

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08118

研究課題名(和文) 進行肺癌における免疫療法の効果を予測するためのPETと低酸素マーカーの可能性

研究課題名(英文) Potential of hypoxic marker and OET for prediction of immunotherapy in advanced lung cancer

研究代表者

解良 恭一 (Kaira, Kyoichi)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：40400783

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)：肺癌細胞株のin vitro研究でFDGおよびFMISOの取り込みはHIF-1の阻害で細胞内取り込みが減少した。FMISOとHIF-1との関連が有意で、PD-L1発現との関連性は両PETトレーサーとも有意ではなかった。PD-1阻害剤を受けた肺癌100例の治療前腫瘍組織でPD-L1, CD4, CD8, FOXP3, HIF-1 発現を評価した。PD-L1とHIF-1 発現は有意な相関がみられ、HIF-1 高発現はPD-1阻害剤の治療抵抗性に関連していた。免疫治療のモニタリングとしてFMISO-PETの臨床試験を行い現在まで16例登録でウクライナ紛争のため試薬製造が進めず現在も進行中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は癌治療で中心の免疫治療の治療効果を予測するための非侵襲的なPETでの有用性を検討する内容である。FDGは一般使用されているが、低酸素を評価するFMISO-PETは研究用のPETではあるが、免疫治療の効果を評価するのに優れている可能性が期待されている。この研究で低酸素マーカーと免疫治療の関連性は認められ、特にその発現が治療抵抗性に関連している。FMISO-PETの免疫治療のモニタリングの有用性が主目的であり、臨床試験を実施して20例中16例が登録された。これはロシアとウクライナ紛争のためFMISO試薬がしばらく届かず試験が順調にいかなかった。現在、試験進行中で終了後解析予定である。

研究成果の概要(英文)：In vitro study using lung cancer cell lines demonstrated the decrease of FDG and FMISO uptake within tumor cells by the inhibition of HIF-1. There was significant relationship between FMISO uptake and HIF-1, but, the expression of PD-L1 was not significantly associated with the uptake of both PET tracer. PD-L1, CD4, CD8, FOXP3, HIF-1 were analyzed in 100 patients with lung cancer who received PD-1 inhibitor by immunohistochemistry. The high expression of HIF-1 was significantly related to the resistance of PD-1 inhibitor. As monitoring of immunotherapy, clinical trial using FMISO-PET was approved and on-going at our institution. Until now, 16 patients were registered for further analysis. However, the war of Ukraine and Russia was not stopped, thus, the drug of FMISO was not imported. The progress of our study is delay. The remaining patients are recruiting.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：免疫治療 低酸素 PET 肺癌 免疫微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進行肺癌の薬物治療において、細胞障害性抗がん剤、分子標的治療薬、抗 PD-1/PD-L1 抗体による免疫チェックポイント阻害剤 (immune checkpoint inhibitor: ICI) が標準治療となっている。しかし、抗 PD-1/PD-L1 抗体の有効性を示すバイオマーカーとして腫瘍組織内の PD-L1 発現が重要であることが知られている。最近のがん免疫治療は、ICI 単剤ではなくて細胞障害性抗がん剤や血管新生阻害剤との併用、また抗 PD-1 抗体と抗 CTLA-4 抗体の併用が化学療法より有意に予後を改善することが示され、ICI と他剤併用療法 (いわゆる複合免疫療法) の意義が示されている。ただ、この複合免疫療法は PD-L1 発現に関わらずある一定の効果を認めるが、ICI 単剤に比べて治療効果が改善するかどうかを正確に予測する指標は今のところ存在していない。

最近の研究では、腫瘍の代謝及び活動性を評価する分子イメージングとして FDG 集積が ICI 単剤の治療効果及び腫瘍組織内の PD-L1 発現と相関が報告されている。PD-L1 発現の upregulation と腫瘍組織内の低酸素状態に起因する HIF の発現が関与し、低酸素になると壊死及び炎症が起こり T 細胞リンパ球や TNF 発現が誘導され腫瘍免疫が活性化され ICI が奏功しやすい可能性が示唆されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PD-1 阻害剤含む免疫治療の効果と低酸素誘導、免疫微小環境及び糖代謝に関するマーカーとの関連性を検討し、さらに、低酸素イメージング製剤である ¹⁸F-fluoromisonidazole (FMISO) PET で実際の免疫療法の効果をモニタリングとし、低酸素イメージングの免疫療法における治療効果予測におけるバイオマーカーとしての意義を明らかにすることである。

