

令和 4 年 4 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16861

研究課題名(和文)抗PD-1抗体の効果予測バイオマーカーの確立

研究課題名(英文)Biomarker for predicting the effect of anti-PD-1 antibody

研究代表者

野村 基雄(Nomura, Motoo)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：90609596

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)：抗PD-1抗体の効果予測バイオマーカーとして、短鎖脂肪酸濃度との関係を明らかにした。

抗PD-1抗体投与前の便中・血漿中短鎖脂肪酸(酢酸/インドール酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸、吉草酸、イソ吉草酸、ヒドロアンゲリカ酸、カプロン酸、コハク酸)を測定した。便中の酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸と血漿中プロピオン酸、イソ吉草酸は抗PD-1抗体に奏効症例で有意に高かった。抗PD-1抗体治療前の便中の酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸と血漿中イソ吉草酸が高値の症例は、有意に無増悪生存期間が長かった。ただし、それぞれの短鎖脂肪酸において、便・血漿の濃度に相関は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物モデルを用いた研究では、免疫チェックポイント阻害剤の有効性は特定の腸内細菌種の存在に依存すると報告された。ヒトにおける免疫チェックポイント阻害剤と腸内細菌叢の代謝産物の報告は国内外を含めても報告されていない。本研究により、腸内細菌叢の最終代謝産物である短鎖脂肪酸が抗PD-1抗体の効果予測バイオマーカーであることが明らかとなった。腸内細菌叢の代謝産物は便検体であり、無侵襲であることから、繰り返し検査が可能であり治療効果のモニタリングにも使用可能であり、大きなメリットがある。今後、検討される腸内細菌叢制御方法の確立に、腸内細菌叢の代謝産物を指標とすることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：To evaluate fecal and plasma SCFAs in patients with solid cancer tumors treated with a programmed death-1 inhibitor (PD-1i).

High concentrations of fecal acetic acid (AA), propionic acid (PA), butyric acid (BA), and valeric acid (VA), and plasma PA and isovaleric acid (IVA) were significantly higher in the responder group than non-responder group. High concentration of fecal AA, PA, BA, and VA, and plasma IVA were associated with longer progression-free survival in solid cancer patients treated PD-1i.

There was no significant association between each individual fecal and plasma SCFA concentrations.

研究分野：免疫化学療法

キーワード：免疫チェックポイント阻害薬 バイオマーカー 抗PD-1抗体 短鎖脂肪酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤(ICI)の1つである抗 programmed death-1(PD-1)抗体は、PD-1/PD-L1 経路を阻害し、T細胞によるがん細胞への攻撃を増強する有望な免疫療法薬である。悪性黒色腫、非小細胞肺癌をはじめ、進行がんを対象として多数の第I~III相臨床試験が報告されている。抗 PD-1 抗体と殺細胞性抗がん剤を比較した複数の第III相試験において、いずれの試験でも抗 PD-1 抗体が殺細胞性抗がん剤に比べて有意に生存期間を延長すると報告された[1,2]。抗 PD-1 抗体により長期生存症例を認める一方、固形がんに対する奏効割合は15-40%と低く、奏効症例を同定する効果予測バイオマーカーの開発が求められている。

【効果予測バイオマーカーとしてのPD-L1】

免疫組織染色による腫瘍組織でのPD-L1の発現は、抗PD-1抗体の治療効果予測バイオマーカーの有力な候補と考えられ、複数の試験で臨床効果予測因子として検討されている。しかし、腫瘍細胞におけるPD-L1の発現は腫瘍局所環境によって変化しうるため、腫瘍組織においてPD-L1の発現が認められない症例でも治療効果が認められることが報告されている。

