

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09574

研究課題名(和文)腎細胞癌におけるI/O薬効果予測因子の基礎的・臨床的探索

研究課題名(英文) Investigation of predictive factors for efficacy of immune checkpoint inhibitor in renal cell carcinoma

研究代表者

角野 佳史 (Kadono, Yoshifumi)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：10397218

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)：ヒト腎細胞癌細胞株ACHNおよびCaki-1において、ケモカイン受容体CCR2, 5, 6が高発現しており、ケモカインシグナルの活性が確認された。これらの発現はジテルペンであるカーウェオールとカフェストールで抑制できた。さらに免疫チェックポイント阻害薬のターゲットであるPD-L1も高発現しており、同様にジテルペンで抑制可能であった。ジテルペンは腎細胞癌細胞のAKT/ERKのリン酸化を阻害することで上皮間葉移行を阻害し、増殖や遊走を抑制した。腎細胞癌患者の血清から免疫チェックポイント阻害薬の効果を予測する因子を見出そうとしたが、明確に予測できる因子を同定し得なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カーウェオールとカフェストールの直接的な抗腫瘍効果のメカニズムとして、ヒト腎細胞癌細胞に対するアポトーシスの誘導による増殖能の抑制と上皮間葉移行の阻害による遊走・転移能の抑制が明らかとなった。さらに、ケモカイン受容体やPD-L1の発現の抑制を介し、ケモカインシグナルの阻害、抗腫瘍免疫応答に作用し、間接的に癌微小環境にも影響しうることを示唆された。腫瘍免疫学的作用により間接的な抗腫瘍効果を発揮する可能性を有することを初めて示した基礎研究であり、腎細胞癌に対する新たな治療薬の開発に繋がる有益な研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The combination of kahweol acetate and cafestol administration synergistically inhibited cell proliferation and migration by inducing apoptosis and inhibiting epithelial-mesenchymal transition. Mechanistic dissection revealed that kahweol acetate and cafestol inhibited AKT and ERK phosphorylation. Moreover, kahweol acetate and cafestol downregulated the expression of not only C-C chemokine receptors 2, 5, and 6 but also programmed death-ligand 1, indicating their effects on the tumor microenvironment. Although sera from patients with renal cell carcinoma were investigated to seek novel predictive factors for efficacy of immune checkpoint inhibitor in renal cell carcinoma, no factors were found this time.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：腎細胞癌 免疫チェックポイント ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

日本では年間約 8 千人が腎細胞癌で死亡しており、未だに進行腎細胞癌の根治は難しい状況である。2016 年に immuno-oncology (IO) 薬ニボルマブ (抗 PD-1 抗体) が免疫チェックポイント阻害薬として初めて腎細胞癌に対して承認され、腎細胞癌治療における IO 時代の幕開けを迎えた。2018 年にはニボルマブとイピリムマブ (抗 CTLA-4 抗体) の併用療法 (ニボイピ併用療法) が承認された。このランダム化比較試験では約 10% の患者に完全奏効例が認められ、IO 時代になりようやく進行癌の根治の可能性が見えてきた。しかし、完全奏効に至るのはやはり高々 10% のみである点は厳しい現実であった。興味深い事実として、特定の転移 (例えば肺転移) のみ奏効に至り、他の部位に効果がないために全体として奏効に分類されない症例も相当数存在していた。このような症例には、残存部位の切除や放射線療法 (サイバーナイフなど定位照射) により完全奏効を目指せる可能性があり、単に IO 薬のみの効果だけを期待するのではなく集学的治療へ発展させることが重要であると考えられた。

その後、新規 IO 薬の承認も追加され、ますます期待が高まった IO 薬ではあったが、当時からいくつかの問題点が指摘されていた。第一に価格が高いことが挙げられる。ニボルマブの薬価は引き下げられているものの、適応拡大により投与される患者数は指数関数的に増えている。重要な問題点として特徴的な有害事象も挙げられる。頻度は低く重篤なものも少ないとされているが、重篤な免疫関連有害事象を見逃さないための頻繁かつ丁寧なフォロー、特殊な検査項目、新たなチーム医療体制の構築、ステロイドや免疫抑制剤投与なども含めた他領域との連携が必要であり、数値としては明確に示されないコスト、患者あるいは医師にかかる身体的・時間的負担は計り知れない。

