

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17693

研究課題名（和文）肺癌における化学放射線療法の免疫チェックポイント療法効果増強メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of enhancing the efficacy of immune checkpoint inhibitors after chemoradiotherapy in lung cancer

研究代表者

中原 善朗（Nakahara, Yoshiro）

北里大学・医学部・講師

研究者番号：30772355

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）： 神奈川県立がんセンターで登録された16症例の検体によりBioPlex100システムでサイトカインなどの液性因子を測定し、臨床データとの相関について検討したところ、化学放射線療法前後のMMP3, Fractalkine, MIFの変化がデュルバルマブの治療効果の予測因子である可能性が示唆された。北里大学で新たに10例が登録され、神奈川県立がんセンター・北里大学の検体も併せてELISAによりMMP3, Fractalkine, MIFを測定中である。さらに症例を集積し全40例が集まったところで、副作用の発現状況の検討も踏まえた最終解析を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の対象となった切除不能局所進行非小細胞肺癌の治療については新規治療の出現は現在までにない。今回の検討でMMP3, fractalkine, MIFの化学放射線療法前後での変化がデュルバルマブの効果予測因子であることが分かれば、今後はこれらを治療前後で変化させるような薬物治療や至適な放射線治療のタイミングといった治療開発につながる可能性がある。また、デュルバルマブの効果が特に高いあるいは乏しいと考えられるような症例に関してはデュルバルマブの投与法を再検討するような治療戦略も考えられ、学術的意義・社会的意義は極めて高い。

研究成果の概要（英文）： Using BioPlex100 system, we measured cytokines in samples from 16 cases registered at Kanagawa Cancer Center, and analyzed correlations between cytokines and clinical data. It was suggested that changes in MMP3, fractalkine, and MIF before and after chemoradiotherapy might be predictive factors for the therapeutic effect of durvalumab. Ten new cases have been registered at Kitasato University, samples from Kanagawa Cancer Center and Kitasato University are also being analyzed for MMP3, fractalkine and MIF by ELISA. When total 40 cases would be collected, we plan to conduct a final analysis including the clinical efficacy and adverse effects.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：Chemoradiotherapy Durvalumab MMP3 Fractalkine MIF

## 1. 研究開始当初の背景

Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4)や Programmed death-1 (PD-1)/Programmed death ligand-1 (PD-L1)などの免疫抑制分子は免疫チェックポイント分子と呼ばれ、がん細胞が免疫細胞からの攻撃を逃れる免疫逃避機構に深く関与する。最近では、これら免疫チェックポイント分子を標的とした抗 PD-1 抗体などの免疫チェックポイント阻害剤が非小細胞肺癌、悪性黒色腫をはじめとした種々の悪性腫瘍に劇的な効果を示し、各がん種における標準的治療となっている。しかし、これらの薬剤の臨床効果は個体間で一定ではなく、バイオマーカーの発見が急務である。腫瘍細胞における PD-L1 の発現や腫瘍組織中の遺伝子変異量などが近年、有力なバイオマーカーとして注目されているが、十分に免疫チェックポイント阻害剤の効果予測をするにはいたっていない。

一方で近年、非小細胞肺癌においては放射線治療歴のある患者で免疫チェックポイント阻害剤の効果が高いことが数多く報告されている (Shaverdian N, et al. Lancet Oncol 2017.)。また、PD-L1 抗体であるデュルバルマブは 期非小細胞肺癌において、根治的化学放射線療法後の地固め療法として用いることで全生存期間、無増悪生存期間の延長を示した (Antonia SJ, et al. N Engl J Med. 2017. Antonia SJ, et al. N Engl J Med. 2018.)。

このようなことから、放射線治療や化学療法が免疫チェックポイント分子に影響を及ぼし、免疫チェックポイント療法の効果を増強させている可能性があると考えられるが、そのメカニズムについても十分に分かっていないのが実情である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、免疫チェックポイント阻害剤の効果予測バイオマーカーおよび放射線治療や化学療法が免疫チェックポイント分子に及ぼす影響や、免疫チェックポイント阻害剤の効果を増強するメカニズムを明らかにすることである。

免疫チェックポイント阻害剤の効果予測バイオマーカーとしては、腫瘍組織内のがん細胞・免疫細胞での PD-L1 発現、腫瘍浸潤リンパ球の多寡、がん細胞での遺伝子変異の多寡などが報告されているが、その臨床的評価は定まっていない (Topalian SL, et al. Nat Rev Cancer. 2016.)。また、これらバイオマーカーの研究は腫瘍検体を用いたものがほとんどであり、血液検体を用いた研究は少ない。