【効果予測バイオマーカーとしての腸内細菌叢】

腸内細菌叢の構成が、ICIの奏効割合に関係することが、複数報告された[3-7]。これらの報告において、特定の腸内細菌種との関連が報告されているが、同定された腸内細菌種と有効性に関して同じ国からの報告であっても、研究者毎に菌種が異なり、腸内細菌属で検討しても共通される項目は少ない(表1)。担癌患者のヒト腸内細菌叢をマウスに移植した場合、抗PD-1抗体のヒトでの奏効性とマウスでの奏効性に相関が認められる報告[5,6]から、腸内細菌叢は個体や種を問わずICIの奏効に影響することが示唆される。

表1. 免疫チェックポイント阻害剤のバイオマーカーとしての腸内細菌の報告

	文献	癌腫	治療薬	奏効群菌種	非奏効群菌種	国
Chaput et al.	[3]	悪性黒色腫 N=26	CTLA4i	<i>Faecalibacterium</i> <i>Fiemicutes</i>	<i>Bacteroides</i>	フランス
Frankel et al.	[4]	悪性黒色腫 N=39	CTLA4i PD-1i	<i>Bacteroides</i> <i>caccae</i> <i>Faecalibacterium</i>	<i>Coriobacteriaceae</i> <i>Bacteroides</i> <i>eggerthii</i>	USA
Routy et al.	[5]	肺癌、腎細胞癌 N=153	PD-1i	<i>Akkermansia</i> <i>Ruminococcus</i>	<i>Closteridiales</i> <i>Prevotella</i>	フランス
Gopalakrishnan et al.	[6]	悪性黒色腫 N=43	PD-1i	<i>Ruminococcaceae</i> <i>Faecalibacterium</i>	<i>Bacteroidia</i> <i>Bacteroidales</i>	USA
Matson et al.	[7]	悪性黒色腫 N=42	PD-1i	<i>Enterococcus</i> <i>Collinsella</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Klebsiella</i>	<i>Roseburia</i>	USA

PD-1i : 抗 programmed death-1 阻害薬、CTLA4i : 細胞障害性 T リンパ球抗原 4 阻害薬

免疫チェックポイント阻害剤の奏効と関連すると報告されている *Faecalibacterium prausnitzii*、*Akkermansia muciniphila*、*Collinsella aerofaciens*、*Bifidobacterium adolescentis* は、短鎖脂肪酸(SCFA: Short-chain fatty acid)である酪酸またはプロピオン酸を産生する細菌である[8-10]。酪酸やプロピオン酸は、制御性T細胞の分化・誘導に関与することが明らかとなっている[11,12]。

短鎖脂肪酸は宿主の免疫調整を行うことが知られている。多くの研究では短鎖脂肪酸がCD4+T細胞及び抗原提示細胞に影響することが報告されている。短鎖脂肪酸の一つである酪酸は制御性T細胞を分化誘導することが知られている[13-15]。一方、最近の報告では酪酸を含む短鎖脂肪酸がCD8+細胞障害性T細胞におけるIFN- γ やグランザイムBの発現を促進することが示された[16]。また異なる報告では、短鎖脂肪酸による免疫応答低下の改善が示された[17]。特に酪酸と吉草酸ではヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害作用を有する[16,18,19]。HDAC阻害によるメラノーマ細胞でのPD-L1発現が示された[20-22]。HDAC阻害剤は、いくつもの免疫調整活性を持つことが示され、免疫チェックポイント阻害剤との併用による相乗的な抗腫瘍効果がin vivoモデルで報告されている[23,24]。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗 PD-1 抗体の効果予測バイオマーカーの確立と治療効果を向上するための免疫チューニング治療法の開発である。

3. 研究の方法

課題 便中、血漿中、および腫瘍組織内の短鎖脂肪酸濃度の測定

対象：先行研究登録症例

検体：当院のバイオバンクに保存された治療前検体(血漿・腫瘍組織)

