

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32607
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2020～2022
 課題番号：20K07449
 研究課題名(和文) 悪性黒色腫の免疫チェックポイント阻害薬適応可否の事前予測バイオマーカーの検索

 研究課題名(英文) Biomarkers for predicting response to immune checkpoint inhibitor therapy in malignant melanoma.

 研究代表者
 星野 昭芳 (Hoshino, Akiyoshi)

 北里大学・医学部・講師

 研究者番号：00392382
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：免疫チェックポイント阻害薬(immuno-checkpoint inhibitor:ICI)の投与により悪性黒色腫の治療奏功した患者と、治療効果に乏しい患者について、診断時に生検されたホルマリン固定パラフィン包埋病理組織切片を後方視的に、REV7/MAD2L2発現をin situ hybridization(ISH)法により解析した。ICI奏功症例には、全例ではないがMAD2L2 ISH高値の症例が複数確認された。一方で、ICI非奏功症例においてはMAD2L2 ISHは解析した全症例で低値もしくは非検出であった。ISH高値症例では、腫瘍遺伝子変異量(TMB)蓄積との相関性が確認された。

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(ICI)奏功症例を事前予測する日常診療に有用なマーカーは目下開発中である。ICI有効性の予測因子として 腫瘍細胞因子、腫瘍免疫因子、腫瘍免疫に影響を与える因子、の3種類が想定される。現状は癌細胞PD-L1発現の評価が汎用性が高く臨床応用されているが、効果予測の信頼性はやや低い。腫瘍浸潤リンパ球(TIL)は目下研究段階である。一方で腫瘍遺伝子変異量(TMB)にICI事前予測指標の有用性が指摘されるも高額かつ非簡便であり汎用的利用が難しく、本研究によるREV7/MAD2L2評価を安価簡便かつ汎用性のあるTMBの間接的評価法として提案し、臨床応用を期待する。

研究成果の概要(英文)：Immuno-checkpoint inhibitor (ICI) is effective 1st-line therapy for melanoma treatment. The effective ratio of melanoma patients who received ICI-therapy is quite variable, therefore advantageous biomarker is required before ICI treatment. We divided the melanoma patients into two groups: who are effective/responder (CR, PR, SD) or non-responder (PD) for ICI treatment. The patients' Formalin-fixed paraffin-embedded histopathological sections (FFPE), which were prepared at the time of first diagnosis of melanoma, were analysed for REV7/MAD2L2 expression by in situ hybridization (ISH). Higher MAD2L2 ISH levels were detected in the several cases of ICI responders, despite slight or no MAD2L2 ISH expression among all cases of ICI non-responders. A correlation with effectiveness of ICI treatment and tumor mutational burden (TMB) accumulation was well established, thus detection of FFPE MAD2L2 levels by ISH would be informative biomarker for prediction of effectiveness of ICI treatment.

研究分野：人体病理学

キーワード：免疫チェックポイント阻害薬 治療効果予測 悪性黒色腫 バイオマーカー 腫瘍遺伝子変異量 REV7/MAD2L2

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は最も悪性度が高い皮膚癌であり、進行例は予後不良であり、我が国の皮膚がんによる死亡の約半数は悪性黒色腫が占めている。悪性黒色腫は化学療法の奏効率は低いことが知られている。治療の進歩により免疫チェックポイント阻害剤が使用可能となり、根治術不能な症例の予後の改善が見込まれる。著効例が存在することも報告されているが、その奏効率は 10-40%と期待されたほど高くはなく、奏効率としては決して高いとは言えない状況であるため、適応の可否を判定する有効なバイオマーカーの開発が望まれている。

