

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16405

研究課題名(和文)腎癌における免疫チェックポイント阻害薬の個別化投与法の確立

研究課題名(英文) Individualized administration of immune checkpoint inhibitors in renal cancer

研究代表者

高崎 新也 (Takasaki, Shinya)

東北大学・大学病院・薬剤師

研究者番号：30811830

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)：腎癌治療で使用される免疫チェックポイント阻害薬(ICI)の個別化医療を目指し、ICIの治療効果予測バイオマーカーおよびICI血中濃度によるICIの個別化投与法の構築を目指した。まず、腎癌組織を質量分析計により分析し、癌組織内で高値を示す代謝物を同定した。また、ICIであるニボルマブの血中濃度を測定するための分析法を検討し、前処理法およびターゲットペプチドの最適化を進めた。今後、腎癌の診断マーカー、ICIの血中濃度情報、さらに臨床情報を加えて解析することで、ICIの個別化投与法の構築を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、抗がん薬として免疫チェックポイント阻害薬(ICI: Immune Checkpoint Inhibitor)が注目されている。ICIはがん患者の余命を劇的に延長させることがあり、肺癌や腎癌など多くのがん種で使用されている。一方、ICI治療の問題点として、効く患者と効かない患者が存在する、特徴的な免疫関連副作用が発現する、薬価が極めて高額であるといった問題がある。よって、これらの問題を解決する手段として、ICIの個別化投与法の確立が急務である。本研究成果に基づき臨床研究を進めることで、ICIのより効果的かつ経済的な使用を実現できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to search for biomarkers for predicting the effects of immune checkpoint inhibitors (ICIs) used as therapeutic agents for renal cell carcinoma, and to construct an individualized administration method for ICIs.

First, when renal cell carcinoma tissues were analyzed using a mass spectrometer, the metabolites showing high values in the tissues were revealed. In addition, an analytical method was examined to measure the blood concentration of nivolumab, which is an ICI. As a result, the pretreatment method and the optimization of the target peptide for analyzing it were advanced.

In the future, the method of individualized administration of ICI will be verified by analysis including diagnostic markers for renal cancer, blood levels of nivolumab, and clinical information.

研究分野：医療薬学

キーワード：腎癌 免疫チェックポイント阻害薬 個別化投与 質量分析 バイオマーカー メタボロミクス

1. 研究開始当初の背景

一般に、薬剤の個別化投与法には、2通りの方法がある。ひとつは「最適な薬剤の選択」であり、Responder/Non-responder を予測しうるバイオマーカーに基づいて有効な薬剤を選択することである。もうひとつは「最適な用量の選択」であり、Pharmacokinetics/Pharmacodynamics (PK/PD) に基づいて各患者に至適な用量を設定することである。前者はコンパニオン診断、後者は治療薬物モニタリング (TDM) として臨床応用されている。

最近、抗がん薬として免疫チェックポイント阻害薬 (ICI: Immune Checkpoint Inhibitor) が注目されている。ICI はがん患者の余命を劇的に延長させることがあり、肺癌や腎癌など多くのがん種で使用されている。一方、ICI 治療の問題点として、効く患者と効かない患者が存在する、特徴的な免疫関連副作用が発現する、薬価が極めて高額であるといった問題がある (Hamanishi J, et al. *Cytometry Research*. 2017)。特に薬剤費用の問題は大きく、仮に適応がある全ての患者が ICI を使用すれば、薬剤費用だけで数兆円規模となり、医療財政の破綻を引き起こす。よって、この問題を解決する手段として、ICI の個別化投与法の確立が急務であるが、未だ確立していない。

2. 研究の目的

腎癌で使用される抗がん薬の PK/PD 解析から、薬物血中濃度を適切に管理することで、重篤な副作用の発現を回避でき、がん化学療法の治療効果を最大限に引きだせることを示してきた (Takasaki S, et al. *Int. J. Clin. Oncol.* 2018, Takasaki S, et al. *J Pharm Health Care Sci.* 2019)。そこで本研究では、腎癌の化学療法において ICI の効果予測バイオマーカーを探索し、さらに ICI の個別化投与法の確立を目指した (図 1)。

