

令和元年5月22日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15543

研究課題名(和文) 血漿中がん細胞エクソソーム由来免疫チェックポイント阻害薬バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) The quest for immune checkpoint inhibitor biomarker derived from tumor exosomes

研究代表者

松江 弘之(Matsue, Hiroyuki)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：10250424

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：当初、悪性黒色腫患者の血漿中エクソソームのPD-L1に注目し、免疫チェックポイント阻害薬投与前に効果が期待できる症例を選択するバイオマーカーを見つけようとしていた。そのさなか、エクソソームのPD-L1が免疫抑制状態、抗PD-1反応と関連すると報告された。しかし、PD-L1は炎症でも上昇し、特異性が低いと予想された。また、腫瘍特異的変異抗原(neoantigen)とそれら阻害薬の効果に相関が報告され、neoantigenの同定がその効果予測に重要であると考えられた。そこで、我々は、がん病変部からDNAを抽出し遺伝子パネル解析にてがん関連遺伝子を網羅的に解析し、neoantigenを検索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害薬は悪性黒色腫以外の癌にも適応が拡大されて使用されているが、この種の薬剤の共通の問題点は、担がん患者さんの抗腫瘍免疫の状態を適切に評価する方法がなく、抑制されている抗腫瘍免疫能も評価できないことである。この種の薬剤の効果は、抑制を解除したときの抗腫瘍免疫の強さが関与しており、投与前に効果が期待できる症例の適切なバイオマーカーを見つけることは、適応患者を選択し、医療費削減にも寄与する。我々の研究の継続は、日本人の悪性黒色腫患者さんのneoantigenを同定し、それに対する特異的抗腫瘍免疫を評価する第一歩として重要である。

研究成果の概要(英文)：At the beginning of the study, we focused on PD-L1 in exosomes in the plasma of malignant melanoma patients and sought to find appropriate biomarkers to select cases that could be expected to be effective before administration of the immune checkpoint inhibitor. At that time, in 2018, PD-L1 in exosomes was reported to be associated with immunosuppression and anti-PD-1-response. But, PD-L1 are also elevated in inflammation, and are expected to have low specificity. Also, in recent years, positive correlations between tumor-specific mutant antigens (neoantigens) and the effects of immune checkpoint inhibitors have been reported, and identification of neoantigens was considered to be important for the effect prediction. Therefore, we have extracted DNA from melanoma lesions and comprehensively analyzed cancer-related genes using gene panel analysis to search for neoantigens.

研究分野：皮膚免疫

キーワード：悪性黒色腫 メラノーマ バイオマーカー エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

がん免疫療法は数十年にわたり動物実験で数多くの戦略が試されてきたが、臨床研究に移行できたものは少なく、効果もかなり限定的であった。多くのがん免疫療法はがん細胞を排除あるいは死滅させる免疫を高める様々な方法が試されてきた(Nature Med,10:909,2004)。その後の研究努力の結果、2013年、米国 Science 誌の年末最終号(342:1432,2013)にその年のブレークスルーとしてがん免疫療法が選ばれた。それは進行期メラノーマに対する抗 CTLA4 抗体と抗 PD-1 抗体の単独および併用療法(Wolchok, J.D. et al.: N Engl J Med 369:122,2013)で非常に高い奏効率を報告した臨床試験に対するものであった。わが国では2014年7月に抗 PD-1 抗体が世界に先駆けて承認され、抗 CTLA4 抗体は米国の初承認から4年遅れて2015年7月に承認されている。これらは単独投与でも併用でも進行期メラノーマ全生存期間を延長させる画期的な治療法である。数年後のノーベル賞医学生理学賞は、がんに対する免疫抑制を阻害することによるこれらの抗体を用いた新しいがん治療法の発見で、CTLA-4 抗体療法を発見した James P. Allison 氏と PD-1 抗体を発見した本庶佑氏に贈られたのは記憶に新しい。CTLA-4 や PD-1 は T 細胞の過剰な免疫反応を抑制する分子で、活性化 T 細胞表面上に誘導され、過剰な免疫反応が起こらないようにするいわばブレーキの働きをしている。この抑制シグナルをこれらの中和抗体でブロックすることで担がん患者が本来持っていたが、抑制されていた抗腫瘍免疫が発揮できるようにすることがこれらの治療薬の作用機序である。この種の作用機序の分子標的薬は近年、“免疫チェックポイント阻害薬”と呼ばれている。本萌芽研究申請時(2016年秋)、この二つの分子の抗体だけでも、多くのがんを対象に臨床試験が進行中であったが、肺がん、腎がん、ホジキンリンパ腫など適応の拡大が抗 PD-1 抗体に関してその後なされた。その後それらに加えて、胃がん、頭頸部がん、悪性胸膜中皮腫に適応が追加されている。さらに他のがんでも臨床試験が進行している。

