

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16749

研究課題名（和文）PD1/PDL1の糖鎖分子を用いた免疫療法効果予測バイオマーカーの開発

研究課題名（英文）Development of biomarker for the efficacy and safety of immunotherapy using PD1/PDL1 glycosylation

研究代表者

堀口 裕貴（Hirota, Horiguchi）

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：90897951

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、PD-L1/PD1の糖鎖修飾の変化を検出することによる新規バイオマーカーの開発を目的に検討を行った。PDL1修飾糖鎖の解析は測定装置の機器トラブルで実験が困難となってしまった。そこで臨床検体を用いた可溶性PD-L1の測定、術前補助化学療法がPD-L1発現に与える影響について検討を行った。可溶性PD-L1は疾患や治療介入毎に異なる可能性が示唆された。術前補助化学療法後の膀胱癌104例の免疫染色を行い、PD-L1陽性は予後不良因子であり、MIB-1 indexが高値で残存する場合は予後不良であった。これら治療抵抗性因子が予後と相関する可能性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、PDL1/PD1の糖鎖修飾の変化を検出することによる新規バイオマーカーの開発を目指したが、これは達成できなかった。しかし、臨床検体におけるPD-L1の発現意義について検討し、術前補助化学療法においてその変化に意義があることが示唆された。一般に筋層浸潤性膀胱癌においてPD-L1の発現は予後不良であるが、術前補助化学療法によってその発現が誘導されることを明らかにした。最近の大規模臨床試験でPD-L1発現が術後補助療法の有効性を予測するバイオマーカーであることが示唆されている。その点からも本研究は集学的治療を考える上での術前補助化学療法の有効性を示唆する重要な研究であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We aimed to develop a new biomarker by detecting changes in PD-L1/PD1 glycosylation. The analysis of PDL1-modified glycans in cultured cells was difficult because the glycan analyzer(GlyQ) had equipment trouble. We measured soluble PD-L1 using clinical specimens and examined the influence of neoadjuvant chemotherapy on PD-L1 expression. The results suggest that soluble PD-L1 may be different for diseases and therapeutic interventions. Immunostaining of 104 bladder cancer patients after neoadjuvant chemotherapy showed that PD-L1(+) was associated with high MIB-1 index, and residual tumor with PD-L1(+) and high MIB-1 showed poor prognosis. These results suggests that PD-L1(+) and high MIB-1 after neoadjuvant chemotherapy may be related to treatment resistance that correlate with prognosis.

研究分野：膀胱癌

キーワード：膀胱癌 PD-L1 術前補助化学療法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

固形腫瘍に対する癌免疫療法は PD-1 や PD-L1 を中心にメカニズムが提唱されてきたが、その後の研究により癌が免疫システムから逃避する機序である癌免疫サイクルの重要性が注目されている。しかし、癌局所にリンパ球の浸潤があっても癌を攻撃できない癌があるなど (immune-cold) 局所微小環境における免疫療法のメカニズムは思ったほど簡単ではないこともわかってきた。T 細胞が浸潤しても攻撃できない理由には HLA 抗原の喪失などのメカニズムが言われているが、それだけでは説明できない現象も見受けられる。そこで我々は糖タンパク質である PD-1 や PD-L1 の糖鎖修飾が重要な役割を果たしているのではないかと考えた。また、筋層浸潤性尿路上皮癌を対象にした大規模臨床試験で、治療反応に伴う PD-L1 の発現変化もその後の免疫療法への効果予測に使える可能性が示唆された。このことから、筋層浸潤性尿路上皮癌に対する術前補助化学療法が PD-L1 発現に与える影響についても検討を開始した。

2. 研究の目的

本研究では、PD-L1/PD-1 の糖鎖修飾の変化を検出することによる新規バイオマーカーの開発と術前補助化学療法が PD-L1 発現に与える影響について検討を行った。

