

転移性腎癌患者におけるニボルマブ単剤の治療効果予測に 対する免疫染色スコアリングの有用性

若宮 崇人¹, 久保 輝文², 山下 真平¹

柑本 康夫¹, 鳥越 俊彦², 原 勲¹

¹和歌山県立医科大学泌尿器科, ²札幌医科大学医学部病理学第一講座

USEFULNESS OF IMMUNOSTAINING SCORING FOR PREDICTING RESPONSE TO SINGLE-AGENT NIVOLUMAB IN PATIENTS WITH METASTATIC RENAL CELL CARCINOMA

Takahito WAKAMIYA¹, Terufumi KUBO², Shimpei YAMASHITA¹,

Yasuo KOHJIMOTO¹, Toshihiko TORIGOE² and Isao HARA¹

¹The Department of Urology, Wakayama Medical University

²The Department of Pathology, Sapporo Medical University School of Medicine

Although several biomarkers have been identified to predict prognosis in renal cell carcinoma (RCC), there are no evidence-based biomarkers to predict the response to immune checkpoint inhibitors. In this study, we focused on lymphocytes and tumor cells in the tumor microenvironment and investigated whether immunostaining scoring could predict the best overall response. We evaluated 32 patients with metastatic RCC (mRCC) who were treated with nivolumab monotherapy between August 2016 and July 2020. We performed immunostaining for CD8 T cells, TIA-1, PD-L1, and HLA class I in RCC tissues and assigned a score with a maximum of 4 points each, which we defined as histological score. The best overall response of nivolumab was observed in 4 patients (12.5%) with complete response (CR), 10 patients (31.3%) with partial response (PR), 5 patients (15.6%) with stable disease (SD), and 13 patients (40.6%) with progressive disease (PD). There was no significant difference in patient background between the CR + PR + SD group (19 patients) and the PD group (13 patients), but CD8 T cells were significantly higher and TIA-1 positive cells tended to be higher in the CR + PR + SD group (CD8 T cell : $p = 0.03$, TIA-1 : $p = 0.07$, PD-L1 : $p = 0.67$, HLA class I : $p = 1.00$). In univariate analysis, histological score ≥ 3 tended to contribute to the best overall response of nivolumab ($p = 0.05$). There was no significant difference in overall survival or cancer-specific survival after nivolumab administration between the two groups of patients with histological score ≥ 3 and those with histological score < 3 . In conclusion, immunostaining scoring based on CD8 T cells may be able to predict the efficacy of single-agent nivolumab in patients with mRCC.

(Hinyokika Kyo 68 : 311-315, 2022 DOI: 10.14989/ActaUrolJap_68_10_311)

Key words : Metastatic renal cell carcinoma, Immunostaining, Nivolumab, CD8 T cell, TIA-1

緒 言

腎癌の予後を予測するバイオマーカーはこれまでいくつかが同定されているが、ニボルマブを含めた免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) の治療効果を予測する、十分なエビデンスのあるバイオマーカーは存在しない。今回われわれは、腫瘍微小環境において特にリンパ球、腫瘍細胞に着目し、バイオマーカーになりえる因子について免疫染色を行い、スコアリングすることで治療効果が予測できるかを検討した。

対象と方法

2016年8月~2020年7月の間に、当院および関連施設においてニボルマブ単剤による治療を受けた転移性腎癌患者32例を対象とし、後方視的研究を行った。

ニボルマブによる最良治療効果は、RECIST guideline v1.1 で評価し、効果を認めた群 (CR + PR + SD) と認めなかった群 (PD) に分け、患者背景、腎癌病理組織について比較検討した。さらに病理組織については、CD8 陽性 T 細胞、TIA-1、PD-L1、HLA class I の4種類の免疫染色を行い、それぞれの抗体については順に、クローン 4B11、TIA-1、E1L3N、EMR8-5 を用いた。