これらの薬剤の共通の問題点は、担がん患者の抗腫瘍免疫の状態を適切に評価する方法はなく、抑制されている抗腫瘍免疫能も評価できないことである。この種の薬剤でがんの種類と症例によって効果がない症例が多くあり、投与前に効果が期待できる症例を選択する適切なバイオマーカーを見つけることは、適応患者を選択し、医療費削減にも寄与する。

## 2. 研究の目的

本萌芽研究は、当初、がん患者の原発巣、再発巣、血中がん細胞、転移巣のすべてから由来する血漿中のがん細胞由来エクソソーム構成成分の解析と免疫チェックポイント阻害薬を投与されたメラノーマ患者の臨床データセットの解析から、適応・副作用のバイオマーカーを探索することであった。さらに、一定温度で核酸を増幅させる Loop - mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を用いて簡便で感度・特異度の高い安価な検出方法の開発を目指そうとした。今後増加が予想される免疫チェックポイント阻害薬の適応を決定する基準をがん種によらずバイオマーカーにより決定する“がん個別化医療”の基盤の提供を目標としていた。当時、がん細胞由来のエクソソームから免疫チェックポイント阻害薬バイオマーカーを発見した報告はなかった。しかし、その後、エクソソーム中の PD-L1 が免疫抑制状態、抗 PD-1 反応と関連すると報告がなされた(Chen G et al: Nature 560: 382,2018)。この結果は我々の予想と一致していた。また、PD-L1 は樹状細胞をはじめ他のがん以外の細胞でも発現しており、炎症一般においても、炎症局所や血清中エクソソームにも検出されるようになり、担がん患者さんのみに見られるわけではなく特異性が低いと考えられる。

一方、本研究申請書に記載したように、がんは均一な細胞集団ではなく、がん幹細胞を含み、さらに遺伝子レベルでは多くのパッセンジャー変異と複数のドライバー変異を持ち、個々のがん細胞のエピジェネティックな変化も多様性に富んだ細胞集団であることが予想されている (Nature Reviews Cancer 15:473, 2015)。

がん免疫はこれらの多様性にどこまで対応しているか、また何らかの原因でその免疫能が抑制されているかは個々の症例でまったく不明である。しかし、免疫チェックポイント阻害薬は免疫抑制を抑えれば、がん免疫を引き出せることを示唆している。我々の獲得免疫系の理論的に10の15乗以上のレパトアを持つT細胞受容体の多様性を考えれば、がんの拡大や転移で絶えず生じている新たながん抗原(neoantigen)に対応しうる能力を持っている。それらの能力を効率的に引き出し、がん細胞を攻撃できるような免疫環境を整えることが免疫チェックポイント阻害薬の作用機序であると考えられる。腫瘍由来 neoantigen と免疫チェックポイント阻害薬の効果との関連が報告されだしており (Yi M et al. The role of neoantigen in immune checkpoint blockade therapy. Exp Hematol Oncol.16;28)、このような国内外の研究の進展を踏まえ、本研究の目的をエクソソームの neoantigen の発現を見ることが最も新規性があると考えた。そこでまず我々が集めた患者さんの病変部の neoantigen の解析を先行させて施行し、その後、エクソソームの neoantigen の発現を見ることに計画を変更した。

