

氏名・(本籍)	松尾 翼 (宮城県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1075 号
学位授与の日付	令和 4 年 9 月 29 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Harmonization across programmed death ligand 1 (PD-L1) assays for lung cancer by immunohistochemistry using noncontact alternating current electric field mixing (電界攪拌技術を応用した肺癌における PD-L1 抗体試薬汎用化の試み)
論文審査委員	(主査) 後藤明輝 教授 (副査) 大森泰文 教授 植木重治 教授

## 学位論文内容要旨

### 論文題目 (論文題目のと訳)

Harmonization across programmed death ligand 1 (PD-L1) assays  
for lung cancer by immunohistochemistry using noncontact  
alternating current electric field mixing  
(電界攪拌技術を応用した肺癌における PD-L1 抗体試薬汎用化の試み)

申請者氏名 松尾 翼

### 研究目的

免疫チェックポイント阻害薬は、進行・再発肺癌における薬物療法として確立された治療である。腫瘍の programmed death ligand 1 (PD-L1) 発現の程度が治療効果予測の一つとして用いられており、PD-L1 発現の正確な評価が重要である。しかしながら、免疫チェックポイント阻害薬は各薬剤毎に独自のコンパニオン診断薬と対応する自動免疫染色装置が存在し、使用する抗体試薬により PD-L1 発現の結果やその陽性判定基準が異なることが既に報告されている。そのため、一つの抗体試薬で測定した PD-L1 発現の結果を異なる免疫チェックポイント阻害薬の使用基準として用いることができないが、通常の診療において何種類もの抗体で PD-L1 発現を測定することは現実的ではない。今回我々は、同一検体に対して各抗体試薬を用いた PD-L1 発現結果を比較し、迅速免疫組織化学染色に用いる非接触電界攪拌技術を応用して抗原抗体反応の安定化を図ることで、抗体試薬間の PD-L1 発現結果の差異を減らし、抗体試薬の汎用化が出来ないかを研究した。

### 研究方法

本研究では、第一に 2018 年 1 月から 2018 年 12 月まで、秋田大学医学部附属病院で施行され、外注検査で、非小細胞肺癌を対象とした KEYNOTE-024 および KEYNOTE-010 臨床試験 (Pembrolizumab) で PD-L1 発現率の測定に使用され体外診断用医薬品として承認されている 22C3 抗体を用いたコンパニオン診断薬において腫瘍 PD-L1 発現が測定されている非小細胞肺癌切除検体 58 例に対して、28-8 抗体 (Nivolumab)、SP142 抗体 (Atezolizumab)、SP263 抗体 (Durvalumab) を用いて、従来通りの静置法と比較して、1 次抗体反応および 2 次抗体反応において非接触電界攪拌法を用いた免疫組織化学染色 (AC mixing 法) により PD-L1 発現結果の均一化が可能かどうか確認した。陽性判定基準は各抗体のアルゴリズムに沿って、28-8 抗体、SP263 抗体は tumor proportion score (TPS) でそれぞれ  $\geq 1\%$ 、 $\geq 25\%$  を陽性判定、SP142 抗体

においては、OAK 試験または Impower 臨床試験 (Atezolizumab) における判定基準も使用し、腫瘍細胞 (TC) と腫瘍浸潤免疫細胞 (IC) の染色で陽性を確認できたもの (TC1/IC1) を陽性判定とした場合と、全抗体において評価基準も固定して、TPS  $\geq 1\%$  を陽性とした場合の 2 通りで評価した。解析は JMP IN 14.2.0 を用いて、PD-L1 発現結果を Sigmoidal 4 parameter logistic (4PL) curve で描き、全抗体染色結果の曲線を近似した best fit curve を求めた。次に、最初の実験で得られた PD-L1 発現結果は実際に免疫チェックポイント阻害薬の治療効果予測にどのような変化をもたらすのかを確認するために、2017 年 6 月から 2019 年 2 月までに、実際に免疫チェックポイント阻害薬による治療を受けた非小細胞肺癌術後再発患者 27 名の手術時切除検体に対して、同様に静置法と AC mixing 法で各抗体の PD-L1 発現の再評価を行い、再評価した PD-L1 検査での免疫チェックポイント阻害薬の奏効率に差異が生じるかを確認した。

