

# 論文要旨

Quantitative Immunohistochemical Assay with Novel Digital Immunostaining for  
Comparisons of PD-L1 Antibodies

(新規デジタル免疫染色による PD - L1 抗体の定量的免疫組織化学的分析  
の比較)

関西医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科講座  
(指導：岩井 大 教授)

藤澤 琢郎

## 【はじめに】

我々は「高輝度蛍光粒子を用いたデジタル免疫染色」と呼ばれる新しい定量的免疫染色法を開発した。従来の免疫組織化学(IHC)の評価方法は、3,3' ジアミノベンジジン (DAB) などによる呈色の染色強度に依存し半定量的であるが、デジタル免疫染色は、染色強度ではなく粒子を数えることでより客観的なデータを得られる。また、1抗体1粒子で結合構成されるために、より定量的であると考えられる。

Programmed cell death-1(PD-1)は、細胞傷害性 T 細胞の表面に発現する免疫チェックポイント受容体の一種であるが、細胞傷害性 T 細胞の PD-1 受容体と抗原提示細胞や腫瘍細胞の Programmed cell death ligand-1 (PD-L1) の結合により、抗腫瘍効果が不活性化を来すことが知られており、PD-L1 発現腫瘍に PD-1/PD-L1 結合を阻害する薬剤は一部の症例に持続性の抗腫瘍効果を示すことが種々の腫瘍で明らかになってきている。

PD-1/PD-L1 抗体薬の有効性と DAB ベースの免疫組織学的手法で測定した PD-L1 タンパク質発現との間には強い関連性があるが、免疫組織学的手法で陰性(適応外)と判断された症例の一部にも有効例が存在し、完全な治療効果予測マーカーとはいえない状況である。

各薬剤に対してそれぞれコンパニオン、コンプリメンタリーな試薬が上市されて1薬剤1試薬の組み合わせが行われているが、日常診療では対応が難しく、1試薬による判定を複数の薬剤の予測因子として使用できないかの「読み替え」研究が複数行われ一定の方向性が明らかになってきているが、各試薬の実力を測定する上で、抗体の力価、検出システム、および視覚化のダイナミックレンジの違いなど、多くの変数が存在している。

我々の開発したデジタル免疫組織学的手法の特徴である定量性を用いることで、各抗体の力価を評価すること。また、高輝度な粒子によるタンパク低発現領域の精密定量化を用いることで通常染色での偽陰性の可能性を探究することは今後の診断試薬の開発に寄与すると考えられる。

## 【研究方法】

PD-L1 タンパク質発現に対する PID の正確さを実証するために、我々は粒子の数を5つの細胞株(NCI-H446、PC-3、NCI-H1299、A549、およびNCI-H460)からのELISAおよびnCounterによるmRNA分子カウントデータと比較した。

## 【結果】

ELISAによって測定されたPD-L1の最高タンパク質発現レベルは、NCI-H460が最も高く、続いてA549、PC-3、NCI-H1299、NCI-H446の順であった。さらに、nCounterによって測定されたPD-L1 mRNA値は、ELISAによって測定されたタンパク質量と高い相関関係を示した。PD-L1 スコア(細胞当たりのPIDカウント)とELISAレベルとの比較は、全ての一次抗体について高い相関を示した。さらに、各抗体についてPD-L1発現傾向に差はなかった。PD-L1 スコアとnCounterレベルとの比較は、全ての一次抗体について高い相関を示

し、各抗体について PD-L1 発現傾向に差はなかった。

#### 【考察】

我々は、PD-L1 抗体を用いたデジタル免疫染色法は ELISA でのタンパク発現量および nCounter で得られた mRNA 発現量と高度に相関していることから、デジタル免疫染色法は直線的な定量化が可能な技術であることを証明した。

検討した 4 つの抗体のうち、SP142 以外の全ての力価はほぼ同等であることが証明され、近年報告されている「読み替え」研究の結果と一致した。

また、ヒト肺癌組織におけるデジタル免疫染色の結果も近年の報告を支持するものであった。

以上、PD-L1 抗体でのデジタル免疫染色法は高感度、定量的、正確かつ頑強な組織切片上でのタンパク発現解析手技であることを証明した。今後、免疫チェックポイント阻害剤投与例で、コンパニオン診断薬の判定とデジタル免疫染色による精密定量化技術での判定を比較することで、通常法による偽陰性例・疑陽性例を明らかにすることでより有用な診断薬開発の情報を提供することが可能になると期待される。