

出國報告（出國類別：進修與研究）

以腫瘤組織微環境建立早期肺癌使用術 前免疫療法的療效預測模型

服務機關：國立成功大學醫學院附設醫院內科部

姓名職稱：蘇柏嵐

派赴國家：美國

出國期間：2023年5月4日至2024年5月3日

報告日期：2024年6月26日

摘要

術前使用合併化學治療與免疫療法已成為早期非小細胞肺癌患者的標準治療方法。然而，接受術前合併化學治療與免疫療法的患者中只有約 20-30%達到病理完全緩解 (complete pathological response)，這個指標與延長無疾病生存期(Disease-free survival)和總生存期(Overall survival)密切相關，這樣的結果顯示需要更新的合併療法來改善治療結果。過去在第二期臨床試驗 NADIM 中，對於早期肺癌的病患使用術前合併化學治療與免疫療法有達到不錯的成效，在進行檢體的後分析時，發現術後有達到病理完全緩解的患者在批量 RNA 定序(Bulk RNA sequencing)中有較高的干擾素- γ (Interferon- γ)和顆粒酶 B(Granzyme B)表達。這些因子與細胞毒性 T 細胞和自然殺手細胞的活化有關。在另外的一個第二期臨床試驗 LCMC3 的事後分析也發現，NKG2A+ 自然殺手細胞(帶有抑制活性訊號的自然殺手細胞)的增加也與病理反應呈現負相關。這些研究強調了先天免疫在術前治療病理反應中的重要性。在本研究中，我們進行第二期臨床試驗 LCMC3 的後分析，希望可以建立術前免疫療法的療效預測因子。我們依據空間點模式(Spatial point pattern)分析多重免疫熒光數據，並依據這項研究的結果建立術前免疫治療的療效預測因子，為來將嘗試開發新的藥物組合。

關鍵字：早期肺癌、術前免疫治療、腫瘤微環境

目次

封面	1
摘要	2
目次	3
本文	
目的	4
過程	6
心得	14
建議事項	15

目的

非小細胞肺癌是肺癌的主要組織學亞型，目前是癌症相關死亡的主要原因。這些患者中約有一半為早期疾病，其中包括可手術切除（IA 至 IIIA 期）和局部晚期疾病（IIIB 和 IIIC 期）。然而，根據以往全球肺癌分期研究，可手術肺癌患者的 5 年存活率僅為 30-50% 左右，仍有很大的改善機會。在過去，免疫療法在轉移性肺癌治療中已有顯著的成功。免疫檢查點抑制劑（包括 atezolizumab 和 pembrolizumab）單一療法已被證明可延長 PD-L1 高表達的轉移性非小細胞肺癌患者的總生存期。此外，化療和免疫治療的合併治療以及雙重免疫治療都提高了所有肺癌患者的存活率。近年來，越來越多的研究探討免疫療法對早期非小細胞肺癌的療效。起初的臨床試驗使用的是單一免疫檢查點抑制劑療法（nivolumab 和 atezolizumab），已發現在早期非小細胞肺癌患者中產生了主要病理反應（major pathological response）。隨後，化療和免疫療法的組合，包括 nivolumab、atezolizumab 和 pembrolizumab，提供了更高的完全病理緩解率（complete pathological response），這與延長無疾病生存期和總生存期密切相關。儘管這種方法已成為早期非小細胞肺癌患者的標準治療方法，但接受新輔助化學免疫治療的患者中只有約 20-30% 達到病理完全緩解。這表明需要更新的聯合療法來進一步改善治療結果。

