

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09730

研究課題名(和文) MSI関連因子を用いた泌尿器癌の抗PD-1抗体治療効果予測アルゴリズムの作成

研究課題名(英文) MSI related predictive biomarkers of response to immune checkpoint inhibitors for patients with metastatic urological cancers

研究代表者

山本 義明 (Yamamoto, Yoshiaki)

山口大学・医学部・特別医学研究員

研究者番号：30593298

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)：抗PD-1抗体にて治療を行った尿路上皮癌121例、腎細胞癌65例の症例を対象に、血液リンパ球数、好中球数等の臨床的因子を用いて、抗PD-1抗体の治療効果を予測するアルゴリズムを作成した。尿路上皮癌30例、腎細胞癌30例の腫瘍由来DNAと血液由来DNAを使用し、マイクロサテライト領域のMSI解析を行った。抗PD-1抗体で完治した転移性MSI尿路上皮癌では、ミスマッチ修復蛋白の発現低下と、ミスマッチ修復遺伝子の変異を認めた。更に、抗PD-1抗体にて治療された尿路上皮癌、腎細胞癌73例に対する、口腔内と便(消化管)中のマイクロバイオーム解析を、菌由来DNAを用いて網羅的に行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

尿路上皮癌や腎細胞癌に対して、抗PD-1抗体治療前の末梢血による好中球/リンパ球比等により、抗PD-1抗体の治療効果が予測できることは、尿路上皮癌や腎細胞癌患者の治療法選択において有意義であると考えられる。また、治療後の好中球/リンパ球比減少が、抗PD-1抗体の治療効果を予測することは、実臨床において役立つと考えられる。

尿路上皮癌におけるMSI-highとミスマッチ修復遺伝子の変異、更に、ミスマッチ修復蛋白の減少が、尿路上皮癌に対する抗PD-1抗体の治療効果を予想するバイオマーカーになり得る可能性が示唆された。MSI関連因子が、尿路上皮癌に対して、抗PD-1抗体治療法選択の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We examined inflammation-based prognostic scores in 121 patients with advanced urothelial carcinoma (UC) and 65 patients with metastatic renal cell carcinoma who received PD-1 antibody. The combination of several inflammation-based prognostic scores may be a potential biomarker for estimating prognosis in patients with those carcinomas treated by PD-1 antibody. A PCR-based assay and DNA microarray showed Microsatellite instability (MSI)-high and the immunohistochemistry of mismatch repair genes showed decreased expression of MSH2 and MSH6 protein in both the primary bladder and the metastatic tumor. Whole-exome sequencing revealed somatic MSH2 mutation c.1351C>T (p.Gln451Ter) in the primary bladder and metastatic tumors, while this germline mutation was not detected. The somatic MSH2 (c.1351C>T) mutation is associated with MMR-deficiency and MSI-high which enabled a long-term complete response to anti-PD-1 antibody in a metastatic UC of the bladder.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：抗PD-1抗体 尿路上皮癌 腎細胞癌 マイクロサテライト不安定性 ミスマッチ修復遺伝子 口腔内マイクロバイオーム 消化管内マイクロバイオーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗 PD-1 抗体の登場により、腎細胞癌や尿路上皮癌の実臨床で転移巣の消失症例や、長期間治療効果持続症例を認め、更に、有害事象が化学療法より少ない為、同領域治療におけるパラダイムシフトをもたらしたと言える。

抗 PD-1 抗体の効果予測のバイオマーカーとして PD-L1 発現、体細胞変異数、腫瘍浸潤リンパ球、末梢血単核細胞、INF- γ 、腸内細菌等、数々の報告を認めているが現在の所、決定的な報告は認めない。更に、腎細胞癌、尿路上皮癌に対する抗 PD-1 抗体の奏効率は 21-25% と低く、その効果予測は極めて困難である為、腎細胞癌、尿路上皮癌における治療効果予測のバイオマーカーの探索が喫緊の課題である。