固形腫瘍は体細胞遺伝子に一定の変異があることが確認されているが、その変異量は腫瘍により差があることが知られている。悪性黒色腫や喫煙者の非小細胞癌には多くの遺伝子変異の蓄積があるのに対して、乳癌、肝臓癌、非喫煙者の非小細胞癌、あるいは小児がんでは遺伝子変異量は少ない。つまり、紫外線や喫煙などの慢性刺激により発症する癌と、ホルモンやウイルス、あるいは特定のがん遺伝子によって発症する癌では、遺伝子変異の蓄積量が異なることを意味する。この腫瘍に蓄積した遺伝子変異量は近年、tumor mutation burden (TMB) として定量化の試みがなされている。

実際に CheckMate026 臨床試験において、TMB の高い非小細胞肺癌患者では奏効率、無増悪生存期間ともに高くなるという結果が明らかにされている(Carbone DP et al., NEJM, 2017)ほか、固形腫瘍の一部においては腫瘍組織中の TMB が多い癌種では免疫チェックポイント阻害薬の効果が高い傾向が示されている。腫瘍に蓄積した体細胞遺伝子変異によって腫瘍細胞が変異由来抗原の発現量を増すことで、免疫チェックポイント阻害薬使用下では腫瘍細胞がキラーT細胞に非自己として認識されやすくなるためではないかと考えられている。このことは、TMBは免疫チェックポイント療法の有効性を評価する指標となりうることを意味している。実際に TMB の定量化のためには、腫瘍細胞から DNA を抽出して次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行う必要があり、費用や解析時間の点からもより簡便なバイオマーカーが望まれている。

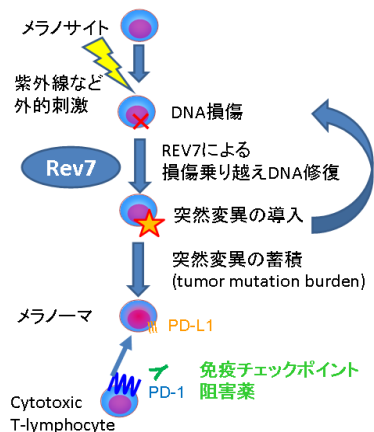


図1 作業仮説: REV7高発現腫瘍細胞ほど tumor mutation burdenが蓄積している

2. 研究の目的

紫外線誘発突然変異に関する分子として同定された REV7 は、DNA 修復機構のうち、損傷乗り越え DNA 複製(translesion DNA synthesis: TLS)の中核を担う分子である(Murakumo Y, et al., J Biol Chem 2000, 2001; Murakumo Y. Mutat Res 2002)。通常の複製ポリメラーゼは DNA 損傷部位で DNA 伸長反応が停止してしまうが、TLS は DNA 損傷部位を乗り越えて DNA 合成を継続させ複製を完了させるシステムであり、細胞を DNA 損傷による細胞死から救う役割を担っている。しかしながら、TLS による DNA 合成はしばしば不正確であり、突然変異導入の主要な原因となる。つまり腫瘍細胞における REV7 高発現は、悪性腫瘍の TMB に関与していると推定される(図 1)。

実際に我々や他の研究グループによって、REV7 と突然変異の関係は明らかにされている。REV7 をノックダウンした線維芽細胞は紫外線照射後の突然変異率が減少することから、REV7 の発現は突然変異導入に関係している(McNally K, et al., DNA Repair (Amst), 2008)。また臨床検体においても REV7 高発現腫瘍は低発現腫瘍と比較して有意に予後不良であること、REV7 ノックダウン腫瘍細胞は抗癌剤であるシスプラチンによる DNA 損傷に対して有意に感受性が高いことも判明した(Niimi K, et al., Cancer Sci, 2014, Okina S, et al., Int J Hematol, 2015 他)。つまり REV7 が高発現している悪性腫瘍細胞は DNA 損傷トランス機能が亢進しており、突然変異が蓄積しやすい条件であると考えられる。しかし、外来環境要因による DNA 損傷を最も受けやすい悪性黒色腫など皮膚癌では、REV7 の機能や役割について、また TMB 蓄積に実際にどの程度関与しているかについて未だ検討されていない。