3. 研究の方法

肺癌細胞株を用いた実験では FDG 及び FMISO 取り込み実験を施行する。Glut1 と HIF-1 の siRNA によりノックダウンを行い FDG 及び FMISO の細胞内取り込み実験を行い、PD-L1 発現に従って FDG 及び FMISO 集積、Glut1、HIF-1 発現の状態を比較検討する。

免疫治療がなされた肺癌腫瘍検体を用いて免疫微小環境 (PD-L1, CD4, CD8, Foxp3)、低酸素誘導 (HIF-1)、糖代謝 (Glut1) に関するマーカーを免疫組織学的に評価し、さらに FDG 集積との関連性も検討する。免疫治療の効果や予後を含めた臨床病理学的検討を行う。

FMISO-PET の臨床試験を院内の倫理審査委員会の承認後施行する。試験内容は進行非小細胞肺癌で初回治療において PD-1 阻害剤含め免疫治療が予定された症例を対象に治療前、2 か月後に FMISO-PET および FDG-PET を施行し、治療前の腫瘍検体を用いて免疫微小環境 (PD-L1, CD4, CD8, Foxp3)、低酸素誘導 (HIF-1)、糖代謝 (Glut1) に関するマーカーを免疫組織学的に評価する。さらに PET 施行時に血液採取を行い、免疫に関連するマーカーを CyTOF 機器による PBMC 解析を同時に行う。トランスレーショナル研究として FMISO-PET の免疫治療への有効性を総合的に検討する。

4. 研究成果

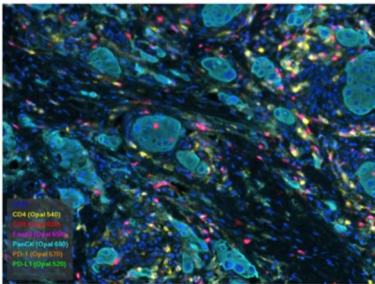
肺癌細胞株における FDG および FMISO の取り込み実験では、HIF-1 阻害により FDG および FMISO 取り込みが低下傾向を認めた。Glut1 阻害における FDG 集積は明らかに低下傾向を認めた。

PD-1 阻害剤であるペムプロリズマブ単剤が初回治療として施行された 107 例において免疫微小環境を臨床病理学的に検討した。患者背景は男性：女性 = 91 例：16 例、腺癌：非腺癌 = 52 例：55 例、PS = 0-1：2-3；82 例：

25 例であった。PD-L1 発現は 1-49%が 26 例、50%以上が 81 例であった。

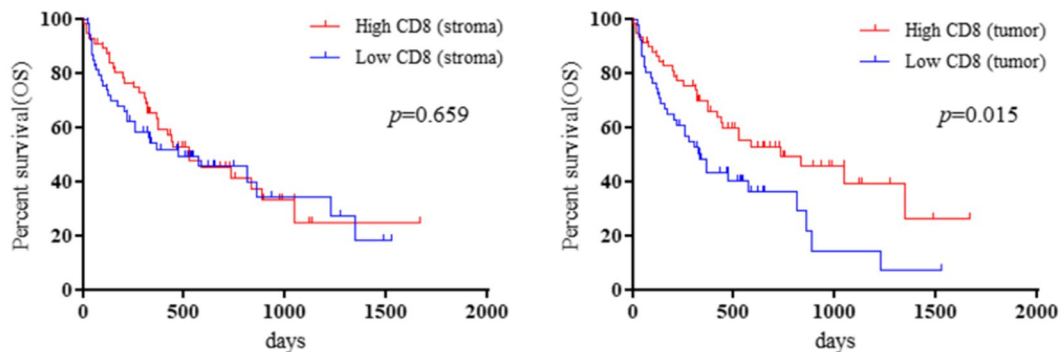
以下、Figure 1A に CD4、CD8、FOXP3 の蛍光多重染色を示す。

腫瘍細胞間質を主体に染色がなされた。Fig. 1A (Kaira K, et al. Discover Oncol 2023)



