

## 公益財団法人 東京医科大学がん研究事業団 がん研究助成金研究報告書

令和 6 年 7 月 3 日

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者 (職名)	氏名	所属施設				
研究者 (職名)	高田 一樹 ㊞ ( 臨床助教 )	施設名	東京医科大学 呼吸器・甲状腺外科学分野	所在地	新宿区西新宿 6-7-1	電話 03(3342)6111
研究課題	間質性肺炎合併肺癌における腫瘍内免疫微小環境解析と 免疫チェックポイント阻害薬に対するバイオマーカー研究					
研究目的	本研究は、間質性肺炎合併肺癌（IP合併肺癌）の治療における現状の問題点を解決するための免疫関連バイオマーカーを探索することを目的とする。IP合併肺癌に対する治療は、早期症例では外科的切除、進行期や再発例には薬物療法が中心であるが、外科治療に伴う急性増悪のリスクが10-30%と高く、特に術後の急性増悪は人工呼吸器管理を要し、致命的となる場合がある。薬物療法においても、間質性肺障害（ILD）発症リスクが低いレジメンが選択されるため、有効な治療法が制限され、予後不良の因子となる。また、IP合併肺癌は悪性度が高く、広範な癌病変や高頻度のリンパ節転移も予後不良の因子となりうる。さらにはIP合併肺癌はPD-L1高発現である症例も少なくないため、ICIによる治療効果も期待されている。一方、ICI治療による免疫関連有害事象（irAE）の中でILD発症リスクが高いため、治療選択においては慎重にならざるを得ない。本研究では、腫瘍内免疫微小環境を詳細に解析し、ICIの効果予測やirAE発症リスクを明らかにすることで、治療の最適化を図ることを目的とする。					
研究方法	2016-2019年に非小細胞肺癌と診断され、免疫チェックポイント阻害薬（ICI）による治療が行われた148例中、間質性肺炎合併肺癌29例と非合併例119例を抽出する。そのうち、急性増悪が起った症例はそれぞれ8例（23%）／15例（13%）であり、急性増悪非発症例を含めて29例／30例を抽出する（合計59例）。間質性肺炎を合併しない症例の急性増悪非発症例はランダムに抽出する。上記の59例を対象に、生検組織検体もしくは肺切除組織検体のHE標本から腫瘍領域の評価を行う。FFPE標本から未染色スライドを準備し、OPAL 7-COLOR MANUAL IHC KIT (Akoya Biosciences, USA) を用いて、各症例に対して2つのパネルで染色を行う。Vectra Polaris (Akoya Biosciences, USA) を用いて各スライドをスキャンし、画像解析ソフトinForm (Akoya Biosciences, USA) により、各免疫応答細胞の自動定量解析を行う。					
研究成果	今年度は、蛍光多重免疫染色を行うための準備を行った。 (1) 抗体の染色条件を設定した。 pancytokeratin AE1/AE3 (epithelial cell positive, dilution 1:300, Dako, Carpinteria, CA) PD-L1 (clone E1L3N, dilution 1:100; Cell Signaling Technology) CD4 (helper T cells, Novocastra, clone 4B12, dilution 1:80, Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL; CD4 clone SP35, ready to use, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ; CD4 clone SP35, dilution 1:100, Spring Bioscience, San Francisco, CA) CD8 (cytotoxic T cells, clone C8/144B, dilution 1:20; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) CD3 (T-cell lymphocytes, dilution 1:100; Dako)					

研究成績	<p>CD68 (macrophages, clone PG-M1, dilution 1:450; Dako)      PD-1 (clone EPR4877-2, dilution 1:250; Abcam, Cambridge, MA)      granzyme B (cytotoxic lymphocytes, clone F1, ready to use; Leica Biosystems)      CD57 (natural killer T cells, clone HNK-1, dilution 1:40; BD Biosciences, San Jose, CA)      CD45R0 (memory T cells, clone UCHL1, ready to use; Leica Biosystems)      FOXP3 (regulatory T cells, clone 206D, dilution 1:50; BioLegend, San Diego, CA)</p> <p>(2) 以下の抗体の組み合わせで各免疫細胞を同定し、パネル1、2とした。      パネル1: malignant cells expressing PD-L1 (AE1/AE3 + PD-L1+); helper T cells (CD3 + CD4+); cytotoxic T cells (CD3 + CD8+); TAMs (CD68+); TAMs expressing PD-L1 (CD68 + PD-L1+)      パネル2: memory cells (CD45R0; including memory/natural killer cells CD45R0 + CD57 + granzyme B-, memory/regulatory cells CD45R0 + FOXP3+, memory antigen experienced cells CD45R0 + PD-1+, and other CD45R0+ cells); memory/regulatory cells (CD45R0 + FOXP3+); memory antigen experienced cells (CD45R0 + PD-1+); activated natural killer cells (CD57 + granzyme B + CD45R0-); antigen experienced cells (PD-1; including PD-1 + CD45R0+ and other PD-1+ cells)</p>
今後の予定	<p>今後は、OPAL 7-COLOR MANUAL IHC KIT (Akoya Biosciences, USA)を用いて蛍光多重免疫染色を実施し、画像解析ソフト inForm (Akoya Biosciences, USA)を用いた各免疫関連細胞の自動定量解析を行う予定である。これにより、間質性肺炎合併の有無、ICIによるILD発症の有無に伴う腫瘍内免疫微小環境のプロファイルを詳細に解析し、比較検討を行う。</p> <p>さらに、今後も研究費を獲得し、当初から計画していた遺伝子発現解析とTCRシーケンス解析の実施を可能にしたいと考えている。上述のサンプルから抽出したmRNAを用いて、免疫関連遺伝子の網羅的発現解析を実施する (nCounter, PanCancer Immune Profiling Panel, NanoString)。本解析では、ハウスキーピング遺伝子を含む770遺伝子のパネルを使用し、腫瘍浸潤リンパ球 (TILs) の各種免疫応答細胞の内訳や発現変動遺伝子の同定、パスウェイ解析を行う。</p> <p>同様に、抽出したmRNAを用いて、TCRシーケンス解析 (TCRレパートア解析、Repertoire Genesis) も実施する計画である。</p> <p>腫瘍内免疫微小環境の多角的な解析を通じて、間質性肺炎合併肺癌 (IP合併肺癌) の治療に関連する新規バイオマーカーの発見に寄与することが期待される。</p>

令和 6年 7月 3日

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者所属施設名 東京医科大学

氏 名 高田 一樹

印

## 收支決算書

(単位 円)

交付を受けた助成金額		金 2,000,000 円	
支 出 内 訳	費 目	明 細	単 価 及 金 額
	設備、備品費	なし	0円
	消耗品費	・実験消耗品費 ・外付けHDD ・振込手数料	1,983,718円 15,081円 1,320円 2,000,119円
	計		2,000,119円
	過 △ 不 足 額		△119円
備 考			

## 支 出 費 内 訳

区分	金額	根拠
設備、備品費		
消耗品費	1,983,718円	実験消耗品① 121,110円 実験消耗品② 549,538円 実験消耗品③ 93,973円 実験消耗品④ 150,777円 実験消耗品⑤ 40,986円 実験消耗品⑥ 76,384円 実験消耗品⑦ 950,950円 研究を記録するためのHDD 15,081円 振込手数料(3回分) 440円×3 = 1,320円
	15,081円	
	1,320円	

※注意：旅費（出張費、宿泊費、交通費）は研究経費に入りません。