

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09739

研究課題名(和文) 転移性腎がん免疫治療への血中循環腫瘍細胞とレパトア解析によるバイオマーカー探索

研究課題名(英文) Search for biomarkers on immunotherapy for metastatic renal cancer by using circulating tumor cells and repertoire analysis

研究代表者

永田 政義 (Nagata, Masayoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00323668

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)：進行腎細胞がんに対する免疫チェックポイント阻害薬療法(10)の患者から、血中循環腫瘍細胞(CTC)を採取し、関連分子発現を解析する。また患者側免疫学的解析として、末梢血レパトア解析での網羅的解析を行い、効果予測や重篤な免疫関連有害事象(irAE)予測因子などバイオマーカー探索する。10治療前患者からのCTCでPD-L1やEGFRなど関連分子発現を検出しえたが、現在の観察期間では有効性予測には至らなかった。10併用療法施行した解析可能な6例に関して、高容量シグナル使用irAE 3例と起こさなかった3例にて、末梢血B cell/T cellレパトア解析dataから現在統計学的解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今までの研究は、がん細胞における分子異常や遺伝子異常から抗がん剤の効果予測・評価する研究が主体であった。免疫治療の有効性や免疫関連有害事象に関与するのは、がん側の要素に加えて、患者側の免疫環境も重要である。本研究の特徴は、2方向のアプローチで行なった。一つは、がん側の遺伝子変異や分子発現解析を末梢血liquid biopsyによって行ない、もう一方は、患者宿主免疫機能の側面からTCR/BCRレパトア解析を用いた。それぞれの解析手法も独自の手法を用いた。dataは複雑であるが、免疫側からのアプローチによって有効性や有害事象を予測しうるバイオマーカー開発は現在の免疫治療時代に有用となりうる。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor cells (CTC) were collected from patients with immune checkpoint inhibitor therapy (10) for advanced renal cell carcinoma and analyzed for expression of related molecules. In addition, as a patient-side immunological analysis, comprehensive analyses are performed by repertoire analysis from peripheral blood, and biomarkers such as effect prediction and serious immune-related adverse events(irAE) predictors are searched. Expression of related molecules such as PD-L1 and EGFR could be detected by CTC from patients before 10 treatment, but the efficacy was not predicted during the current observation period. Of the 6 analyzable patients who underwent 10 combination therapy, 3 patients who used high-dose steroid due to severe irAE and 3 patients who did not use it are currently undergoing statistical analysis from peripheral blood B cell / T cell repertoire analysis data.

研究分野：進行腎がんへの薬物治療

キーワード：腎細胞がん 免疫チェックポイント阻害薬 血中循環腫瘍細胞 レパトア解析 抗CTLA-4抗体 抗PD-1抗体

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

進行腎細胞がんに対する免疫チェックポイント阻害薬治療(I0 治療)として、抗 PD-1 抗体 Nivolumab と抗 CTLA-4 抗体 Ipilimumab が適応承認を得た。長期効果が得られる症例もあり、全生存率(OS)を延長できた。しかし、とくに Ipilimumab は重篤な免疫関連有害事象(irAE)を引き起こしうる。今までの研究は、がん細胞における分子異常や遺伝子異常から抗がん剤の効果を予測・評価する研究が主体であった。免疫治療の有効性や免疫関連有害事象に関与するのは、がん側の要素に加えて、患者側の免疫環境も重要である。現在、腎がん I0 治療に有効性と安全性を予測しうる有用なバイオマーカーはなく、この確立には、がん側の遺伝子発現と患者免疫側のプロファイルの両側からのアプローチが必要である。

近年、がん領域で注目されているのが Liquid biopsy 研究である。侵襲が少ない末梢血採血からの解析であり、手術摘除組織標本と違って、治療経過によって継時的な解析が可能である。末梢血に存在する血中循環腫瘍細胞 CTC での解析は、原発巣の組織からの解析に比べ、今後がんの進展と予後を最も反映する治療標的であると考えられる。腎がん研究における CTC 解析は、他がん種に比べるとまだ臨床的な段階になっておらず、本研究はその臨床応用への足がかりとなる研究である。

