

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09550

研究課題名（和文）変異SETD2の機能喪失メカニズムの解析と腎癌に対する免疫療法への応用

研究課題名（英文）Analysis of the loss-of-function mechanism of mutant SETD2 and its application to immunotherapy for the patients with renal carcinoma

研究代表者

稲元 輝生（Inamoto, Teruo）

大阪医科薬科大学・医学部・准教授

研究者番号：20330087

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：10%以上の頻度で遺伝子変異を来す上位の遺伝子（VHL；71.40%、PBRM1；57.10%、SETD2；42.90%、KDM5C；20.00%、TTN；17.10%、CACNA11；17.10%、BAP1；14.30%、DYNC111；11.40%、MTOR；11.40%）に関して1744人（1813検体）のccRCCデータベースを包括的に解析して、遺伝子変異体がccRCC患者の生存に与えるインパクトを評価した。腎癌での体性変異が最も患者生存に与えるインパクトはSETD2が最も高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いずれの腎癌免疫療法も効果が限定的である理由と解決のヒントは不明である。有力な原因遺伝子を同定し、将来、治療感受性を向上できるのであろうか。腎癌の分子病態の全容解析からすでに重要性が判明しているSETD2の免疫療法における役割の解析は直ちに取組まないといけないもので、その結果は社会に還元できるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Top genes that cause gene mutations at a frequency of 10% or more (VHL; 71.40%, PBRM1; 57.10%, SETD2; 42.90%, KDM5C; 20.00%, TTN; 17.10%, CACNA11; 17.10%, BAP1; 14.30%, We comprehensively analyzed the ccRCC database of 1744 people (1813 samples) regarding DYNC111; 11.40%, MTOR; 11.40%) to assess the impact of genetic variants on the survival of ccRCC patients. SETD2 had the highest impact on patient survival among somatic mutations in renal cancer.

研究分野：泌尿器悪性腫瘍

キーワード：転移性腎癌 遺伝子変異 機能喪失

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腎細胞癌 (aRCC) に対する免疫チェックポイント阻害薬 **immune checkpoint inhibitor (ICI)** は生存延長のメリットから国内外のガイドラインで高い推奨度を付与されている。しかし、ICI はいずれも奏効率が 4 割に達することはまれで治療効果の底上げが必要である。

2. 研究の目的

転移性の腎細胞癌 (aRCC) に対する免疫チェックポイント阻害薬 **immune checkpoint inhibitor (ICI)** は生存延長のメリットから国内外のガイドラインで高い推奨度を付与されている。しかし、ICI はいずれも奏効率が 4 割に達することはまれで治療効果の底上げが必要である。**BRAF** に対する阻害薬の併用で免疫療法の治療効果の向上がメラノーマでは実現されている一方で、腎癌は **BRAF** の変異がなく、アプローチを変える必要がある。本研究では腎癌の遺伝学的背景が検索可能な 7 つのコホート研究からバイオインフォマティクスのツールを用いて患者生存を予測するターゲットを絞り、対象遺伝子 **SETD2** に着目した。先行研究で **SETD2** 変異は腎癌の発癌初期ではなく癌の進展に関わることが示されたが免疫療法時代における役割の解析は今までなかった。本研究では、抑制遺伝子と考えられる **SETD2** の癌細胞内での機能欠損変異により腫瘍微小環境への T 細胞浸潤が減少する“コールド”な腫瘍となることを示す。