免疫染色によるスコアリングについて詳細を示す。CD8 陽性 T 細胞の評価は腫瘍実質に最も浸潤している部位 (Fig. 1A) とし、その連続切片で同部位の TIA-1 を、共に400倍視野で評価した。PD-L1 と HLA class I は1枚の切片全体で染色される割合を評価した。各項目についてすべて加点方式とし、CD8 陽性 T 細胞は52個以上で1点、TIA-1 については、CD8

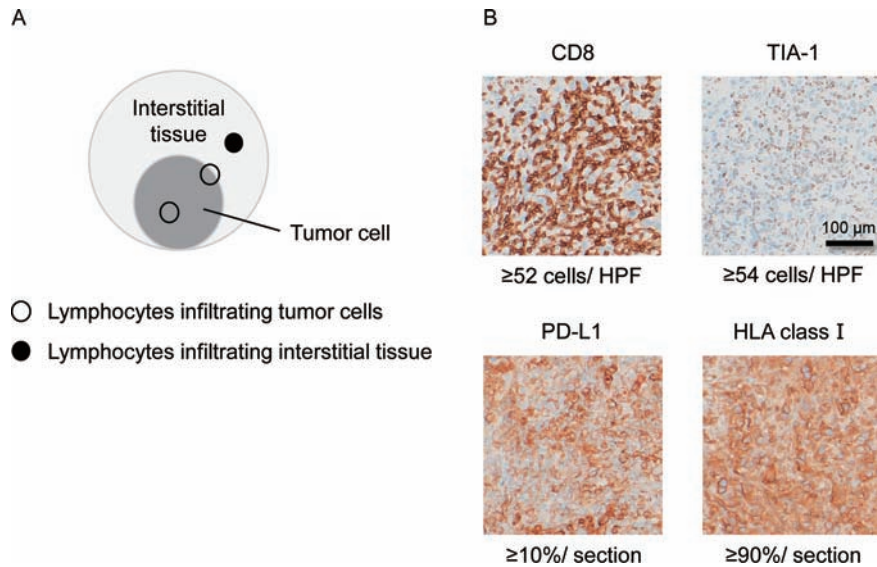


Fig. 1. (A) Schematic image of lymphocytes infiltrating tumor cells (red dots). (B) Immunostaining showing the cells are positive for CD8, TIA-1, PD-L1 and HLA class I.

陽性 T 細胞が52個以上かつ TIA-1 陽性細胞54個以上で1点, PD-L1 は全体視野の10%以上で1点, HLA class I は90%以上で1点とし, 最高4点でスコアリング (以下 Histological score) した. これらはすべて AUC のカットオフ値を用いた (Fig. 1B). また Histological score 3点以上と3点未満で2群に分け, ニボルマブの最良治療効果に寄与する因子かどうかを患者背景, 血液検査も含めて検討した. さらに, Histological score で分けた2群間でニボルマブ開始後の全生存と癌特異的生存についても比較検討した.

統計学的検討は, Wilcoxon 順位和検定, Fisher の正確検定, ロジスティック回帰分析, ログランク検定を用いて行った. いずれも $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとした.

結 果

ニボルマブの最良治療効果は, CR が4例(12.5%), PR が10例 (31.3%), SD が5例 (15.6%), PD が13例 (40.6%) であり, 効果を認めたと判断した SD 以上の病勢コントロール率 (DCR: disease control rate) は59.4%であった.