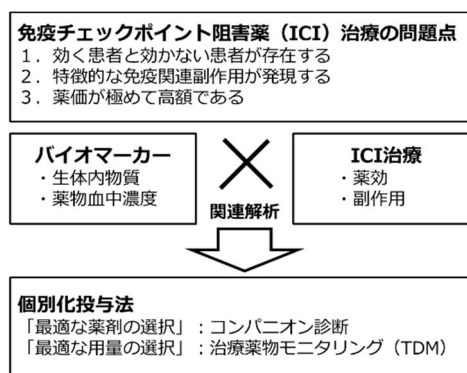


図 1. 研究概要

3. 研究の方法

腎癌における生体物質の分析

液体クロマトグラフィータンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた生体内物質 (代謝物) の網羅的メタボローム解析を腎癌患者で手術により摘出した組織を対象として行った (図 2)。

東北大学病院で 2014 年 11 月から 2017 年 1 月に腎癌で腎摘出術を受け、淡明型腎細胞癌と病理診断された 10 例の摘出腎の癌部及び非癌部組織を検体とした。ホモジネートした検体を質量分析した後、多変量解析を行い、非癌部に比し癌部で存在量の多い代謝物を見出した。次に、receiver operating characteristic (ROC) 解析を用いて、それらの診断性能の評価 (AUC) さらに悪性度との比較を行った。

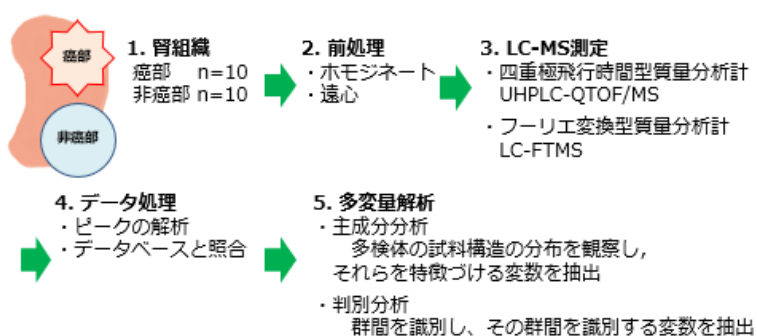


図2. 網羅的メタボロミクスプロトコール

(1) 腎癌組織において有意に上昇する代謝物の同定
癌部と非癌部の比較にて 58 化合物が癌部で上昇 ($p < 0.01$, Fold change > 1.5) し、そのうち 34 化合物が ROC 解析から AUC > 0.8 を示した (図 3)。

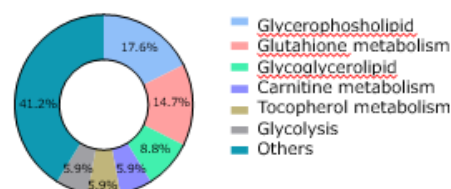


図3. 癌部で上昇する代謝物

(2) 診断能が高い (AUC>0.8) 代謝物及び経路の同定

AUC≤0.8 の群で悪性度と関連ある項目数が多く、診断と悪性度評価に有用な代謝経路は異なる可能性が考えられた (表1)