### 3. 研究の方法

- (1) 本研究に必要な生命倫理審査の承認を当大学院医学研究院の生命倫理審査会から得た。それに基づき適切にインフォームドコンセント(IC)を得た患者さんの試料を使用した。
- (2) IC を得た患者さんの術前の血清、悪性黒色腫病変部のホルマリン固定・パラフィン包埋標本(FFPE)ブロックと凍結保存用試料、免疫チェックポイント阻害薬使用後の適時採取した血清を保存する。
- (3) FFPE ブロックから 10 $\mu$ m の厚さの標本を 20 枚作製する。それらの標本から腫瘍細胞の多い部分をマイクロダイセクション法で回収し、DNA を抽出する(研究協力者、山本が担当)。
- (4) ターゲット遺伝子エクソンシーケンスパネルでドライバー変異を含む包括的なゲノム情報を修得する。
- (5) DNA メチル化も同時に解析する。
- (6) サンプルをクラスタリングし、患者さんの臨床情報との相関を解析し、臨床的に有用なマーカーとなる遺伝子を抽出する。
- (7) それらの結果を踏まえ、市販のエクソソーム抽出精製キットで、それらの遺伝子 DNA、その翻訳されたタンパク質の発現を検討する。

### 4. 研究成果

- (1) (2) 本研究に必要な生命倫理審査の承認を得て、スムーズに対象患者さんより IC を得て、種々のサンプルを保存し、蓄積した。本研究にとどまらず将来の悪性黒色腫の研究に使用できるように試料は適切に保存できるようになった。
- (3) FFPE ブロックから 10 $\mu$ m の厚さの標本を 20 枚作製し、それらの標本から腫瘍細胞の多い部分をマイクロダイセクション法で回収し、DNA を抽出し、収量と品質を評価する一

連の過程が構築された。

(4) 標本につきターゲット遺伝子エクソンシーケンスパネルでドライバー変異を含む包括的なゲノム情報を修得した。

(5) 同時に DNA メチル化を解析して情報を蓄積した。

(6) サンプルをクラスタリングし、患者さんの臨床情報との相関を解析し、臨床的に有用なマーカーとなる遺伝子を解析中である。

統計的に有意差をもって解析するのに免疫チェックポイント阻害薬使用例のデータの蓄積中である。

(7) それらの結果を踏まえ、まず市販のエクソソーム精製キットを用いて精製し、候補遺伝子 DNA、転写 RNA、翻訳タンパク質がエクソソームに搭載されているかを検討する予定である。

免疫チェックポイント阻害薬のレスポンドーとノンレスポンドーを層別化できる候補遺伝子とその遺伝子変異(neoantigen)、その遺伝子発現を制御する部位のメチル化の関与など明らかにすることは、いまだ報告がされていない。さらに、免疫チェックポイント阻害薬を使用する前に、患者さんのエクソソームのそれらの発現を見ることで、その薬剤の効果を予測できれば、極めて有用なバイオマーカーの候補となると考えられる。どちらも、いまだ報告がなく、極めて萌芽的な研究であり、新たな研究費を獲得して研究を継続させたい。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計2件)

山本洋輔、悪性黒色腫におけるゲノム・エピゲノム変異、第77回日本癌学会学術総会、2018

山本洋輔、悪性黒色腫におけるゲノム・エピゲノム変異、第76回日本癌学会学術総会、2017

## 6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：松岡 悠美

ローマ字氏名：(MATSUOKA,yuumi)

研究協力者氏名：末廣 敬祐

ローマ字氏名：(SUEHIRO,keisuke)

研究協力者氏名：山本 洋輔

ローマ字氏名：(YAMAMOTO,yosuke)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。