

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16081

研究課題名(和文) 骨髄抑制によるMDSC低下を指標とした膵癌化学療法における新規予後マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of a novel prognostic marker for pancreatic cancer chemotherapy as an indicator of MDSC reduction due to myelosuppression.

研究代表者

藤井 宏典 (Fujii, Hironori)

岐阜薬科大学・薬学部・客員共同研究員

研究者番号：90775173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：重篤な好中球減少発現患者では、骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)が低下している可能性があり、抗がん薬の有効性指標となる可能性がある。
まずMDSC濃度測定系確立のため、ヒト培養白血病細胞HL60、NB4、KG-1を用いて条件検討を行い、フローサイトメトリー解析にて全ての細胞をCD11b+CD14⁻CD33⁺として分離できた。さらに、重篤な好中球減少をMDSC低下のサロゲートマーカーとし全生存期間(OS)との関連を検討した。トリフルリジン塩酸塩とベバシズマブの投与患者で、不死時間バイアスを考慮した時間依存性Cox回帰分析を行い、重篤な好中球減少とOSの延長が有意に関連することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)濃度測定系の確立を行ったのちに、トリフルリジンチピラシル塩酸塩とベバシズマブ併用療法の重篤な好中球減少をMDSCの低下のサロゲートマーカーと仮定し、治療効果との関連を検討した。本研究で、ヒト検体を用いてMDSCを測定することはコロナ禍でできなかったが、時間依存性COX回帰分析を用いて、重篤な好中球減少と治療効果との関連を明らかにできたことで、重篤な好中球減少を指標にしたがん化学療法の治療効果予測の可能性を高めることにつながった。今後ヒト検体を用いて、MDSC濃度を調べることで治療効果の向上に大きく貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Patients with severe neutropenia may have decreased myeloid derived suppressor cells (MDSC), which may be an indicator of the efficacy of anticancer drugs.

First, to establish a system for measuring MDSC concentration, we investigated conditions using three types of cultured human leukemia cells, HL60, NB4, and KG-1, and were able to isolate all cells as CD11b+CD14⁻CD33⁺ by flow cytometry analysis. In addition, severe neutropenia was used as a surrogate marker of MDSC decline and its association with overall survival (OS) was examined. Time-dependent Cox regression analysis with immortality time bias was performed in patients treated with trifluridine tipiracil hydrochloride and bevacizumab. Results showed that severe neutropenia was significantly associated with prolonged OS.

研究分野：臨床薬剤学

キーワード：重篤な好中球減少 MDSC がん化学療法 生存期間 フローサイトメトリー解析 不死時間バイアス 時間依存性Cox回帰分析

1. 研究開始当初の背景

好中球減少は、抗がん剤治療において見られる有害事象の1つである。我々はこれまでに膵癌のFOLFIRINOX療法(イリノテカン、オキサリプラチン、5-FU、レボホリナート：FX)において、重篤な好中球減少が発現した患者では、発現しなかった患者と比べて有意に生存期間が長いことを報告した¹⁾。さらにそのメカニズムのひとつとしてMyeloid derived suppressor cells (MDSCs)に着目した。MDSCsは、マクロファージ、樹状細胞、顆粒球といった単球系の細胞に分化すべき未熟な骨髄細胞が、がんや炎症によって血中やリンパ節等の二次リンパ組織に出現したものであり、免疫抑制作用を示すことが報告されている²⁾。MDSCsの生存期間への関与の程度はがん種によって異なるとされているが、膵がん患者では他のがん種と比較しても末梢血中のMDSCs増加の程度が大きく、その関与が多いと考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、膵がん患者の効果判定のバイオマーカーとして、好中球減少やPeripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)中のMDSCsの割合変化が化学療法の効果や生存期間に関連するかを明らかにすることである。

