

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09133

研究課題名(和文) 免疫チェックポイント阻害剤の奏効予測バイオマーカー探索に向けた複合的アプローチ

研究課題名(英文) Identification of predictive biomarkers for immune checkpoint inhibitors using T cell receptor repertoire analysis

研究代表者

加藤 大悟 (Kato, Taigo)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70648021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：現在複数の癌腫において、免疫チェックポイント阻害剤(Immune checkpoint inhibitor, ICI)が使用されている。しかし奏効率は限定されており、治療効果を予測するbiomarkerの探索が求められている。PD-1阻害剤であるニボルマブ治療前後で経時的に採取した末梢血単核細胞(PMBC)よりRNAを採取し、TCR(T細胞受容体, T cell receptor)シーケンスを行い、末梢血T細胞の網羅的表現型解析を行った。その結果TCRレパトア解析によるDIやT細胞クローン数の増減が、ICIの奏効を早期に予測するsurrogate markerとなり得ることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では、代表的なICIであるニボルマブ投与患者において、TCRレパトア解析によるパラメーターの変化が治療後早期奏効予測マーカーとなり得ることが示された。本研究成果は進行性腎細胞癌に限らず、ICIを利用する複数の癌腫に適応可能である。奏効予測マーカーを明らかにすることで、適切な患者選択が可能となり、大幅な医療費削減にも貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Immune checkpoint inhibitors (ICIs) are now widely used in several types of cancer. However, the response rate is limited and it is urgent to pursue novel non-invasive biomarkers of responses to ICI that allow the “early” determination of clinical benefits. We collected RNA from peripheral blood mononuclear cells (PMBC) before and after treatment with nivolumab, T cell receptor (TCR) repertoire analysis revealed that the responders to nivolumab showed an expansion of certain T cell clones even in the blood, as evidenced by the significant decrease in the TCR diversity index and increase in the number of expanded TCR clonotypes 1 month after treatment. We propose that global TCR repertoire analysis may allow identifying early surrogate biomarkers in the peripheral blood for predicting clinical responses to anti-PD-1 therapy.

研究分野：腎細胞癌

キーワード：免疫チェックポイント阻害薬 バイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在複数の癌腫において、免疫チェックポイント阻害剤 (Immune checkpoint inhibitor, ICI) が使用されている。しかし奏効率は限定されていることや、副作用として重篤な自己免疫疾患も報告されていることから、治療効果を予測する biomarker の探索が求められる。これまでに治療前腫瘍組織における PD-L1 が高発現である症例において奏効率が高いといった報告があるが、PD-L1 の染色法、PD-L1 非発現例においても奏効例があるなど未だ克服すべき課題が多く、複数の治療を経過した後の腫瘍環境を反映しておらず、ICI 治療前に効果を予測することは困難であると考えられた。そのため、治療開始早期に簡便に血液検体を用いた効果予測 surrogate marker が同定できれば、今後患者ごとの適切な免疫療法を選択することが可能となると考え、本研究を行うこととした。

2. 研究の目的

上記における背景を踏まえ、次世代シーケンスによる末梢血中腫瘍免疫担当細胞のレパトア解析 末梢血腫瘍免疫担当細胞が分泌するエクソソーム由来タンパクに対するプロテオーム解析という二つの異なるアプローチを用いて ICI 治療後早期に効果を予測する biomarker を同定する。

3. 研究の方法

A. T細胞受容体 (T cell receptor, TCR) シーケンスによる末梢血および腫瘍組織中 T細胞に対する TCR レパトア解析

進行性腎細胞癌に対してニボルマブを投与した患者 25 名において、投与前、投与 1・3・6 ヶ月後の末梢血 Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) および一部の症例では投与前腫瘍組織より RNA を抽出し、次世代シーケンサーによる T細胞受容体 / 鎖 (T cell receptor / , TCRA/B) のレパトア解析を行い、抗原認識部位である相補性決定領域 (CDR3) の配列を決定した TCR レパトア解析を行った。