2. 研究の目的

我々は山口大学の知能情報工学科、先端がん治療開発学講座、消化器腫瘍外科との共同研究で、腎細胞癌の分子標的薬の治療効果予測アルゴリズムと遺伝子チップ(マイクロアレイ)を作成した。

本研究の目的は、上記と同様の研究チームと手法による、泌尿器癌における抗 PD-1 抗体の治療効果を予想するアルゴリズムと遺伝子チップの作成である。現在の所、数多くの抗 PD-1 抗体のバイオマーカーが報告されているが、(1) 宿主因子、(2) 腫瘍因子、(3) 環境因子等多くの因子に規定される為、一つの因子のみの探索では不可能と考える。本研究では(1) 宿主因子として末梢血単核細胞のリンパ球/単球比やグラスゴー予後スコア等を用い、(2) 腫瘍因子として MSI を中心とした DNA 修復関連遺伝子変化等の網羅的解析と、(3) 環境因子として口腔内と便中(消化管内)のマイクロバイオーム解析を行い、それらの因子に対する統計的パターン認識に基づいた重みづけによる、抗 PD-1 抗体の治療効果予測アルゴリズムを作成する。

3. 研究の方法

(1) 泌尿器癌の宿主(臨床)因子に着目した治療予測因子の探索として、抗 PD-1 抗体にて治療を行った尿路上皮癌 121 例の症例を対象に、末梢血単核細胞のリンパ球/単球比や臨床的因子と、抗 PD-1 抗体との治療効果、無増悪生存期間や全生存期間等の予後との比較検討を行った。

また、抗 PD-1 抗体にて治療を行った腎細胞癌 65 例の症例を対象に、末梢血単核細胞のリンパ球/単球比や臨床的因子と、抗 PD-1 抗体との治療効果、無増悪生存期間や全生存期間等の予後との比較検討を行った。

それらの因子に重みづけを行い、尿路上皮癌と腎細胞癌に対する抗 PD-1 抗体の治療効果を予測するアルゴリズムを作成した。

(2) 泌尿器癌の腫瘍因子に着目したバイオマーカーの開発として、マイクロサテライト不安定性(MSI)に関連した因子の探索を行った。尿路上皮癌 30 例、腎細胞癌 30 例の腫瘍由来 DNA と血液由来 DNA を使用し、マイクロサテライト領域(BAT-25、BAT-26、NR-21、NR-24、MONO-27)の MSI 解析を、PCR ベースの電気泳動と遺伝子チップ(マイクロアレイ)を用いて行った。そのメカニズムの検証として、ミスマッチ修復蛋白(MLH1、MSH2、MSH6、PMS2)の発現と、CD8、PD-L1 の発現を免疫染色にて評価した。更に、抗 PD-1 抗体著効例に対する網羅的解析によるバイオマーカーの開発として、ミスマッチ修復遺伝子も含めて、全エクソームシーケンスを用いた網羅的解析を行った。

(3) 泌尿器癌の環境因子に着目したバイオマーカーの開発として、抗 PD-1 抗体にて治療を行った尿路上皮癌、腎細胞癌 73 例に対して、口腔内と便中(消化管内)のマイクロバイオーム解析を、菌由来 DNA を用いて次世代シーケンサーにて網羅的な解析を行った。口腔内と便中の細菌と、患者の末梢血単核細胞のリンパ球/単球比、リンパ球数等の宿主因子や、抗 PD-1 抗体の治療効果、無増悪生存期間や全生存期間等の予後との比較検討を行った。

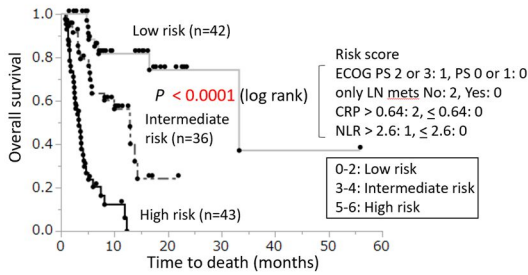
4. 研究成果

(1) 泌尿器癌の宿主(臨床)因子に着目した抗 PD-1 抗体の治療効果予測因子として、尿路上皮癌患者の、治療前の血液リンパ球数、好中球数、CRP 値を基に、尿路上皮癌に対する抗 PD-1 抗体の治療効果を予測するアルゴリズムを作成した(図1)。