また、放射線治療や化学療法が免疫チェックポイント阻害剤の効果を増強させるメカニズムの一つとして Immunogenic cell death (ICD) が挙がる。ある種の抗がん剤や放射線療法は、通常のネクロシスやアポトーシスに比して免疫応答を誘導しやすい形でがん細胞を殺傷することが分かっているが、この細胞死の形が ICD である (Krysko DV, et al. Nat Rev Cancer. 2012.)。この ICD においては、化学療法や放射線療法によりアポトーシスを起こした腫瘍細胞から DAMP (Damage Associate Molecular Pattern) という物質が放出される。DAMP により抗原提示細胞が腫瘍局所に誘導、活性化され、細胞障害性 T 細胞が活性化され強い抗腫瘍効果が発揮される。DAMP の代表的な物質として High Mobility Group Box1 (HMGB-1)、Calreticulin などが挙げられる (Galluzzi L, et al. Cancer Cell. 2015) が、本研究では血液検体を用いて、これらの物質を化学放射線療法の前後、デュルバルマブ治療前後で解析し、臨床データとの相関を調べる。DAMP に関しては基礎的に解析されたものは存在するが、臨床データとの相関を調べたものは少なく、学術的かつ独自性の高い研究といえる。

本研究の成果として、放射線治療や化学療法が免疫チェックポイント分子に及ぼす影響や、免疫チェックポイント阻害剤の効果を増強するメカニズムが明らかになれば、そのデータを用いて放射線治療と免疫チェックポイント阻害剤治療の至適なタイミングを探ることができ、新たな治療ストラテジーを考案することができる。将来的には、本研究から得られた治療ストラテジーを検証するような臨床試験を多施設共同試験で実施する予定である。

## 3. 研究の方法

### 1) 末梢血での解析

期非小細胞肺癌の治療前、化学放射線療法終了後 (デュルバルマブ開始前)、デュルバルマブ 2 コース終了後、デュルバルマブ 6 コース終了後、増悪時の 5 回、末梢血 10m l をヘパリン採血、末梢血 10m l を循環腫瘍細胞用採血管で採血する。なお、本研究のためだけに採血操作を行うことはしない。通常の診療・検査に必要な採血時に追加で本研究に必要な血液を採取する。循環腫瘍細胞用採血管で採取した血液から循環セルフリー DNA、循環腫瘍細胞を分離したのち、分離した細胞における PD-L1、HLA など免疫関連分子の発現を免疫染色にて解析する (循環腫瘍細胞の解析は Abnova 社で実施する)。また、循環セルフリー DNA および RNA を real time PCR や次世代シーケンサーにより解析し、がん細胞に特異的な遺伝子変化を同定する。末梢血単核球における各免疫細胞サブセットの頻度や T 細胞における免疫チェックポイント分子 (PD-1、TIM-3、LAG-3、CTLA-4、など) の発現をフローサイトメトリーで解析する。さらに血清から HMGB-1、Calreticulin、CXCL2、MMP2 などのサイトカインを ELISA で解析し定量化する。

## 2) 腫瘍組織での解析

日常診療での診断に用いた検体の残余があり、本研究に利用可能な場合にのみ実施する。

期非小細胞肺癌の治療前、化学放射線療法終了後（デュルバルマブ開始前）、デュルバルマブ投与後、増悪時の腫瘍組織における免疫チェックポイント分子（PD-1、TIM-3、LAG-3、CTLA-4、など）の発現や浸潤リンパ球サブセットなどを免疫組織染色にて評価する。がん部および非がん部から DNA および RNA を抽出し、real time PCR や次世代シーケンサーによる遺伝子解析を行う。同一患者において、がん部および非がん部での解析結果を比較検討することにより、がん細胞に特異的な遺伝子変化を同定する。