3. 研究の方法

A) PD-L1/PD-1 の糖鎖修飾の変化の検出

市販のニボルマブ、ペンプロリズマブ、アベルマブの糖鎖修飾をキャピラリー電気泳動型糖鎖解析装置：GlyQ で検討する。

B) 培養細胞系による PD-L1 修飾糖鎖の解析

PD-L1 陽性膀胱癌細胞株 (T24 と 5637 細胞等) を用いて、培養液中の可溶性 PD-L1 を抽出し、糖鎖構造を測定する。

C) 臨床検体を用いた可溶性 PD-L1 の測定と修飾糖鎖の解析

担癌患者の可溶性 PD-L1 を測定し、糖鎖構造を測定する。

D) 筋層浸潤性尿路上皮癌に対する術前補助化学療法が PD-L1 発現に与える影響について

膀胱全摘後の手術検体を用いて組織における PD-L1 の発現について免疫染色を行う。また増殖因子である MIB-1 も同時に測定し、PD-L1 と MIB-1 の相関について検討する。PD-L1 陽性の判定は陽性腫瘍細胞 $\geq 1\%$ を陽性と判定した。

4. 研究成果

A) PD-L1/PD-1 の糖鎖修飾の変化の検出

市販のニボルマブ、ペンプロリズマブ、アベルマブの糖鎖修飾を比較すると、異なる糖鎖構造が同定され、同じような抗体薬品であっても違う薬効がある可能性が示唆された (図 1)。

B) 培養細胞系による PD-L1 修飾糖鎖の解析は

キャピラリー電気泳動型糖鎖解析装置：GlyQ の機器トラブルで機器自体が自主回収となり

実験が困難となった。培養細胞系による PD-L1 修飾糖鎖の解析は今後の課題とし、測定が可能となった段階で検討を行う。

C) 臨床検体を用いた可溶性 PD-L1 の測定と修飾糖鎖の解析

尿路上皮癌患者 117 名、腎癌患者 102 名、精巣腫瘍患者 29 名の可溶性 PD-L1 を測定した。可溶性 PD-L1 濃度はそれぞれ 64.7、63.23、53.81 pg/mL と尿路上皮癌と腎癌では有意差を認めなかったが、精巣腫瘍と尿路上皮癌では有意差を認めた。治療別にみると腎癌では免疫療法群 (ICI 群) では非免疫療法群 (non-ICI 群) より可溶性 PD-L1 濃度が有意に高かったが、尿路上皮癌では両群に差がなかった (図 2)。これら検体より可溶性 PD-L1 の抽出と糖鎖解析を試みたが、可溶性 PD-L1 濃度が低すぎて抽出後の糖鎖測定が困難であること、測定機器のトラブルにより測定自体が困難であったことから、可溶性 PD-L1 糖鎖解析は今後の課題である。これら可溶性 PD-L1 濃度と免疫療法への反応については現在検討を続けている。

図 1 修飾される糖鎖構造の違い

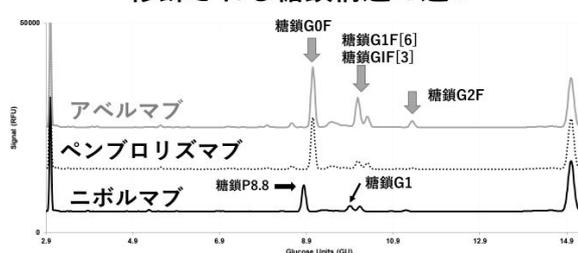
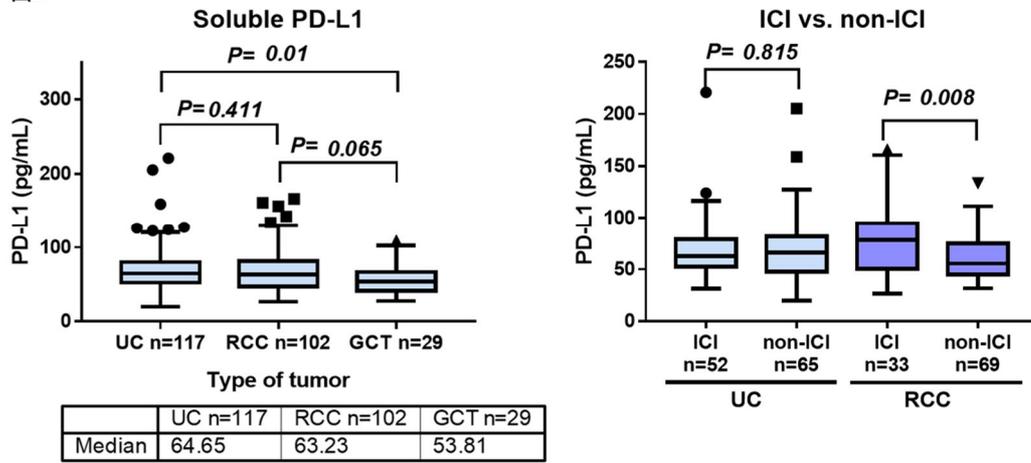
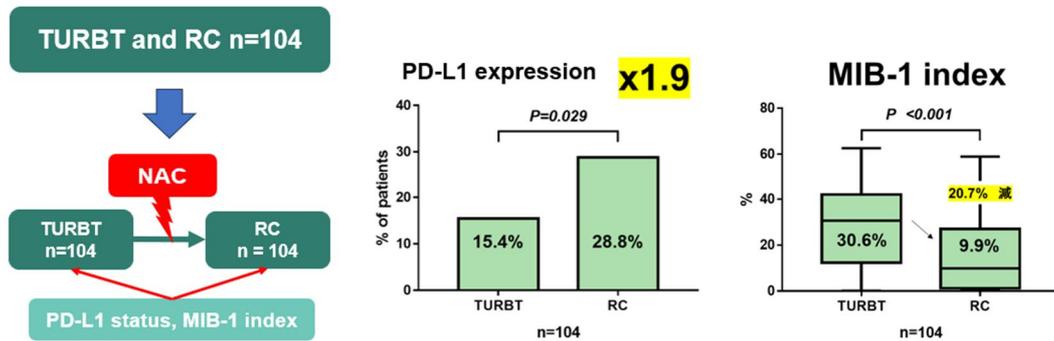