B. 末梢血 T細胞由来エクソソーム中タンパクに対するプロテオーム解析

我々はこれまでに腫瘍や尿中エクソソーム由来の miRNA やタンパクが泌尿器癌を診断するバイオマーカーと成り得ることを示してきた。現在までに免疫細胞由来エクソソーム中タンパクに対してプロテオーム解析を行った報告はなく、CD8⁺T細胞 (細胞傷害性 T細胞) CD4⁺T細胞 (ヘルパー T細胞) CD4⁺CD25⁺T細胞 (制御性 T細胞) に由来するエクソソーム中タンパクを抽出し、TMT ラベル化液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析 (LC-MS/MS) による網羅的プロテオーム解析を行った。

これらの得られたデータを in house のデータベースと照合し、各 T細胞分画のエクソソーム由来候補タンパクを同定し、ニボルマブ投与患者血清中の標的プロテオーム解析を行い、ニボルマブ奏効を治療前、治療後早期に予測し得るバイオマーカー探索を行った。

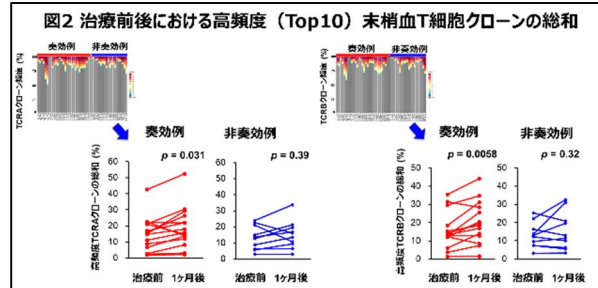
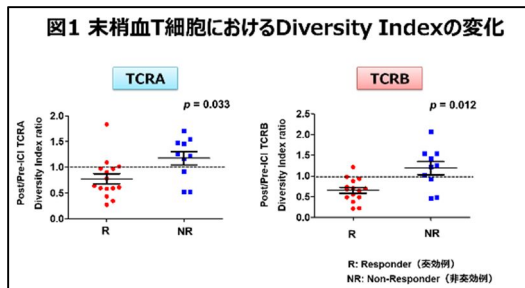
4. 研究成果

A. T細胞受容体 (T cell receptor, TCR) シーケンスによる末梢血および腫瘍組織中 T細胞に対する TCR レパトア解析

男性 21 例、女性 4 例、年齢の中央値は 65 歳 (44-81)、組織型は淡明細胞癌 22 例、非淡明細胞癌 3 例であった。投与開始時の IMDC 分類は Favorable 1 例、Intermediate 15 例、Poor 4 例。最大治

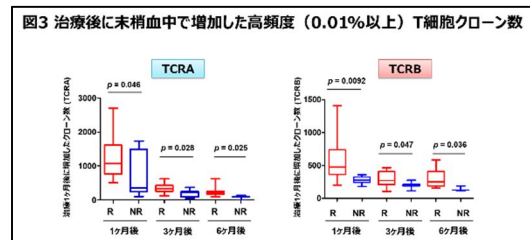
療効果は CR1 例、PR4 例、SD13 例、PD7 例であり、本研究では CR1 例、PR4 例に加え、Long SD (6ヶ月以上のSD期間) 10 例をニボルマブ奏効群と定義した。

治療前後の PBMC を用いて TCR シーケンスを施行したところ、奏効群において Diversity Index

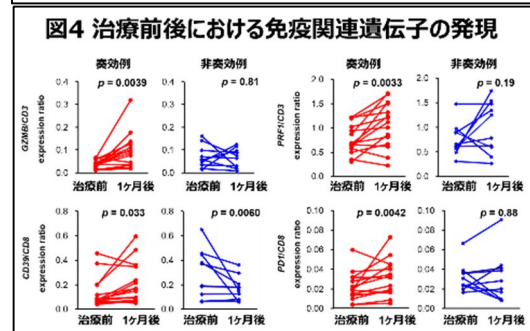


がニボルマブ開始 1 ヶ月後に有意に低下しており (TCRA: P = 0.033, TCRB P = 0.012)、投与 1 ヶ月後の Top10 クローンの総和は、投与前と比較して増加傾向であり、主要な T 細胞クローンが末梢血中で有意に増加したと考えられた (図 1 および図 2)。

また Diversity Index が低下した群では、増加群と比較し有意に無増悪生存期間が延長した (P = 0.0011)。また興味深いことに、奏効例では Nivolumab 投与 1 ヶ月後に増加した T 細胞クローンが有意に多く、これらは投与 3、6 ヶ月後も血中に残存し、長期に渡る抗腫瘍効果を示すと考えられた (図 3)。