腫瘤微環境，包括免疫細胞和其他非惡性細胞（如成纖維細胞和血管）的組成，已被廣泛研究並評估它們在癌症發生和治療反應中的作用。許多研究都集中在免疫細胞組成對接受手術的早期非小細胞肺癌患者存活結果的影響。大多數這些研究的結論是，較高數量的腫瘤浸潤細胞毒性 T 淋巴細胞與存活結果的改善有關。然而，過去仍有研究指出相反的結論，例如有一項研究表明，細胞毒性 T 淋巴細胞浸潤的增加與腺癌組織學患者較差的生存結果有關。有趣的是，進一步的分析表明，細胞毒性 T 淋巴細胞的分佈與 CD4+FOXP3+CCR4+調節性 T 細胞和 CD163+M2 巨噬細胞的分佈密切相關。這項研究表明，為了充分了解腫瘤免疫微環境的動態，評估其他免疫細胞與細胞毒性 T 細胞的交互作用與空間相關性至關重要。透過多重免疫螢光測試，研究人員可在單一切片上同時分析所有免疫細胞，藉以更全面地了解腫瘤免疫微環境，我們也將在本研究利用此工具研究腫瘤免疫微環境，並藉此預測早期非小細胞肺癌使用術前免疫化學治療的療效。

在腫瘤發生過程中，先天免疫和適應性免疫在消除癌細胞方面發揮著至關重要的作用。最初，自然殺手細胞、NKT 細胞、 $\gamma\delta$ T 細胞、巨噬細胞和樹突狀細胞浸潤腫瘤，隨後逐漸增加腫瘤特異性 CD4+ 輔助 T 細胞和 CD8+ 細胞毒性 T 細胞。在免疫檢查點抑制劑（包括 PD-1/PD-L1 抑制劑和 CTLA-4 抑制劑）出現後，細胞毒性 T 細胞已被探索作為治療標靶。同樣，先天免疫也正在作為下一代療法的目標進行研究。在 II 期 COAST 試驗中，對於同步放化療後部分緩解或病情穩定的局部晚期 NSCLC 患者，PD-L1 抑制劑 durvalumab 和 NKG2A 抑制劑 monalizumab 聯合治療顯示，與 durvalumab 單藥治療相比，可改善無進展生存期（Progression-free survival）。由此研究顯示使用藥物同時活化適應性免疫和先天免疫是未來有前景的治療方法。

關於可手術病患的術前輔助治療，目前也有一些證據支持自然殺手細胞的作用。從第二期臨床試驗 LCMC3 研究的後分析中，我們發現自然殺手細胞的存在與病理反應呈負相關。隨後的單細胞分析進一步揭示，腫瘤內的這些自然殺手細胞表達高水平的 NKG2A，從而透過 HLA-E/NKG2A 途徑誘導向自然殺手細胞和細胞毒性 T 細胞發出抑制信號。同樣，在 NADIM 試驗的事後分析中，具有完全病理反應的患者俱有較高的干擾素- γ 和顆粒酶 B 表達，這與細胞毒性 T 細胞和自然殺手細胞的活化有關。此外，使用 CIBERSORTx 對批量 RNA-Seq 數據進行去卷積分析細胞組成中發現，具有完全病理反應的患者在其腫瘤免疫微環境中具有較高比例的活化自然殺手細胞和 M1 巨噬細胞。這些研究強調，除了細胞毒性 T 細胞外，自然殺手細胞在確定早期 NSCLC 術前輔助免疫療法的療效方面也發揮著至關重要的作用。在本研究中，我們將透過單細胞分析研究腫瘤微環境，以確定預後因素和潛在的治療標靶，並希望針對自然殺手細胞發展合適的治療組合。

過程

實驗過程：

1. 患者族群

在本研究中，我們將回溯性評估第二期臨床試驗 LCMC3 的病患資料，此臨床試驗收錄的族群為新診斷為 II-III A 期 NSCLC 的患者，在試驗中會者被給予術前輔助免疫治療，並記錄他們的臨床表徵，如年齡、性別、腫瘤大小、淋巴結狀態、體能狀態、基因變異情形以及免疫治療的選擇等。另外也收錄手術後的臨床切片並判斷其病理緩解程度，在本研究過程中，我們也將收集治療前的腫瘤樣本以及手術後的腫瘤樣本以進行多重免疫螢光分析。