本研究では、その発症進展と紫外線暴露との関係性が明らかである悪性黒色腫について、TMB の蓄積に REV7 が関与しているという仮説を立て(図 1)、臨床検体および培養細胞株を用いてその仮説を検証し、ヒト悪性黒色腫の新たな治療法・予防法の開発に寄与することを目的とする。皮膚悪性黒色腫における REV7 の機能について、臨床材料を用いた実験と培養細胞株を用いた基礎実験にて解析を行う。悪性黒色腫の臨床検体を用いて免疫チェックポイント阻害薬の効果と REV7 発現の臨床病理学的意義を明らかにし、そのメカニズムを培養細胞レベルで解明して、REV7 を利用した免疫療法の有効性評価の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1). 黒色腫における REV7 発現の臨床病理学的意義

悪性黒色腫患者のホルマリン固定・パラフィン包埋病理組織切片を用いて、黒色腫における REV7 発現の臨床病理学的意義を組織学的、免疫組織化学的に検討する。検討項目として、HE 染色標本により、腫瘍の組織像、分裂像、浸潤形態、病変部の腫瘍厚（厚さにより病期分類が 5 段階に分類される）の評価を行い、免疫組織化学染色を用いて、腫瘍における REV7 発現強度、発現割合のスコアリング、Ki-67 陽性率による腫瘍の増殖能を評価する。予備検討により、REV7 は悪性黒色腫にて高発現している症例があることが明らかになっている。REV7 発現の黒色腫における臨床病理学的意義を統計学的に解析する。

(2). REV7 ノックアウトによる悪性黒色腫細胞における移動能・浸潤能の変化

悪性黒色腫細胞株を用いて CRISPR/Cas9 システムを利用して REV7 をノックアウトした細胞株を樹立し、細胞の増殖能・移動能・浸潤能について、それぞれ WST-1 アッセイ、スクラッチアッセイならびに Boyden chamber を用いた浸潤能評価を実施する。これにより、REV7 発現低下による黒色腫細胞の悪性形質への影響を評価する。

(3). 免疫チェックポイント阻害薬の治療効果と REV7 発現の臨床病理学的意義の解明

免疫チェックポイント阻害薬が投与された悪性黒色腫患者について、診断時のホルマリン固定・パラフィン包埋病理組織切片を用いて、黒色腫における REV7 発現の臨床病理学的意義を組織学的、免疫組織化学的に検討する。検討項目として、免疫組織化学染色を用いた腫瘍における REV7 発現強度、発現割合をスコアリング評価し、臨床的治療効果との相関の有無について統計学的に解析する。治療開始前に免疫チェックポイント療法の適応の是非を評価する指標となりうるかについて検討する。

4. 研究成果

(1)につき、悪性黒色腫患者検体を用いた病理組織化学的解析について研究を実施した。悪性黒色腫患者のホルマリン固定・パラフィン包埋病理組織切片を用いて、黒色腫における REV7 発現強度と腫瘍悪性度との連関についての臨床病理学的意義を組織学的、免疫組織化学的に検討した。悪性黒色腫患者の病変部の H.E. 染色標本を用い、腫瘍の組織像、分裂像、浸潤形態、病変部の腫瘍厚の各項目について病理組織学的な評価を行った。また免疫組織化学染色を用いて、腫瘍における REV7 発現の有無およびその染色強度を評価し、Ki-67 陽性率による腫瘍の増殖能との比較を行った。結果としては、REV7 発現強度が高い悪性黒色腫患者では有意に病変部の腫瘍厚(tumor thickness)が厚いことが判明し、Rev7 発現の強度と病理学的な病期進行分類が有意に相関することが判明した。

(2)については、2種類の悪性黒色腫細胞株(MEWO 株および G361 株)を入手し、CRISPR/Cas9 システムを利用して REV7 遺伝子をノックダウンさせた細胞株を樹立した。野生株および遺伝子改変細胞株における増殖能・移動能・浸潤能について、それぞれ WST-1 アッセイ、スクラッチアッセイならびに Boyden chamber を用いた浸潤能評価を実施した。結果として、REV7 発現の低下が黒色腫細胞の移動能・浸潤能を低下させることが明らかとなった。

