

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09704

研究課題名(和文)新規免疫療法治療効果予測因子としてのGPI-80を用いたMDSCの発現・機能解析

研究課題名(英文) Expression and function analysis of MDSC as a predictive factor of novel immunotherapy with GPI-80

研究代表者

加藤 智幸 (Kato, Tomoyuki)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：40396560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は腎癌患者の末梢血中に存在するMDSCsをGPI-80発現量とその変動係数を用いて解析する方法を確立している。免疫チェックポイント阻害剤を用いた薬物療法前・治療中の腎癌患者末梢血中のMDSCs数や機能変化をGPI-80およびその他の免疫パラメータを用いて解析した結果、治療中にMDSCs指標(CD16発現量とLAP-1発現量)が上昇した症例では、抗腫瘍効果を認めなかった。治療時に生じる免疫関連有害事象を認めた症例では、GPI-80変動係数が低下した。完全奏効例では治療前の末梢血中にGPI-80発現量が増加した好中球が増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、免疫チェックポイント阻害剤を用いた薬物療法の治療前および治療初期の骨髄系細胞の変動が、抗腫瘍効果と免疫関連有害事象に関連していることが明らかとなった。完全奏効症例では治療前に好中球のGPI-80発現量が増加しており、GPI-80発現量増加の時期を狙って免疫チェックポイント阻害剤を投与することで、より高い抗腫瘍効果が得られる可能性がある。さらに、薬剤投与やや慢性炎症により、CD16・LAP-1発現量上昇単球が増加してきた場合、治療を一時中断して免疫応答の回復を待つなど、癌治療の最適化にも寄与する。また、『GPI-80高発現型好中球』を補充・誘導する免疫治療法に発展する可能性もある。

研究成果の概要(英文)： In chronic inflammatory conditions such as renal cancer, MDSCs appear and suppress the cancer immune response. We have previously established a method for analyzing MDSCs in the peripheral blood of patients with renal cancer using the expression level and coefficient variation of GPI-80, combining with myeloid-differentiation markers. We investigated changes in the number and function of MDSCs using peripheral blood before and during cancer therapies.

The increasing MDSCs indexes (CD16 and LAP-1 expression level) were associated with poor response to each cancer therapy. In cases of immune-related side effects, GPI-80 coefficient variation, which is other MDSCs indicators, was reduced. In the case of complete response, neutrophils with increased GPI-80 expression level were significantly observed before the therapy. Since GPI-80 was involved in the activation of NF- $\kappa$ B, it is possible that it is involved in neutrophil function that enhances the cancer immune response.

研究分野：泌尿器科

キーワード：MDSCs 腎癌 GPI-80

## 1. 研究開始当初の背景

2000年代後半から種々の分子標的薬の登場や近年の免疫チェックポイント阻害薬の開発により、本邦での転移性腎癌症例の生存期間はサイトカイン療法時代の21か月(Naito S, et al. Eur Urol, 2009)から27か月(Shinohara N, et al. Cancer Sci, 2015)と延長した。しかしながら、薬物療法のみで転移性腎細胞癌の根治は困難であり、多数の患者が治療抵抗性となり癌死に至る。実臨床においては、既存の薬剤の中から個々の患者において、より有効性が高く、より副作用の少ない薬剤の選択を迫られる。適切な薬剤選択のためにはバイオマーカーが必要であるが、腎細胞癌において治療効果予測のための有効性の高いバイオマーカーは存在しないというのが実情であり、その開発は喫緊の課題である。さらにこれらの癌種に対するより有効性の高い新たな治療戦略の開発が求められている。

好中球は生体内に最も多く存在する免疫細胞であるが、転移性腎細胞癌では、原発巣の腫瘍内好中球の存在は全生存率の独立した危険因子であることが報告された(J Clin Oncol. 24:1997, 2006)。また末梢血中好中球の増加は免疫療法の予後不良因子であることも報告された(Br J Cancer. 2006 94: 218-226)。以上より好中球は腎細胞癌の予後に関連した重要な因子であると考えられる。これらの好中球は myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) と呼ばれ、非常に多様で未熟な骨髄球系細胞であり、腫瘍細胞特異的 T 細胞や NK 細胞の機能抑制を介して抗腫瘍免疫を抑制していることが示唆されている(Clin Cance Res. 2012 17: 4887)。さらに MDSC は腫瘍血管新生を誘導することができ、血管新生阻害薬治療抵抗性獲得に関わっていることが示唆されている(Int Immunopharmacol. 2001 11: 856)。