2. 組織製備與多重免疫螢光過程

根據 CODEX® 的標準作業流程，使用組織染色的多重抗體組進行標記、成像和移除的迭代循環，反覆測定各個指標。其中包含淋巴球 (CD4、CD8)、巨噬細胞 (CD68、HLA-DR、CD163)、自然殺手細胞 (CD56、CD16)、骨髓細胞 (CD33、CD14、CD15、HLA-DR)、調節性 T 細胞 (Foxp3) 的標記，另也將檢查樹突狀細胞 (S100) 和成纖維細胞 (SMA) 的特徵分子。以及免疫檢查點蛋白，包括 PD-1/PD-L1、LAG3、VISTA、ICOS、IDO-1，以及其他與免疫細胞活化相關的分子，包括顆粒酶 B (Granzyme B) 和 Tim3，也將被評估。

3. 執行細胞註釋

使用建置於 ImageJ 系統中的 CODEX® Multiplex Analysis Viewer 載入影像原始檔案後，可以對有核細胞進行 DAPI 陽性識別，並透過對 DAPI 陽性細胞進行 gating 以消除非細胞的偽影。經過 gating 後的 FCS 檔案將被重新匯出，並隨後匯入 JAVA 程式背景的 Vortex 聚類軟體中，在該軟體中它們將使用角距離演算法進行無監督 X 平移聚類 (X-shifting clustering)，後續將藉由 heatmap 評估各個 cluster 的表面標記的表現量，並進行相對應的細胞種類分型。

4. 腫瘤微環境的無監督特徵提取以分析協調的細胞鄰域

識別細胞類型後，將捕獲一個由 10 個最近鄰細胞 (包括中心細胞) 組成的“窗口”，該窗口是使用 Python 的 scikit-learn 實現的 K 最近鄰算法通過 X/Y 坐標之間

的歐幾里德距離測量的，然後被定義為單元鄰域。然後每個視窗將轉換為包含 10 個鄰居中每種細胞類型的頻率的向量，隨後將使用 Python 的 MiniBatchKMeans 的 scikit-learn 實現對視窗進行聚類。接著每個單元將被分配到其周圍視窗所在的單元鄰域。最後，包含每位患者的細胞類型和細胞鄰居之間相關性的矩陣將被納入維度為患者 x 細胞類型 x 細胞鄰居的三維張量中。然後將使用 Tensorly Python 套件執行非負 tucker 分解 (non-negative tucker decomposition) 來識別細胞類型和細胞鄰域之間相互作用的主要成分，其中核心張量表示細胞類型模組和細胞之間的相互作用-鄰域模組和因子張量表示模組與原始細胞類型、細胞鄰域或組織類型之間的相關性。

5. 透過 G-cross 函數估計免疫細胞和腫瘤細胞之間的空間關係

G-cross 函數是地理學研究相關的工具，用於評估特定人口與功能性單位如賣場、商店的地理位置。目前有許多研究開始應用 G-cross 函數來計算腫瘤細胞與免疫細胞的空間相關性，舉例來說，此公式可藉由設定以腫瘤細胞為中心，評估一定距離內發現的免疫細胞的機率分佈。此機率分佈可用於量化任兩種細胞類型之間的相對接近度。因此，G-cross 功能可作為免疫浸潤的定量指標，區分出雖然距離很近但與腫瘤細胞分開聚集的免疫細胞和與腫瘤細胞密集共存的免疫細胞。

G-cross 函數在數學上表示如下：

$$G_{xy}(r) = 1 - e^{-\lambda_y \pi r^2}$$

這裡，下標「x」和「y」表示我們正在計算「y」類型單元相對於「x」類型單元的空間分佈。術語 λ_y 代表載玻片中「y」型細胞的總密度。上述 G-cross 函數的曲線下面積(AUC)反映了「y」型細胞距離「x」型細胞一定距離內的浸潤程度。

