

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17182

研究課題名（和文）PD-1阻害薬の耐性化機構におけるMUC1の役割

研究課題名（英文）Importance of MUC1 in the mechanism of resistance for anti-PD-1 inhibitor

研究代表者

難波 将史（NAMBA, MASASHI）

広島大学・病院（医）・助教

研究者番号：40848090

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）：肺癌患者の血清KL-6とPD-1抗体の治療効果は相関するものの、KL-6の数値とPD-L1の発現程度は相関関係にはなかった。また、KL-6の免疫組織学的染色の結果も治療効果と相関するようなデータは得られなかった。肺癌細胞株を用いて、KL-6の発現をsiRNAでノックダウンすることでPD-L1の発現に変化が起こるかどうかをフローサイトメトリーで評価したが、明確な変化を確認することはできなかった。ただ、フローサイトメトリーの結果のみでKL-6とPD-L1との関係を否定できるわけではなく、今後の追加実験が必要と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害薬が効かない肺癌患者の中に血清KL-6が高値のものがあることがわかっており、KL-6が治療標的となりえるかどうかを探索する研究である。PD-L1発現との関連に着目して研究を行ったが、現状ではその関与を明らかにすることはできなかった。

研究成果の概要（英文）：Although there was a correlation between serum KL-6 and the therapeutic effect of the PD-1 antibody in patients with lung cancer, no correlation was found between the KL-6 values and the level of PD-L1 expression. Moreover, data from the immunohistochemical staining of KL-6 did not show a correlation with the therapeutic effect.

We used flow cytometry to evaluate whether there would be any changes in PD-L1 expression when KL-6 expression was knocked down with siRNA in lung cancer cell lines, but we were unable to confirm any clear changes. However, it should not be concluded that there is no relationship between KL-6 and PD-L1 based solely on the results of the flow cytometry. It is considered necessary to conduct additional experiments in the future.

研究分野：Lung cancer

キーワード：MUC1 KL-6 PD-L1 PD-1 antibody

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害薬である PD-1 阻害薬は、腫瘍細胞の PD-L1 発現が高発現である癌患者に対して有効であることが知られている。しかし、PD-L1 が高発現であるにも関わらず治療効果を得られない患者も半数以上存在しており、こうした患者では PD-1/PD-L1 経路以外に免疫逃避を引き起こす経路が存在していると予想される。そのため、現在世界中で治療効果を予測する新規バイオマーカーの探索や耐性機序を明らかにするための研究が行われている。

申請者は、MUC1 (Mucin 1) という糖蛋白が癌細胞の免疫逃避に寄与していることを報告してきた (Namba et al. Cancer Lett 2019)。MUC1 は細胞外ドメインが巨大な糖蛋白であることから、LAK 細胞活性や trastuzumab を介した抗体依存性細胞傷害 (ADCC) などの免疫学的細胞傷害活性を物理的に阻害している。また、MUC1 は細胞外ドメインだけではなく、細胞内ドメイン (MUC1-C) も細胞内シグナルを介して、薬剤耐性や免疫逃避の促進に関わっていることが知られている。このように MUC1 は癌細胞の免疫逃避に強く関わっている一つの因子であるにも関わらず、PD-1 阻害薬との関係についてはいまだ検討されていない。

2. 研究の目的

PD-L1 が高発現にも関わらず、PD-1 阻害薬の治療効果が得られないような症例において、どのような免疫逃避経路が関わっているかについては諸説報告されているもののまだ一定のコンセンサスは得られていない。

本研究の目的は、MUC1 が PD-1 阻害薬を介した免疫細胞の免疫応答 (抗腫瘍効果) にどのような影響を与えているのか、つまり耐性獲得 (免疫逃避) に関わっているかどうかを明らかにすることである。さらに、MUC1 が治療標的となりうるかどうかも評価する。

3. 研究の方法

(1) 肺癌患者における PD-L1 および MUC1 (KL-6) の評価

まず、2015 年～2018 年の間に当院で Nivolumab および Pembrolizumab による治療を受けた肺癌患者 125 名を抽出し、血清中 KL-6 などの検査データや治療期間、無増悪生存期間などの臨床データを診療録から収集する。で選定した肺癌患者のうち、当院に病理組織検体が保存されている症例を抽出し、これらの組織を用いて連続切片を作製し、KL-6 と PD-L1 の免疫染色を行う。KL-6 については既報の分布形態 (Apical, Circumferential, Cytoplasm) やスコアリング法 (0~+++) で染色の程度を評価し、PD-L1 は Tumor Proportion Score (TPS) を利用して、染色の程度をスコアリングする。スコアリングした KL-6 の染色の程度が、血清中の KL-6 と相関することを確認する。また、KL-6 の染色の程度と PD-L1 の TPS やその他の臨床所見 (奏効率や無増悪生存期間など) との相関も確認する。