上記(1), (2)により得られた成果を取りまとめて論文投稿を行い、研究成果は Pathology International 誌に掲載された(Hoshino A et al., Pathol Int. 2022 Jan;72(1):14-24. PMID: 34637584)。

(3)については、免疫チェックポイント阻害薬(ICI)の事前効果予測に供する検体が、当初は予定されていた症例には満たず解析に難渋した。研究期間中に、ICI 治療は最新の研究成果でも奏効率こそ約 36%程度に留まるもののひとたび奏功すれば極めて有効な治療法であるとして、ICI 治療がメラノーマ治療の効果的な第一選択療法に格上げとなったことから、最終的な予定症例数 50 症例は満たさないものの 35 症例を集めることが可能となった。本研究では、メラノーマ患者を ICI 治療奏功群、治療不応群 2 群に分け、メラノーマの初回診断時に採取された生検検体のホルマリン固定パラフィン包埋組織病理切片 (FFPE) を検討対象として、in situ hybridization 法 (ISH) によって、REV7/MAD2L2 発現を後方視的に分析した。副次評価項目としては、ICI 有効性と腫瘍変異負荷(TMB)の蓄積とは相関関係は十分に確立されているため、REV7/MAD2L2 発現と TMB 蓄積の相関性についても併せて評価した。結果、ICI 治療奏功群では高い MAD2L2 ISH 発現量を示す症例が含まれた。ICI 治療不応例の症例すべてでは MAD2L2 ISH の発現は微量または非検出であった。ICI 治療奏功群のうち高い MAD2L2 ISH 発現量を示す症例において、全例ではないが高度に TMB が蓄積した症例が含まれた。

これら結果から腫瘍における REV7/MAD2L2 高発現が、TMB 蓄積に関与している可能性が高いと結論付けた。本研究の結果から、ISH による FFPE を使用した REV7/MAD2L2 発現量の事前検出は、ICI 治療開始前にその治療効果を事前予測するための、安価簡便かつ汎用性の高い有益なバイオマーカーになり得ることを提案することが可能となった。

上記(3)については、報告書作成時点にて論文投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Hoshino Akiyoshi, Nakayama Chika, Jiang Shi Xu, Sakurai Yasutaka, Kato Takuya, Numata Yoshiko, Umezawa Atsuko, Ichinoe Masaaki, Murakumo Yoshiki	4. 巻 72
2. 論文標題 Upregulation of REV7 correlates with progression of malignant melanoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 14～24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13174	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 Murakumo Yoshiki, Sakurai Yasutaka, Kato Takuya, Hashimoto Hiroshi, Ichinoe Masaaki	4. 巻 15
2. 論文標題 REV7 in Cancer Biology and Management	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1721～1721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers15061721	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 Sanoyama Itaru, Sakurai Yasutaka, Ichinoe Masaaki, Hoshino Akiyoshi, Kesen Yurika, Kato Takuya, Numata Yoshiko, Umezawa Atsuko, Jiang Shi Xu, Murakumo Yoshiki	4. 巻 71
2. 論文標題 Increased expression of REV7 in small cell lung carcinomas and its association with tumor cell survival and proliferation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 15～23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13040	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Akiyoshi Hoshino, Masaaki Ichinoe, Yasutaka Sakurai, and Yoshiki Murakumo
2. 発表標題 REV7 expression is associated with disease progression of malignant melanoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akiyoshi Hoshino, Masaaki Ichinoe, Yasutaka Sakurai, and Yoshiki Murakumo
2. 発表標題 REV7 expression is associated with disease progression of malignant melanoma
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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
研究分担者	村雲 芳樹 (MURAKUMO Yoshiki) (40324438)	北里大学・医学部・教授 (32607)	

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