### 研究成績

従来との静置法と比較して、AC mixing を用いた免疫組織化学染色によってより鮮明な染色が得られた。各抗体のアルゴリズムに沿った陽性判定基準では、28-8 抗体で 2 例、SP142 抗体で 4 例、SP263 抗体で 2 例に、従来法では PD-L1 陰性と判断された症例において PD-L1 陽性と判定された。全抗体で TPS  $\geq 1\%$  に陽性判定基準を揃えた場合でも、SP142 抗体で 3 例、SP263 抗体で 4 例に陽性転化がみられた。各抗体の sigmoidal 4PL curve では静置法では陽性判定のばらつきが大きく、1 本の曲線に近似することが出来なかったが、AC mixing 法においては判定ばらつきが解消され、1 本の best fit curve として描出することができた。加えて、実際に免疫チェックポイント阻害薬が投与された症例の検討では、28-8 抗体 2 例、SP263 抗体 4 例、SP142 抗体 3 例で、AC mixing 法において陽性判定と変わり、再評価した PD-L1 で奏効率を再計算すると、いずれの抗体でも AC mixing 法の方が免疫チェックポイント阻害薬の効果予測としてのコンパニオン検査感度が優れていた。

### 結論

非接触電界攪拌技術を応用した免疫組織化学染色により、抗体試薬間の PD-L1 発現の染色ばらつきを是正し安定させることができた。安定化された PD-L1 免疫組織化学染色結果は、免疫チェックポイント阻害薬の効果予測をより正確に評価することが可能であった。

## 学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主査： 後藤 明輝  
 申請者： 松尾 翼

論文題名： Harmonization across programmed death ligand 1 (PD-L1) assays for lung cancer by immunohistochemistry using noncontact alternating current electric field mixing  
 (電界攪拌技術を応用した肺癌における PD-L1 抗体試薬汎用化の試み)

### 要旨

著者の研究は、論文内容要旨に示すように、肺癌における programmed death ligand 1 (PD-L1) の免疫染色において、電界攪拌技術を応用した抗原抗体反応の安定化により、抗体クローン間の差異を減らすことで、多数存在する抗体試薬の汎用化を図り、その臨床的有用性を検討したものである。免疫チェックポイント阻害薬の治療適応や効果予測を行うための、PD-L1 発現の評価のためのコンパニオン診断として、抗体クローンや対応した自動免疫染色装置が多数あることによる実臨床での問題点に着目し、抗体試薬の汎用化が実現することにより、高額な検査を頻回に行う経済的負担の軽減や、採取する検体量が少量で済むという利点が見込まれる。本研究では電界攪拌技術を用いた PD-L1 の免疫組織化学染色のプロトコール作成に続き、免疫チェックポイント阻害薬の効果予測としての検査の有用性を、従来の検査の結果と比較することで、臨床的有用性の検討を行っている。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

### 1) 斬新さ

PD-L1 発現の判定には、本邦では 4 種類のコンパニオン診断検査が存在し、その結果の差異の大きさが問題となっている。筆者らの教室では、秋田県産業技術センターとの共同研究で開発した電界攪拌技術を用いることで、免疫組織化学染色における抗原抗体反応の促進に成功し、これまでに乳癌の HER2 DISH の時間短縮やプローブの希釈、肺癌 ALK FISH の時間短縮への応用も成功している。本研究の斬新性は、この電界攪拌技術を従来の検査時間の短縮という点ではなく、抗体試薬間の差異の削減、試薬の汎用化に応用した点にある。

### 2) 重要性

肺癌診療においては免疫チェックポイント阻害薬がキードラッグとなっており、外科治療の前後の補助療法、根治化学放射線療法後の地固め療法、進行・再発非小細胞肺癌に対する薬物療法といずれの stage においても欠かせない治療となっている。4 種類の免疫チェックポイント阻害薬が薬事承認されており、各薬剤に対応

したコンパニオン診断としての抗体試薬と自動免疫染色装置があり、多くの施設で検査を外注に頼っているのが現状である。PD-L1 発現という一つの検査に対して複数回の検査を行うことは、様々な癌腫で遺伝子検査が治療選択に必須になっている現代において、患者の経済的な負担のみならず、膨らみ続ける医療費の問題にも大きく関わる。本研究において、電界攪拌技術を PD-L1 の免疫組織化学染色に応用することで得られた結果は、抗体試薬間の差異を減らし、且つ免疫チェックポイント阻害薬の効果予測という点においても、より精度の高い検査であったという点が、本研究において最も重要であると言える。

### 3) 研究方法の正確性

免疫組織化学染色における電界攪拌の条件については、既に筆者らの教室において開発し、報告したプロトコールに則り行われている。PD-L1 抗体においても病理専門医による評価を行い、体外診断薬の結果判定と同レベルでの評価を行っている。結果の判定に関しては、いずれも統計学的検討を加えており、評価法として客観的で正確性があると考えられる。

### 4) 表現の明瞭さ

現在の PD-L1 測定における問題点を背景に研究目的を掲げ、電界攪拌技術を追加した PD-L1 プロトコール作成に関する方法論が明確に記載され、従来のコンパニオン診断で行われた PD-L1 測定結果との比較検討結果、考察が簡潔に述べられていると考える。

以上より、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。