## 2. 研究の目的

MDSC は腎細胞癌患者における分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬に対する抵抗性の一因となっている可能性があり、GPI-80 が治療効果予測マーカーとなり得るのではないかと考えられる。また、GPI-80 を用いて MDSC を標的とした治療を行うことで薬物治療の効果をより高める可能性があるのではないかと考えられる。このことから、MDSC 抑制治療の開発を目標に、治療前・治療中の末梢血を用いて MDSCs の数や機能の変化と、GPI-80 の治療効果予測マーカーとしての有用性を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1)腎癌患者症例

腎細胞癌患者(66 症例)において、免疫チェックポイント阻害剤投与(37 症例) 分子標的薬あるいは抗癌剤投与(29 症例)を行った症例について検討を行った。免疫チェックポイント阻害剤の内訳は、Nivolumab+Ipilimumab、Nivolumab、Avelumab+Axitinib、Pembrolizumab+Axitinib であった。分子標的薬の内訳は、Sorafenib、Cabozantinib、Pazopanib、Axitinib、Everolimus、抗癌剤は TS-1 であった。66 症例中 45 症例(治療終了後 3~6 ヶ月後)について、CT 検査結果をもとに、RECIST1.1 に基づいて抗腫瘍効果を判定した。

### (2)末梢血解析

治療開始直前、治療 3 週間後、治療 6 週間後、治療 12 週間後に、それぞれ採血を行った。先行論文に従い、骨髄系細胞(好中球・単球)と、リンパ球系細胞(T 細胞・B 細胞・NK 細胞)の各亜集団の変動を全血染色法および細胞内染色法にて各抗体で染色し、フローサイトメトリーにて解析した(Tohoku J Exp Med 249:203-212, 2019; Methods Mol Biol

(3)GPI-80 の機能解析

GPI-80 の過剰発現細胞と GPI-80 遺伝子欠損細胞を作製して解析を行った。それらの細胞を用い、pantetheinaes 活性と還元型/酸化型グルタチオン測定を行った ( 発表論文 1 )。

4 . 研究成果

(1) 癌治療経過に伴う骨髓系細胞・リンパ球系細胞の変動

癌治療経過に伴う骨髓系細胞・リンパ球系細胞の各細胞分画の変動パターンは、患者個人により大きく異なっていたが、共通して認められる変動として、治療開始後の初期 ( 3~6 週後 ) が大きく、治療後期 (12 週後) では、収束する傾向が観察された ( データ示さず ) 。とくに、骨髓系細胞の機能分子 (CD16, Fcγ レセプター; LAP-1, TGF-β1 前駆体) や細胞傷害性 T 細胞の増殖指標 (Ki-67) の変動は、治療開始 3~6 週後にかけて、上昇し、その後、12 週後にかけて収束する傾向がみられた ( 図 1 ) 。このことから、治療開始後初期に、免疫動態への影響が大きいことが推察された。

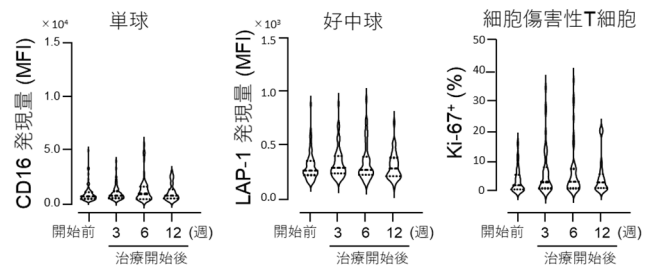


図1. 癌治療経過に伴う骨髓系細胞・リンパ球系細胞の変動

腎癌治療開始前、開始後3, 6, 12週間後の末梢血を用い、各抗体を反応させ、単球様細胞 (CD33<sup>hi</sup>CD16<sup>+/+</sup>)、好中球様細胞 (CD33<sup>+</sup>CD16<sup>hi</sup>)、細胞傷害性T細胞 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) をフローサイトメトリーにて解析した (MFI, mean of fluorescence intensity; n = 66)。

(2)癌治療初期の骨髓系細胞の変動

我々は、以前の報告で、単球様細胞上の CD16 発現量は、単球様 MDSCs の指標となり、LAP-1 も骨髓系細胞の MDSCs の指標となる可能性を示している。そこで、治療応答 ( 完全奏功 + 部分応答 ) 症例と治療不応答 ( 病勢進行 + 安定状態 ) 症例に分け、初期変動の違いを検討した。その結果、治療に反応しなかった症例では、CD16 発現と LAP1 発現が有意に上昇する傾向が認められた。一方、治療応答症例では、CD16 発現と LAP1 発現の有意な上昇は観察されなかった ( 図 2 ) 。このことから、治療開始初期に、CD16 発現と LAP1 発現の上昇が生じるような骨髓細胞系の変動は、癌免疫応答抑制を反映している可能性が考えられた。