3. 方法

3.1. MDSCs濃度の測定系の確立

末梢血中のMDSCsは通常は1%程度であり、非常に少ないポピュレーションを検討する必要がある。そこでMDSCを安定して分離可能な測定系の確立を目指して検討を行った。通常MDSCsはPBMC中のCD11b+CD14-CD33+またはCD33+HLA-の細胞とされている。ヒトの血液検体を用いて、これらの細胞群を分離するのは難しいため、MDSCs同様にCD11b+CD14-D33+である3種のヒト培養白血病細胞HL60、NB4、KG-1を用いて条件検討を行うとともに、これらの細胞についてその性状を比較検討した。フローサイトメトリー解析にてすべての細胞をCD11b+CD14-CD33+として分離することができた。

3.2. 不死時間バイアスの考慮した好中球減少と生存期間の相関に関する検討

膵癌患者を対象としてPBMCを用いたMDSCs濃度の測定検討を行う予定であったが、コロナ禍で十分な膵癌患者の確保ができなかった。

一方、大腸癌においても、治療開始前のMDSC濃度が高い患者は低い患者と比較して、生存期間が有意に短いことが報告されている³⁾。そこで、重篤な好中球減少の発現頻度が極めて高いトリフルリジンチピラシル塩酸塩(TAS-102)とベバシズマブ(Bmab)併用療法に着目した⁴⁾。Bmab+TAS-102療法開始前の大腸癌患者の血液検体を用いて、MDSCs濃度の変化と好中球減少の関連について検討するも、そのPBMCの確保が困難であった。そのため、Bmab+TAS-102を投与された大腸癌患者の重篤な好中球減少をMDSCs低下のサロゲートマ

カーと仮定し、重篤な好中球減少と全生存期間(OS)との相関について不死時間バイアスの考慮した検討を行うこととした。本研究は岐阜大学大学院医学系研究科倫理審査委員会の承認を得て行った(承認番号:2021-A221)。

3.2.1 研究対象者および変数

研究対象者は、2016年3月から2021年6月の間にBmab+TAS-102が投与された大腸癌患者とした。主要評価項目はOSであり、Bmab+TAS-102の投与開始から死亡までの期間と定義した。無増悪生存期間(PFS)は、Bmab+TAS-102の投与開始から腫瘍の増悪が認められた日、または死亡した日までの期間と定義した。OSとPFSについては、追跡調査不能となった患者、または観察期間終了まで生存していた患者を打ち切った。腫瘍反応は、RECIST ver1.1に従って評価された。病勢コントロール率は、完全奏効または部分奏効、あるいは病勢安定を示した患者の割合と定義した。好中球減少は、CTCAE ver 5.0に従って評価し、グレード3以上の好中球減少を重篤な好中球減少と定義した。年齢やmodified Glasgow Prognostic Score (mGPS)などの潜在的な交絡因子は、解析において考慮した。

3.2.2 統計方法

本研究では、追跡調査期間中にグレード3以上の好中球減少を経験した患者を曝露群とした。しかし、これは不死時間バイアスの懸念をもたらす。この可能性に対処するため、一次解析では、ハザード比が時間経過とともに変化しないと仮定するのではなく、時間依存性Cox回帰モデルを用いた⁵⁾。時間に依存する共変量の生存曲線をグラフ化するために、Simon and Makuch法を用いた⁶⁾。このカプランマイヤー生存曲線は、単に固定共変量を仮定してカプランマイヤー曲線をプロットするよりも、生存曲線の差をより正確に表現することを可能にする。さらに、感度分析としてランドマーク分析⁷⁾を行った。本研究では、治療開始後30日、60日、90日、120日にランドマークを設定した。各ランドマーク後のアウトカムイベントは解析に含まれた。各ランドマーク以前にグレード3以上の好中球減少症を発症した患者は好中球減少症群に分類され、各ランドマーク以前にグレード3以上の好中球減少症を発症しなかった患者は非好中球減少症群に分類された。両群間の死亡に関するハザード比は、Cox比例ハザード回帰分析を用いて算出した。

本研究では、予想される効果について特定の仮説が予め設定されていなかったため、サンプルサイズの算出は行わなかった。データ解析は、Rソフトウェアバージョン4.2.2を用いて実施した。すべての分析において、 $p < 0.05$ を有意とした。