図2



D) 臨床検体では術前補助化学療法による PD-L1 発現の変化に着目して検討を行った。筋層浸潤性膀胱癌 104 例の術前補助化学療法前と後の手術サンプルを用いて PD-L1 と MIB-1 の免疫染色を行った。PD-L1 発現は術前補助化学療法により 1.9 倍に有意に増加していた。また MIB-1 は術前補助化学療法により 20.7% の有意な減少を認めた (図 3)

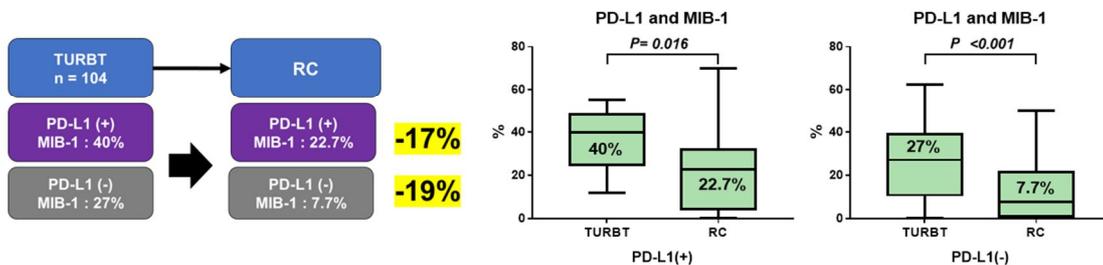
図3



そこで、PD-L1 発現と MIB-1 の関連性を検討すると、術前補助化学療法前の検体では、PD-L1 陰性群の MIB-1 : 27% に比して、PD-L1 陽性群の MIB-1 は 40% と高値であった。また術前補助化学療法により PD-L1 発現に関係なく約 20% の低下を認めたが、PD-L1 陽性群の MIB-1 は予後不良を示唆する 20% を超えており、PD-L1 と MIB-1 の関連性が示唆された (図 4)

図4

Association of PD-L1 and MIB-1 index



NAC had similar effects for MIB-1 index reduction regardless the PD-L1 status

以上より、PD-L1 陽性かつ MIB-1 > 22% をカットオフとしてリスク分類を行うと、どちらも陽性であるハイリスク患者は明らかに予後不良であることが示唆された (図 5)

図5 The impact of PDL1 status on oncological outcomes.