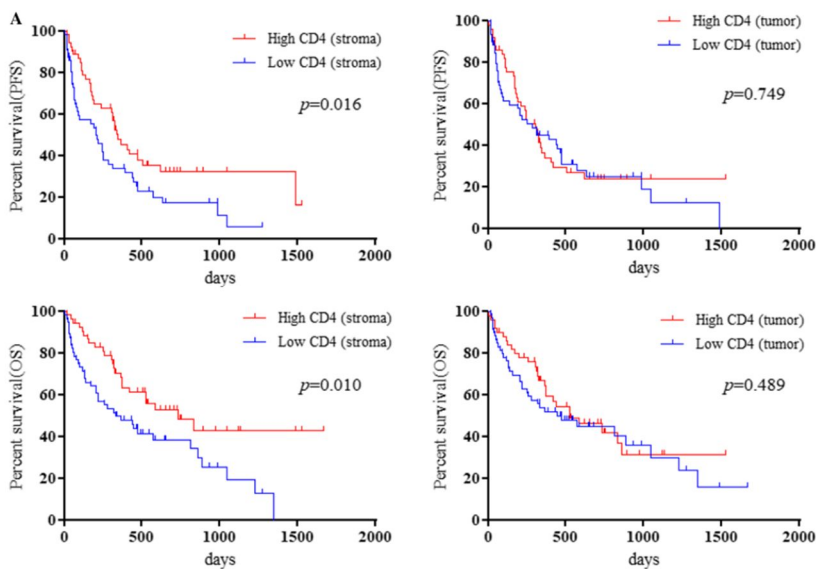
生存解析： 腫瘍内組織では CD8 高発現で全生存期間に有意差を認めた。

Figure 1B (Kaira K, et al. Discover Oncol 2023)



腫瘍内間質における CD4 高発現で全生存期間および無増悪生存期間で有意に予後良好であった。

Figure 1C (Kaira K, et al. Discover Oncol 2023)



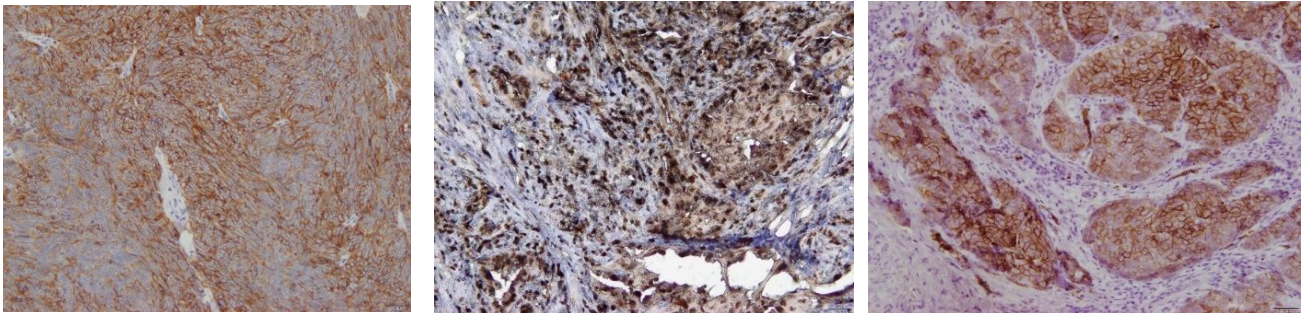
更に、PD-L1, GLUT1, HIF-1 発現について免疫組織学的検討を加えた。

Figure 1D

(PD-L1)

(HIF-1)

(GLUT1)



HIF-1 と PD-L1 および GLUT1 発現について有意な相関を認めた。

しかし、HIF-1 発現と CD4, CD8, FOXP3 による腫瘍内リンパ球数では有意な相関関係は認められなかった。

さらに、HIF-1 発現に従った生存解析を行ったが、Figure E に示すように HIF-1 高発現で有意にペンブロリズマブ単剤治療後の予後不良であることが示された。

