

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16695

研究課題名（和文）T細胞レパトア解析を用いた免疫チェックポイント阻害剤奏功早期予測マーカーの探索

研究課題名（英文）Identification of predictive biomarkers for immune checkpoint inhibitors using T cell receptor repertoire analysis

研究代表者

木内 利郎（kinouchi, toshiro）

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：30747069

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）：進行性腎細胞癌に対してニボルマブを投与した患者20名より、投与前、投与後の末梢血Peripheral Blood Mononuclear Cells（PBMC）を経時的に採取した。PBMCよりRNAを抽出し、T細胞受容体（T cell receptor, TCR）レパトア解析を施行したところ、奏効例では高頻度な特定のT細胞クローンが投与開始1ヶ月後、3ヶ月後で有意に増加していた。以上からTCRレパトア解析による末梢血T細胞のクローン数の増減などを把握することで、免疫チェックポイント阻害薬治療後早期に奏効を予測するバイオマーカーとなり得ることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在多くの癌腫において免疫チェックポイント阻害薬（ICI）が適応となったが、奏効率は20-30%と限定的であることや重篤な免疫関連副作用が出現する例もあり、奏効予測マーカーの開発が急務である。我々は進行性腎細胞癌においてPD-1阻害剤を使用した症例において、末梢血T細胞のTCRレパトア解析を行った。その結果、奏効例では、末梢血中でも治療後早期に特定のT細胞クローンが増加した。末梢血T細胞のクローン数の増減などを把握することで、ICI治療後早期に奏効を予測できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：In our study, we collected blood samples from 20 advanced kidney cancer patients, before anti-PD-1 treatment (nivolumab) and at 1, 3 and 6 months after starting nivolumab. We found that responders of nivolumab had expansion of certain T cell clones even in PBMCs, suggesting that T cell receptor analysis with next-generation sequencing can be a strong tool in addressing patients who respond to immune checkpoint inhibitors.

研究分野：腎細胞癌

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 1．研究開始当初の背景

我が国における腎細胞癌と診断される患者数は年々増加しており、診断時に約 30% は進行性で、その多くは予後不良である。近年、進行性腎細胞癌に対する治療は従来のインターフェロン、インターロイキン 2 などの免疫療法、分子標的療法に加え、免疫チェックポイント阻害薬である抗 PD-1 抗体などの新規免疫療法が台頭してきた。しかしその奏効率は単剤で 25% 程度であり、個々の患者にとって適切な治療法を選択することや医療経済の観点からも治療効果の期待できる患者群をあらかじめ予測、選別することは重要であり、その探索が求められる。

抗 PD-1 抗体は腫瘍の免疫回避機構を阻害し、T 細胞を活性化する。T 細胞には様々なクローンが存在することが知られており、およそ  $1 \times 10^{18}$  種類あるとされる。免疫療法が奏効している患者においては特定の腫瘍免疫性の高い T 細胞クローンが増殖し、腫瘍免疫性を高めている可能性が考えられる。

そこで我々は、定期的に簡便・低侵襲に採取することができる末梢血において、治療経過中に特定の T 細胞クローンのモニタリングを行うことで、治療効果の予測が可能となると考えた。これらの surrogate marker が同定できれば、今後患者ごとの適切な免疫療法を選択することが可能であり、医療経済面からも非常に有用である。

今回申請者は科研費（若手研究）の助成を受け、以下の研究成果を得た。

## 2．研究の目的

免疫療法を施行している転移性腎細胞癌患者の末梢血中において末梢血単核細胞 Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) の遺伝子発現に着目し、T 細胞のレパトア解析や免疫関連遺伝子の発現を調べることで、免疫チェックポイント阻害薬 (PD-1 阻害薬) が有効と予測される患者群を同定する。

## 3．研究の方法

免疫チェックポイント阻害薬投与患者において、経時的に PBMCs より RNA を採取し、経時的に採取された RNA を用いて、TCR (T 細胞受容体, T cell receptor) シーケンスを行い、末梢血 T 細胞や腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) のレパトア解析を行う。パラメーターとして Diversity index (T 細胞の多様性を示す指標) や T 細胞クローンの評価などを行い、臨床経過との関連を明らかにし、これらを網羅的に解析する。また Real-time PCR 法により投与前後の PBMCs 中の免疫関連遺伝子の発現を比較し、奏効例、非奏効例に特徴的な変化を見出す。