表1. AUC 別の悪性度評価に有用な化合物

Group	Pathway & Metabolites	AUC	Clinicopathological factors				
			Tumor volume	Pathological T(pT1 vs pT3)	Fuhrman grade(low vs high)	Clinical M(cM0 vs cM1)	Coagulation necrosis(- vs +)
AUC > 0.8	Glutathione metabolism						
	Ophthalmic acid	0.937	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	p<0.005
	Cysteineglutathione disulfide	0.89	N.S.	p<0.01	N.S.	N.S.	N.S.
	Glycerolipid metabolism						
	Glycerolphosphorylethanolamine	0.928	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	p<0.05
	Tryptophan metabolism						
	N-Formylkynurenine	0.896	N.S.	p<0.005	N.S.	N.S.	N.S.
	Glycolysis metabolism						
	Glucose 1-phosphate	0.833	p<0.005	p<0.005	N.S.	N.S.	N.S.
	Fructose 6-phosphate	0.833	p<0.005	p<0.005	N.S.	N.S.	N.S.
	Other						
	Trigonelline	0.814	N.S.	N.S.	p<0.005	N.S.	N.S.
	5-Lactoylglutathione	0.811	p<0.005	p<0.005	N.S.	N.S.	N.S.
3-Methoxybenzenepropanoic acid	0.928	p<0.05	p<0.005	N.S.	N.S.	N.S.	
AUC < 0.8			Tumor volume	Pathological T(pT1 vs pT3)	Fuhrman grade(low vs high)	Clinical M(cM0 vs cM1)	Coagulation necrosis(- vs +)
	Tryptophan metabolism						
	L-Kynurenine	0.791	N.S.	p<0.005	N.S.	N.S.	N.S.
	TCA cycle						
	Saccharic acid	0.725	p<0.05	N.S.	p<0.005	p<0.05	p<0.05
	Succinic acid	0.783	N.S.	p<0.005	N.S.	N.S.	N.S.
	2-Hydroxyglutarate	0.567	N.S.	N.S.	p<0.05	N.S.	N.S.
	Glycine metabolism						
	Hexanylglycine	0.753	N.S.	N.S.	p<0.05	N.S.	N.S.
	Alanine and aspartate metabolism						
	Alanine	0.662	N.S.	p<0.005	N.S.	N.S.	N.S.
	2-oxoglutaric acid	0.733	p<0.005	p<0.005	p<0.05	N.S.	p<0.05
	Nucleotide sugars metabolism						
	Sedoheptulose 7-phosphate	0.701	p<0.05	p<0.005	N.S.	N.S.	N.S.
	Glycolysis metabolism						
	Lactic acid	0.672	p<0.005	p<0.005	p<0.005	N.S.	N.S.
	Inositol metabolism						
Myoinositol	0.644	p<0.005	p<0.005	N.S.	N.S.	N.S.	

(3) 悪性度 (腫瘍体積、cM、pT、Fuhrman grade、凝固壊死) との比較

癌部で上昇した化合物のうち、9 化合物が腫瘍体積と相関していた。そのうち 8 化合物は Glycolysis と TCA cycle に属していた。また、グルタチオン経路に属する 3 化合物と Energy store 経路に属する 2 化合物は腫瘍体積が小さい段階で上昇していることから、早期診断への応用が期待される (図4)

これらの研究から、腎癌の診断及び悪性度評価において重要な代謝物およびその代謝経路を

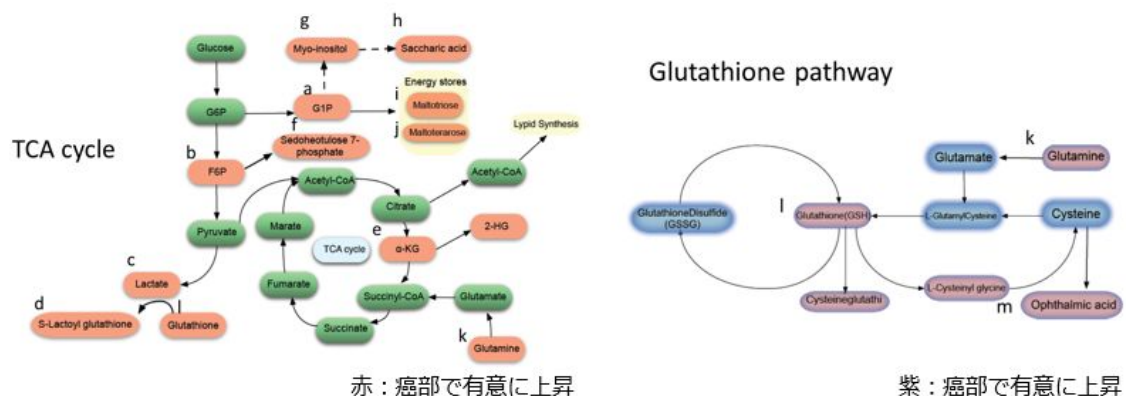


図4. 腎癌の診断と悪性度に関する代謝経路

同定した。今後、侵襲性が低く、容易に採取可能な血液や尿中のバイオマーカーの探索を進めていく。加えて、免疫チェックポイント阻害薬における抗腫瘍効果の判定に使用できるか検討を予定している。

