

令和 5 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20968

研究課題名(和文) 血中エクソソーム内の細菌叢情報を用いた尿路上皮癌の早期血液診断薬の開発

研究課題名(英文) Circulating extracellular vesicles carrying Firmicutes DNA reflect the local immune status and may predict clinical response to cancer immunotherapy in urothelial carcinoma

研究代表者

山本 顕生 (Yamamoto, Akinaru)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50909653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：ファーミキューテスDNAを持つ末梢EVの量が少ないほど、腫瘍組織内の浸潤T細胞数が多く(CD3： $p=0.015$ ，CD4： $p=0.039$ ，CD8： $p=0.008$)、その表面で活性化マーカーが多く(CD4とCD8 T細胞の両方でICOS： $p=0.001$ ，4-BB：CD4 T細胞： $p=0.016$)発現することが有意に関連した。Firmicutesの存在量が多い患者はすべて病勢が進行し($p=0.026$)、免疫療法の予後が著しく劣っていた($p=0.035$)。血液中のEVが運ぶファーミキューテス門の豊富さは局所的な免疫状態を反映し、尿路上皮癌の免疫療法の効果や予後を予測することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに尿路上皮癌の血液バイオマーカーは存在しておらず、尿を用いた尿細胞診検査や膀胱鏡検査を用いて尿路上皮癌の診断は行われてきた。しかし、その感度の低さや侵襲性の高さから、簡便な血液バイオマーカーの作成が希求されていた。そこで、我々の開発した血液内エクソソームの細菌遺伝情報を用いたバイオマーカーの創出は非常に新規性が高く、臨床応用されることができれば非侵襲的に尿路上皮癌患者の早期発見に結び付くと考える。また、近年癌治療の主流ともなりつつある免疫療法の治療効果も予測可能であり、治療適応患者の選出にも役立つ可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：The smaller amount of peripheral EVs carrying Firmicutes DNA was significantly correlated with the higher number of infiltrating T cells within tumor tissues (CD3; $p=0.015$, CD4; $p=0.039$, CD8; $p=0.008$) and the higher expression of activation markers on their surface (ICOS on both CD4; $p=0.001$ and CD8 T cells; $p=0.016$ and 4-1BB on CD4 T cells; $p=0.016$). All patients with higher Firmicutes abundance had disease progression ($p=0.026$) and significantly inferior prognosis for immunotherapy ($p=0.035$). Firmicutes abundance carried by EVs in the blood can reflect the local immune status and predict the efficacy and prognosis of UC immunotherapy.

研究分野：泌尿器科癌

キーワード：尿路上皮癌 血液診断薬 血液細菌叢 エクソソーム 腫瘍免疫 腫瘍微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト生体内では、腸内細菌のみならず血液中にも細菌の遺伝情報が存在し、宿主にとって臨床的影響を与えることが報告された¹。