3. 研究の方法

SETD2 の機能解析； **SETD2** 不活性化がどのように T 細胞浸潤に影響を与えているのかを評価するために、**SETD2** の機能欠損変異体のケモカイン遺伝子群の発現を調べる。腎癌細胞株である **786-O** (コスモバイオ) を実験に使用する。**SETD2** は殆どのヒト腎癌細胞株で発現が認められるとされているので (Molecular Cancer. 2016; 15: 83)、まず、**SETD2** 欠損体を **zinc finger nuclease (ZFN)** 法を用いて作成する (CompoZr Targeted Integration Kit - AAVS1; Sigma-Aldrich)。**SETD2** 遺伝子が導入された **786-O** に、**SETD2** 配列をターゲットとする **ZFN** 発現 mRNA をエレクトロポレーションにより導入する。**ZFN** によるターゲット配列の切断・変異は **CEL-1 nuclease assay** により検出する。**SETD2** の発現強度の変化および欠損 (null) 細胞の出現頻度はフローサイトメトリー (BD) で解析する。ターゲット領域の切断・変異が確認された **ZFN** 処理細胞集団から、**SETD2** null 細胞をクローニングして遺伝子変異を DNA 解析により決定する。**Truncating** 変異を有する **SETD2** 野生型、あるいは **SET** ドメイン変異体 (**R1625C**) 配列は **786-O SETD2 null** 細胞を用いて作成する。遺伝子発現を **786-O SETD2 +/+**、**786-O SETD2 null**、**786-O SETD2 -/-** で比較する。そして重複する発現を調査してドメイン変異体が機能欠損変異であるかどうか確認する。そしてバイオインフォマティクスのツールセット **Blast2GO** を用いて **gene set enrichment analysis (GSEA)** を行い、免疫刺激に関わるサイトカイン (**IL12** など) や免疫抑制性のサイトカイン (**IL10** など) の集積の有無で **SETD2** の欠損が免疫応答を損なうことを証明する (代表者・分担者)。

4. 研究成果

aRCC に対する ICI として、本邦において抗 PD-1 抗体ニボルマブが二次治療に、CTLA-4 抗体であるイピリムマブとの併用療法が **IMDC intermediate/poor** リスクの aRCC に対する 1 次治療に承認され、欧米で抗 PD-1 抗体であるペンブロリズマブやアベルマブなどの ICI が既に臨床で使用されている。ICI は TKI と異なり一度奏功すれば持続的な治療効果を生じ、全生存期間 (OS) を増加させる。しかし、効果を示す症例は全体の 3 割台にとどまり、大多数の患者がこの治療の成果を享受出来ずに終わる。そのため、治療効果向上を目指した ICI と TKI を 1 次治療で併用する複合免疫療法の検討も行われていて、現代の腎癌治療の主役は免疫療法である。では、aRCC に対する ICI の奏効率はどうか向上するのであろうか。既報の網羅的研究で凡そ 100 例の淡明細胞型腎細胞癌 (ccRCC) の全エキソン塩基配列解析・RNA 塩基配列解析・遺伝子発現の解析・DNA メチル化解析から 28 の遺伝子が有意に変異を生じていて、**VHL**、**PBRM1**、**BAP1**、**SETD2** の変異率が特に高いことが示された上、ナンセンス変異やフレームシフト変異が多く、これらの遺伝子はがん抑制遺伝子として作用することが示唆された (Nature Genetics 2013; 45: 860)。しかし、これらの遺伝子を実際の治療に如何に応用するのかに関しては報告が皆無であった。2018 年に初めて aRCC に対する ICI 治療の反応性を遺伝子変異で予測する報告がなされ **PBRM1** の変異が ICI の反応低下の一因とされた (Science 2018; 359:801)。申請者らは、腎癌細胞表面抗原 **CD26** に対する抗腫瘍特異抗体の機能解析に取り組んで来た (Clin Cancer Res. 2006; 12: 3470)。その後、高親和性 Fab クローンを **human Fc** と融合させた新規の **humanized antibody (hum mAb)** を作製し、この新規 **hum mAb** の **Fc region** をヒトの **effector cells** が認識し抗体の効果を促進させることを報告した (Clin Cancer Res. 2007; 13: 4191)。この抗体はフランスで第 I/II 相の臨床試験において固形腫瘍に対する抗腫瘍効果を示したが、その効果は限定的であった (Br J Cancer. 2017; 116: 1126, Lancet Oncol. 2017; 2044)。腎癌、特に ccRCC で遺伝学的な全容解明がなされた今、次に大切なことは実臨床でこれら遺伝子をどのように生かせるかに尽きる。そのきっかけをつかむために、①ccRCC で特に高い頻度で変異を来す遺伝子のパネルと②ICI 治療を受けた患者で治療抵抗性を予測し得た遺伝子変異