また、腎細胞癌患者の、治療前の血液リンパ球数、血小板数、LDH 値を基に、腎細胞癌に対する抗 PD-1 抗体の治療効果を予測するアルゴリズムを作成した(図2)。

尿路上皮癌に対するPD-1抗体治療効果予測 (図1)

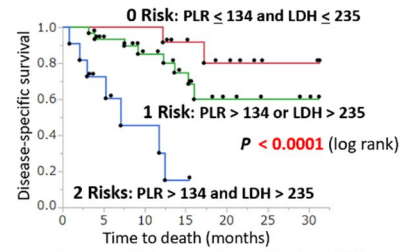
Pre-treatment Factor	Category	Univariate	Multivariate analysis	
		P	Risk ratio (95% CI)	P value
ECOG PS*	2, 3 vs 0, 1	< 0.0001	2.42 (1.27-4.53)	0.0077
only LN mets	No vs Yes	0.0004	2.76 (1.34-6.46)	0.0049
Alb	< 3.9 vs > 3.9 g/dL	0.0209		
CRP	> 0.56 vs ≤ 0.56 mg/d	< 0.0001	2.53 (1.32-5.08)	0.0047
Hb	≤ 11.5 vs > 11.5 g/dL	0.0617		
Na	< 139 vs > 139 mEq/L	< 0.0001		
NLR	> 3.0 vs ≤ 3.0	< 0.0001	2.33 (1.24-4.52)	0.0079



Yamamoto Y, Matsuyama H: Int J Clin Oncol 2021

腎細胞癌に対するPD-1抗体治療効果予測 (図2)

Pre-treatment Factor	Category	Univariate	Multivariate analysis	
		P	Risk ratio (95% CI)*	P value
ECOG-PS	≥ 2 vs 0, 1	0.2374		
MSKCC risk	poor vs inter/favor	0.0052		
IMDC risk	poor vs inter/favor	0.1408		
LDH	> 235 vs ≤ 235 IU/L	0.0266	3.92 (1.37-10.80)	0.0123
NLR	> 3.9 vs ≤ 3.9	0.4240		
LMR	≤ 3.5 vs > 3.5	0.0113		
PLR	> 134 vs ≤ 134	0.0017	7.95 (2.16-51.64)	0.0008

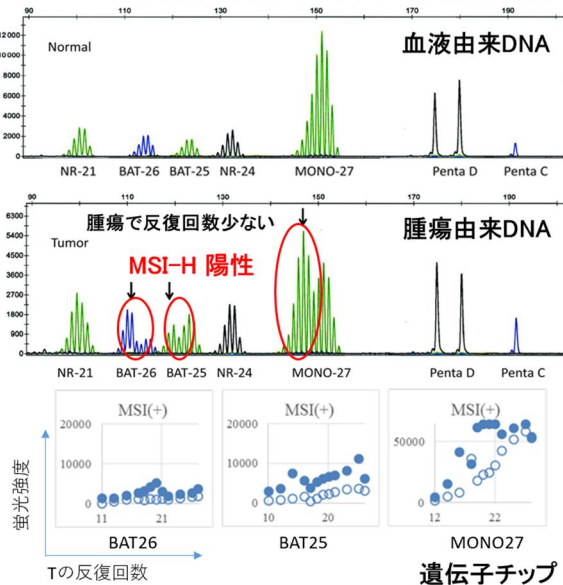


Yamamoto Y, Matsuyama H: Jpn J Clin Oncol 2020

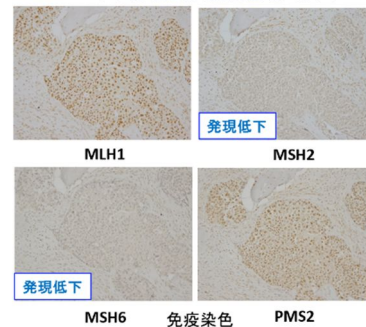
(2) 泌尿器癌の腫瘍因子に着目した抗 PD-1 抗体の MSI 関連治療効果予測因子として、尿路上皮癌 30 例、腎細胞癌 30 例の腫瘍由来 DNA と血液由来 DNA を使用し、マイクロサテライト領域 (BAT-25、BAT-26、NR-21、NR-24、MONO-27) の MSI 解析を、PCR ベースの電気泳動と遺伝子チップ (マイクロアレイ) を用いて行った (図3)。