4 . 研究成果

4.1. 対象患者

Bmab+TAS-102を受けた転移性大腸癌患者80名から、TAS-102の初回投与量が減量された23名の患者を除外し、57名が組み入れられた。組み入れ患者全57名は、重篤な好中球減少発

現患者30人と重篤な好中球減少非発現患者27人に分けられた。最終解析には、適格基準を満たした57名の被験者全員が含まれた。

4.2. 全期間における生存解析および重篤な好中球減少の発現率

全患者において、追跡期間中央値は305日(四分位範囲：217-432)であった。OSの中央値は14.2カ月(95%CI[13.4-18.6])、PFSの中央値は6.8カ月(95%CI[5.2-10.2])であった。追跡期間中の重篤な好中球減少の発現率は52.6%(30/57人)であった。この30名のうち、Bmab+TAS-102の投与開始からの重篤な好中球減少の発現期間の中央値は56日であった。

4.3. 重篤な好中球減少の有無によるTAS-102とBmabの有効性の比較

重篤な好中球減少と生存率との関連性の評価における不死時間バイアスを防ぐため、時間変化するCox回帰モデル解析を実施した。生存期間中央値は、Simon and Makuch's modified Kaplan-Meier生存曲線を用いた。その結果、OS中央値は、重篤な好中球減少患者において15.3カ月(95%CI：14.1-NA)、重篤な好中球減少でない患者において10.0カ月(95%CI：8.1-NA)であった。時間依存性Cox回帰では、年齢とmGPSで調整した後、重篤な好中球減少が生存期間の延長と有意に関連していた(HR：0.42；[95% CI：0.19-0.89]，p=0.025)(図1A)。PFS中央値は、重篤な好中球減少がある患者とない患者でそれぞれ8.5カ月(95%CI：5.5-12.0)と5.3カ月(95%CI：3.5-9.2)であった。有意ではないが、重篤な好中球減少の患者はPFSが長い傾向にあった(HR:0.72；[95% CI：0.40-1.32]，p=0.3)(図1B)。

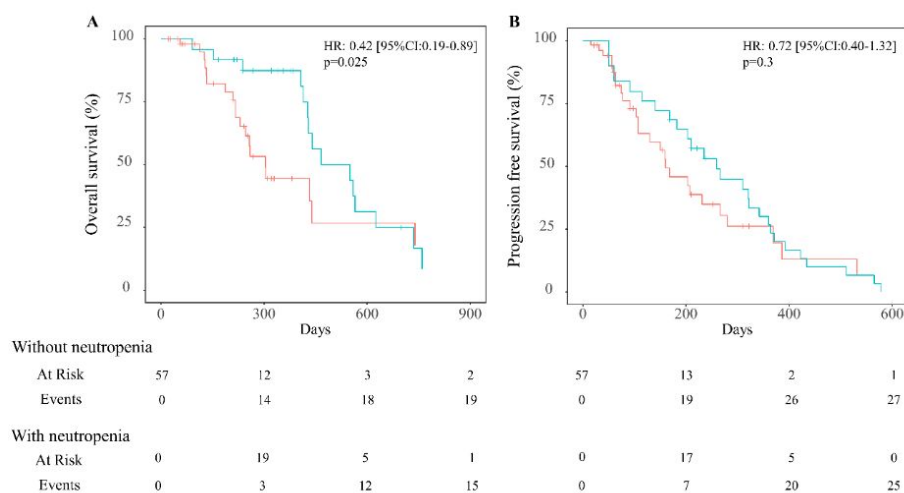


図1. TAS-102とBEVの併用療法を受けた大腸がん患者における全生存期間(A)と無増悪生存期間(B)のSimon and Makuch's modified Kaplan-Meier生存曲線。緑線：重篤な好中球減少が発現した患者、赤線：重篤な好中球減少が発現しなかった患者。