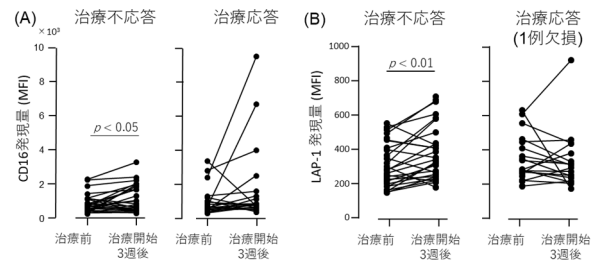


図2. 癌治療経過に伴うMDSC指標の変動と治療応答性の違い

腎癌治療開始前と開始後3週後の末梢血中の (A) 単球様細胞 (CD33<sup>hi</sup>CD16<sup>+/+</sup>) の CD16 発現量と (B) 好中球様細胞 (CD33<sup>+</sup>CD16<sup>hi</sup>) の LAP-1 の変動をフローサイトメトリー解析した。治療不応答 (病勢進行 + 安定状態; n = 26) 症例と治療応答 (完全奏功 + 部分応答; n = 18~19) 症例について、各々の変動の違いを paired Student's t-test にて統計解析を行った。

(3) 免疫関連有害事象 (immune-related Adverse Events, irAEs) と GPI-80 変動係数

免疫チェックポイント阻害剤を用いた癌治療において、免疫関連有害事象 (immune-related Adverse Events, irAEs) の制御は、有効性の高い治療を継続するために必須である。一方、irAEs の発現は、癌免疫応答が生じていることを示す一面もある。そこで、irAEs 発症例と未発症例に関

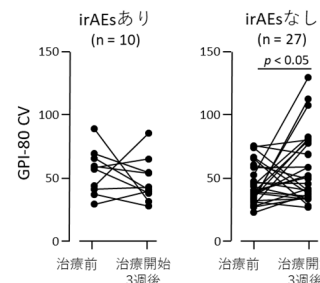


図3. 癌治療開始後のGPI-80 CV上昇症例はirAEs発症しない免疫チェックポイント阻害剤治療症例において、腎癌治療開始前・開始後3週後における、末梢血中の好中球様細胞 (CD33<sup>+</sup>CD16<sup>hi</sup>) の GPI-80 発現の変動係数 (GPI-80 CV) をフローサイトメトリー解析した。免疫関連副作用 (irAEs) 発症例と未発症例について、治療開始前と治療開始後のGPI-80 CVの変動を paired Student's t-test にて統計解析を行った。

連して変動する指標を検討した。その結果、irAEs 未発症において、治療開始 3 週後に GPI-80 変動係数(CV, coefficient variation)が有意に上昇していた。一方、irAEs 発症では、その上昇は認められなかった(図3)。以前の我々の報告において、GPI-80 CV の上昇は、好中球様 MDSCs が誘導されたことを示すことを明らかにしている。このことから、好中球様 MDSCs が治療後に誘導されると、irAEs 発症が抑制される傾向があることが類推された。

#### (4)完全奏功症例の検出

免疫チェックポイント阻害剤治療を施行された 45 症例中、完全奏効例は 3 症例、病勢進行例は 5 症例であった。少数例であるが完全奏効例と病勢進行例につき、免疫パラメータを比較検討したところ、好中球の GPI-80 の発現量が、完全奏効例で有意に高かった(図4)。このことから、GPI-80 発現上昇に伴う好中球機能が、癌免疫応答を惹起する要因に関連している可能性が考えられた。

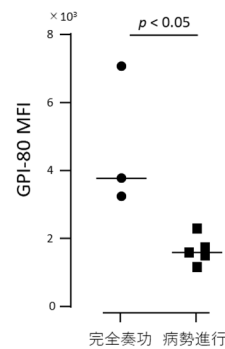


図4. 完全奏効と病勢進行症例の治療開始前のGPI-80発現量  
腎癌治療開始前の末梢血中好中球様細胞(CD33+CD16<sup>hi</sup>)のGPI-80発現量をフローサイトメトリー解析した。病勢進行症例(n = 5)と完全奏効症例(n = 3)について、GPI-80発現量の違いをunpaired Student's *t*-testにて統計解析を行った。

