

令和 4 年 5 月 22 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08615

研究課題名(和文) 肺癌における血清エクソソーム非コードRNAを用いたがん免疫療法の効果予測

研究課題名(英文) Serum-derived exosomal microRNA predicts the response to immune checkpoint inhibitors cancer in lung cancer patients

研究代表者

清家 正博 (SEIKE, MASAHIRO)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：30366687

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)：非小細胞肺癌患者41名を対象に、免疫チェックポイント阻害薬(ICI)の効果を予測する血清エクソソームmiRNAを評価し、miR-125a-3pがICIの効果と関連することを明らかにした。miR-125a-3p高発現は、PD-L1低発現(50%未満)患者において、ICI効果予測因子としてより有用であり、無増悪生存期間および全生存期間短縮と相関していた。肺癌細胞株を用いた検討にて、miR-125a-3p過剰発現にて、NRG1とPD-L1発現の低下が認められた。非小細胞肺癌患者血清エクソソームのmiR-125a-3pは、PD-L1低発現肺癌患者のICI療法の効果予測バイオマーカーとして有用である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌患者における免疫チェックポイント阻害薬の有効性に関する汎用性の高いバイオマーカーに関する臨床的なニーズは高い。腫瘍内PD-L1発現を用いた薬剤の使い分けがなされているが、今回の研究にて、PD-L1低発現(50%未満)非小細胞肺癌患者における血清エクソソームmiR-125a-3pは、ICI療法の効果予測バイオマーカーとして有用である可能性がある。本研究成果を臨床応用できれば、肺癌患者の予後改善および個別化医療推進への貢献など臨床のおよび社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the profiles of serum-derived exosomal miRNAs predicting the effect of immune checkpoint inhibitors (ICI) in 41 patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). Exosomal miR-125a-3p was associated with ICI response. Exosomal miR-125a-3p was more useful as a predictor of ICI response in patients with low PD-L1 expression (<50%). Moreover, high expression of miR-125a-3p was correlated with shorter progression-free survival and overall survival. The induction of miR-125a-3p regulated PD-L1 expression via NRG1 suppression in lung cancer cells. Exosomal miR-125a-3p may be a useful biomarker to predict response to ICI therapy in advanced NSCLC with low PD-L1 expression.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：肺癌 がん免疫療法 エクソソーム 非コードRNA マイクロRNA

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肺癌の免疫療法のバイオマーカー

肺癌において、2014年に免疫チェックポイント阻害薬(ICI)であるニボルマブが承認され、ニボルマブ投与を受けた既治療進行非小細胞肺癌患者の5年生存率は13.4%とこれまでにない長期予後データが報告された。現在4剤のICIが肺癌において使用可能であるが、問題になっているのが免疫関連有害事象と医療費増加である。腫瘍内PD-L1発現が患者選別のためのバイオマーカーの1つとして用いられているが、検体採取に関わる侵襲性などの問題が依然課題として残されている。そのため、より鋭敏で感度の高いICIの効果予測因子を見出し、有効で安全なICI個別化医療を実践していく必要がある。さらに組織採取が不要で低侵襲なリキッド検体でのバイオマーカーを開発していくことが強く望まれている。

(2) 非コードRNA研究

申請者らは、特定の癌遺伝子/癌抑制遺伝子発現制御に関与する非コードRNA(ncRNA (microRNA: miRNA, long non coding RNA: lncRNA))に着目し、肺癌の診断/予後因子および薬剤感受性を調節していることを明らかにしてきた。申請者らは、miRNAに関する最先端の国際的研究に早期から携わり、肺癌の新規診断/予後および薬剤耐性に関わるmiRNA異常の解明を試み、非小細胞肺癌の診断/予後因子miR-155, let7aの同定(Yanaihara N, Seike M, et al. *Cancer Cell*. 2006)、EGFR阻害薬感受性におけるmiR-21などの薬剤感受性に関わるmiRNAの同定(Seike M, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009) (Sugano T, Seike M, et al. *Mol. Cancer Ther*, 2015) (Takahashi A, Seike M, et al. *Sci Rep*, 2018)などの研究成果を報告してきた。長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)機能に関しては、ドライバー遺伝子異常(EGFR/ALK)肺癌の分子標的薬耐性に関わるCRNDEの意義を明らかにした(平成28-30年度基盤研究C) (Takahashi S, Seike M, et al. *Int J Mol. Sci*, 2021)。

(3) エクソソーム研究

血清や尿などの癌患者の体液中に存在する分泌型ncRNA(リキッドncRNA)の中で、細胞間伝達の媒介役として様々な生理現象や疾患に関わり、癌細胞からも分泌される膜小胞エクソソームに着目して研究を行っている。エクソソームは、タンパク質やmiRNAなどのncRNAを原発巣から転移巣に運搬することや抗腫瘍免疫応答の制御等発癌に関わることが報告されている。血清または血漿内におけるncRNA解析は、腫瘍以外の他の合併症や全身性疾患の影響を排除することが難しいが、血清内エクソソーム内の分子は腫瘍における発現と相関が高く、血液内の分解酵素の影響や検体保存段階での高温、酸、凍結融解などの影響を受けにくいというバイオマーカーとしての利点を有する。申請者らは、肺癌特異的血清エクソソーム由来miRNA(miR-21, miR-30c, miR-651, miR-652)を見出している(2012-14年度基盤研究C)。

