e82870.

21) Que Y, Xiao W, Guan YX, Liang Y, Yan SM, Chen HY, Li QQ, Xu BS, Zhou ZW, Zhang X. PD-L1 expression is associated with FOXP3+ regulatory T-cell infiltration of soft tissue sarcoma and poor patient prognosis. *J Cancer*. 2017; 8: 2018-2025.

22) Yang H, Zhou X, Sun L, Mao Y. Correlation between PD-L2 expression and clinical outcome in solid cancer patients: a meta-analysis. *Front Oncol*. 2019; 9: 47.

23) Nakano T, Takizawa K, Uezato A, Taguchi K, Toh S, Masuda M. Prognostic value of programmed death ligand-1 and ligand-2 co-expression in salivary gland carcinomas. *Oral Oncol*. 2019; 90: 30-37.

24) Takamori S, Takada K, Azuma K, Jogo T, Shimokawa M, Toyokawa G, Hirai F, Tagawa T, Kawahara A, Akiba J, Okamoto I, Nakanishi Y, Oda Y, Hoshino T, Maehara Y. Prognostic impact of programmed death-ligand 2 expression in primary lung adenocarcinoma patients. *Ann Surg Oncol*. 2019; 26: 1916-1924.