効果を認めた群 (以下, DC 群) と認めなかった群 (以下, PD 群) の患者背景を Table 1 に示す. ベースラインの腫瘍径の和に有意差はなく, 淡明細胞型腎癌はそれぞれ約80%であった. DC 群の1例のみ先行的腎摘除術を施行されていなかったが, 生検組織が十分にあり免疫染色によるスコアリングができると判断した症例であった. 使用数は違うが, 全症例にチロシナーゼ阻害薬 (TKI) を含む先行治療が行われていた. 転移部位は肺が最も多く, 次いで骨やリンパ節が多かったが, いずれの項目についても統計学的有意差

Table 1. Patient characteristics

	DC (CR + PR + SD) (n = 19)	PD (n = 13)	P value
Age, years (IQR)	70 (63–76)	68 (54–72)	0.44
Male, n (%)	14 (74)	10 (77)	0.83
Karnofsky PS ≤ 70%, n (%)	3 (16)	1 (8)	0.49
Sum of diameters of target lesions at baseline, mm (IQR)	46 (29–135)	41 (26–89)	0.40
Sarcomatoid/rahdoid change, n (%)	2 (11)	3 (23)	0.33
Clear cell RCC, n (%)	16 (84)	10 (77)	0.60
Prior nephrectomy, n (%)	18 (95)	13 (100)	0.40
Number of prior TKI, n (%)			0.13
1	3 (16)	7 (54)	
2	13 (68)	5 (38)	
≥3	3 (16)	1 (8)	
Number of prior mTORI, n (%)			0.22
0	17 (89)	13 (100)	
1	2 (11)	0 (0)	
Number of prior IFN/IL2, n (%)	2 (11)	2 (15)	0.68
Metastatic site, n (%)			
Lung	13 (68)	9 (69)	0.96
Lymph node	4 (21)	6 (46)	0.13
Bone	7 (37)	2 (15)	0.18
Liver	3 (16)	3 (23)	0.60
Others	7 (37)	3 (23)	0.40

DC: disease control rate. CR: complete response. PR: partial response. SD: stable disease. PD: progressive disease. IQR: interquartile. PS: performance status. RCC: renal cell carcinoma. TKI: tyrosine kinase inhibitor. mTORI: mammalian target of rapamycin inhibitor.

Table 2. Pathological assessment

	DC (CR + PR + SD) (n = 19)	PD (n = 13)	p value
CD8 T cell ≥ 52 cells, n (%)	15 (79)	5 (38)	0.03
TIA-1 ≥ 54 cells, n (%)	11 (58)	3 (23)	0.07
PD-L1 $\geq 10\%$, n (%)	5 (26)	2 (15)	0.67
HLA class I $\geq 90\%$, n (%)	18 (95)	13 (100)	1.00

Table 3. Factors contributing to the therapeutic effect of nivolumab

	Univariate analysis		
	OR	95% CI	p value
Age	1.04	0.97-1.12	0.18
Male	0.84	0.16-4.35	0.83
Karnofsky PS $\leq 70\%$	2.25	0.20-24.4	0.50
Clear cell RCC	1.60	0.26-9.53	0.60
Sarcomatoid/rahdoid change	0.39	0.05-2.76	0.34
Multiple organ metastasis	1.46	0.35-6.16	0.59
Sum of diameters of target resions at baseline	1.00	0.99-1.02	0.26
NLR before nivolumab administration	1.15	0.83-1.58	0.20
PLR before nivolumab administration	1.00	0.99-1.01	0.23
Immuno-score ≥ 3	4.58	0.94-22.2	0.05

OR: odds ratio. CI: confidence interval. NLR: Neutrophil to lymphocyte ratio. PLR: Platelet to lymphocyte ratio.

を認めなかった。病理学的評価についても2群で比較を行い、CD8陽性T細胞数はDC群で有意に多く、TIA-1陽性細胞数はDC群で多い傾向がみられた (Table 2)。

単変量解析では、Histological score 3点以上がニボルマブの最良治療効果に寄与する傾向がみられたが ($p = 0.05$)、統計学的に有意差のある因子は認めなかった (Table 3)。また Histological score 3点以上と3点未満の2群間に、ニボルマブ開始後の全生存 ($p = 0.81$) と癌特異的生存 ($p = 0.97$) の統計学的有意差は認められなかった (Fig. 2, 3)。さらに有意差のあったCD8陽性T細胞52個以上と52個未満の2群に分けて解析を行ったが、全生存 ($p = 0.45$) と癌特異的生存 ($p = 0.93$) に統計学的有意差は認められなかった。