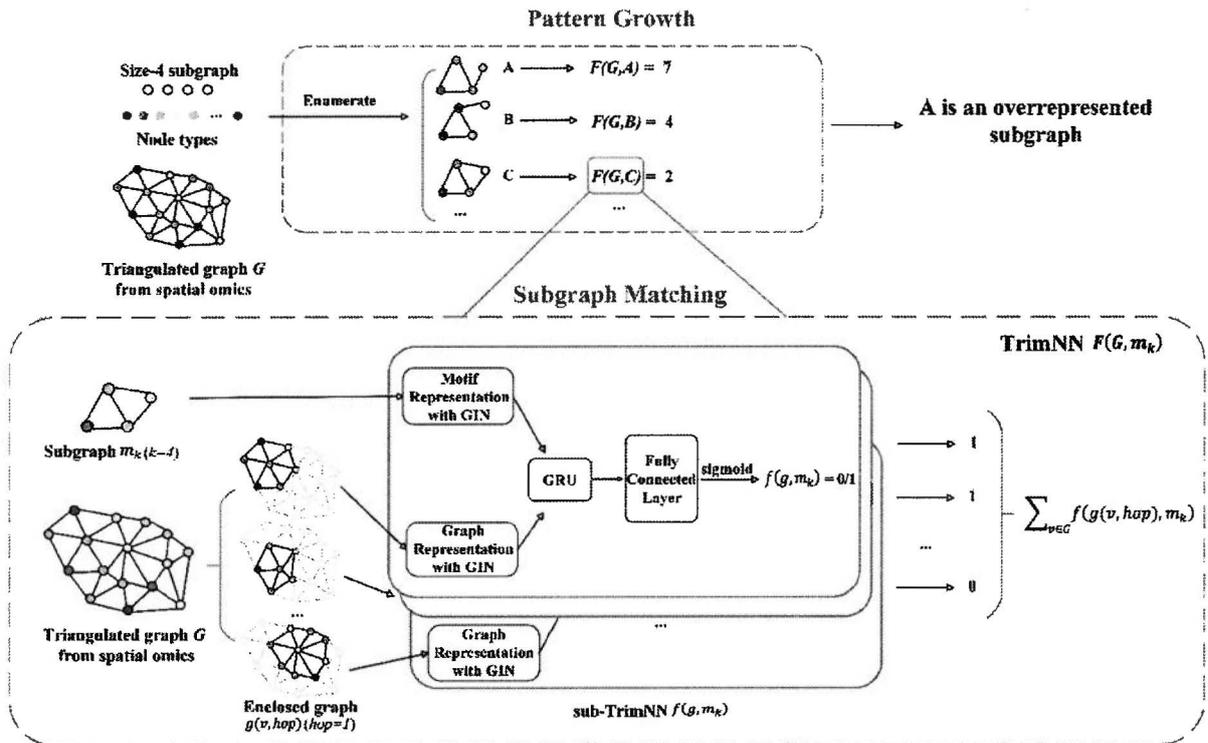
6. 空間分數的計算

與上一節類似，我們將從多重免疫螢光數據中提取細胞標識及其相應的空間資訊 (X/Y 軸值)。然後，我們將使用 deldir R 套件中的 Delaunay 三角剖分演算法來建立 Voronoi 圖，以分析與目標細胞直接相互作用的相鄰細胞的組成。使用 spatstat R 包，我們可以確定距目標細胞到最近的指定免疫細胞的距離，這將使我們能夠計算空間得分。例如，如果我們對腫瘤細胞、細胞毒性 T 細胞和調節性 T 細胞之間的相互作用感興趣，我們可以計算細胞毒性 T 細胞到腫瘤細胞的距離與細胞

毒性 T 細胞到調節性 T 細胞的距離的比率。

7. 組織模組 (tissue motiff) 的運算

在上一階段的 Delaunay 三角剖分演算法建置後，可以分析細胞與細胞之間直接連線的數量，譬如 T 細胞與腫瘤細胞剛好在鄰近的數量，亦可以使用三或四個細胞為單位，組建成三角形或多角形的模組進行分析（如圖一），在完成數量計算後，會針對其模組中單位細胞出現的數量來進行數據正規化。