まとめ

本研究結果から、PD-L1 や PD-1 に付加される糖鎖は異なることが示唆された。これら生物学的意義や治療反応性への影響は今後の課題である。また、可溶性 PD-L1 は癌種や治療により違うことが示唆されたがその差はわずかであった。可溶性 PD-L1 の糖鎖変化と生物学的意義や治療反応性への影響は今後の課題である。筋層浸潤性膀胱癌の術前補助化学療法後の PD-L1 は増加していたが MIB-1 は低下していた。PD-L1 と MIB-1 を組み合わせると予後不良群が抽出できる可能性が示唆された。筋層浸潤性膀胱癌の術前補助化学療法後の PD-L1 陽性や MIB-1 高値は予後不良因子であるため、これら治療抵抗性因子は術後のアジュバント免疫療法の患者選択に有効である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Ishii Noritaka, Hatakeyama Shingo, Miura Hikari, Tanaka Ryuma, Oishi Takuya, Horiguchi Hirotaka, Hosogoe Shogo, Fujita Naoki, Iwamura Hiromichi, Okamoto Teppei, Yamamoto Hayato, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Ohyama Chikara	4. 巻 0
2. 論文標題 Trends in the age of hospitalized patients with urological cancers: A 17 year experience	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Urology	6. 最初と最後の頁 00-000
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/iju.15180	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 -

1. 著者名 Fujita Naoki, Momota Masaki, Horiguchi Hirotaka, Hamano Itsuto, Mikami Jotaro, Hatakeyama Shingo, Ito Hiroyuki, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Nishimura Shoji, Yoshikawa Kazuaki, Ohyama Chikara	4. 巻 15
2. 論文標題 Combination of Muscle Quantity and Quality Is Useful to Assess the Necessity of Surveillance after a 5-Year Cancer-Free Period in Patients Who Undergo Radical Cystectomy: A Multi-Institutional Retrospective Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1489 ~ 1489
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15051489	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 Togashi Kyo, Hatakeyama Shingo, Soma Osamu, Okita Kazutaka, Fujita Naoki, Tanaka Toshikazu, Noro Daisuke, Horiguchi Hirotaka, Uemura Nozomi, Iwane Takuro, Okamoto Teppei, Yamamoto Hayato, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Ohyama Chikara	4. 巻 14
2. 論文標題 Utility of the Age Discrepancy between Frailty-Based Biological Age and Expected Life Age in Patients with Urological Cancers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 6229 ~ 6229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14246229	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 Miura Hikari, Hatakeyama Shingo, Tanaka Toshikazu, Fujita Naoki, Horiguchi Hirotaka, Tanaka Ryuma, Noro Daisuke, Tokui Noriko, Okamoto Teppei, Yamamoto Hayato, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Ohyama Chikara	4. 巻 -
2. 論文標題 Oncological and functional outcomes of female reproductive organ-sparing radical cystectomy and ileal neobladder construction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.urolonc.2022.11.018	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 -

1. 著者名 Iwamura Hiromichi, Hatakeyama Shingo, Narita Takuma, Ozaki Yusuke, Konishi Sakae, Horiguchi Hirotaka, Kodama Hirotake, Kojima Yuta, Fujita Naoki, Okamoto Teppei, Tobisawa Yuki, Yoneyama Tohru, Yamamoto Hayato, Yoneyama Takahiro, Hashimoto Yasuhiro, Ohyama Chikara	4. 巻 12
2. 論文標題 Significance of pelvic lymph node dissection during radical prostatectomy in high-risk prostate cancer patients receiving neoadjuvant chemohormonal therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-13651-x	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 -

1. 著者名 Horiguchi Hirotaka, Hatakeyama Shingo, Yoneyama Tohru, Yoneyama Mihoko Sutoh, Tanaka Toshikazu, Fujita Naoki, Okamoto Teppei, Yamamoto Hayato, Yoneyama Takahiro, Yoshizawa Tadashi, Hashimoto Yasuhiro, Kawaguchi Toshiaki, Ohyama Chikara	4. 巻 39
2. 論文標題 Prognostic significance of the Ki67 index and programmed death-ligand 1 expression after radical cystectomy in patients with muscle-invasive bladder cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations	6. 最初と最後の頁 238.e9 ~ 238.e17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.urolonc.2020.11.029	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hirotaka Horiguchi, Shingo Hatakeyama, Ryuji Tabata, Toshikazu Tanaka, Teppei Okamoto, Hayato Yamamoto, Takahiro Yoneyama, Yasuhiro Hashimoto, Satoshi Sato, and Chikara Ohyama
2. 発表標題 THE EFFECT OF LYMPHOVASCULAR INVASION ON ONCOLOGICAL OUTCOMES BETWEEN pT2 AND ypT2 IN PATIENTS WITH MUSCLE-INVASIVE UROTHELIAL CARCINOMA
3. 学会等名 AUA annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2024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
---------	---------