さらに投与前後の PBMC における免疫関連遺伝子の発現を比較したところ、奏効例では細胞傷害性 T 細胞マーカーや癌特異的 T 細胞マーカーである CD8⁺CD39⁺ T 細胞や CD8⁺PD-1⁺ T 細胞の増加が示唆された (図 4)。

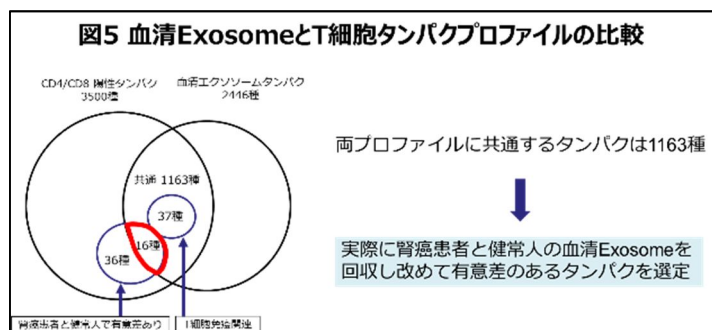


以上より TCR レパトア解析による Diversity Index や T 細胞クローン数の増減、特定の免疫関連遺伝子の比較は、ICI の奏効を早期に予測するサロゲートマーカーとなり得ると考えられた。

以上の成果は、Oncoimmunology 誌 (2021 Jan 19;10(1):1862948)、Anticancer research 誌 (2020 Sep;40(9):4875-4883) に掲載された。

B. 末梢血 T 細胞由来エクソソーム中タンパクに対するプロテオーム解析

健康人 10 名、進行性腎細胞癌患者 5 名の PBMC よりフローサイトメトリー法にて CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺CD25⁺T 細胞をソーティングした。各分画よりタンパクを抽出し、TMT ラベル化液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析法 (LC-MS/MS 法) による網羅的プロテオーム解析を行った。さらに健康人と腎癌患者の血清エクソソームを超速心法にて回収し、エクソソ