考 察

本研究では腎癌組織について、腫瘍微小環境における過去の報告¹⁾から、ICIの効果予測に特に重要と思われる因子を選択し、検討を行った。リンパ球側の因子としてCD8陽性T細胞、TIA-1、腫瘍細胞側の因子としてPD-L1、HLA class Iの4種類の免疫染色を

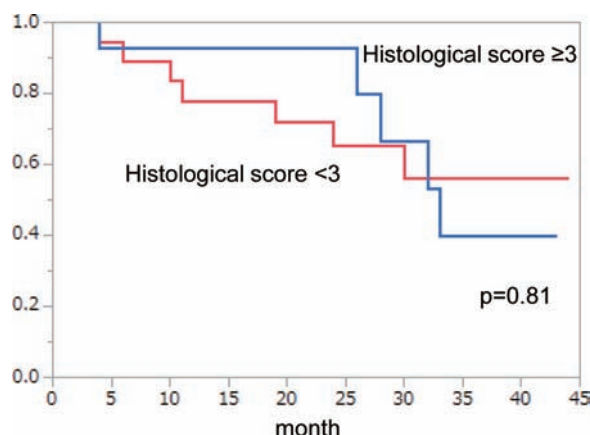


Fig. 2. Overall survival between the two groups of patients with histological score ≥ 3 and those with histological score < 3 .

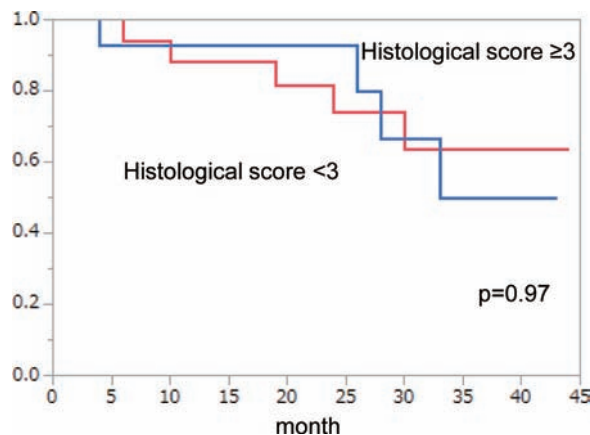


Fig. 3. Cancer-specific survival between the two groups of patients with histological score ≥ 3 and those with histological score < 3 .

行った。CD8陽性T細胞がDC群で有意に多く、これらを加点によりスコアリングした3点以上の群でニボルマブの最良治療効果を予測できる傾向が見られた。

腎癌の腫瘍微小環境における予後予測因子として、

Table 4. Prognostic factor of the major tumor microenvironment components in RCC

Tumor microenvironment element	Status	Prognosis
<u>Cells</u>		
CD8+ T cells	High density	Poor
Regulatory CD4+ T cells	High density	Poor
Tumor associated Macrophages	High density	Poor
B cells/Tertiary lymphoid structure	High density	Good
<u>Immune checkpoints</u>		
LAG3	Overexpression	Poor
TIM3	Overexpression	Poor
TIGIT	Overexpression	Poor
PD-L1	Overexpression	Poor

CD8 陽性 T 細胞, 制御性 T 細胞や腫瘍関連マクロファージなどの密度が高いと予後不良とされ, B 細胞の密度が高いと予後良好であるとされる (Table 4)²⁻⁴⁾. 免疫チェックポイント分子としては, LAG3, TIM3, TIGIT, PD-L1 などが高発現していると予後不良であるとされる^{5,6)}. このように予後との関連を示す報告は多いが, ICI の効果を予測する因子としてはいずれも十分なエビデンスがない. 腫瘍微小環境をより正確に解析するためには, 腫瘍細胞だけでなく, 免疫細胞も解析する必要がある. 本研究では, がん免疫サイクルにおける各ステップのうち特にエフェクター相に焦点を当てた⁷⁾. 腎癌における ICI への反応に関して, 本研究のような免疫染色を用いたスコアリングで検討した報告はみられない.