のパネルを照らし合わせ、③解析可能な複数のデータベースを包括して ccRCC 生存を最も予測する遺伝子を絞り、機能を解析する手順を取る。腎癌、特に aRCC での ICI 治療を受けた患者での治療抵抗群の遺伝子変異同定からその機能解析まで証明した論文は現状で 1 報のみある (Science 2018 ; 359:801)。35 例の ICI 治療を施行された ccRCC の患者組織で全エクソーム解析がなされ、ICI 治療の抵抗性を司る遺伝子が同定された (Science 2018 ; 359:801)。我々は同コホートを見直し、10%以上の頻度で遺伝子変異を来す上位の遺伝子 (VHL ; 71.40%、PBRM1 ; 57.10%、SETD2 ; 42.90%、KDM5C ; 20.00%、TTN ; 17.10%、CACNA1I ; 17.10%、BAP1 ; 14.30%、DYNC1I1 ; 11.40%、MTOR ; 11.40%) に関して 1744 人 (1813 検体) の ccRCC データベースを包括的に解析して、遺伝子変異体が ccRCC 患者の生存に与えるインパクトを評価した。すると、腎癌での体性変異が最も患者生存に与えるインパクトは SETD2 が最も高かった。このように、ccRCC の遺伝学的背景の解析から、変異の頻度・生存に与える重要度がともに高く、さらに ICI の治療効果も予測する観点からターゲットを絞った方法に独自性があり、本研究を通して SETD2 の免疫担当細胞側ではなく腫瘍細胞側で機能解析ができれば、腫瘍組織の表現型から将来、臨床の場で免疫療法の順序などを決定することに発展させることが可能と考えられる。

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 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yano Y, Ohno T, Komura K, Fukuokaya W, Uchimoto T, Adachi T, Hirasawa Y, Hashimoto T, Yoshizawa A, Yamazaki S, Tokushige S, Nishimura K, Tsujino T, Nakamori K, Yamamoto S, Iwatani K, Urabe F, Mori K, Yanagisawa T, Tsuduki S, Takahara K, Inamoto T, Miki J, Kimura T, Ohno Y, Shiroki R, Azuma H.	4. 巻 14
2. 論文標題 Serum C-reactive Protein Level Predicts Overall Survival for Clear Cell and Non-Clear Cell Renal Cell Carcinoma Treated with Ipilimumab plus Nivolumab.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 5659-69.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14225659	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 該当する

1. 著者名 Inamoto T, Azuma H, Adachi H, Okayama Y, Sunaya T, Oya M.	4. 巻 18
2. 論文標題 Outcomes of sorafenib treatment of advanced renal cell carcinoma according to IMDC risk criteria: analysis of Japanese real-world data from postmarketing all-patient surveillance of sorafenib.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Future Oncol	6. 最初と最後の頁 1371-80.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2217/ fon-2021-1001.	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 該当する

1. 著者名 Inamoto T, Azuma H, Adachi M, Okayama Y, Sunaya T, Oya M.	4. 巻 18(11)
2. 論文標題 Outcomes of sorafenib treatment of advanced renal cell carcinoma according to International Metastatic Renal Cell Carcinoma Data Consortium risk criteria: analysis of Japanese real-world data from postmarketing all-patient surveillance of sorafenib.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Future Oncol .	6. 最初と最後の頁 1371-80.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2217/ fon-2021-1001.	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲元 輝生、東 治人。
2. 発表標題 今後の進行性尿路上皮癌の治療のトレンドと本邦でのIO治療の立ち位置
3. 学会等名 第71回泌尿器科学会中部総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲元輝生
2. 発表標題 RCC複合免疫療法の上乗せ相手を考える
3. 学会等名 腎細胞がん教育セミナー2021 ~ Immuno Oncology UPDATE ~
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲元輝生
2. 発表標題 Nivo + Ipi 併用療法による Durable response の価値
3. 学会等名 泌尿器腫瘍 I-O Seminar in 豊野
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲元 輝生、小村 和正、上原 博史、内本 泰三、伊夫貴 直和、能見 勇人、東 治人
2. 発表標題 淡明型腎細胞癌において免疫チェックポイント阻害剤の要となるBRAFの役割はあるのか？
3. 学会等名 日本泌尿器科学会中部総会
4. 発表年 2020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	東 治人 (Azuma Haruhito) (40231914)	大阪医科薬科大学・医学部・教授 (34401)	

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