ーム内タンパクのプロテオーム解析を行った。その結果、腎癌患者を特異的に選別し得る T 細胞由来エクソソーム内タンパクを 16 種類同定した。現在進行性腎細胞癌に対してニボルマブを投与された患者 25 名の血清より上記 16 種類のタンパクの定量化を行い、治療後早期奏効予測マーカーの開発をさらに進めているところである (図 5)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kato T, Tomiyama E, Koh Y, Matsushita M, Hayashi Y, Nakano K, Ishizuya YU, Wang C, Hatano K, Kawashima A, Ujike T, Kawasaki K, Morii E, Gotoh K, Eguchi H, Kiyotani K, Fujita K, Nonomura N, Uemura M.	4. 巻 40(9)
2. 論文標題 A Potential Mechanism of Anticancer Immune Response Coincident With Immune-related Adverse Events in Patients With Renal Cell Carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer research	6. 最初と最後の頁 4875-4883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.14490	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato T, Kiyotani K, Tomiyama E, Koh Y, Matsushita M, Hayashi Y, Nakano K, Ishizuya Y, Wang C, Hatano K, Kawashima A, Ujike T, Fujita K, Nonomura N, Uemura M.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Peripheral T cell receptor repertoire features predict durable responses to anti-PD-1 inhibitor monotherapy in advanced renal cell carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncoimmunology	6. 最初と最後の頁 1862948
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/2162402X.2020.1862948	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 加藤大悟、富山栄輔、洪陽子、松下慎、中野剛佑、林裕次郎、波多野浩士、河嶋厚成、氏家剛、藤田和利、清谷一馬、植村元秀、野々村祝夫
2. 発表標題 進行性腎細胞癌における免疫チェックポイント阻害剤早期奏効予測のための血液バイオマーカーの開発
3. 学会等名 第23回日本免疫治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤大悟、富山栄輔、洪陽子、松下慎、中野剛佑、林裕次郎、波多野浩士、河嶋厚成、氏家剛、藤田和利、清谷一馬、植村元秀、野々村祝夫
2. 発表標題 Elucidation of early predictive biomarker in urological cancer patients with immune checkpoint inhibitors using T cell receptor sequencing
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taigo Kato, Eisuke Tomiyama, Yoko Koh, Makoto Matsusita, Yujiro Hayashi, Kosuke Nakano, Yu Ishizuya, Cong Wang, Koji Hatano, Atsunari Kawashima, Takeshi Ujike, Kazutoshi Fujita, Kazuma Kiyotani, Motohide Uemura, Norio Nonomura
2. 発表標題 T cell receptor sequencing predict early response for immune-check point inhibitors in urological cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taigo Kato, Kazuma Kiyotani, Eisuke Tomiyama, Yoko Koh, Makoto Matsusita, Yujiro Hayashi, Kosuke Nakano, Yu Ishizuya, Cong Wang, Koji Hatano, Atsunari Kawashima, Takeshi Ujike, Kazutoshi Fujita, Motohide Uemura, Norio Nonomura
2. 発表標題 Elucidation of early predictive biomarker in urological cancer patients with immune checkpoint inhibitors using T cell receptor sequencing
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤大悟、富山栄輔、洪陽子、松下慎、中野剛佑、林裕次郎、波多野浩士、河嶋厚成、氏家剛、藤田和利、清谷一馬、植村元秀、野々村祝夫
2. 発表標題 T細胞受容体レパトア解析を用いた免疫チェックポイント阻害剤早期奏効予測バイオマーカーの探索
3. 学会等名 第108回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Taigo Kato, Kazuma Kiyotani, Eisuke Tomiyama, Yoko Koh, Makoto Matsusita, Yujiro Hayashi, Kosuke Nakano, Yu Ishizuya, Cong Wang, Koji Hatano, Atsunari Kawashima, Takeshi Ujike, Kazutoshi Fujita, Motohide Uemura, Norio Nonomura
2. 発表標題 Identification of early predictive biomarker for immune checkpoint inhibitors by T cell receptor repertoire analysis in advanced kidney cancer patients
3. 学会等名 American Urological Association Annual Conference 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	Taigo Kato, Koji Hatano, Atsunari Kawashima, Takeshi Ujike, Akira Nagahara, Kazutoshi Fujita, Kazuma Kiyotani, Motohide Uemura and Norio Nonomura
2. 発表標題	A potential mechanism of anti-cancer immune response activated by immune-related adverse events (irAEs) in urological cancer patients
3. 学会等名	Society for Immunotherapy of Cancer 2019 (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	Taigo Kato, Koji Hatano, Atsunari Kawashima, Takeshi Ujike, Akira Nagahara, Kazutoshi Fujita, Kazuma Kiyotani, Motohide Uemura and Norio Nonomura
2. 発表標題	Characterization of anti-cancer immune response activated by immune-related adverse events (irAEs) in urological cancer patients
3. 学会等名	第57回日本癌治療学会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	加藤大悟、植村元秀、洪陽子、松下慎、林裕次郎、中野剛祐、石津谷祐、王聡、波多野浩士、河嶋厚成、氏家剛、藤田和利、清谷一馬、野々村祝夫
2. 発表標題	次世代シーケンスを用いた免疫チェックポイント阻害剤によるirAE免疫応答機構の解明
3. 学会等名	第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	加藤大悟、植村元秀、洪陽子、松下慎、中野剛祐、林裕次郎、石津谷祐、王聡、山本致之、河嶋厚成、氏家剛、永原啓、藤田和利、清谷一馬、後藤邦仁、今村亮一、野々村祝夫
2. 発表標題	次世代シーケンスを用いた免疫チェックポイント阻害剤によるirAE免疫応答機構の解明
3. 学会等名	第50回腎癌研究会
4. 発表年	2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

本研究成果をもとに「進行性腎細胞癌における免疫チェックポイント阻害剤早期奏効予測のための血液バイオマーカーの開発」にて第23回日本免疫治療学会江川賞（2020年1月，東京）を受賞した。

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	清谷 一馬 (Kiyotani Kazuma) (30433642)	公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター 免疫ゲノム医療開発プロジェクト・主任研究員 (72602)	
研究分担者	植村 元秀 (Uemura Motohide) (40631015)	大阪大学・医学系研究科・講師 (14401)	
研究分担者	朝長 毅 (Tomonaga Takeshi) (80227644)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・上級研究員 (84420)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------