このような諸問題を解決するため、バイオマーカーによって治療効果や有害事象を予測し、不要な投与を可能な限り減らす必要があった。腫瘍組織では肺癌などで PD-L1 の発現が低い患者には IO 薬が効きにくいことが報告されるなど臨床応用が期待されていた。しかし、発現が低い場合でも著効する患者が存在することや、その逆もまたあり、特に腎癌ではクリアカットな値の設定は困難とされた。血球成分もバイオマーカーとなる可能性が報告されているものの、コンセンサスを得られるほどのエビデンスを有するものは見だせていなかった。癌の種類ごとに真逆の結果となるバイオマーカーの存在も報告されていることも解釈を難解にしていた。IO 薬は理論的作用点が存在するが、いわゆるプライミングフェーズに PD-1 阻害薬が作用している可能性や、チェックポイント阻害によって別のシグナルが活性化することも報告されており、未解明の多様な作用点の存在が示唆され、直接的な作用点のみをバイオマーカーとすることには限界があった。作用点をターゲットとしたバイオマーカーと、作用機序を大局的な観点から捉えたバイオマーカーを複合的に包含したバイオマーカーの開発が必須であると考えていた。しかし、複雑な作用機序が存在するため、バイオマーカー研究はなかなか進展が見られない分野となっていた。

2. 研究の目的

本研究は IO 薬 (ニボルマブ単剤とニボイピ併用療法) を使用している腎細胞癌患者の各種検体から、IO 薬の新規バイオマーカーを探索する臨床研究パートと、免疫関連細胞および分泌蛋白がどのように耐性機構に関わっているのかを明らかにする基礎研究パートで構成する。これまでは基礎研究から導き出された理論的根拠が一定程度あるものについてバイオマーカーとしての有用性を検討しているが、実臨床で使用可能なレベルにまで信頼できるものがなかった。患者検体を用いた臨床的データと・基礎的データの両方から、実臨床で使用できるバイオマーカーを探索する。

本研究のバイオマーカー探索の目的の一つは転移部位別の効果が予測可能であるかという点である。腎細胞癌では多発肺転移がしばしば見られるが、IO 薬で肺転移が完全奏効することも多い。このような症例における切除可能な他部位の転移は手術的に切除すれば結果として完全奏効となる。つまり、完全切除不能な転移に対して IO 薬、特に新規治療であるニボイピ併用療法が有効であるかどうかという点を知ることが重要と考えている。T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子再構成は腎細胞癌の治療や転移の状態によって特徴的なものになると考えられる。TCR レパトア解析では、治療や転移の状態に特異的な T 細胞クローナリティを測定しうる。転移部位に応じて T 細胞クローナリティが異なることに加え IO 薬の反応性についても特異性がある可能性もあり、興味深い動きを示すバイオマーカーとなると考えられる。また、癌細胞に有利な状況を誘導する免疫細胞である抑制性 T 細胞 (Treg) や骨髄由来抑制細胞 (MDSC) の血中濃度と IO 薬の効果も検討する。

基礎研究パートでは、転移微小環境に焦点をあてる。CTLA-4 のブロックで活性型 T 細胞を誘導する TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2) の発現が高まることが報告されている。一方、当研究室では TRAF2 ノックアウトマウスでは肺の CCL2 発現が亢進することを明らかにした。抗 CTLA-4 抗体が機能しない患者では肺の CCL2 発現が低下しない可能性が示唆される。CCL2 は別名マクロファージ遊走因子とも呼ばれる強力なマクロファージの活性化因子である。肺にお