・免疫チェックポイント阻害薬の血中濃度分析

現在使用されている ICI は、抗体医薬品である。これら抗体医薬品の分析法は免疫反応を利用

した ELISA 法が主として使用されてきたが、抗体医薬品の主成分である IgG がもともと生体内に多量に存在することで、夾雑物となり、正確な分析は困難であった。しかし、最近、測定対象以外の IgG を前処理の段階で可能な限り除去し、さらに LC-MS/MS を用いることで高精度な分析法が開発されている (Iwamoto N, et al. *Pharmacol Res Perspect.* 2018)。これらの技術を用いて、腎癌の ICI であるニボルマブとイピリマブを測定対象として、分析条件の最適化、さらに分析法バリデーションを行うことで、ICI 血中濃度分析法を確立する。

腎癌の個別化医療への適用に向けた、抗体医薬定量法の確立を目指した。ニボルマブを取り上げ、液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析 (LC/MS/MS) を用いる定量法の基礎的検討を行った。(1) タンパク消化法の検討、(2) ターゲットペプチドの探索について検討した。

(1) タンパク消化法の検討

まず、消化法について、トリプシン固相化スピンカラム (Monospin) に通導、プロテイン A 固相化樹脂とトリプシン固相化ビーズで Fab 先端部のみ選択的に断片化 (nSMOL 法)、

自己消化やキモトリプシン活性を抑えたトリプシン (Trypsin Gold) を用いた溶液中消化を比較検討した。その結果、感度が高かったトリプシン固相化スピンカラムを選択した。次に、定量範囲の検討を行った。その結果、定量下限は 62.5 µg/mL であり、一層の高感度化が必要と考えられた。

(2) ターゲットペプチドの探索

重軽鎖合わせて 654 アミノ酸残基のうち 239 (36.5%) を検出でき、ピーク強度 10 万以上となった 9 ペプチドであり、ニボルマブの特異的な配列は「NTLFLQMNSLR」であった。また、その中で最も強度が高いトランジションが特定された。

これらの検討の結果より、消化法について選択し、ペプチド探索により強い強度のペプチドの検出に成功した。今後、定量法の構築し、患者検体について測定していく予定である。

4. 研究成果

腎癌組織検体を用いた網羅的メタボロミクス研究により、診断マーカー候補同定した。また、腎癌で使用されるニボルマブの質量分析法を用いた測定法の最適化を行った。今後、腎癌の診断マーカー候補とニボルマブの血中濃度を測定し、さらに臨床情報を加えた解析により、ICI の個別化投与法を検証していく予定である。

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 2件）

1. 著者名 Sato Tomonori, Kawasaki Yoshihide, Maekawa Masamitsu, Takasaki Shinya, Saigusa Daisuke, Ota Hideki, Shimada Shuichi, Yamashita Shinichi, Mitsuzuka Koji, Yamaguchi Hiroaki, Ito Akihiro, Kinoshita Kengo, Koshiba Seizo, Mano Nariyasu, Arai Yoichi	4. 巻 145
2. 論文標題 Value of global metabolomics in association with diagnosis and clinicopathological factors of renal cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 484 ~ 493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32115	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 -

1. 著者名 Sato Tomonori, Kawasaki Yoshihide, Maekawa Masamitsu, Takasaki Shinya, Shimada Shuichi, Morozumi Kento, Sato Masahiko, Kawamorita Naoki, Yamashita Shinichi, Mitsuzuka Koji, Mano Nariyasu, Ito Akihiro	4. 巻 111
2. 論文標題 Accurate quantification of urinary metabolites for predictive models manifest clinicopathology of renal cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2570 ~ 2578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14440	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高崎新也、佐藤友紀、川崎芳英、前川正充、三枝大輔、伊藤明宏、眞野成康
2. 発表標題 腎癌組織中代謝物のメタボローム解析
3. 学会等名 第29回日本医療薬学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------