測定：LC-MS/MS(Liquid chromatography with tandem mass spectrometry)を用いて測定

解析：血漿・腫瘍組織の短鎖脂肪酸について、便中短鎖脂肪酸濃度との相関、抗 PD-1 抗体の効果との相関を検討する。

課題 コンパニオン診断としての validation

対象：新規に抗 PD-1 抗体+抗 CTLA-4 抗体の併用療法を受ける症例

検体：治療開始前と治療開始後の便・血漿

測定：LC-MS/MS(Liquid chromatography with tandem mass spectrometry)を用いて測定

解析：便および血漿の短鎖脂肪酸について、治療効果(奏効)・有害事象発生および生存との相関を検討する。

課題 非臨床データの収集

C56BL/6 マウス(各群 6 匹)に腫瘍(MC38 または CT26)を皮下に移植し、移植後 7 日後から短鎖脂肪酸を 2 週間経口投与し、移植後 7 日以降 3 日毎に腫瘍サイズを計測する。各種短鎖脂肪酸の濃度は 50 mM、100 mM、150 mM、200 mM に変更し、コントロール(短鎖脂肪酸投与なし)と比較する。至適な投与濃度を同定し、抗 PD-1 抗体(腹腔内投与)との併用治療における腫瘍サイズの推移を計測する。

4. 研究成果

課題：便中短鎖脂肪酸測定 52 名、血漿中短鎖脂肪酸濃度測定 31 名。便中・血漿中短鎖脂肪酸(酢酸/インドール酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸、吉草酸、イソ吉草酸、ヒドロアンゲリカ酸、カプロン酸、コハク酸)を測定した。便中の酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸と血漿中プロピオン酸、イソ吉草酸は抗 PD-1 抗体に奏効症例で有意に高かった(表 2)。抗 PD-1 抗体治療前の便中の酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸と血漿中イソ吉草酸が高値の症例は、有意に無増悪生存期間が長かった(表 3)。ただし、それぞれの短鎖脂肪酸において、便 - 血漿の濃度に相関は認めなかった[25]。腫瘍組織内の短鎖脂肪酸濃度の測定を実施したが、同じ検体であっても測定値のばらつきが強く、補正困難であることを確認した。

表 2. 奏効/非奏効症例の短鎖脂肪酸濃度

	Responder	Nonresponder	P value
Fecal concentration, median (range), $\mu\text{mol/g}$			
Acetic acid	346.4 (162.0-652.8)	216.7 (30.3-510.8)	0.02
Propionic acid	172.6 (92.2-302.1)	103.6 (1.2-350.8)	0.002
Butyric acid	89.0 (20.6-211.3)	40.4 (0.0-218.1)	0.004
Isobutyric acid	33.8 (2.9-78.1)	19.0 (0.0-81.5)	0.05
Valeric acid	19.7 (0.3-118.8)	9.6 (0.0-45.4)	0.04
Isovaleric acid	21.3 (3.7-49.2)	11.2 (0.0-56.1)	0.11
Hydroangelic acid	17.3 (1.6-42.0)	10.4 (0.0-34.2)	0.36
Caproic acid	0.9 (0.2-13.6)	0.6 (0.0-5.6)	0.09
Succinic acid	12.5 (0.0-81.0)	8.4 (0.0-42.3)	0.55
Plasma concentration, median (range), $\mu\text{mol/g}$			
3-Indoleacetic acid	1.1 (0.0-2.0)	1.0 (0.0-17.6)	0.83
Propionic acid	5.1 (3.2-12.3)	2.7 (0.0-7.2)	0.01
Butyric acid	0.6 (0.0-4.1)	0.0 (0.0-3.6)	0.12
Isobutyric acid	1.4 (0.0-4.5)	0.8 (0.0-3.8)	0.69
Valeric acid	0.0 (0.0-0.9)	0.0 (0.0-0.6)	0.37

Isovaleric acid	0.3 (0.0-0.9)	0.0 (0.0-0.4)	0.01
Hydroangelic acid	0.0 (0.0-1.3)	0.0 (0.0-1.3)	0.49
Caproic acid	1.6 (0.9-3.2)	1.2 (0.0-3.6)	0.42
Succinic acid	0.0 (0.0-6.3)	0.0 (0.0-15.3)	0.63