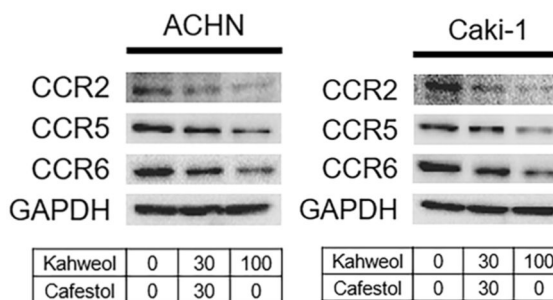
いて、CCL2 は CCR2 陽性単球や肺胞マクロファージを活性化させ、肺の血管内皮細胞の血管透過性を亢進させるとも報告されている。血管透過性亢進は血中に浮遊する癌細胞が末梢組織に生着する入口となるだけでなく、局所では癌細胞の生存に有利な環境を作ることが知られている。また、乳癌細胞を使った実験では、CCL2 は肝での Kupffer 細胞の活性化を介して肝転移を促進すると報告されている。活性型 T 細胞が抑制されない場合は CCL2 が肺や肝への転移に有利に働いている可能性がある。また、PD-1 ノックアウトマウスにおいては CCL2 分泌が有意に亢進することも報告されており逆に癌進展につながる可能性がある。このような環境を作りだす患者では抗 PD-1、CTLA-4 抗体が効かない可能性がある。これらのデータは CCL2 が、IO 薬が効きにくい患者のバイオマーカーとなる可能性を示唆しており、CCL2 をはじめとしたケモカインやケモカインシグナルを介する IO 薬の治療抵抗性あるいは腎細胞癌の活性化機構の解明は臨床応用に直結する重要なテーマである。本研究では CCL2-CCR2 シグナルをはじめとした腎細胞癌に重要なケモカインシグナルをいかに抑制するか、という点について検討する。

3. 研究の方法

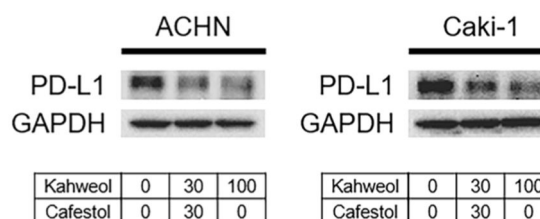
- (1)すでに腎細胞癌の活性化機構に重要な役割を果たすと報告されているケモカインおよびその受容体からなるシグナル CCL2-CCR2 軸や CCL5-CCR5 軸のほか、当研究室で行われた先行研究により明らかにされた、あらたな腎細胞癌の重要な活性化経路である CCL20-CCR6 軸を抑制しうる物質を模索する。具体的にはすでに前立腺癌で複数のケモカインシグナルを抑制することを明らかにしているジテルペン(カーウェオールとカフェストール)が腎細胞癌においても機能するかどうかを調べる。
- (2)さらに免疫における間接的な抗腫瘍効果を有する可能性を明らかにするため、これらのジテルペンが、IO 薬の作用点である腎細胞癌細胞に発現する PD-L1 の発現に影響を与える可能性を検討する。
- (3)これらのジテルペンが、実際に腎細胞癌の表現型(増殖や遊走)に対して作用するか検討する。
- (4)ジテルペンが直接的に腎細胞癌細胞の活性を抑制する場合、その作用機序についての詳細を明らかにする。
- (5)IO 薬を使用予定の腎細胞癌患者の血液を用いて免疫細胞数をカウントし、さらに TCR レパトア解析を行い、IO 薬の効果を予測する因子を明らかにする。

4. 研究成果

ヒト腎細胞癌細胞株 ACHN および Caki-1 において、ケモカイン受容体 CCR2, 5, 6 の発現の有無を調べたところ、いずれも強く発現していることが明らかになった。すでに前立腺癌細胞においてこれらの経路を阻害することを確認しているジテルペン、カーウェオールとカフェストールを用いて、ケモカインシグナルを抑制することが可能かどうかを調べたところ、濃度依存的に、また両方同時に加えることで相乗的に CCR2, 5, 6 の発現が抑制された(右図)。



また、ACHN および Caki-1 における PD-L1 の発現も確認でき、カーウェオールとカフェストールを加えたところ、濃度依存的に、また両方同時に加えることで相乗的に PD-L1 の発現が抑制された(右図)。



