

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16453

研究課題名(和文) ペメトレキセドの腫瘍免疫応答誘導に關与する白血球プロファイリング解析

研究課題名(英文) Phenotyping of white blood cells contributing to tumor immunity activated by pemetrexed

研究代表者

高木 陽 (Takagi, Haruhi)

順天堂大学・大学院医学研究科・非常勤助教

研究者番号：40868907

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)：進行非小細胞肺癌に対してペメトレキセド(PEM)を投与中の患者を対象に、採血検体を用いて白血球プロファイリングを実施した。PEM長期奏功患者では、非奏功患者と比較してNLRやリンパ球数が増加しており、PEMが腫瘍免疫を賦活している可能性が示唆された。そこで、PD-1陽性リンパ球やテロメラーゼ陽性単核球に着目し、治療前後での比較および表面抗原解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、白血球のプロファイリングは免疫系の変化を鋭敏に反映するため、テロメラーゼ活性の亢進白血球、PD-1白血球の定量は、鋭敏なICI奏効予測マーカーとなり、将来的な、PEM及びPEM+ICI併用療法の個別化治療選択に応用が可能となる。少量採血による診断システムは即座に他科のがん診断にも応用可能であり、将来的には非侵襲的がん診断法として肺がん研究にとどまらず、さまざまながん種へ展開することを目指す。本システムの実現によって治療奏効率の向上と生存期間の延長で国民生活の質の向上と高額ながん医療コストの節減による社会経済の発展に貢献できることが見込まれ、本研究の学術的意義は非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the clinical characteristics and predictive factors in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer who underwent long-term Pemetrexed (PEM) maintenance therapy. The long-term PEM administration group exhibited a higher ALC and a lower NLR than the shorter-term group. Increased PD-1 lymphocytes were associated with the long-term PEM response group. These results suggest PEM is related to PD-1 lymphocyte mediated tumor immunity. Moreover, we focused on the monocytic cells with high telomerase activity in the lung cancer patients.

研究分野：呼吸器

キーワード：ペメトレキセド 免疫チェックポイント分子 テロメラーゼ活性 腫瘍免疫応答誘導 非扁平非小細胞肺がん

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

肺腺癌の一部の患者では、PEM 投与により、長期の無増悪生存期間を認めている。近年、基礎研究レベルで PEM は、T 細胞内在性メカニズムを介して多面的に腫瘍免疫活性を増強する作用が学会レベルで報告（AACR2019）されており、ICI との相乗作用が期待されている。我々は、PEM の超長期奏効維持症例の臨床的特性の予備調査を行ったところ、治療経過において統計学有意差をもってリンパ球分画の低下をきたさないことを確認した。これは、癌患者の血中において長期生存し白血球の腫瘍免疫に直接作用する白血球分画の関与をうかがわせる。この PEM により惹起長期生存し腫瘍免疫を維持させる分画を定量解析することが、PEM 長期奏効予測、並びに PEM+ICI の奏効予測のコンパニオン診断に繋がり、患者末梢血採血による非侵襲的簡易測定モニタリングが可能なることから肺癌患者個別化治療選択に極めて有用な、臨床マーカーになり得ることが期待される。更にテロメスキャン OBP-401 を用いた肺がん患者採血検体の CTC 検出試験では、肺がん > 健常人に比べ、GFP 陽性白血球が、血中循環腫瘍細胞（CTC）とともに有意に増加することが明らかになっている。これらの背景から、テロメスキャン OBP-401 を基盤技術として白血球のテロメラーゼ活性や細胞特性を統合的に解析するシステムの構築と PEM と PEM+ICI のより鋭敏な奏効予測マーカーとしてのテロメスキャン GFP+/PD-1+/CD45+白血球の臨床応用への有用性を検証する着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、PEM の免疫系制御能の直接作用が推測され、PEM が、腫瘍免疫応答誘導性細胞死（Immunogenic tumor cell death: ICD）をどのようにして引き起こすのか？どのようにして、PEM と ICI の併用療法は効果を示すのかという疑問を解明することを目的とする。申請者の研究グループは、不老不死の長期生存に関与するテロメア活性の亢進血中細胞のリキッドバイオプシー研究に着手した。極めて独自のな、検出技術基盤として、診断試薬としてテロメスキャン OBP-401（遺伝子改変アデノウイルスウイルス）を用いて、テロメラーゼ活性依存的に感染した細胞を GFP 蛍光によって標識することができる。ICI の奏効に関与する PD-1 陽性に加えて、更にテロメア活性の亢進した生きた白血球細胞（テロメスキャン GFP+/PD-1+/CD45+）の高速高感度検出が FACS で可能となった。また、同時にフローサイトメトリーと組み合わせ測定によって、様々な免疫チェックポイントマーカー等や各種細胞表面抗原の発現や血球サブタイプの存在比率との相関も総合的に解析することが可能となる。本システムは血液中に豊富に存在する白血球を対象とした測定系のため、定量的かつリアルタイムな解析が可能であり、基礎研究面においては抗腫瘍免疫応答のメカニズムの解明や新たなバイオマーカーの創出につながることも考えられる。特に、末梢血白血球におけ