#### (5)GPI-80 機能の検討

GPI-80 は、pantetheinase (Vanin-1)ファミリー分子であることが知られている(J Pharmacol Sci 123:1-8, 2013)。しかし、その GPI-80 の機能の詳細は不明であった。そこで、我々は、GPI-80 の pantetheinase 活性の有無を明らかにし、その活性に伴う変化を検討した。その結果、GPI-80 は pantetheinase 活性を有しており、細胞内の酸化型グルタチオン比率が上昇していた(図5、発表論文1より改変)。

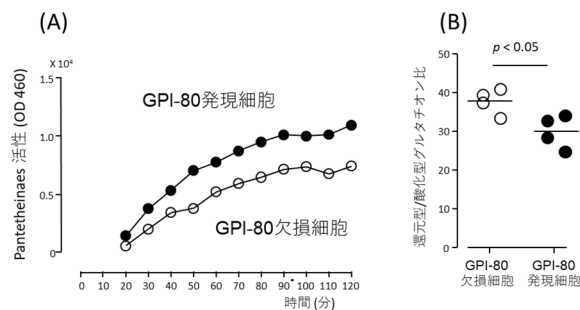


図5. GPI-80発現によるpantetheinase活性と還元型グルタチオン比率の変動  
GPI-80発現している細胞(●)と、GPI-80遺伝子を欠損させた細胞(○)を用いて、(A)pantetheinase活性を測定した(独立5回測定の代表例)。(B)細胞内の還元型/酸化型グルタチオン比率の違いをunpaired Student's *t*-testにて統計解析を行った。

細胞内の酸化型グルタチオン比率が上昇は、炎症応答亢進に関わる NF- $\kappa$ B の活性化を誘導することが知られている(Circ Res 84:516-524, 1999; Mol. Biosyst. 2012, 8, 650-662)。そこで実際に NF- $\kappa$ B の活性化を測定したところ、GPI-80 発現分画では、NF- $\kappa$ B の活性化が生じていた(図6、発表論文1より改変)。

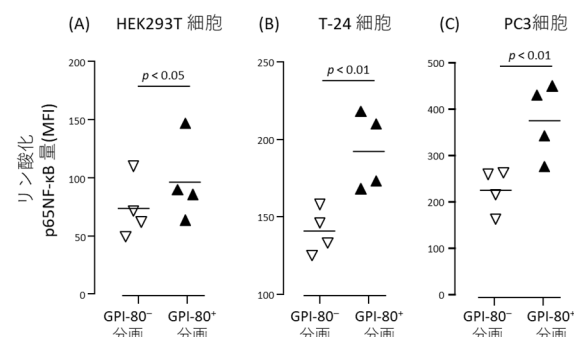


図6. GPI-80発現細胞分画におけるNF- $\kappa$ B活性化亢進  
泌尿器系細胞株HEK293T(A)、T-24(B)、PC3(C)に一過性にGPI-80を過剰発現させた。GPI-80発現細胞分画(▲)と非発現細胞分画(△)のNF- $\kappa$ Bの活性化状態を抗リン酸化p65NF- $\kappa$ B抗体を用いてフローサイトメトリー解析を行った。各々独立した実験を行い、paired Student's *t*-testにて統計解析を行った。

これらのことから、GPI-80 は、好中球、および、好中球が遊走した組織でのレドク

クスバランスを制御することで、炎症応答亢進に關与する微小環境形成に關与している可

能性が考えられた。

(6) 考察・結語

治療開始後の初期に変動する MDSCs の指標の上昇は、治療不応答と irAEs の発症抑制に関連していた。その MDSCs の指標のうち、治療不応答と関連しているのは、単球様細胞の CD16 発現上昇と好中球様細胞の LAP-1 発現上昇であった。一方、irAEs の発症抑制に関連しているのは、好中球様細胞の GPI-80 CV 上昇であった。このように、MDSCs 指標の違いにより、関連する臨床症状との違いが認められた。このことは、MDSCs は一様な集団ではなく、多様な MDSCs 機能集団であることを示していると考えられる。実臨床において有用な指標を選択することで、MDSCs の再定義が促される可能性がある。現在、この研究で得られた知見をもとに、発現量と変動係数を用いた細胞集団の分類方法を検討している(発表論文 2)。

本研究において、治療開始前に GPI-80 発現量上昇が認められる症例では免疫チェックポイント阻害薬投与により高い抗腫瘍効果が期待できる可能性が示された。これは、癌薬物療法の効果予測や適切な治療時期の判断に使用できる可能性がある。具体的には、好中球の GPI-80 発現量増加の時期を狙って、免疫チェックポイント阻害剤治療を開始することで、完全奏功が期待できるかもしれない。そして、抗癌剤や慢性炎症により、CD16・LAP-1 発現量上昇単球が増加してきた時期には、治療を中断し、免疫応答(GPI-80 発現量増加)の回復を待って治療を開始する等、様々な癌治療の最適化を実現できるかもしれない。