次にカーウェオールとカフェストールを用い、増殖能および遊走能試験を行った。カーウェオールとカフェストールは ACHN および Caki-1 の増殖および遊走を用量依存的に阻害し、両者の併用で相乗効果が認められた。また、ACHN および Caki-1 に対しては十分な増殖・遊走抑制作用を発揮した低用量カーウェオールとカフェストールの併用では、ヒト腎近位尿管上皮細胞株(HK-2)に対しては増殖抑制作用を示さなかった。この結果は、カーウェオールとカフェストールは腎細胞癌細胞にのみ選択的に強い細胞毒性作用を有し、正常細胞には毒性が少ない薬剤であることが示唆された。また、カーウェオールとカフェストールは強力にアポトーシスを誘導した。抗アポトーシス蛋白や上皮間葉移行(EMT)関連蛋白の阻害、Akt/ERK のリン酸化の阻害が確認された。

以上よりカーウェオールとカフェストールの直接的な抗腫瘍効果のメカニズムとして、ヒト腎細胞癌細胞に対するアポトーシスの誘導による増殖能の抑制と EMT の阻害による遊走・転移能の抑制が明らかとなった。さらに、ケモカイン受容体や PD-L1 の発現の抑制を介し、ケモカインシグナルの阻害、抗腫瘍免疫応答に作用し、間接的に癌微小環境にも影響しうることを示唆された。

臨床パートとして進行腎細胞癌の1次治療あるいは2次治療以降において、10薬を使用する予定の患者血中のTreg、MDSCをフローサイトメーターにて測定した。当初Tregは(CD4+CD25+Foxp3+)、MDSCは(CD11b+CD33+)でソーティングを予定していたものの、多くの検体において特にMDSCの回収が困難であることが明らかとなった。これは本来、ヒトにおけるMDSCの定義がマウスほど明確ではなく、単球系細胞の分化の一系統である可能性やリンパ系細胞である可能性も報告されるなどあいまいなものであったためと考えられる。

治療前のレパトアにおいては、免疫チェックポイント阻害薬に対する反応性あるいは生命予後における有効症例と非有効症例の間で、明らかな有意差は認められなかった。特にニボルマブ単剤療法症例においては、治療前のレパトアにばらつきが多かった印象であり、症例数が少ないことも含め、免疫チェックポイント阻害薬が有効な症例の特徴が見いだせなかった原因と考えられた。

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 Makino T, Izumi K, Hiratsuka K, Kano H, Shimada T, Nakano T, Kadomoto S, Naito R, Iwamoto H, Yaegashi H, Shigehara K, Kadono Y, Nakata H, Saito Y, Nakagawa-Goto K, Sakai N, Iwata Y, Wada T, Mizokami A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Anti-proliferative and anti-migratory properties of coffee diterpenes kahweol acetate and cafestol in human renal cancer cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 675
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80302-4.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牧野友幸、泉浩二、岩本大旭、加納洋、島田貴史、門本卓、内藤伶奈人、八重樫洋、角野佳史、溝上敦
2. 発表標題 コーヒージテルペン酢酸カーウェオールとカフェストールのヒト腎癌細胞における抗腫瘍効果についての検討
3. 学会等名 第71回日本泌尿器科学会中部総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牧野友幸、泉浩二、岩本大旭、加納洋、島田貴史、門本卓、内藤伶奈人、八重樫洋、角野佳史、溝上敦
2. 発表標題 コーヒージテルペンkahweol acetateとcafestolのヒト腎細胞癌細胞に対する増殖・遊走抑制効果
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牧野友幸、泉浩二、岩本大旭、加納洋、島田貴史、門本卓、内藤伶奈人、八重樫洋、角野佳史、溝上敦
2. 発表標題 コーヒージテルペンKahweol acetateとcafestolは腎細胞癌の増殖・遊走を抑制する
3. 学会等名 第30回泌尿器科分子・細胞研究会
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 分担者	溝上 敦 (Mizokami Atsushi) (50248580)	金沢大学・医学系・教授 (13301)	
研究 分担者	泉 浩二 (Izumi Kouji) (80646787)	金沢大学・附属病院・講師 (13301)	

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