るテロメラーゼ活性の亢進が免疫システム中でどのような役割を担っているかについては未解明であるため非常に興味深い。白血球のプロファイリングは免疫系の変化を鋭敏に反映するため、本システムから得られる、テロメスキャン GFP 陽性/PD-1 陽性白血球の定量は、鋭敏な ICI 奏効予測マーカーとなり、将来的な、PEM 及び PEM+ICI 併用療法の個別化治療選択に応用が可能となる。テロメスキャンを用いた少量採血による診断システムは即座に他科のがん診断にも応用可能であり、将来的には非侵襲的がん診断法として肺がん研究にとどまらず、さまざまながん種へ展開することを目指す。本システムの実現によって治療奏効率の向上と生存期間の延長で国民生活の質の向上と高額ながん医療コストの節減による社会経済の発展に貢献できることが見込まれ、本研究の学術的意義は非常に大きい。

3. 研究の方法

PEM 長期投与患者の臨床的特性の解析：PEM が長期奏効した患者群について、その患者背景や臨床データ等を非奏効群と比較し、多変量解析によって長期奏効の予測因子を発見する。特に末梢血リンパ球数や単球数などに着目した解析を行う。また、次治療として ICI が投与された症例について検証し、奏効率や免疫関連有害事象の発生率を算出する。既に、予備調査で PEM 長期投与群のリンパ球数の減少率の低下を確認しており、症例を積み重ねて検証する。

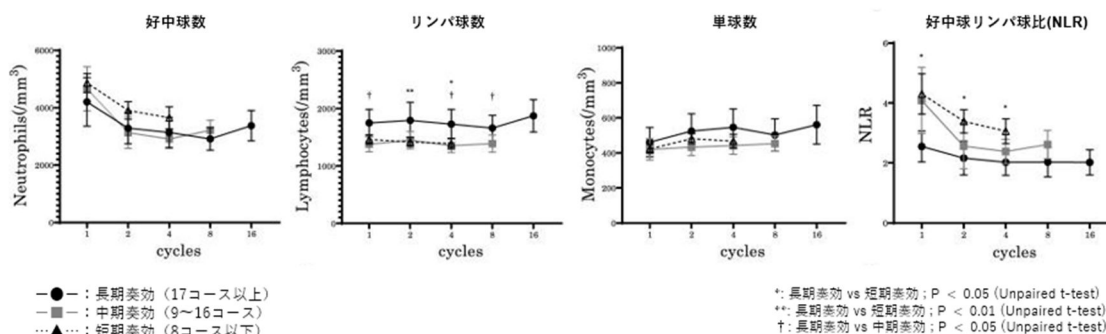
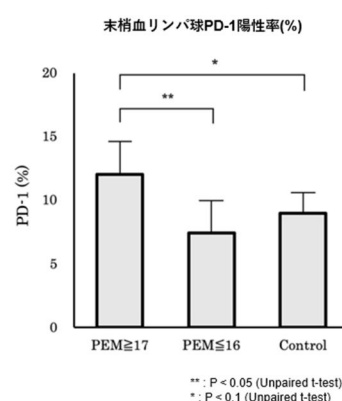
テロメスキャン OBP-401 を用いた高精度テロメラーゼ活性亢進 PD-1 白血球検出プラットフォームの構築：高精度フローサイトメーター(BD FACSAria™ Fusion)によって蛍光輝度・染色パターン(GFP、核染色、免疫染色)から白血球の計数とプロファイリングを行うシステムの開発を行う。具体的には、OBP-401 の感染による GFP 標識とともに免疫細胞別(リンパ球(T 細胞/B 細胞/NK 細胞)、単球(マクロファージ/樹状細胞)、顆粒球(好塩基球/好酸球/好中球))の細胞表面マーカーおよび ICI の奏功に関係する様々な免疫チェックポイント受容体(PD-1、CTLA-4、TIM-3 等)の蛍光免疫染色を行い、フローサイトメーターを用いてマルチカラー免疫プロファイリングを行う。既に、GFP+/PD-1+/CD45+白血球の検出が肺癌患者末梢血採血 1ml から定量可能な段階である。本 FACS システムを用いてまずは、In vitro で健常人末梢血採血から白血球分画を比重差遠心勾配法で分離し、長期/短期 PEM 投与下で肺癌細胞株 A549、PC9 との共培養を行う。GFP+/PD-1+/CD45+白血球の経時的推移をモニタリングし PEM の腫瘍免疫応答誘導性白血球の直接的制御を検証する。

