

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2022

課題番号：19K23978

研究課題名(和文)エクソソームRNA/タンパク質での抗PD-1/PD-L1抗体のバイオマーカー開発

研究課題名(英文)Biomarker analysis for anti-PD-1/PD-L1 antibody with exosomal RNA/protein

研究代表者

宿谷 威仁 (Shukuya, Takehito)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：90529174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームは、径20-200nmの細胞外に分泌される小胞で、mRNA、microRNA、タンパク質などを内包し細胞間情報伝達機構を有する。

我々は、抗PD-1/PD-L1抗体を投与された肺癌患者の血漿エクソソーム内miRNA、タンパク質を測定し、患者背景、治療内容、治療に対する効果、無増悪生存期間、生存期間、有害事象などのデータとの関連を統計解析したが、有用なマーカーを検出することはできなかった。しかしながら、サイトカイン・ケモカインを測定したところ、このうち、いくつかの分子が治療効果や有害事象と関連があることが示され、今後、この分子に着目し、研究を継続していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍に対する免疫を賦活化する免疫チェックポイント阻害薬の一つである、抗PD-1/PD-L1抗体は、奏効すれば長期に癌の進行を抑制しうる画期的な薬剤である。一方で、薬価が高額であることから、効果を投与前や治療後早期に正確に予測するバイオマーカーの開発が期待されている。我々の研究では、当初標的としていた、エクソソーム内のmicroRNA、タンパク質から抗PD-1/PD-L1抗体の有効性や安全性に関わる有用なバイオマーカーを検出することはできなかったが、続けて行った、サイトカイン・ケモカインの解析により、今後の研究につながるバイオマーカーを検出することが出来、これを発展させ研究を進めていく。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are extracellular secretory vesicles of 20-200 nm in diameter that contain mRNA, microRNA, and proteins and serve as intercellular signal transduction mechanisms.

We measured miRNAs and proteins in plasma exosomes of lung cancer patients treated with anti-PD-1/PD-L1 antibodies and statistically analyzed the association between exosomal miRNAs/proteins and data on patient background, response to treatment, progression-free survival, survival, and adverse events, but unfortunately could not detect any useful markers.

However, measurement of cytokines and chemokines indicated that several of these molecules were associated with treatment response and adverse events, and we plan to continue our research with a focus on these molecules.

研究分野：呼吸器内科学、臨床腫瘍学

キーワード：肺癌 血漿 バイオマーカー エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

Programmed death-1(PD-1)および **programmed death ligand-1 (PD-L1)** を標的とした抗体は、これら **ligand** と **receptor** の **interaction** を阻害し、**T** リンパ球の癌細胞に対する免疫応答を再活性化し、抗腫瘍効果を発揮する。これまでの基礎研究、臨床研究の結果より、抗 **PD-1** 抗体あるいは抗 **PD-L1** 抗体単剤や従来の殺細胞性抗癌剤とこれら抗体の組み合わせが進行肺癌に対する化学療法として広く用いられるようになった。これらの治療に奏効を示す患者の一部では、腫瘍の増殖を長期間抑えることが可能で、これらの薬剤の登場が進行癌に対する治療にパラダイムシフトを起こしたと言える (**Shukuya T, et al. J Thorac Oncol 2016;11:976-88**)。抗 **PD-1** 抗体の一つであるペムブロリズマブの効果予測因子として、腫瘍組織での **PD-L1** の免疫染色が有用であることが示されており、実際に、**PD-L1** の免疫染色で腫瘍細胞の **50%**以上が染色される場合はペムブロリズマブの単剤治療が従来の化学療法に比べて有効であることが示されている (**Reck M, et al. N Engl J Med 2016;375:1823-1833**)。しかしながら、**PD-L1** の免疫染色で腫瘍細胞が染まらない場合でも抗 **PD-1/PD-L1** 抗体が効果を示す症例が少なからず存在し (**Brahmer J, et al. N Engl J Med 2015;373:123-135**)、例えば、**EGFR** 阻害薬としてのバイオマーカーである **EGFR** 遺伝子変異のように、確実な効果予測バイオマーカーとは言えない (**Mok TS, et al. N Engl J Med 2009;361:947-957**)。また、抗 **PD-1/PD-L1** 抗体治療中に、間質性肺障害など時に致命的となる免疫関連有害事象が生じることが知られているが、これまでそれらを予測するバイオマーカーの開発には至っていない。

また、抗 **PD-1/PD-L1** 抗体を用いた治療は進行肺癌のみならず、局所進行非小細胞肺癌に対する化学放射線療法後の地固め療法としても用いられており、さらに、術前・術後化学療法としての有用性が現在検証されている。一方、薬剤費は非常に高額で、非小細胞肺癌患者一人に年間使用するのみで **1000-1500** 万円かかるとされており、本邦の肺癌患者数を考慮すると、患者のみならず国家にも莫大な経済的負担を与えることになる。