抗 PD-1 抗体で完治した転移性 MSI-high 尿路上皮癌を認め (図3) そのメカニズムの検証として、ミスマッチ修復蛋白 (MLH1、MSH2、MSH6、PMS2) の発現を免疫染色にて評価したところ、原発腫瘍と転移腫瘍でミスマッチ修復蛋白の発現低下を認めた (図4)。CD8 の免疫染色では、腫瘍内に CD8 の高発現を認め、CD8⁺T 細胞が高度に腫瘍内に浸潤していることが示唆された (図5)。PD-L1 の免疫染色では、PD-L1 の発現は高度で (図5) MSI-high 尿路上皮癌で抗 PD-1 抗体の治療効果が高い原因の一つとなっていることが示唆された。

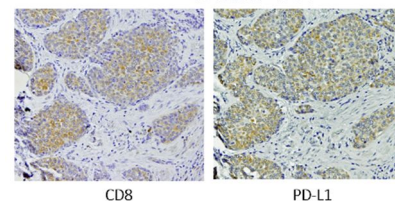
PCRベース電気泳動・遺伝子チップによるMSI解析 (図3)



ミスマッチ修復蛋白発現解析 (図4)



CD8 & PD-L1発現解析 (図5)



更に、抗 PD-1 抗体著効例に対する網羅的解析によるバイオマーカーの開発として、全エクソームシーケンスを用いた網羅的解析を行った。MSI-high 尿路上皮癌の原発腫瘍と転移腫瘍で、MSH2 ミスマッチ修復遺伝子の変異 c.1351C>T (p.Gln451Ter) を認めたと、生殖細胞系列変異は認められなかった (図 6)。

ミスマッチ修復遺伝子変異 (図6)

Microsatellite Instability (MSI), mismatch repair (MMR) protein expression, and MMR gene mutation

Location	MSI	MMR expression	MMR somatic mutation	MMR germline mutation
Bladder tumor	MSI-H*	MSH2/MSH6 loss	<i>MSH2</i> c.1351C>T (p.Gln451Ter)	None
Metastasis	MSI-H	MSH2/MSH6 loss	<i>MSH2</i> c.1351C>T (p.Gln451Ter)	None

*MSI-H, high-frequency microsatellite instability

以上の結果より、尿路上皮癌における MSI-high とミスマッチ修復遺伝子の変異、更に、ミスマッチ修復蛋白の減少が、尿路上皮癌に対する抗 PD-1 抗体の治療効果を予想するバイオマーカーになり得る可能性が示唆された。

(3) 泌尿器癌の環境因子に着目した抗 PD-1 抗体の治療効果予測因子として、抗 PD-1 抗体にて治療された尿路上皮癌、腎細胞癌 73 例に対する、口腔内と便 (消化管) 中のマイクロバイオームの解析を、菌由来 DNA を用いて次世代シーケンサーにて網羅的に行った。

口腔内と便 (消化管) 中の細菌の同定が完了し、現在、それらの細菌と、抗 PD-1 抗体で治療された患者の末梢血単核細胞のリンパ球/単球比、リンパ球数等の宿主因子や、抗 PD-1 抗体との治療効果、無増悪生存期間や全生存期間等の予後との比較検討を行っているところである。

< 引用文献 >

Yoshiaki Yamamoto, Hideyasu Matsuyama, Hiroaki Matsumoto, et al. Prognostic value of risk stratification using blood parameters for nivolumab in Japanese patients with metastatic renal-cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol.* 2020 17;50(2):214-220