2. 研究の目的

本研究では、尿路上皮癌患者の血液中に細菌遺伝情報が存在すること、及び宿主に対する臨床的意義を明らかにすることを目的とする。

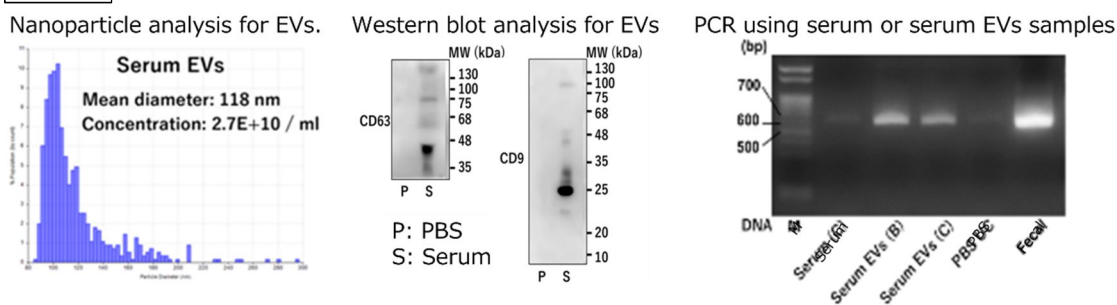
3. 研究の方法

健常者 20 名、癌局所内免疫状態が判明している²尿路上皮癌患者 50 名、キイトルーダを投与された転移性尿路上皮癌患者 31 名の治療前血清 101 サンプルから細胞外小胞 (EV) を抽出した。16S rRNA メタゲノム解析を行い、門レベルでの細菌叢評価を施行し、癌局所内免疫状態と相関する細菌叢を同定した。その後、キイトルーダ投与患者の治療効果と、同定した細菌遺伝情報発現との相関を評価することで、キイトルーダの治療効果及び予後予測が可能であるかを評価した。

4. 研究成果

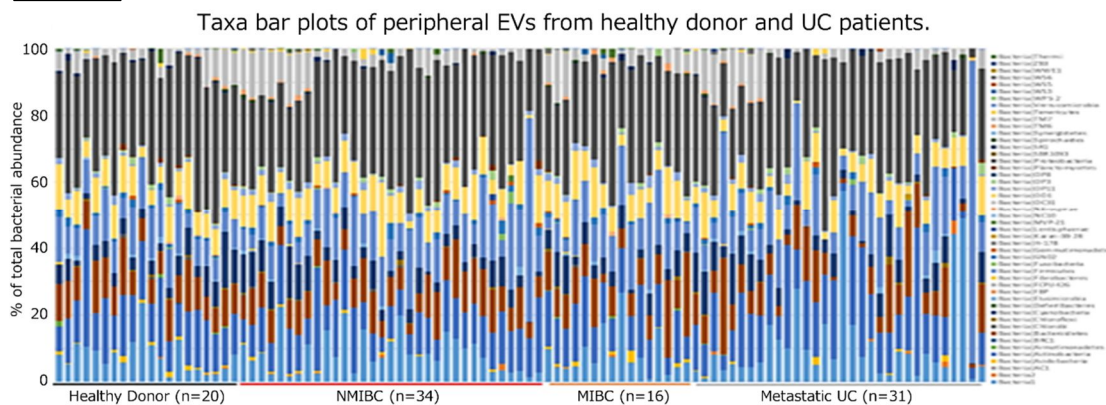
健常者、及び尿路上皮癌患者の血中 EV が確かに抽出できていることをまず確認した (図 1)。

図 1



抽出した EV を 16S rRNA シークエンスに供することで、健常者、及び尿路上皮癌患者の血中 EV 内には様々な細菌遺伝情報が含まれることが明らかとなった (図 2)。

図 2



我々が既に報告している尿路上皮癌患者の癌局所内免疫状態 (図 3)² とマッチさせた尿路上皮癌患者の血中 EV 内の Firmicutes 門発現は癌局所内免疫状態と有意な相関を認めた (図 4)。