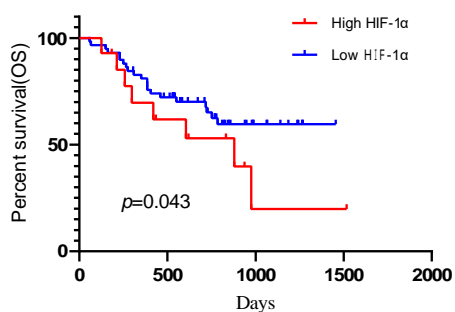
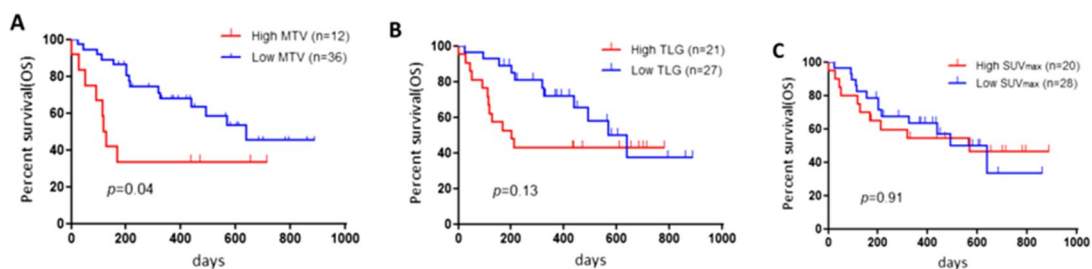


Figure 1E: HIF-1 発現に従った全生存解析

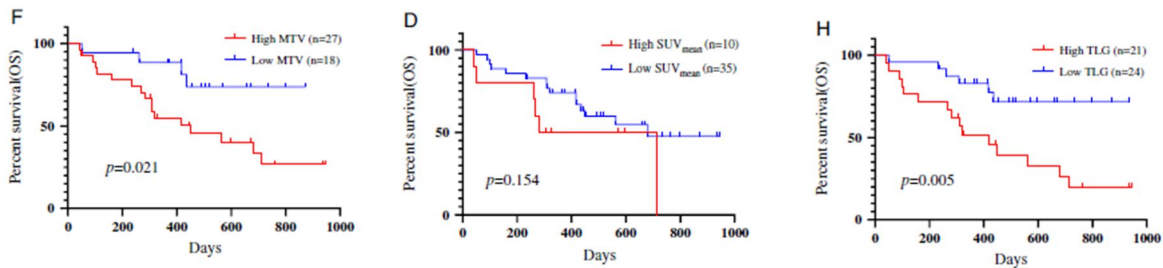
さらに、ペンブロリズマブ単剤、プラチナ併用化学療法と PD-1 阻害剤併用が施行された症例の治療前 FDG-PET の集積について SUV_{max} , MTV, TLG の値による予後解析を行った。

Figure 2A: 初回ペンブロリズマブ単剤治療癌なされた非小細胞肺癌 48 例における FDG 集積に従った全生存解析 (Yamaguchi O, et al. Sci Reports 2020)



MTV および TLG 高発現が有意に予後不良であったが、 SUV_{max} では予後との相関は認められなかった。

Figure 2B: 初回免疫化学療法併用治療がなされた非小細胞肺癌 45 例における FDG 集積に従った全生存解析 (Hashimoto K, et al. J Immunotherapy 2022)



こちらについても MTV および TLG 高発現が有意に予後不良であったが、SUV_{max} では予後との相関は認められなかった。

FMISO-PET を用いた進行非小細胞肺癌の臨床試験については、登録目標数 20 例に対して現在 16 例が登録された。ロシア-ウクライナ紛争の前までは順調に試験が遂行していたが、紛争による社会事情が変化し、FMISO 試薬が本国へ届かなくなり 1 年以上試験を遂行することができなかった。現在は、適格症例に対して試験を再開しているので、残り 4 例を登録して FMISO-PET と FDG-PET との比較をしながら、FMISO-PET の免疫治療の効果及び予後予測の有効性について SUV_{max}、MTV、TLG を用いて解析をしていく。さらに PET 施行前後に PBMC 採血をしており、血液内のリンパ球、影響状態など血清マーカーについても探索的な解析を追加する。さらに PET 施行前の腫瘍検体を用いて免疫微小環境(PD-L1, CD4, CD8, Foxp3)、低酸素誘導(HIF-1)、糖代謝(Glut1)に関するマーカーを免疫組織学的に評価して臨床病理学的な側面から FMISO-PET の役割を検討していく。16 例の治療内容は、14 例がイピリムマブ+ニボルマブ、2 例がペンプロリズマブ単剤治療であった。

本研究では細胞レベルで FMISO 集積と HIF-1 との関連性を示したが、FMISO が低酸素マーカーであることは従来から報告があり従来の結果を確認することができた。