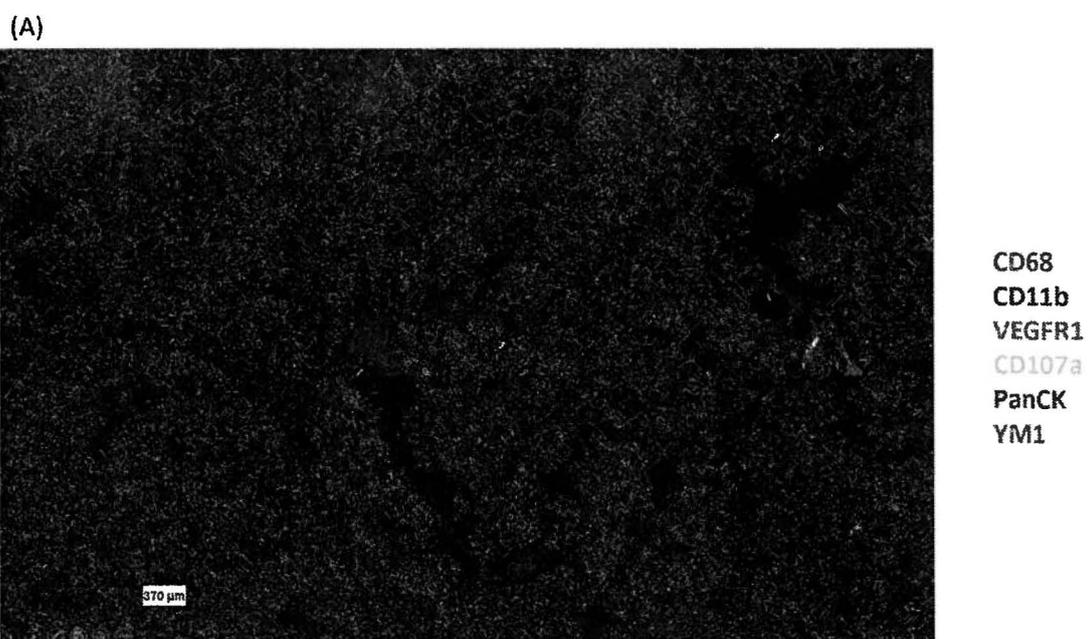


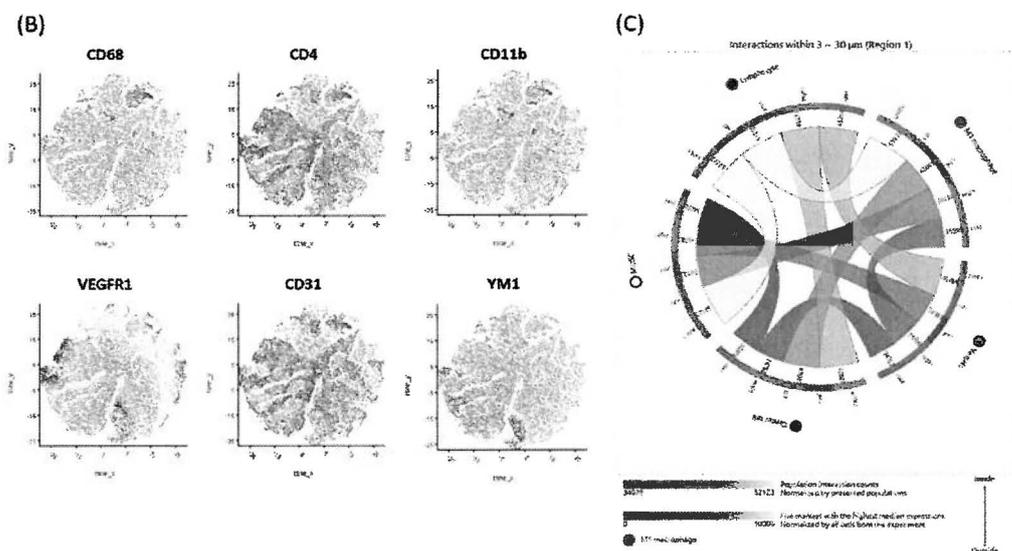
圖一、組織模組的計算，在本圖中的範例為四個細胞組成的多邊形為組織模組進行分析

研究成果：

本次研究中主要是使用第二期臨床試驗 LCMC3 的病患檢體與資料，在該臨床試驗中，總共收案了 181 位病患，其中 171 位患者接受了兩種劑量的 atezolizumab，另外 10 名沒有完成治療，主因是由於藥物相關不良事件、醫師臨床決策改變與病患個人因素等。在 181 位患者中，159 位接受了以治癒導向的手術，其餘 22 人沒有接受手術。在 159 位接受手術的患者中，其中 16 位病患的腫瘤帶有表皮生長因子接受器突變（外顯子 19 缺失 (n=8)、外顯子 20 插入 (n=1)、外顯子 21 L858R 替換 (n=1)) 或 ALK 融合基因 (n=6)，這些病患被排除在主要療效分析之外。