肺癌の薬物療法の治療選択には、組織診および細胞診検体を用いた遺伝子変異解析およびPD-L1発現検索が必須であるが、時間的および空間的な分子異常解析が求められる現状においては、リキッド検体を用いた低侵襲でかつ経時的に評価可能なバイオマーカーが実臨床において求められている。

2. 研究の目的

本研究では、肺癌患者における安全かつ効果的なICI治療を行うために必須な感度の高いバイオマーカーとしてのncRNA(miRNA/lncRNA)を同定し、臨床応用に向けて低侵襲な検査法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 非小細胞肺癌患者における ICI 治療前および治療 8-9 週後血清採取
- (2) 血清内エクソソーム抽出およびエクソソームマーカーを用いた検証
- (3) 網羅的 miRNA および lncRNA 発現解析(3D Gene/Agilent Human Gene Expression array)
- (4) 治療効果 (有効 vs 無効) と副作用に関連する miRNA/lncRNA 同定および標的遺伝子同定
- (5) *in vitro* および *in vivo* での候補 miRNA/lncRNA の機能解析
- (6) 新規検体を用いた miRNA/lncRNA 発現と治療効果の検証

4. 研究成果

(1) 血清エクソソーム miRNA 発現プロファイル

非小細胞肺癌患者 23 名の血清エクソソームを用いて miRNA マイクロアレイ解析を施行した。ICI 効果を予測するエクソソーム miRNA を同定するために、奏効患者 (PR+SD) 14 名と非奏効患者 (PD) 9 名を比較検討し、治療効果に関わる 210 の miRNA を明らかにし、その中で、癌の進展や免疫に関連する miR-125a-3p に着目した。奏効患者に比べて非奏効患者では miR-125a-3p が高発現している症例を多く認め、定量的 RT-PCR にて発現を検証した (図 1)。

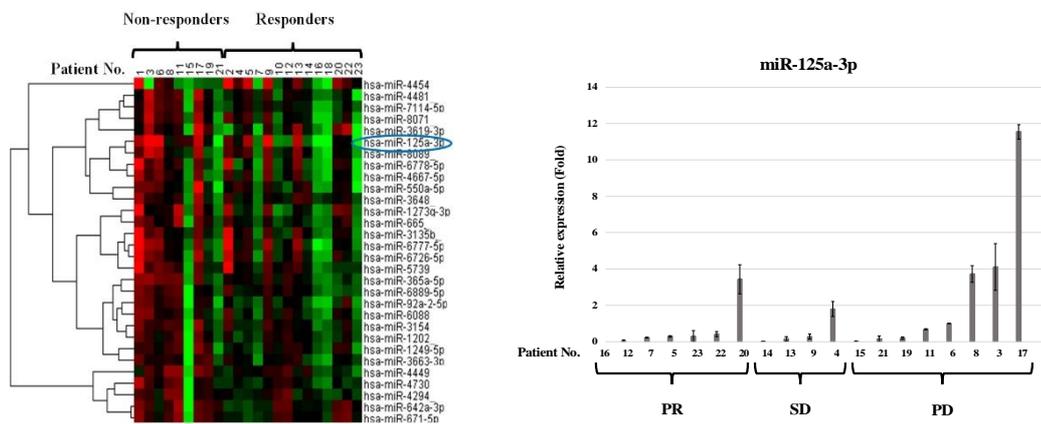


図 1. ICI 治療効果に関わる miRNA プロファイル

(2) 血清エクソソーム miR-125a-3p 発現と ICI 治療効果

エクソソーム miR-125a 発現と ICI 効果を評価するために、患者検体を追加し、41 名の患者 (奏効 32 名と非奏効 9 名) を用いて定量的 RT-PCR にて解析した。miR-125a-3p 低発現群 (<0.41) と高 miR-125a-3p 発現群 (>0.41) では病態制御率 (DCR) に有意差を認めた (オッズ比 (OR) = 5.83, $p=0.029$)。さらに、PD-L1 <50% 群においてこの差は顕著であった (OR = 1.09e8, $p=0.039$) (図 2)。PD-L1 <50% 群における ICI 効果に関する多変量解析においても、miR-125a-3p は ICI 効果予測の独立した予測因子 (OR = 9.85e14, $p=0.0075$) であった。