臨床病理学的検討では、ペンプロリズマブ単剤治療がなされた 107 例の腫瘍組織が免疫組織的に検討された。腫瘍内リンパ球である CD4 と CD8 が予後に関連していたが、腫瘍内間質への CD4 高浸潤と腫瘍内への CD8 高浸潤が予後良好な因子であった。また、HIF-1 高発現は予後不良の可能性が示唆され、腫瘍内における PD-L1 と GLUT1 発現と有意な関連性を認めた。しかし、HIF-1 は腫瘍内リンパ球数とは有意な関連性は認められなかった。

このことから、腫瘍内低酸素は腫瘍内リンパ球浸潤とは独立して免疫微小環境へ影響を与え、免疫治療の予後不良に関連していることが分かった。さらに、FDG-PET による腫瘍内糖代謝における免疫治療後の予後への役割を検討したところ、metabolic tumor volume による糖代謝を計測することで予後マーカーの役割を確認できた。従来の報告でも FDG 高集積は、PD-1 阻害剤の予後不良因子であることが示されているが、我々の研究でも確認できた。

最も重要な低酸素を評価する FMISO-PET での臨床試験であるが、予定された研究期間内に登録完了して解析をすることを予定していたが、ロシアとウクライナ紛争が起こり、FMISO の試薬が不足して研究が一時中断したのは予定外であった。しかし、16 例と 80%まで登録されているので、目標である 20 例を登録して予定通りの解析を行い論文として報告する。実際の PET で腫瘍内の低酸素の変化が免疫治療の効果及び予後を予測する有用なマーカーであることが確認できれば、症例数を増やして実用化に向けた研究を今後計画していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kaira K, Imai H, Mouri A, Yamaguchi O, Kagamu H	4. 巻 57
2. 論文標題 Clinical Effectiveness of Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer with a Poor Performance Status.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicina (Kaunas)	6. 最初と最後の頁 1273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medicina57111273	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 Kaira K, Imai H, Yamaguchi O, Mouri A, Kagamu H	4. 巻 13
2. 論文標題 Salvage Chemotherapy in Patients with Previously Treated Thymic Carcinoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 5441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13215441	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 Imai H, Kaira K, Hashimoto K, Nitanda H, Taguchi R, Yanagihara A, Umesaki T, Yamaguchi O, Mouri A, Kawasaki T, Yasuda M, Kobayashi K, Sakaguchi H, Kuji I, Kagamu H	4. 巻 10
2. 論文標題 Tumor immunity is related to 18 F-FDG uptake in thymic epithelial tumor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Med	6. 最初と最後の頁 6317-6326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.4176. Epub 2021 Aug 7.	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 Hashimoto K, Kaira K, Yamaguchi O, Shiono A, Mouri A, Miura Y, Kobayashi K, Imai H, Matsusaka Y, Kuji I, Kagamu H	4. 巻 47
2. 論文標題 Visual Assessment of 18F-FDG Uptake on PET to Predict Survival Benefit to PD-1 Blockade in Non-Small Cell Lung Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Nucl Med	6. 最初と最後の頁 108-116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/RLU.0000000000004009.	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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 解良 恭一
2. 発表標題 Management and problems of oncologic emergency in advanced lung cancer
3. 学会等名 第25回 アジア太平洋呼吸器学会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 解良 恭一
2. 発表標題 EGFR-TKI耐性肺癌におけるPD-1阻害剤投与後のEGFR-TKI再投与の効果
3. 学会等名 第61回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 解良 恭一
2. 発表標題 EGFR遺伝子変異陽性肺癌のEGFR-TKI治療における腫瘍内AXL発現の意義
3. 学会等名 第61回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本 康佑、解良 恭一
2. 発表標題 抗PD-1抗体治療後の腫瘍内18F-FDG集積の視覚的評価による予後解析
3. 学会等名 第62回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究協力者	渡邊 かずえ (Watanabe Kazue)		
研究協力者	今井 久雄 (Imai Hisao)		
研究協力者	橋本 康佑 (Hashimoto Kosuke)		
研究協力者	山口 央 (Yamaguchi Ou)		
研究協力者	各務 博 (Kagamu Hiroshi)		
研究協力者	久慈 一英 (Kuji Ichiei)		

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