図 3

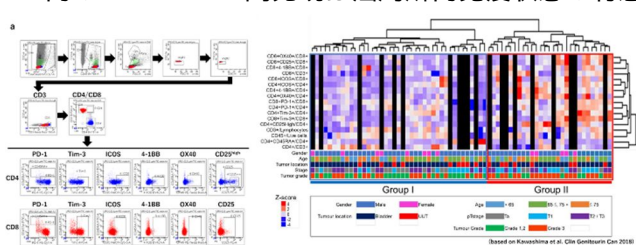
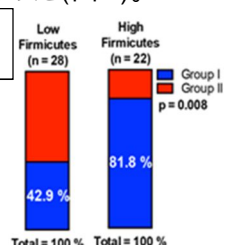
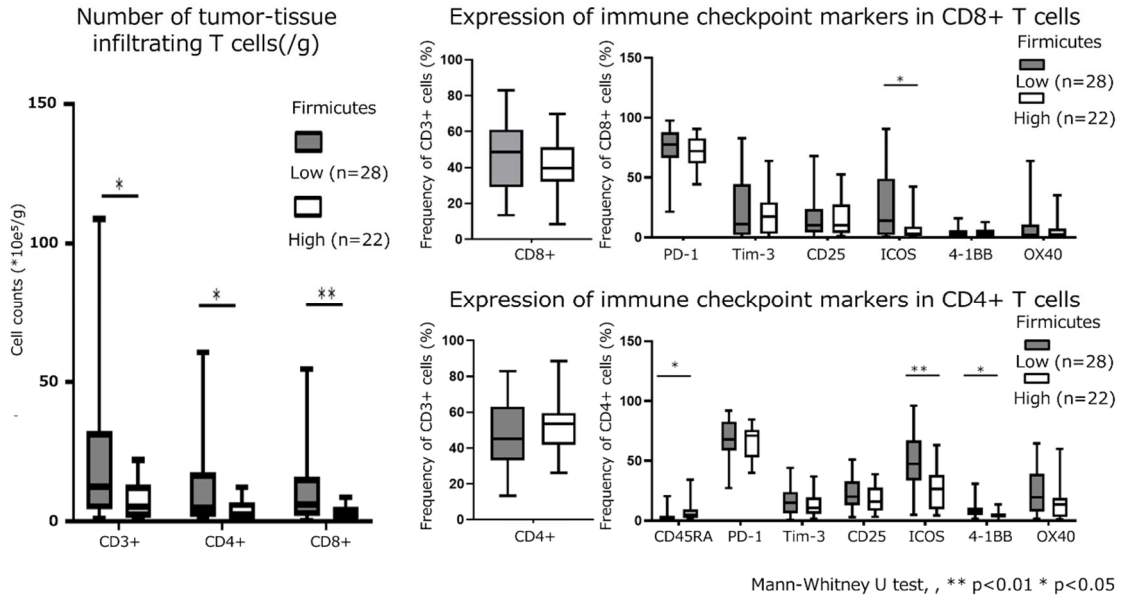


図 4



つまり、CD4T 細胞が高発現している Group でその発現が高く、CD8 ならびに免疫細胞表面分子が高発現している Group ではその発現が低下していた (p=0.038, 図 5)。

図 5



そこで、血中 EV 内の Firmicutes 門発現割合を高/低の 2 群に分類し癌局所内免疫状態との関係性を評価したところ、Firmicutes 門低発現群では腫瘍浸潤 T 細胞数の有意な上昇(p=0.015, 図 5) ならびに CD4、CD8T 細胞ともに、細胞上の活性化分子マーカーである Inducible co-stimulatory molecule (ICOS)の有意な上昇が認められた(CD4: p=0.002, CD8: p=0.016, 図 5)。一方、血液中 T 細胞の発現様式との有意な関連は認めなかった。

最後に、キイトルーダ使用症例を用いて治療効果を評価したところ、血中 EV 内の Firmicutes 門低発現群では SD 以上の治療効果を認めた症例は約 42%存在していたのに対して、高発現群では SD 以上の治療効果を認めた症例は存在しなかった(p=0.026, 図 6)。

図 6

Treatment efficacy with pembrolizumab

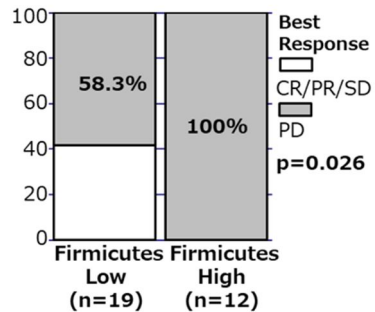
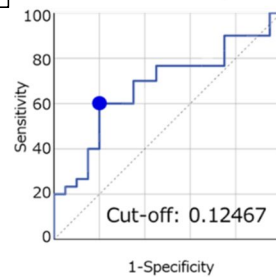