[雑誌論文]

1. Takeda Y, Kurota Y, Kato T, Ito H, Araki A, Nara H, Saitoh S, Tanaka N, Tsuchiya N, Asao H: GPI-80 Augments NF-kappaB Activation in Tumor Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22(21), 12027; <https://doi.org/10.3390/ijms222112027> ( 査読あり )

2. Takeda Y, Kawano K, Ma R, Saitoh S, Asao H. Five Patterns of Cell Signaling Associated with Cell Behavior. *Yamagata Med J* 2022, 40(1): 1 – 20 ( 査読あり )

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tomoyuki Kato, Yuji Takeda, Hiromi Ito, Yuta Kurota, Atsushi Yamagishi, Toshihiko Sakurai, Sei Naito, Akemi Araki, Hidetoshi Nara, Hironobu Asao, Norihiko Tsuchiya	4. 巻 249
2. 論文標題 GPI-80 as a Useful Index for Myeloid Cell Heterogeneity and a Potential Prognostic Biomarker for Metastatic Renal Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 203-212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1620/tjem.249.203	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 -

1. 著者名 Takeda Y, Kawano K, Ma R, Saitoh S, Asao H.	4. 巻 40(1)
2. 論文標題 Five Patterns of Cell Signaling Associated with Cell Behavior.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Yamagata Med J	6. 最初と最後の頁 1-20
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7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kato Tomoyuki, Takeda Yuji, Naito Sei, Ito Hiromi, Ushijima Masaki, Narisawa Takafumi, Yagi Mayu, Kanno Hidenori, Sakurai Toshihiko, Yamanobe Takuya, Asao Hironobu, Tsuchiya Norihiko
2. 発表標題 Dynamic changes in myeloid cells in urological cancer patients during immune checkpoint treatment
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 "加藤智幸, 武田裕司, 内藤整, 荒木明美, 福原宏樹, 斉藤真一, 成澤貴史, 櫻井俊彦, 浅尾裕信, 土谷順彦
2. 発表標題 BCG膀胱内注入療法による尿中抗腫瘍型好中球の誘導
3. 学会等名 日本泌尿器腫瘍学会 第6回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeda Y, Kato T, Kurota Y, Ito H, Tsuchiya N, Asao H.
2. 発表標題 Analysis of inflammatory response during intravesical immunotherapy with BCG for non-muscle invasive bladder cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武田裕司, 加藤智幸, Sabrina Saima, 内藤整, 伊藤裕美, 牛島正毅, 成澤貴史, 黒田悠太, 菅野秀典, 斉藤真一, 土谷順彦, 浅尾裕信
2. 発表標題 腎がんと膀胱がん治療時に出現する免疫抑制型好中球と抗腫瘍型好中球の同定
3. 学会等名 山形形態機能研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Saima S, Kato T, Takeda Y, Naito S, Ito H, Takai Y, Ushijima M, Ozawa M, Narisawa T, Kanno H, Sakurai T, Tsuchiya N, Asao H
2. 発表標題 Heterogeneity of neutrophils in renal cell and urothelial carcinoma patients during immune checkpoint inhibition therapy
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeda Y, Kato T, Shinichi S, Akemi A, Asao H
2. 発表標題 Anti-tumor response during intravesical immunotherapy with BCG for non-muscle invasive bladder cancer
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武田裕司, 加藤智幸, Sabrina Saima, 内藤整, 伊藤裕美, 牛島正毅, 成澤貴史, 黒田悠太, 菅野秀典, 斉藤真一, 土谷順彦, 浅尾裕信
2. 発表標題 膀胱癌BCG膀胱内注入治療時に出現する抗腫瘍型好中球の同定
3. 学会等名 山形大学医学部実験動物セミナー・第32回研究成果発表会
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	武田 裕司  (Takeda Yuji)  (90302299)	山形大学・医学部・准教授   (11501)	
研究分担者	内藤 整  (Naito Sei)  (00431643)	山形大学・医学部・助教   (11501)	
研究分担者	黒田 悠太  (Kurota Yuta)  (00594326)	山形大学・医学部・助教   (11501)	
研究分担者	土谷 順彦  (Tsuchiya Norihiko)  (70282176)	山形大学・医学部・教授   (11501)	

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