### 2. 研究の目的

本研究は、I0 治療を施行される腎がん患者から、腫瘍側の解析として患者からの末梢血から CTC を回収して用い、薬剤の標的分子発現やがん抗原、とくに PD-L1 分子などの免疫チェックポイントの関連分子発現を解析する。また患者側の免疫学的な解析として、末梢血レパトア解析での網羅的解析を行い、薬剤効果予測や重篤な irAE 予測因子など有効な個別化 I0 治療に向けてのバイオマーカー探索を目標とする。

### 3. 研究の方法

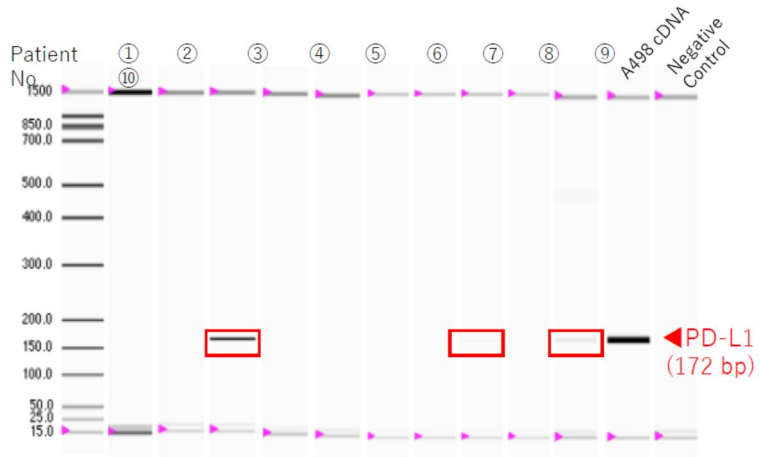
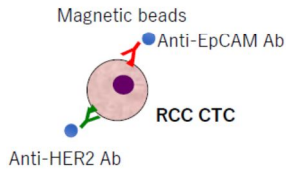
本研究は、2方向のアプローチで行なうのが特徴である。一つは、がん側の遺伝子変異や分子発現解析、もう一方は、患者宿主免疫機能の側面から解析する。それぞれの解析手法も独自の手法を用いる。がん側の遺伝子発現や抗原発現解析は、手術や生検組織標本ではなく、末梢血 liquid biopsyによって行なう。CTC回収の手法として、AdnaTest (Qiagen社)およびCytoQuest (Abnova社)を用いた。RCC患者の末梢血からCTCを回収し、PD-L1,2など免疫チェックポイント関連分子やがん抗原分子発現を解析する。また患者免疫側の解析手法として、TCR/BCRレパトア解析を用いる。Repertoire Genesis社の非バイアス次世代レパトア解析を利用する。

### 4. 研究成果

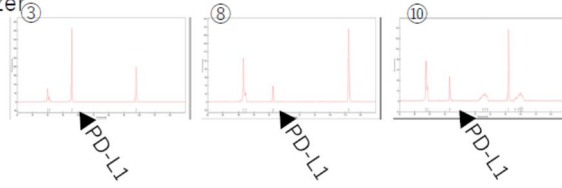
初年度は主にCTC回収および解析をメインに行なった。実際に進行転移性RCC患者でのCTC回収率やそれからの分子発現解析が可能かどうかを検証した。I0治療前の進行腎がん症例25例に対して、AdnaTestを用いCTCにおけるPD-L1などの発現を解析した。うち13例にはCytoQuestでもCTC検出を試みた。臨床因子ではPD-L1発現と相関するものは同定できなかった。また関連分子発現を検出しえたが、現在の観察期間ではどの因子も有効性予測には至らなかった。