在主要分析族群中，主要病理緩解 (major pathological response, MPR) 率為 20%，而病理完全緩解 (pathological complete response, pCR) 率為 6%。

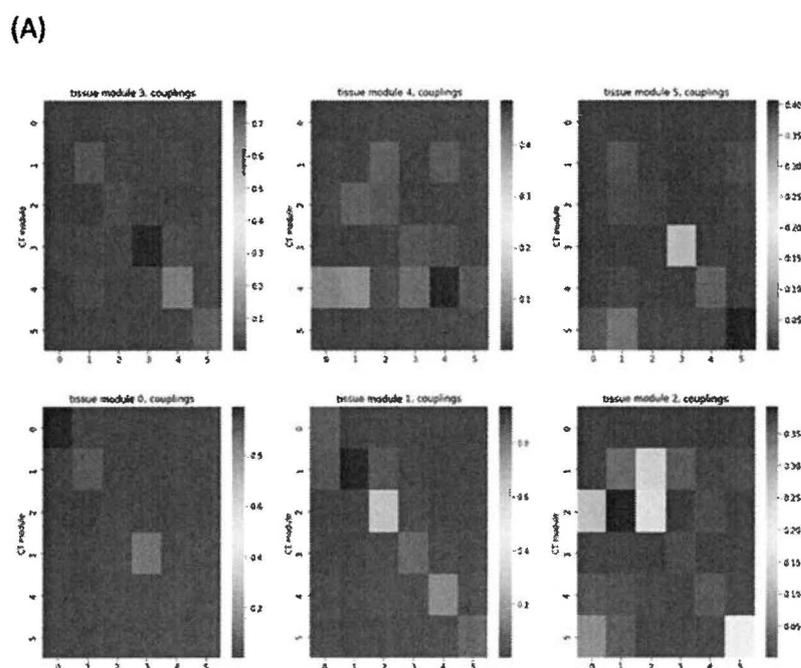
在進行多重螢光染色後，將原始影像匯入 Image J 為平台建構的 CODEX[®] multiviewer 進行影像分析。圖二(A)為初始影像的型態，每個螢光色彩代表不同的細胞表面蛋白表現量，在進行 viable cell gating 後，資料會轉入 JAVA 背景的 Vortex 程式並進行非監督式 clustering，後續使用 heatmap 將細胞聚類 manually curated 再進行 annotation。後續為了視覺化表現，會進行 tSNE 進行降維與做圖 (圖二(B))，並且使用 chord plot 進行細胞與細胞間表面蛋白表象的相關性 (圖二(C))