次に、30日、60日、90日、120日のランドマーク解析を行った。30日、60日、90日、120日

のランドマークにおける好中球減少症あり群となし群の生存時間中央値は、それぞれ19.6カ月(13.1-NA)と13.1カ月(7.5-17.4), 16.1カ月(12.1-NA)と12.2カ月(8.0-16.6), 15.1カ月(11.1-NA)と10.7カ月(5.5-21.3), および11.4カ月(10.2-NA)と 9.7カ月(4.5-20.4)であった。Cox比例ハザード解析では、30日、60日、90日、120日のランドマークにおけるOSに対する重篤な好中球減少のそれぞれのHRは0.30, 0.65, 0.39, 0.41であった(表1)。

表1. 30日、60日、90日、120日のランドマークにおけるグレード3以上の好中球減少症の有無による生存解析

Landmark time point, days	Number of patients ¹		Median survival time after landmark period, months ²		Hazard ratio ³ (95% CI)
	With grade \geq 3 neutropenia	Without grade \geq 3 neutropenia	With grade \geq 3 neutropenia	Without grade \geq 3 neutropenia	
30	9 (15.8)	48 (84.2)	19.6 (13.1-NA)	13.1 (7.5-17.4)	0.30 (0.10-0.90)
60	17 (30.4)	39 (69.6)	16.1 (12.1-NA)	12.2 (8.0-16.6)	0.65 (0.30-1.42)
90	23 (41.1)	33 (58.9)	15.1 (11.1-NA)	10.7 (5.5-21.3)	0.39 (0.17-0.90)
120	24 (44.4)	30 (55.6)	11.4 (10.2-NA)	9.7 (4.5-20.4)	0.41 (0.18-0.95)

¹ n (%)

² median (confidence interval)

³ Hazard ratio and 95% confidence interval was estimated by Cox proportional hazards regression adjusted age and mGPS

以上、本研究では、重篤な好中球減少をMDSCs低下のサロゲートマーカーと仮定し、不死時間バイアスに対応したアプローチを活用し、Bmab+TAS-102療法における重篤な好中球減少の発現と生存期間の有意な相関を明らかにすることができた。本研究成果は、好中球減少の発現頻度高い化学療法レジメンにおける、重篤な好中球減少を用いた治療効果予測マーカーの解明に大きく貢献できたと考える。今後、PBMC検体の確保が可能となり次第、MDSCsの測定を行い、がん化学療法の治療効果の解明を行っていくことで、MDSCsを用いた治療効果予測マーカーの確立につながると考えられる。