# mRCC症例のCTCにおけるPD-L1発現

## AdnaTest



## EXPERION bio-analyzer



## CTC分子発現 (AdnaTest)

No.	年齢・性	Line	前治療	CTC number (CytoQuest)	PD-L1	EGFR
1	71 F	0	None	0		
2	60 M	3	Axitinib	0		
3	75 F	1	Pazopanib	0		
4	76 M	1	Sunitinib	0		
5	73 M	0	None	0	陽性	陽性
6	75 M	4	Everolimus	4	陽性	
7	62 M	0	None	4		
8	61 M	1	Temsirolimus	10		
9	72 M	1	Temsirolimus	15		
10	76 M	2	Axitinib	15		陽性
11	72 M	2	Pazopanib	20		
12	85 F	0	None	30		
13	72 M	4	Sorafenib	920		
14	68 M	3	Sorafenib			
15	70 M	2	Sorafenib			
16	64 M	2	Everolimus			
17	54 M	1	Sunitinib		陽性	
18	80 M	2	Axitinib		陽性	
19	73 M	3	Sunitinib		陽性	
20	63 F	1	Sunitinib			
21	78 M	4	Pazopanib		陽性	
22	61 M	1	Pazopanib		陽性	
23	53 M	3	Pazopanib			
24	74 M	2	Sunitinib			
25	66 F	3	Axitinib		陽性	

PD-L1陽性  
7 / 25 (28%)

■ PD-L1 陽性  
■ EGFR 陽性  
■ 未測定

Baseline character	PD-L1 negative (N=18)	PD-L1 positive (N=7)	P-value
Age (years) median (range)	71.5 (53-85)	73 (54-80)	0.673
Sex (male/female)	Male 13/ Female 5	Male 6/ Female 1	0.637
Time since diagnosis (y) median (range)	6.34 (0-27.9)	6.25 (0.08-12.1)	0.627
Presence of liver meta (y/n) N (%)	Yes 2 (11.1%) No 16 (88.9%)	Yes 2 (28.6%) No 5 (71.4%)	0.549
Presence of lung meta (y/n) N (%)	Yes 12 (66.7%) No 6 (33.3%)	Yes 5 (71.4%) No 2 (28.6%)	>0.999
Presence of bone meta (y/n) N (%)	Yes 10 (55.6%) No 8 (44.4%)	Yes 4 (57.1%) No 3 (42.9%)	>0.999
Presence of LN meta (y/n) N (%)	Yes 3 (16.7%) No 15 (83.3%)	Yes 4 (57.1%) No 3 (42.9%)	0.066
Previous nephrectomy (y/n) N	Yes 11 (61.1%) No 7(38.9%)	Yes 5 (71.4%) No 2 (28.6%)	>0.999
Prior use of TKI (y/n) N (%)	Yes 13 (72.2%) No 5 (27.8%)	Yes 6 (85.7%) No 1 (14.3%)	0.637
Prior use of IFN (y/n) N (%)	Yes 5 (27.8%) No 13 (72.2%)	Yes 2 (28.6%) No 5 (71.4%)	>0.999

Fisher's exact test was used for categorical variables, and Wilcoxon Mann-Whitney test was used for continuous variables.

次年度以降はIpilimumab+Nivolumabの10併用療法を1st lineで治療した患者より、レパトア解析結果と、がんへの有効性や免疫関連有害事象の有無など、臨床経過を比較検討する。解析可能な6例に関して、2021年度にIpilimumab+Nivolumabの投与前とIpilimumab 4回投与後において、末梢血から採血し、1症例につき投与前後のペアサンプルで末梢血レパトア解析を依頼した。Ipilimumabの4回投与は全ての症例に終え、3例で免疫関連有害事象を発症した。各症例について解析する各臨床因子と経過のdatabaseを作成した。高容量マイクロイドの使用を余儀なくされた免疫関連有害事象を起こした3例と起こさなかった3例において、末梢血B cell/T cellレパトア解析dataから現在統計学的解析中である。dataは複雑であるが、免疫関連有害事象を予測しうるプロファイルや免疫治療の有効性を予測しうるプロファイルを統計学的に探索している。

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 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永田 政義
2. 発表標題 腎がんにおけるリキッドバイオプシー、現状と課題ならびに薬物療法について
3. 学会等名 第6回 Liquid Biopsy研究会(招待講演) (招待講演)
4. 発表年 2022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	長屋 直哉  (Nagaya Naoya)  (10795024)	順天堂大学・医学部・助教    (32620)	
研究分担者	堀江 重郎  (Horie Shigeo)  (40190243)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授    (32620)	

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