

令和 2 年 6 月 1 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：18K16696

研究課題名（和文）腎癌患者免疫細胞由来血清エクソソームの網羅的タンパク解析による癌免疫状態の理解

研究課題名（英文）Proteomics analysis of serum extracellular vesicles from renal cell carcinoma treated with immune checkpoint inhibitors

研究代表者

王 聡（Wang, Cong）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70783893

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：進行性腎細胞癌患者および健常人のPeripheral Blood Mononuclear Cell（PBMC）よりフローサイトメトリーにてCD4+/CD8+/CD4+CD25+T細胞を分取し、LC-MS/MS法による網羅的プロテオーム解析を行い、癌患者に特徴的な増減を示すタンパクを同定した。今後は進行性腎細胞癌に対して免疫チェックポイント阻害薬を投与した患者より経時的に採取した血漿を用いて、候補タンパクの定量を行い、免疫チェックポイント阻害薬の奏効を予測するバイオマーカーを同定する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在腎細胞癌を含む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、奏効率は限定的であり、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健常人と比較し、有意に増減する候補タンパクを同定しており、現在PD-1阻害剤を使用した症例において、経時的に採取した血漿を用いて、先述の候補タンパクの定量を試みている。これにより奏効例に特徴的な候補タンパクの変化が認められれば、ELISA法などによる非侵襲的な奏効予測マーカーの確立に繋がる。

研究成果の概要（英文）：In our study, we identified proteins which is uniquely upregulated or downregulated in peripheral T cells of advanced kidney cancer patients by means of proteome analysis. We already collected plasma samples from kidney cancer patients before anti-PD-1 treatment (nivolumab) and at 3, 6 months after starting nivolumab. Now, we are trying to quantitate candidate proteins identified previously using these plasma samples, which will be predictive markers 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 プロテオーム解析 エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 1．研究開始当初の背景

転移性または切除不能腎細胞癌の予後は不良である。免疫チェックポイント阻害剤（Immune checkpoint inhibitors, 以下 ICI）は、腎細胞癌を含めた多くの癌腫において抗腫瘍効果が認められているが、奏効率は 20～30%に止まっている。メラノーマでは抗 PD-1 抗体が有効であった患者群において、腫瘍組織中に浸潤する特定の T 細胞クローンの割合が増加していることが報告されていることから、ICI 投与による免疫状態の変化が示唆されている。T 細胞を中心とした免疫細胞の変化を治療開始後に経時的にモニタリングし、臨床情報と統合して解析することにより、早期に治療効果予測を可能とするバイオマーカーの確立に繋がる可能性があると考えた。本研究では、バイオマーカー探索のリソースとして、エクソソームと呼ばれる内部に DNA、miRNA、mRNA、タンパクなどが含まれている細胞外小胞に着目した。エクソソームは全ての細胞から分泌され、様々な体液中に安定的に存在する。また分泌細胞の情報がエクソソームに内包されており、細胞の状態、周囲環境によって内包物質も変化する特徴が挙げられる。したがって、ICI 投与後の免疫環境の変化に伴い、免疫細胞由来エクソソームの情報も変化する。これを血中で捉えることで免疫状態のモニタリングが可能になると考え、本研究を開始した。

## 2．研究の目的

進行性腎細胞癌患者血清に存在する免疫細胞由来エクソソームに着目し、タンパク発現解析により、ICI 投与前後で変動するタンパクを同定する。同定したタンパク情報と臨床情報を統合することにより、ICI の治療効果の早期予測、また効果持続を予測する血液バイオマーカーを同定し、個別化医療を目指す。

## 3．研究の方法

本研究では、進行性腎細胞癌に対して抗 PD-1 抗体治療を行う症例に対して末梢血を投与前、投与後経時的に採取し、以下の研究を展開する。

### 血清中エクソソームの抽出およびその確認

本研究では超遠心法により患者血清よりエクソソームの回収を行い、ウエスタンブロット法、ナノ粒子トラッキングシステムおよび電子顕微鏡にてエクソソームの抽出精製が可能であることの確認を終えている。