## 3) 臨床情報の収集

電子カルテ等で患者データを収集し、個人情報をもとに匿名化した解析用データベースを作成し、調査項目としては以下の診療情報が含まれる。

患者背景（性別、年齢、身長、体重、performance status、既往歴、生活歴、職業等）、症状、経過、合併症、診断（疾患名、組織型、TNM/病期分類）、検査情報（臨床検査値（白血球数・分画、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数、網赤血球数、凝固系、総蛋白、アルブミン、プレアルブミン、血中脂質、TB/DB、AST、ALT、ALP、GTP、BUN、Cr、CRP、プロカルシトニン、血糖、HbA1c/グリコアルブミン、腫瘍マーカー、KL-6、SP-D、SP-A、下垂体ホルモン、甲状腺ホルモン、副甲状腺ホルモン、PTHrp、副腎ホルモン、CRH 負荷試験、自己抗体、感染症検査、尿検査（尿タンパク、尿潜血、尿沈渣、クレアチニンクリアランス）、画像検査（X線検査、CT検査、MRI検査、核医学検査、超音波検査）、遺伝子検査等）、内視鏡検査所見、胸腔鏡検査所見、手術所見、病理組織学的所見・細胞診所見、呼吸機能検査所見、心電図、治療、ケア、治療効果、無再発生存期間、再発日、再発部位、生存期間、死亡日、死因、死亡場所、剖検所見等

1)2)の解析結果と 3)の臨床経過との関連を分析し、患者選択や予後予測に有用なバイオマーカーを同定する。また、放射線治療と免疫チェックポイント阻害剤治療の至適なタイミングを探り、新たな治療ストラテジーを考案する。

## 4. 研究成果

本研究の目的は局所進行非小細胞肺癌における化学放射線療法 デュルバルマブ治療における効果予測因子・副作用発現予測因子につき検討すること、および化学放射線療法により免疫チェックポイント阻害剤の効果が増強するメカニズムを解析することである。

神奈川県立がんセンターで登録された 16 症例の検体により BioPlex100 システムでサイトカインなどの液性因子を測定し、臨床データとの相関について検討したところ、化学放射線療法前後の MMP3、Fractalkine、MIF の変化がデュルバルマブの治療効果の予測因子である可能性が示唆された。北里大学で新たに 10 例が登録され、神奈川県立がんセンター・北里大学の検体も併せて ELISA により MMP3、Fractalkine、MIF を測定中である。さらに症例を集積し全 40 例が集まったところで、副作用の発現状況の検討も踏まえた最終解析を行う予定である。

当初の計画では症例集積がすでに完了している予定であったが、新型コロナウイルス感染症のパンデミックにより大幅な患者数の減少があり、まだ症例集積が完了していない。

ELISA による測定で MMP3、Fractalkine、MIF の化学放射線療法前後での変化が局所進行非小細胞肺癌における化学放射線療法 デュルバルマブの効果予測因子であるということが確立できれば、これらが化学放射線療法によりなぜ変化するのか、そのメカニズムを調べるために腫瘍組織での検討も予定している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|                                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 . 発表者名<br>中原 善朗                                                                                                    |
| 2 . 発表標題<br>Change in plasma damage-associated molecular patterns due to chemoradiotherapy in locally advanced NSCLC |
| 3 . 学会等名<br>第19回日本臨床腫瘍学会学術集会                                                                                         |
| 4 . 発表年<br>2022年                                                                                                     |

|                                                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 . 発表者名<br>中原 善朗                                                                                                                                   |
| 2 . 発表標題<br>MMP3, Fractalkine and MIF are Associated with Clinical Outcomes in Locally Advanced NSCLC Treated with Chemoradiotherapy and Durvalumab |
| 3 . 学会等名<br>IASLC 2022 Asia Conference on Lung Cancer ( 国際学会 )                                                                                      |
| 4 . 発表年<br>2022年                                                                                                                                    |

|                                                                                                                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 . 発表者名<br>中原 善朗                                                                                                    |
| 2 . 発表標題<br>Change in plasma damage-associated molecular patterns due to chemoradiotherapy in locally advanced NSCLC |
| 3 . 学会等名<br>第19回日本臨床腫瘍学会学術集会                                                                                         |
| 4 . 発表年<br>2022年                                                                                                     |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

|       | 氏名<br>( ローマ字氏名 )<br>( 研究者番号 ) | 所属研究機関・部局・職<br>( 機関番号 ) | 備考 |
|-------|-------------------------------|-------------------------|----|
| 研究協力者 | 笹田 哲朗<br><br>(Sasada Tetsuro) |                         |    |

6．研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号）      | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|-------|--------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 氷室 秀知<br><br>(Himuro Hidetomo) |                       |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|