【参考資料】

1. Yamada Y, et al. *Cancers (Basel)*. 2018;10:454.
2. Lee CR, et al. *Int J Mol Sci*. 2018;19:869.3.
3. Limagne E, et al. *Cancer Res*. 2016;76:5241-52.
4. Pfeiffer P, et al. *Lancet Oncol*. 2020;21:412-420.
5. Suissa S. *Am J Epidemiol*. 2008;167:492-499.
6. Simon R, et al. *Stat Med*. 1984;3:35-44.
7. Putter H, *Stat Biosci*. 2017;9: 489-503.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Watanabe Daichi, Fujii Hironori, Yamada Yunami, Matsuhashi Nobuhisa, Makiyama Akitaka, Iihara Hirotohi, Takahashi Takao, Kiyama Shigeru, Kobayashi Ryo, Yoshida Kazuhiro, Suzuki Akio	4. 巻 26
2. 論文標題 Association of albumin-bilirubin score in patients with colorectal cancer receiving later-line chemotherapy with regorafenib	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1257 ~ 1263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-021-01910-2	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 OHATA KOICHI, FUJII HIRONORI, SADAKA SHIORI, KATO-HAYASHI HIROKO, IIHARA HIROTOSHI, KOBAYASHI RYO, UEMURA SHINYA, IWASHITA TAKUJI, SHIMIZU MASAHITO, SUZUKI AKIO	4. 巻 41
2. 論文標題 Comparison of Chemotherapy-induced Nausea and Vomiting Between Gemcitabine Plus Nab-paclitaxel Combination Chemotherapy and Gemcitabine Monotherapy in Patients With Advanced Pancreatic Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3643 ~ 3648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15154	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 Fujii Hironori, Koda Maaya, Sadaka Shiori, Ohata Koichi, Kato-Hayashi Hiroko, Iihara Hirotohi, Kobayashi Ryo, Ishihara Takuma, Uemura Shinya, Iwashita Takuji, Hayashi Hideki, Sugiyama Tadashi, Shimizu Masahito, Suzuki Akio	4. 巻 7
2. 論文標題 Anorexia, pain and peripheral neuropathy are associated with a decrease in quality of life in patients with advanced pancreatic cancer receiving outpatient chemotherapy ? a retrospective observational study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences	6. 最初と最後の頁 27
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40780-021-00210-1	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 Fujii Hironori, Ueda Yukino, Hirose Chiemi, Ohata Koichi, Sekiya Kumiko, Kitahora Mika, Sadaka Shiori, Yamamoto Senri, Watanabe Daichi, Kato-Hayashi Hiroko, Iihara Hirotooshi, Kobayashi Ryo, Kaburaki Miho, Matsuhashi Nobuhisa, Takahashi Takao, Makiyama Akitaka, Yoshida Kazuhiro, Hayashi Hideki, Suzuki Akio	4. 巻 8
2. 論文標題 Pharmaceutical intervention for adverse events improves quality of life in patients with cancer undergoing outpatient chemotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Health Care and Sciences	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40780-022-00239-w	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 Fujii Hironori, Araki Ayumu, Iihara Hirotooshi, Kaito Daizo, Hirose Chiemi, Kinomura Motohiko, Yamazaki Mizuki, Endo Junki, Inui Toshiya, Yanase Komei, Sasaki Yuka, Gomyo Takenobu, Sakai Chizuru, Kawae Daisuke, Kitamura Yu, Fukui Masachika, Kobayashi Ryo, Ohno Yasushi, Suzuki Akio	4. 巻 16
2. 論文標題 Cancer cachexia as a determinant of efficacy of first-line pembrolizumab in patients with advanced non-small cell lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mco.2022.2524	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 SATO YUKINA, IIHARA HIROTOSHI, KINOMURA MOTOHIKO, HIROSE CHIEMI, FUJII HIRONORI, ENDO JUNKI, YANASE KOMEI, KAITO DAIZO, SASAKI YUKA, GOMYO TAKENOBU, SAKAI CHIZURU, IWAI MASAMICHI, TSUBOI YOSHIKI, ISHIHARA TAKUMA, KOBAYASHI RYO, OHNO YASUSHI, SUZUKI AKIO	4. 巻 41
2. 論文標題 Primary Prophylaxis of Febrile Neutropenia With Pegfilgrastim in Small-cell Lung Cancer Patients Receiving Amrubicin as Second-line Therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1615 ~ 1620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.14923	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 YAMADA YUNAMI, MATSUHASHI NOBUHISA, FUJII HIRONORI, MAKIYAMA AKITAKA, IIHARA HIROTOSHI, TAKAHASHI TAKAO, WATANABE DAICHI, KIYAMA SHIGERU, KOBAYASHI RYO, SUZUKI AKIO, YOSHIDA KAZUHIRO	4. 巻 41
2. 論文標題 Impact of Anti-angiogenic Agents on Chemotherapy Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer: Second-line FOLFIRI Plus Bevacizumab or Aflibercept	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 533 ~ 541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.14805	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 WATANABE DAICHI、FUJII HIRONORI、MATSUHASHI NOBUHISA、IIHARA HIROTOSHI、YAMADA YUNAMI、ISHIHARA TAKUMA、TAKAHASHI TAKAO、YOSHIDA KAZUHIRO、SUZUKI AKIO	4. 巻 40
2. 論文標題 Dose Adjustment of Oxaliplatin Based on Renal Function in Patients With Metastatic Colorectal Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2379 ~ 2386
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.14207	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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