PEM 投与肺がん患者症例での検証：採血検体で、PEM 投与群と非投与群の肺がん患者の日常臨床での採血採取時に、解析用採血を+1ml を患者同意の元(IRB 承認済み)採取。本 FACS システムを用いて 標準治療 PEM+ICI 前後 PEM 長期維持投与群(PEM 奏効維持継続群) vs 短期 PEM 投与群(PEM 再発群)の肺癌患者の末梢血白血球の測定を行い、テロメラーゼ活性の亢進や、免疫チェックポイントマーカーの発現、血球サブタイプの存在比率の推移のモニタリングを行う(図 1)。実際の治療効果、臨床経過と白血球のプロファイリングに相関がみ

られた場合、奏効/耐性/予後予測マーカーとしての有用性が確立し、患者個人レベルで最適な治療方法を選択するコンパニオン診断の実現につながる事が期待できる。テロメスキャンによるテロメラーゼ活性 GFP 亢進/PD-1 陽性白血球の検出、血球サブタイプ別の推移、表面マーカーと治療奏効の関連性の解析を行い、肺癌の鋭敏な臨床マーカーとして PEM の長期奏効の機序の機序を解明する。

4. 研究成果

本研究ではまず患者本人より研究同意を得た上で、EDTA スピッツ採血を行った後、比重遠心法で PBMC を回収した。赤血球・血小板の除去やブロッキングなどの前処理を行ったのち、蛍光標識抗体を用いて白血球特異的な表面抗原や免疫チェックポイント分子などを標識し、フローサイトメトリーによる解析を行った。PEM 長期奏功患者では、非奏功患者と比較して NLR やリンパ球数が増加しており(下図)、リンパ球 PD-1 陽性率の上昇がみられた(右図)。一方で単球については奏功との関連性はみられなかった。