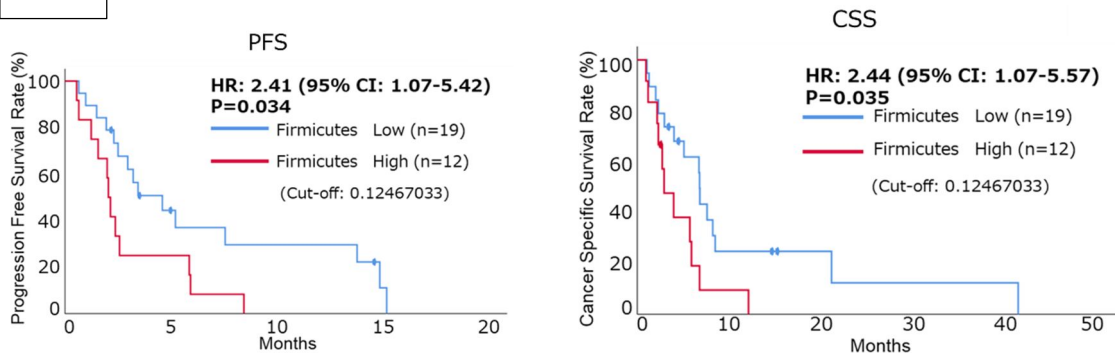
図 7

ROC analysis Firmicutes Phylum



キイトルーダ使用症例で、これまでに得られたカットオフ値(cut-off: 0.12467 図 7)を用いて high と low の 2 群に分けて生存曲線を評価したところ、無増悪生存(HR: 2.41, 95%CI: 1.07-5.42, p=0.034)、癌疾患特異生存(HR: 2.44, 95%CI: 1.07-5.57, p=0.035)、ともに有意に予後不良であった(図 8a, b)。

図 8



便を用いた細菌叢の評価は便移植や細菌の経口投与といった治療法につながる大きな可能性を

秘めているが、排便状況に影響されることや、定期モニタリングすることが困難であるという問題点がある。その点、本研究で用いた血液中の EV に含まれる細菌叢情報の評価は、採血による安定したサンプル採取が可能であり、この方法を用いることで既存の多数の保存検体に対して様々な解析を行うことが可能になると考えられる。

【文献】

1. Poore GD et al. Nature. 2020; 579: 567-574.
2. Kawashima A et al. Clin Genitourin Cancer. 2019; 17: 114-124.

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 0件）

1. 著者名 Jingushi Kentaro, Kawashima Atsunari, Saito Takuro, Kanazawa Takayuki, Motooka Daisuke, Kimura Tomonori, Mita Masashi, Yamamoto Akinaru, Uemura Toshihiro, Yamamichi Gaku, Okada Koichi, Tomiyama Eisuke, Koh Yoko, Matsushita Makoto, Kato Taigo, Hatano Koji, Uemura Motohide, Tsujikawa Kazutake, Wada Hisashi, Nonomura Norio	4. 巻 71
2. 論文標題 Circulating extracellular vesicles carrying Firmicutes reflective of the local immune status may predict clinical response to pembrolizumab in urothelial carcinoma patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 2999 ~ 3011
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-022-03213-5	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 山本顕生
2. 発表標題 尿路上皮癌患者の血中細胞外小胞内ファーミキューテス門の遺伝情報は癌局所免疫を反映しペムプロリズマブの治療効果を予測できる
3. 学会等名 第81回日本癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本顕生
2. 発表標題 尿路上皮癌における血中循環細胞外小胞内Firmicutes門の遺伝情報は癌局所内免疫状態を反映し癌免疫療法の治療効果を予測できる
3. 学会等名 第42回分子腫瘍マーカー研究会
4. 発表年 2022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	河嶋 厚成 (Kawashima Atsunari)		
研究協力者	神宮司 健太郎 (Jingushi Kentaro)		

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