2. 研究の目的

エクソソームは、径 **20-200nm** の細胞外分泌小胞で、**mRNA**、**microRNA**、タンパク質などを内包し細胞間情報伝達機構を有することが明らかにされてきた。癌微小環境においても、癌細胞、免疫細胞の双方がエクソソームを分泌すること、内包する **mRNA**、**microRNA**、タンパク質によって、腫瘍免疫刺激的にあるいは抑制的に働くことが報告されている (**Seo N, et al. Cancer Sci 2018;109:2998-3004**)。

これまで抗 **PD-1/PD-L1** 抗体の効果予測バイオマーカーとして、前述した腫瘍組織での **PD-L1** の免疫染色の他、腫瘍組織の遺伝子変異数である **tumor mutational burden**、腫瘍組織内へのリンパ球浸潤の程度、**LAG-3** や **IDO** などの **PD-1・PD-L1** 以外の免疫チェックポイント分子、腸管内のマイクロバイオーームなどが関与していることが報告されている (**Szustakowski J, et al. SITC 2017**)。すなわち、**PD-L1** や **tumor mutational burden** といった腫瘍側の因子だけでなく、腫瘍組織に浸潤する免疫細胞、そして、腸管内のマイクロバイオーームといった宿主自体の免疫状態など様々な要因が抗 **PD-1/PD-**

L1 抗体の効果発現に関わっていることがわかってきている。そこで、我々は、腫瘍側因子、宿主側因子の両方の状況を包括的に解析すべく、癌細胞や免疫細胞から遊離したであろう血漿中や胸水中のエクソソームを抽出・解析し、抗 **PD-1/PD-L1** 抗体の効果および有害事象の予測バイオマーカーを同定することを目的として、本研究を行った。

3. 研究の方法

2019 年から 2020 年にかけて、抗 **PD-1/PD-L1** 抗体による治療を受けた進行肺がん患者 55 名の治療前および治療開始 3 週間後の血漿検体を用いた。エクソソームはカラムクロマトグラフィー法を用いて抽出した。また、**miRNA** は次世代シーケンサーを用いて、タンパク質は **mass spectrometry** を用いて測定した。これらを、患者背景（年齢、性別、組織型、病期、**performance status** など）、治療内容、治療に対する効果、無増悪生存期間、全生存期間、有害事象などのデータと合わせて解析をおこなった。さらに、血漿中のタンパク質、サイトカインとケモカインにも注目して、同様に解析を行った。

4. 研究成果

血液中のエクソソーム内タンパク質に関して、抗 **PD-1/PD-L1** 抗体の治療効果や有害事象との関連を示した意義のあるタンパク質は認められなかった。血漿中の **miRNA** に関して、同様に、抗 **PD-1/PD-L1** 抗体の治療効果や有害事象との関連を示したものは認められなかった。血漿中のサイトカイン・ケモカインに関しては、抗 **PD-1/PD-L1** 抗体が奏効した患者において、治療開始 3 週間後の **eotaxin-1** が、非奏効群よりも有意に高かった (**p=0.039**)。また、治療開始前および治療開始 3 週間後の両方の血漿で、免疫関連有害事象 (**irAE**) を経験した患者で、より **IL-6** が高値であった (それぞれ **p = 0.0098**、**p = 0.042**)。grade3 以上の **irAE** を認めた患者でも、**IL-6** がより高値であった (**p = 0.033**)。治療開始前および治療開始 3 週間後の両方の血漿で、**IL-10** 高値と全生存期間の短縮に関連があった (**2 年生存率:32.5% vs 72.6%**、**P=0.012**; **44.3% vs 62.3%**、**P=0.109**)。また、治療開始 3 週間後の **eotaxin-1** の増加は、奏効と全生存期間の延長に関連していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Xu Shiting, Miura Keita, Shukuya Takehito, Harada Sonoko, Fujioka Masahiro, Winardi Wira, Shimamura Shoko, Kurokawa Kana, Sumiyoshi Issei, Miyawaki Taichi, Asao Tetsuhiko, Mitsuishi Yoichiro, Tajima Ken, Takahashi Fumiyuki, Hayashi Takuo, Harada Norihiro, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 15
2. 論文標題 Early Detection of Therapeutic Benefit from PD-1/PD-L1 Blockade in Advanced Lung Cancer by Monitoring Cachexia-Related Circulating Cytokines	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1170 ~ 1170
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers15041170	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 Shiting Xu, Keita Miura, Takehito Shukuya, Sonoko Harada, Masahiro Fujioka, Wira Winardi, Shoko Shimamura, Kana Kurokawa, Issei Sumiyoshi, Taichi Miyawaki, Tetsuhiko Asao, Yoichiro Mitsuishi, Ken Tajima, Fumiyuki Takahashi, Takuo Hayashi, Norihiro Harada, Kazuhisa Takahashi
2. 発表標題 Longitudinal characterization of cachexia-related circulating cytokines in advanced lung cancer treated with PD-1/PD-L1 blockade
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023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
---------	---------