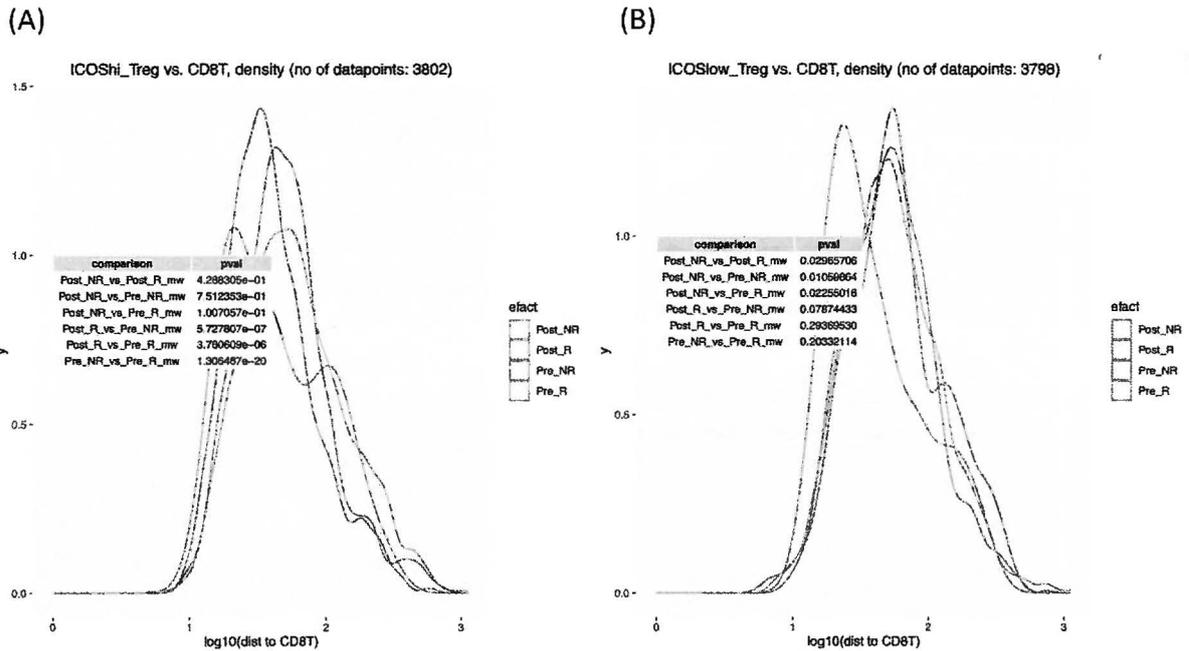




圖二、(A) The represented image of highly multiplexed fluorescence. (B) The expression of different biomarker under t-SNE analysis. (C) The chord plot which illustrate the correlation between different cell types.

在完成細胞 annotation 後，可以得到每個細胞的名稱以及其相對的座標（X、Y 值），後續便可以單一細胞為中心，與鄰近的 20 個細胞形成一個 cellular neighborhood 的資料，之後進行 K-means cluster 來針對 cellular neighborhood 進行分類，分類後創建另一個圖像，將細胞 annotation 轉變為 neighborhood annotation，完成這一步後得到的圖像是在病理切片中，各類 cellular neighborhood 分佈的情形。後續請病理科醫師對照原本的 H&E stain 與 cellular neighborhood 分佈圖，就可以針對不同的 cellular neighborhood 進行命名。在命名後，每一個組織切片都會有 cell type annotation 對上 cellular neighborhood annotation 的關係圖，將不同病患或是不同組織的關係圖組建為 3-D tensor 後，就可以使用 tensor decomposition 進行主成分分析，便可得到圖三(A)中的主成分相關圖，其中橫軸為 cell type 的主成分，而縱軸則為 cellular neighborhood 的主成分，若從主成分回推原始因子，則可以得到圖三(B)中的實際 cell type 與 cellular neighborhood 的相關性。





圖四、The normalized distance between (A) ICOS-highly-expressed regulatory T cell and cytotoxic CD8 T cell (B) ICOS-low-expressed regulatory T cell and cytotoxic CD8 T cell among responder and non-responder. Post_NR, post-treatment sample in non-responder; Post_R, post-treatment sample in responder; Pre_NR, pre-treatment sample in non-responder; Pre_R, pre-treatment sample in responder.

臨床見習：

由於 Prof. David Carbone 是享譽國際的大師級腫瘤科醫師，在這段期間也有爭取到他的門診進行 clinical observation，美國醫療非常注重病人隱私，而且會有非常詳細的資料收集，在醫師親自與病患見面前，通常都會有護理師、腫瘤專科護理師先進行初步問診，收集資訊後，再由醫師確認並做 decision making。另外看診的大辦公室就有其他專業科別的醫師，如胸腔內外科、放射腫瘤科、緩和醫療科等醫師，要進行 consultation 都相當容易，足夠的問診時間也拉近醫師與病患的距離，對醫師來說是相當理想的環境。另外也看到許多不同的臨床試驗，包含公司發起的與研究者自主申請的都有，在 Ohio State University 還有一個部門專門處理研究者自行發起的研究案，通常都合併有更詳盡的 biomarker analysis，可以在執行醫療的同時推動研究的進展。這次主要有參與 DLL3-targeted T cell engager 的臨床試驗的收案過程，也在 Prof. David Carbone 的指導下完成了 review article (*Po-Lan Su, Karthik Chakravarthy, Naoki Furuya, Jeremy Brownstein, Jianhua Yu, Meixiao Long, David Carbone, Zihai Li, Kai He. DLL3-guided therapies in small-cell lung cancer: from antibody-drug conjugate to precision immunotherapy and radioimmunotherapy. Mol Cancer. 2024 May 10;23(1):97.*)。