今回のスコアリングした 4 因子について, 免疫学的観点と他癌腫を含めた過去の報告から以下に選出理由を述べる. 腫瘍細胞が確実に殺傷される条件として, 単に腫瘍組織に CD8 陽性 T 細胞を認めても, 腫瘍実質ではなく間質に多く局在している場合や, 腫瘍細胞に浸潤していても細胞傷害性を示さない場合は機能しているとはいえず, ICI による効果もあまり期待できない. よって, 腫瘍実質に浸潤しているのか, 間質に浸潤しているのかを免疫染色を用いて区別することは特に重要である.

その上で CD8 陽性 T 細胞が癌抗原を認識するために, 腫瘍細胞の HLA class I の発現が大前提となる. さらに CD8 陽性 T 細胞が機能しているかどうかを判断するマーカーとして TIA-1 に着目した. TIA-1 は, 細胞質に存在し顆粒球に関連する RNA 結合タンパク質であり, 細胞傷害性を有する細胞に発現しているとされる⁸⁾. TIA-1 は CD8 陽性 T 細胞の 50~60% 程度に認められるが, 好中球や CD4 陽性 T 細胞, マクロファージ, NK 細胞などにもわずかに認められる⁹⁾. 血液悪性腫瘍, 骨肉腫, 大腸癌で報告が多く, CD8 陽性 T 細胞との組み合わせでさらに有用なバイオマーカーになるとされ, TIA-1 を発現する細胞傷害性の高い活性化 T 細胞は, 免疫療法の指標としても期待されている^{9,10)}.

PD-L1 に関して, 非小細胞肺癌では ICI の効果を予測するマーカーと認識されており¹¹⁾, 腎癌でもニボルマブ奏効群で, 腫瘍の浸潤部位に PD-L1 の発現が高い傾向が見られたとの報告はあるが¹²⁾, 有効なマーカーであるというエビデンスはない. 腫瘍に浸潤した活性化 CD8 陽性 T 細胞が産生するインターフェロンは, 腫瘍細胞における PD-L1 の発現を誘導するので, PD-L1 陽性の腫瘍には多数の CD8 陽性細胞が浸潤しているはずであるが, 間質のマクロファージや他の免疫細胞も PD-L1 を発現する可能性がある. 本研究では, 腫瘍細胞の PD-L1 発現に広く用いら

る E1L3N クローンを使用した, 癌腫や抗体薬によって評価が異なるため判断が難しい場合がある. さらに, PD-L1 の発現は腫瘍微小環境のごく一部しか反映していないため, これだけで抗 PD-1 治療の効果を予測するのは難しい. 以上の理由で今回の 4 因子を選出した, 各因子の重み付けはできておらず, 今後症例を集積してスコアリングの質をより高めたい.

今回は腫瘍細胞に浸潤する CD8 陽性 T 細胞のみ DC 群で有意に多く, その他因子に有意差を認めないという結果だった. 過去の報告と一致しない部分は症例数の少なさが一番の原因だと考えられるが, 今後は免疫的な作用機序からも TIA-1 をはじめとする複数の腫瘍微小環境の因子を組み入れた Histological score が有用な効果予測因子になることを期待したい.