Yoshiaki Yamamoto, Junji Yatsuda, Mototsugu Shimokawa, et al. Prognostic value of pre-treatment risk stratification and post-treatment neutrophil/lymphocyte ratio change for pembrolizumab in patients with advanced urothelial carcinoma. *Int J Clin Oncol.* 2021 Jan;26(1):169-177

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoshiaki Yamamoto, Junji Yatsuda, Mototsugu Shimokawa, Nakanori Fuji, Akihiko Aoki, Shigeru Sakano, Mitsutaka Yamamoto, Akinobu Suga, Yasuhide Tei, Satoru Yoshihiro, Seiji Kitahara, Kazuhiro Nagao, Kimio Takai, Yoriaki Kamiryo, Jumpei Akao, Shiro Yamaguchi, Kazuo Oba, Tomoyuki Shimabukuro, Hiroaki Matsumoto, et al	4. 巻 26
2. 論文標題 Prognostic value of pre-treatment risk stratification and post-treatment neutrophil/lymphocyte ratio change for pembrolizumab in patients with advanced urothelial carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 169 ~ 177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10147-020-01784-w	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 -
1. 著者名 Yamamoto Yoshiaki, Matsuyama Hideyasu, Matsumoto Hiroaki, Sakano Shigeru, Fuji Nakanori, Oba Kazuo, Yamamoto Mitsutaka, Kamiryo Yoriaki, Hiragino Takeshi, Nagao Kazuhiro, Takai Kimio, Aoki Akihiko	4. 巻 50
2. 論文標題 Prognostic value of risk stratification using blood parameters for nivolumab in Japanese patients with metastatic renal-cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 214 ~ 220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jjco/hyz168	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 -
1. 著者名 山本義明、栗林智枝子、小澤翔、佐本征弘、森純一、井上亮、矢野誠司、平田寛、松本洋明 松山豪泰	4. 巻 82
2. 論文標題 転移性尿路上皮癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の治療効果について	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 西日本泌尿器科	6. 最初と最後の頁 61-65
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4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山本 義明、小澤 翔、佐本 征弘、森 純一、井上 亮、矢野 誠司、平田 寛、松本 洋明、松山 豪泰
2. 発表標題 ニボルマブにて治療された転移性腎細胞癌に対する血液検査を用いたリスク分類と予後予測
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本義明、松山豪泰
2. 発表標題 転移性尿路上皮癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の臨床的因子による治療効果予測
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本義明
2. 発表標題 尿路上皮癌に対する免疫チェックポイント阻害剤の分子生物学的考慮
3. 学会等名 第71回西日本泌尿器科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiaki Yamamoto, Hideyasu Matsuyama, Hiroaki Matsumoto, Shigeru Sakano, Nakanori Fuji, Kazuo Oba, Mitsutaka Yamamoto, Yoriaki Kamiryo, Takeshi Hiragino, Kazuhiro Nagao, Kimio Takai, Akihiko Aoki
2. 発表標題 Prognostic value of risk stratification using blood biochemical parameters in Japanese patients with metastatic renal cell carcinoma treated by nivolumab
3. 学会等名 Genitourinary Cancers Symposium - ASCO Meetings（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山本義明, 松山豪泰	4. 発行年 2021年
2. 出版社 日本臨牀	5. 総ページ数 118
3. 書名 特集 膀胱癌 -最近の診断と治療- : 尿路上皮癌における免疫チェックポイント阻害薬の予後予測因子	

〔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	恒富 亮一 (Tsunedomi Ryouichi) (10420514)	山口大学・医学部附属病院・講師 (15501)	
研究分担者	藤田 悠介 (Fujita Yusuke) (40509527)	山口大学・大学院創成科学研究科・准教授 (15501)	
研究分担者	碓 彰一 (Hazama Shoichi) (50253159)	山口大学・医学部・教授(連携講座) (15501)	
研究分担者	松山 豪泰 (Matsuyama Hideyasu) (70209667)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	

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