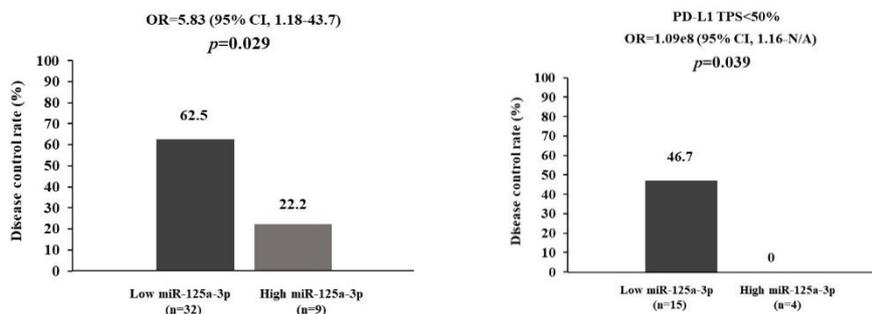


図 2. miR-125a-3 発現と ICI 治療効果

(3) 血清エクソソーム miR-125a-3p 発現と ICI 治療患者の予後

miR-125a-3p 高発現群は低発現群に比べて、無増悪生存期間 (PFS) および全生存期間 (OS) は有意に短かった (PFS 中央値 : 2.1 ヶ月対 5.8 ヶ月、HR = 2.53、 $p = 0.025$) (OS 中央値: 4.7 ヶ月対未達、HR=3.40、 $p=0.0074$)。PD-L1 <50%群においても、miR-125a-3p 高発現群は低発現群に比べ、PFS および OS は有意に短かった ($p = 0.044$) ($p=0.047$) (図 3)。多変量解析において miR-125a-3p は PD-L1<50%群では、PFS および OS の独立した予測因子であった。

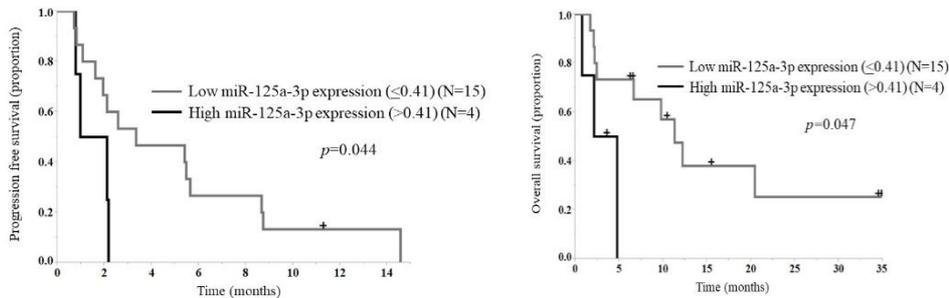


図 3. miR-125a-3p 発現と予後

(4) NRG1 は miR-125a-3p の標的因子

miR-125a-3p の標的遺伝子の一つとして NRG1 が targetscan データベースより見出された。H1975 および H441 細胞への miR-125a-3p 過剰発現にて、NRG1 の mRNA およびタンパク質発現の低下が認められ、NRG1 は miR-125a-3p の標的因子の一つであることが示された。さらに NRG1 下流シグナルのタンパク質発現を評価した。H1975 および H441 細胞への miR-125a-3p 過剰発現にて NRG1 発現抑制とともに p-HER3 発現低下が起こり、さらに p-AKT および PD-L1 発現が低下した (図 4)。これらの結果より、miR-125a-3p が HER3/AKT シグナルを介して PD-L1 発現を制御し、ICI 療法に対する治療効果に関与している可能性を示された。

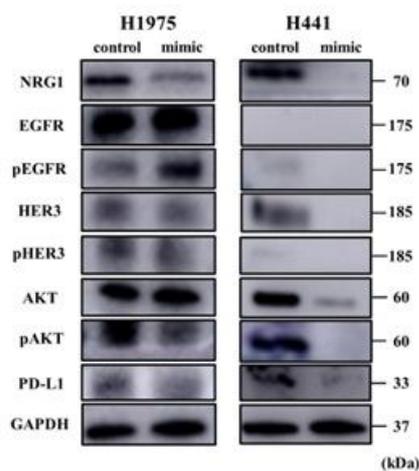


図 4. NRG1 は miR-125a-3p の標的因子

以上、非小細胞肺癌患者を対象に ICI の効果を予測する血清エクソソーム miRNA を評価し、miR-125a-3p が ICI の治療効果および予後と関連することを明らかにした。特に PD-L1 低発現患者において、miR-125a-3p 発現は ICI 効果予測因子としてより有用であった。miR-125a-3p のがん免疫療法への関与として、HER3 や AKT シグナルを介する PD-L1 発現制御の可能性を示した。非小細胞肺癌患者血清エクソソームの miR-125a-3p は、PD-L1 低発現肺癌患者の ICI 療法の効果予測バイオマーカーとして有用である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久金翔、清家正博 他
2. 発表標題 血清エクソソームmiR-125a-3pはNSCLC患者におけるICIの治療効果を予測する
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	宮永 晃彦 (MIYANAGA AKIHIKO) (00591281)	日本医科大学・医学部・講師 (32666)	
研究分担者	野呂 林太郎 (NORO RINTARO) (50366738)	日本医科大学・医学部・講師 (32666)	

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