## 4．研究成果

### 1) 進行性腎細胞癌における免疫チェックポイント阻害剤投与患者からの末梢血細胞より RNA 抽出

転移性腎細胞癌に対して免疫チェックポイント阻害薬であるニボルマブを投与した患者 20 名より、投与前、投与 1・3・6 ヶ月後の末梢血 Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) を採取した。RNA 採取に関しては、PAXgene™ Blood RNA System を用いた。PAXgene™ Blood RNA System では、ヒト末梢血 RNA 精製が比較的容易であり、採血、細胞内 RNA の安定化、検体の保存、輸送が 1 本の採血管で可能である。また真空採血管にあらかじめ RNA 安定化剤を添加してあるため、採血した時点の遺伝子発現プロファイルを忠実に捉えることができ、簡便・均一性をもって血液中免疫担当細胞の遺伝子発現を評価することができる。これにより PBMCs のみを抽出しなくとも、より簡便に次世代シーケンサーによる TCR のレパートリー解析を行うことができる。

2) 末梢血 PBMCs に対する T 細胞受容体(T cell receptor, TCR)レパトア解析

上記の様に抽出した RNA を用いて、次世代シーケンスにより TCR 鎖に対する TCR レパトア解析を施行したところ、奏効例では高頻度な特定の T 細胞クローンが投与開始 1 ヶ月後、3 ヶ月後で有意に増加していた (図 1)。

また PBMC における免疫関連遺伝子の発現レベルを RT-PCR 法で検討したところ、投与開始 1 ヶ月後

に CD3 陽性 T 細胞に

おける GranzymeB

(GZMB)の発現が有意

に増加していた (図

2)。

以上から奏効例では、治療後早期に細胞傷害性を持つ特定の T

細胞クローンが末梢血中で増加しており、TCR レパトア解析による末梢血 T 細胞のクローン数の増減などを把握することや、免疫関連遺伝子の発現を検討することで、免疫チェックポイント阻害薬の治療後早期に奏効を予測するバイオマーカーとなり得ることが示された。

図1 奏効例における投与開始1ヶ月後の末梢血T細胞クローン (Top10を基準) の推移

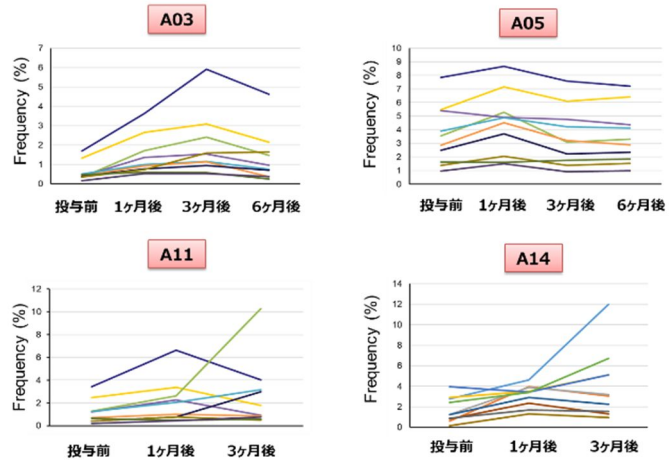
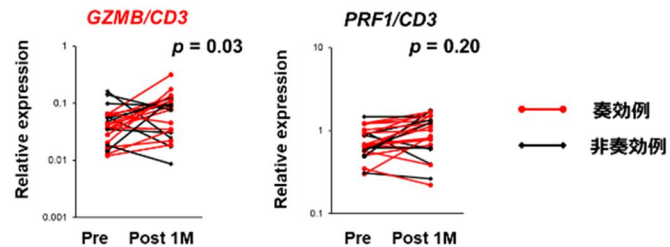


図2 免疫関連遺伝子の発現

Cytotoxic marker



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

特になし

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