さらに、PEM 奏効に関連する単核球の探索の新たな試みとして、テロメラーゼ活性の高い単核球の新たな定量解析を行った。テロメスキャンは、テロメラーゼ活性が高い末梢血細胞に選択的に感染することで GFP 識別発色を増幅させるウイルス製剤であり、高効率に血中テロメラーゼ活性亢進末梢血細胞のみを捕捉する極めて独創的な手法である。この手法を用い、GFP 陽性単核球が腫瘍免疫のバイオマーカーとなりうるかどうか、当院呼吸器内科の肺癌患者 100 人を対象として、化学療法ないし免疫療法(免疫チェックポイント阻害剤: ICI)の投与前後で研究用採血を行った。単核球の GFP 染色と FACS 解析を行い、登録患者の臨床情報を収集して統計解析を行った。また、フローサイトメトリーやウエスタンブロットなどの手法を用いて、GFP 陽性単核球の表面抗原蛋白発現についての検証を行ったところ、以下の知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Sumiyoshi Issei, Okabe Takahiro, Togo Shinsaku, Takagi Haruhi, Motomura Hiroaki, Ochi Yusuke, Shimada Naoko, Haraguchi Mizuki, Shibayama Rina, Fujimoto Yuichi, Watanabe Junko, Iwai Moe, Kadoya Kotaro, Iwakami Shin-ichiro, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 19
2. 論文標題 High lymphocyte population-related predictive factors for a long-term response in non-small cell lung cancer patients treated with pemetrexed: a retrospective observational study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12967-021-02761-1	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 Saito Kaori, Ai Tomohiko, Kawai Akinori, Matsui Jun, Fukushima Yoshiyuki, Kikukawa Norihiro, Kyoutou Takuya, Chonan Masayoshi, Kawakami Takeaki, Hosaka Yoshie, Misawa Shigeki, Takagi Haruhi, Matsushita Yasushi, Hiki Makoto, Okuzawa Atsushi, Hori Satoshi, Naito Toshio, Miida Takashi, Takahashi Kazuhisa, Tabe Yoko	4. 巻 11
2. 論文標題 Performance and usefulness of a novel automated immunoassay HISCL SARS-CoV-2 Antigen assay kit for the diagnosis of COVID-19	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 23196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-02636-x	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 Saito Kaori, Ai Tomohiko, Kawai Akinori, Matsui Jun, Fukushima Yoshiyuki, Kikukawa Norihiro, Kyoutou Takuya, Chonan Masayoshi, Kawakami Takeaki, Hosaka Yoshie, Misawa Shigeki, Takagi Haruhi, Matsushita Yasushi, Hiki Makoto, Okuzawa Atsushi, Hori Satoshi, Naito Toshio, Miida Takashi, Takahashi Kazuhisa, Tabe Yoko	4. 巻 11
2. 論文標題 Author Correction: Performance and usefulness of a novel automated immunoassay HISCL SARS-CoV-2 Antigen assay kit for the diagnosis of COVID-19	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 23968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-03518-y	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 Sekimoto Yasuhito, Nagata Yuichi, Kato Motoyasu, Arai Yuta, Fujimoto Yuichi, Takagi Haruhi, Shukuya Takehiko, Hayashi Takuo, Nagaoka Tetsutaro, Yoshioka Yasuko, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 10
2. 論文標題 Idiopathic dendriform pulmonary ossification diagnosed by bronchoscopic lung cryobiopsy: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respirology Case Reports	6. 最初と最後の頁 e0896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rcr2.896	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 Watanabe Naoki, Takaku Tomoiku, Tsukune Yutaka, Yasuda Hajime, Ochiai Tomonori, Yamada Kohei, Nakazawa Hiroki, Hotta Saori, Nishimaki Takayasu, Takagi Haruhi, Takahashi Kazuhisa, Komatsu Norio, Ando Miki	4. 巻 115
2. 論文標題 Bosutinib-induced lung injury: a report of two cases and literature review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 902 ~ 905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-022-03304-0	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 Namkoong Ho, Edahiro Ryuya, Takano Tomomi, Nishihara Hiroshi, Shirai Yuya, Sonehara Kyuto, Tanaka Hiromu, Azekawa Shuhei, Mikami Yohei, Lee Ho, Hasegawa Takanori, Okudela Koji, Okuzaki Daisuke, Motooka Daisuke, Kanai Masahiro, Naito Tatsuhiko, Takagi Haruhi, et al.	4. 巻 609
2. 論文標題 DOCK2 is involved in the host genetics and biology of severe COVID-19	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 754 ~ 760
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-05163-5	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 Wang Qingbo S., Edahiro Ryuya, Namkoong Ho, Hasegawa Takanori, Shirai Yuya, Sonehara Kyuto, Tanaka Hiromu, Lee Ho, Saiki Ryunosuke, Hyugaji Takayoshi, Shimizu Eigo, Katayama Kotoe, Kanai Masahiro, Naito Tatsuhiko, Sasa Noah, Yamamoto Kenichi, Takagi Haruhi, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 The whole blood transcriptional regulation landscape in 465 COVID-19 infected samples from Japan COVID-19 Task Force	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-32276-2	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 Lee Ho, Chubachi Shotaro, Namkoong Ho, Asakura Takanori, Tanaka Hiromu, Otake Shiro, Nakagawara Kensuke, Morita Atsuh, Fukushima Takahiro, Watase Mayuko, Kusumoto Tatsuya, Masaki Katsunori, Kamata Hirofumi, Ishii Makoto, Hasegawa Naoki, Harada Norihiro, Takagi Haruhi, et al.	4. 巻 22
2. 論文標題 Characteristics of hospitalized patients with COVID-19 during the first to fifth waves of infection: a report from the Japan COVID-19 Task Force	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12879-022-07927-w	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0件

〔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
---------	---------