國際會議參與：

在本次出國期間曾參加癌症免疫治療學會(Society for Immunotherapy of Cancer, SITC)年度會議，我主要專注於兩大議題：三級淋巴結構(TLS)及細胞治療。三級淋巴結構，一種在非淋巴組織中形成的有組織免疫細胞聚集體，與癌症的免疫治療預後和臨床反應有關。這些結構的形成及其對腫瘤內免疫反應的影響尚未完全明瞭。研究顯示，三級淋巴結構在解剖學上類似於次級淋巴器官，但兩者之間存在顯著差異。三級淋巴結構的研究有望提高對其作為預後和預測標記物的認識。另一方面，細胞治療（原名過繼性細胞療法）作為一種高度個人化的癌症療法，主要是使用具有直接抗癌活性的免疫細胞。腫瘤浸潤性淋巴細胞(Tumor-infiltrating lymphocytes, TILs)是一種實驗性細胞療法，對於實體腫瘤的治療具有潛力，但目前僅在臨床試驗中進行。此外，嵌合抗原受體 T 細胞療法(CAR-T)作為癌症治療的新支柱，雖在某些白血病或淋巴瘤中取得顯著臨床反應，但在實體腫瘤和血液惡性腫瘤治療中面臨多重挑戰。這些挑戰包括毒性反應、抗原逃避、腫瘤滲透等問題。因此，發展更強大、抗腫瘤活性更高且毒性更低的 CAR-T 細胞成為當務之急。

心得

實驗部分：

在 Prof. David Carbone 腫瘤實驗室進修的這一年，主要觀察到教授在研究規劃上的縝密度，在台灣做研究時期，常常有想法就希望趕快投入研究，但往往結果不如預期。在教授實驗室研修的這一年，其實真正開始做研究已經是到達的三個月之後，途中經過反覆的討論與修改，在設計 multiplex immunofluorescence panel 時，在有限的數量內希望達到最 comprehensive 的 surface marker，在整個討論過程中加強了許多免疫學的知識，也學會如何分析 flow cytometry 的資料。後續在進行機器學習分析腫瘤微環境時，也更精進自己的程式語言，希望未來可以自己開發出腫瘤微環境的分析平台。

臨床見習：

除了常規診治病患以外，讓我覺得衝擊最大的就是臨床試驗的數量，而且還有多數都是研究者發起的試驗案，這個在台灣困難度很高，主要關卡是在廠商願意贊助藥物的比例低，另外就是做 biomarker 分析的研究經費不足，這樣就會失去很多藉由臨床試驗帶動的基礎研究，這一塊是希望未來有機會改善的。

學術會議：

在 Prof. David Carbone 實驗室進修有一個好處，他會完全資助參與國際會議的費用，這次有幸可以參加美國癌症免疫治療學會的學術年會以及會前的 learning course，收穫相當豐富，也有幸可以認識 University of Pittsburgh 的 Tullia Bruno 教授，參加她主辦的線上研討會，每次都收穫豐富。

建議

1. 可以強化人工智慧在腫瘤微環境的分析，成大有很強的 AI 團隊，未來如果可以應用於生物研究，主導高維資料分析，會是個很吸引人的發展
2. 增加支持研究者發起的臨床試驗案，包含強化與廠商的連結，使廠商願意提供發展中的藥物，以及研究經費支持 biomarker study，這些都有助於臨床醫師進行研究
3. 鼓勵年輕醫師多參加國際學術年會開拓視野