本研究の限界点について述べる. 1 点目として, 病理医によって評価が異なる可能性である. 本研究では一般的評価とされる, リンパ球が最も浸潤している hot spot を基準としたが, 腎癌組織は血管が豊富であり, 腫瘍実質と間質の境界がわかりにくいいため, CD8 陽性 T 細胞が腫瘍細胞に浸潤しているかの評価が難しい. さらに, TIA-1 はリンパ球以外でも染まり, ほぼ同じサイズである好中球は, 形態的には異なるが判別困難なこともある. 本研究では主に 1 人の病理医が評価を行ったが, 複数名で評価してスコアリングの質を上げることで, より実用化につながると思われる. 2 点目として, TKI を中心としたニボルマブの前治療の影響である. 特に TKI に関しては, 樹状細胞の成熟化や腫瘍血管の正常化など, 近年になってより重要な役割が分かってきている. 評価したのはすべて治療薬が使用される前の腎癌原発巣であることから, 再発病変に関しては TKI の投与により腫瘍微小環境が大きく変化している可能性があり, 転移部位によっても違うかもしれない. 3 点目としては, 治療ガイドラインからもニボルマブ単剤の適応が狭く, 評価できた症例が少ないことである.

現在はファーストライン治療として TKI と ICI の併用, ICI の 2 剤併用など多剤併用療法が主軸になったこと, 2021 年 11 月, KEYNOTE-564 試験の結果をふまえて, 腎癌術後補助療法として抗 PD-1 抗体のペンプロリズマブが FDA で承認されたことから, 今後初期治療を選択する上で, 本研究での病理学的評価をより生かせる可能性があると考えられる.

結 語

がん免疫サイクルの各ステップの因子について, CD8 陽性 T 細胞を軸とした免疫染色を行いスコアリングすることで, 免疫チェックポイント阻害薬の最良治療効果を予測できる可能性がある.

文 献

- 1) Bruni D, Angell HK and Galon J: The immune contexture and immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat Rev Cancer* **20**: 662–680, 2020
- 2) Bruno TC: New predictors for immunotherapy responses sharpen our view of the tumour microenvironment. *Nature* **577**: 474–476, 2020
- 3) Rosser EC and Mauri C: Regulatory B cells: Origin, phenotype, and function. *Immunity* **42**: 607–612, 2015
- 4) DeFalco J, Harbell M, Manning-Bog A, et al.: Non-progressing cancer patients have persistent B cell responses expressing shared antibody paratopes that target public tumor antigens. *Clin Immunol Orlando Fla* **187**: 37–45, 2018
- 5) Simonaggio A, Epailard N, Pobel C, et al.: Tumor microenvironment features as predictive biomarkers of response to immune checkpoint inhibitors (ICI) in metastatic clear cell renal cell carcinoma (mccRCC). *Cancers (Basel)* **13**: 231, 2021
- 6) Takamatsu K, Tanaka N, Hakozaiki K, et al.: Profiling the inhibitory receptors LAG-3, TIM-3, and TIGIT in renal cell carcinoma reveals malignancy. *Nat Commun* **12**: 5547, 2021
- 7) Chen DS and Mellman I: Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* **541**: 321–330, 2017
- 8) Shetye J, Ragnhammar P, Liljefors M, et al.: Immunopathology of metastases in patients of colorectal carcinoma treated with monoclonal antibody 17-1A and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res* **4**: 1921–1929, 1998
- 9) Zlobec I, Karamitopoulou E, Terracciano L, et al.: TIA-1 cytotoxic granule-associated RNA binding protein improves the prognostic performance of CD8 in mismatch repair-proficient colorectal cancer. *PLoS One* **5**: e14282, 2010
- 10) Palmerini E, Agostinelli C, Picci P, et al.: Tumoral immune-infiltrate (IF), PD-L1 expression and role of CD8/TIA-1 lymphocytes in localized osteosarcoma patients treated within protocol ISG-OS1. *Oncotarget* **8**: 111836–111846, 2017
- 11) Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, et al.: Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **375**: 1823–1833, 2016
- 12) Stenzel PJ, Schindeldecker M, Tagscherer KE, et al.: Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating leukocytes and of immune checkpoint molecules PD1 and PDL1 in clear cell renal cell carcinoma. *Transl Oncol* **13**: 336–345, 2019

(Received on January 24, 2022)

(Accepted on May 16, 2022)