### プロテオームライブラリーの作成

健常者の血液サンプルからまずフィコールを用いて PBMCs を単離精製する。PBMCs より CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の各分画を FACS によって分取する。T 細胞以外の免疫細胞由来エクソソームも候補になる可能性を考慮し、PBMCs 自体も用いる。分離精製した PBMCs および分取した T 細胞の各分画サンプルを、TMT 標識 LC-MS/MS によって網羅的タンパク解析を行い、独自のプロテオームライブラリーを作成する。これにより次の血中に微量な免疫細胞由来エクソソームタンパクに対して標的プロテオミクスを用いることで高感度に同定・定量できるようになる。

### 抗 PD-1 抗体によって変動する免疫細胞由来エクソソームタンパクの同定

抗 PD-1 抗体を使用する進行性腎細胞癌患者の経時的採血検体（投与前、投与 3、6 ヶ月後）を逐次保存している。健常者、患者血清よりエクソソームタンパクを抽出し、プロテアーゼによる断片化処理を経て、液体クロマトグラフを用いてペプチドを分離する。定量性を高めるために、安定同位体で標識した合成ペプチドを用いた選択反応モニタリング法 (SRM) を用いて、で作成したライブラリー中の標的タンパクに絞って発現解析を行う。健常者をコントロールとして、抗 PD-1 抗体投与前後で変動する特異的な候補タンパクを同定する。

免疫細胞由来エクソソームタンパクをバイオマーカーとして臨床応用を目指す

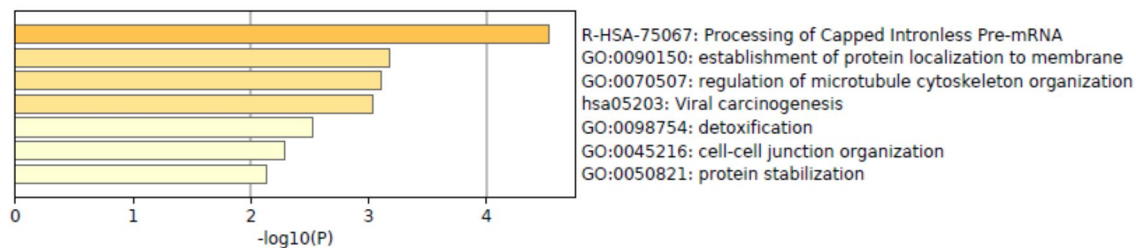
で同定した候補タンパクに対し、多検体で同時に検出できる多重反応モニタリング法 (SRM/MRM) を用いて、確認・定量を行う。臨床情報、特に転帰と画像診断による効果判定の臨床データとを統合させ、抗 PD-1 抗体治療開始後、早期の治療効果予測ならびに効果持続を予測する血液バイオマーカーとしての有用性を検証する。

#### 4. 研究成果

当初免疫細胞由来エクソソームに着目し、タンパク発現を行っていたが、超遠心法による患者エクソソームの回収、ウェスタンブロット法を行った結果、タンパク量が極めて少ないことが分かった。そのためエクソソーム由来タンパクに限定せず、T 細胞由来のタンパク全体で候補タンパクの同定を行う方針にシフトした。

##### 1. T 細胞由来プロテオームライブラリーの作成

まず本研究の第一段階として、健常人 10 人の Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) よりフローサイトメトリーにて CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞を分取し、各分画よりタンパクを抽出し、TMT ラベル化液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析 (LC-MS/MS) による網羅的プロテオーム解析を行った。これにより同定された複数の各分画由来の候補タンパクをプロテオームライブラリーとして作成した。さらに進行性腎細胞癌患者 3 名と健常人 3 名の PBMCs を CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 細胞に分け、プロテオーム解析を行い、進行性腎細胞癌患者に特徴的な増減を示すタンパク候補を計 50 個同定した (図参照)。



##### 2. 進行性腎細胞癌患者における免疫チェックポイント阻害薬奏効予測マーカーの探索

進行性腎細胞癌に対して PD-1 阻害剤であるニボルマブを投与した患者 20 名より、経時的に血漿を採取し得た。現在これらの血漿において、前述の候補タンパクの標的プロテオミクスを行い、PD-1 阻害剤の奏効予測バイオマーカーの同定を行っている。

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〕

-

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