表 3. 短鎖脂肪酸低値群に対する高値群の無増悪生存期間

Short-chain fatty acid (cutoff point)	Hazard ratio (95% confidence interval)	P value
Fecal concentration, $\mu\text{mol/g}$		
Acetic acid (270)	0.29 (0.15-0.54)	<.001
Propionic acid (90)	0.08 (0.03-0.20)	<.001
Butyric acid (40)	0.31 (0.16-0.60)	<.001
Isobutyric acid (30)	0.80 (0.41-1.54)	0.5
Valeric acid (15)	0.53 (0.29-0.98)	0.04
Isovaleric acid (20)	0.76 (0.40-1.43)	0.4
Hydroangelic acid (17)	0.85 (0.46-1.58)	0.62
Caproic acid (2)	0.46 (0.19-1.11)	0.08
Succinic acid (9)	0.97 (0.53-1.77)	0.94
Plasma concentration, $\mu\text{mol/g}$		
3-Indoleacetic acid (1.35)	0.79 (0.36-1.74)	0.56
Propionic acid (6)	0.59 (0.32-1.08)	0.09
Butyric acid (1.25)	0.93 (0.51-1.70)	0.82
Isobutyric acid (2)	0.62 (0.34-1.14)	0.12
Valeric acid (0.1)	1.17 (0.46-2.97)	0.72
Isovaleric acid (0.15)	0.38 (0.14-0.99)	0.04
Hydroangelic acid (0.15)	0.65 (0.26-1.63)	0.36
Caproic acid (1.15)	0.79 (0.36-1.74)	0.57
Succinic acid (2)	2.07 (0.82-5.18)	0.12

課題 : 2020年7月28日に倫理委員会承認された。新型コロナウイルス感染の拡大により試験開始が遅れ、2021年1月より症例登録を開始した。2022年3月31日までに合計20名を登録し、検体の測定を実施し、問題なく測定できることを確認した。検体の測定結果と各症例の奏効・有害事象発生および生存との関係を解析すべく、追跡中である。

課題 : 非臨床データの収集

酪酸(100mM)がコントロールおよび他の濃度と比べ腫瘍縮小効果が強いことを明らかにした。抗PD-1抗体(腹腔内投与)との併用治療を行ったが、併用治療による上乘せ効果を認めなかった。

引用文献

1. Robert C, Long GV, Brady B, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* 2015;372:320-330.
2. Reck M, Delvys RA, Robinson AG et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer, *N Engl J Med.* 2016;375:1823-1833.
3. Chaput N, Lepage P, Coutzac C et al. Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann Oncol* 2017; 28: 1368-1379.
4. Frankel AE, Coughlin LA, Kim J et al. Metagenomic Shotgun Sequencing and Unbiased Metabolomic Profiling Identify Specific Human Gut Microbiota and Metabolites Associated with Immune Checkpoint Therapy Efficacy in Melanoma Patients. *Neoplasia* (New York, N.Y.) 2017; 19: 848-855.

5. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* 2018; 359: 91-97.
6. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* 2018; 359: 97-103.
7. Matson V, Fessler J, Bao R et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* 2018; 359: 104-108.
8. Rios-Covian D, Gueimonde M, Duncan SH et al. Enhanced butyrate formation by cross-feeding between *Faecalibacterium prausnitzii* and *Bifidobacterium adolescentis*. *FEMS Microbiol Lett* 2015; 362.
9. Qin P, Zou Y, Dai Y et al. Characterization a Novel Butyric Acid-Producing Bacterium *Collinsella aerofaciens* Subsp. *Shenzhenensis* Subsp. Nov. *Microorganisms* 2019; 7.
10. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol* 2017; 19: 29-41.
11. 古澤之裕. 腸内細菌によるエピゲノム修飾を介した腸管制御性 T 細胞の誘導機構. *腸内細菌学雑誌* 2017; 31: 15-22.
12. 大野博司. 腸内フローラと生体防御・免疫制御：統合オミクスによる解析. *Jpn. J. Clin. Immunol* 2014; 37: 403-411.
13. Smith PM, Howitt MR, Panikov N et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* 2013; 341: 569-573.
14. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* 2013; 504: 446-450.
15. Arpaia N, Campbell C, Fan X et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature* 2013; 504: 451-455.
16. Luu M, Weigand K, Wedi F et al. Regulation of the effector function of CD8+ T cells by gut microbiota-derived metabolite butyrate. *Scientific Reports* 2018; 8: 14430.
17. Moriyama M, Ichinohe T. High ambient temperature dampens adaptive immune responses to influenza A virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; 116: 3118-3125.
18. Fellows R, Denizot J, Stellato C et al. Microbiota derived short chain fatty acids promote histone crotonylation in the colon through histone deacetylases. *Nat Commun* 2018; 9: 105.
19. Yuille S, Reichardt N, Panda S et al. Human gut bacteria as potent class I histone deacetylase inhibitors in vitro through production of butyric acid and valeric acid. *PLoS One* 2018; 13: e0201073.
20. Woods DM, Sodre AL, Villagra A et al. HDAC Inhibition Upregulates PD-1 Ligands in Melanoma and Augments Immunotherapy with PD-1 Blockade. *Cancer Immunol Res* 2015; 3: 1375-1385.
21. Booth L, Roberts JL, Poklepovic A et al. HDAC inhibitors enhance the immunotherapy response of melanoma cells. *Oncotarget* 2017; 8: 83155-83170.
22. Cao K, Wang G, Li W et al. Histone deacetylase inhibitors prevent activation-induced cell death and promote anti-tumor immunity. *Oncogene* 2015; 34: 5960-5970.
23. Llopiz D, Ruiz M, Villanueva L et al. Enhanced anti-tumor efficacy of checkpoint inhibitors in combination with the histone deacetylase inhibitor Belinostat in a murine hepatocellular carcinoma model. *Cancer Immunol Immunother* 2019; 68: 379-393.
24. Knox T, Sahakian E, Banik D et al. Selective HDAC6 inhibitors improve anti-PD-1 immune checkpoint blockade therapy by decreasing the anti-inflammatory phenotype of macrophages and down-regulation of immunosuppressive proteins in tumor cells. *Sci Rep* 2019; 9: 6136.
25. Nomura M, Nagatomo R, Doi K, Shimizu J, Baba K, Saito T, Matsumoto S, Inoue K, Muto M. Association of Short-Chain Fatty Acids in the Gut Microbiome With Clinical Response to Treatment With Nivolumab or Pembrolizumab in Patients With Solid Cancer Tumors. *JAMA Netw Open*. 2020;3:e202895.

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Motoo Nomura; Ryosuke Nagatomo; Keitaro Doi; Juko Shimizu; Kiichiro Baba; Tomoki Saito; Shigemi Matsumoto; Koichi Inoue; Manabu Muto.	4. 巻 -
2. 論文標題 Association of Short-Chain Fatty Acids in the Gut Microbiome With the Clinical Response to Treatment of Nivolumab or Pembrolizumab in Patients with Solid Cancer Tumors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JAMA Network Open	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） なし	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 該当する

〔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 Motoo Nomura, Ryosuke Nagatomo, Koichi Inoue, Keitaro Doi, Juko Shimizu, Kiichiro Baba, Tomoki Saito, Shigemi Matsumoto, Manabu Muto.
2. 発表標題 Association of short-chain fatty acids in gut microbiome and clinical response in solid cancer patients treated with anti-PD-1 antibody.
3. 学会等名 ESMO Congress 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 がん患者の免疫チェックポイント阻害剤に対する応答性を判定するための方法	発明者 野村基雄、武藤学	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-126382	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 がんの処置および/または予防のための医薬組成物	発明者 野村基雄	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-165312	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------