(2) 肺癌細胞株における MUC1 (KL-6) の発現と Nivolumab の治療効果の評価

胸水を有する肺癌患者のうち、事前に同意が得られた患者から胸水を採取し、初代培養で肺癌細胞株を樹立させる。あるいは樹立された肺癌細胞株を購入し、これらの細胞株の細胞表面上に発現している PD-L1 および MUC1 (KL-6) の発現程度をフローサイトメトリー技術を用いて、評価する。また、PD-L1 と MUC1 (KL-6) の細胞表面上の分布形態も共焦点顕微鏡や生細胞イメージング技術を用いて観察する。

PD-L1 を発現している樹立させた肺癌細胞株を用いて、同一患者由来のリンパ球の免疫応答が Nivolumab の投与によって増強されるかどうかを、MUC1 (KL-6) が高発現あるいは低発現の細胞株で比較する。評価方法としては、ELISPOT および 51Cr 遊離試験を予定している。MUC1 (KL-6) が高発現と低発現の細胞株をそれぞれ複数株ずつ準備できることが望ましいが、もしいずれかの細胞株しか得られなかった場合には、siRNA やレトロウイルスを用いた遺伝子操作によって、MUC1 (KL-6) の発現量を変化させた評価も行う。MUC1 (KL-6) の発現量によって Nivolumab に対する感受性が変化するかどうかを確認する。もし、変化した場合には、MUC1 が影響を与えることが知られている PI3K/Akt 経路や Fas/TRAIL などの細胞内シグナルに実際にどのような影響を与えているかなどをウエスタンブロット法や免疫沈降法などで確認し、そのメカニズムを探索する。

4. 研究成果

(1) 肺癌患者における PD-L1 および MUC1 (KL-6) の評価

125 名の肺癌患者の年齢中央値は 67 歳、男女比は男 86 名、女 39 名であった (表 1)。PD-L1 は IHC 22C3 pharmDX 「ダコ」を用いて、TPS で評価し、0% が 7 例、1-49% が 39 例、50% 以上が 50 例、評価できなかったものが 29 例であった。投与された免疫チェックポイント阻害薬は Nivolumab と Pembrolizumab それぞれ 65 名、60 名であった。また、最大治療効果はそれぞれ PR/SD/PD が 36/37/52 であった。KL-6 の免疫組織化学染色を実施できたものは 74 例であった。

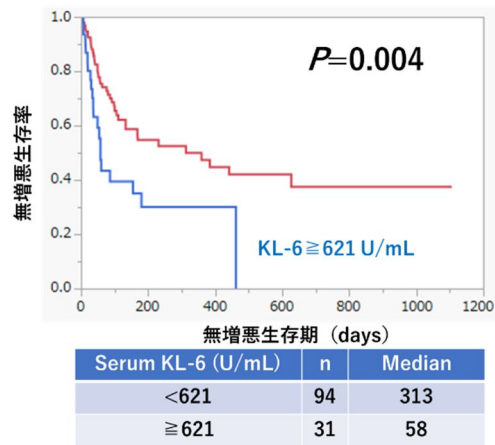
表1. 患者背景

	n=125
年齢 (years, median ± SD)	67 ± 10.0
性別 (男/女)	86/39
PS (0/1/2/3/4)	33/75/13/3/1
組織型 (Ad/Sq/Others)	87/27/11
PD-L1 TPS (0%/1-49%/50% ≤ /不明)	7/39/50/29
治療前KL-6 (U/mL, median ± SD)	381 ± 2098.9
治療薬剤 (Nivolumab/Pembrolizumab)	65/60
薬剤の導入Line (1/2/3次以降)	22/47/56
最大治療効果 (PR/SD/PD)	36/37/52
PFS (days, median, 90%C.I.)	86 (19.6-511)
OS (days, median, 90%C.I.)	266 (38.2-831)
KL-6の分布 (Ad, Apical/Cytoplasm) (n=54)	28/26
KL-6の染色の強さ (Sq, Hi/Low) (n=20)	13/7

扁平上皮癌は全例Cytoplasmの分布形態であったため、分布形態ではなく、染色の強さ(HiあるいはLow)で評価した。腺癌の分布はApical/Cytoplasmが28/26例であった。扁平上皮癌の染色の強さはHi/Lowが13/7であった。

ROCカーブを用いてKL-6のカットオフを621U/mLと設定した場合、KL-6高値群は低値群と比べて優位にPFSが短かった(図1)。一方で、PD-L1の発現と血清KL-6、KL-6の免疫染色の分布あるいは染色の強さと予後の相関は見られなかった。

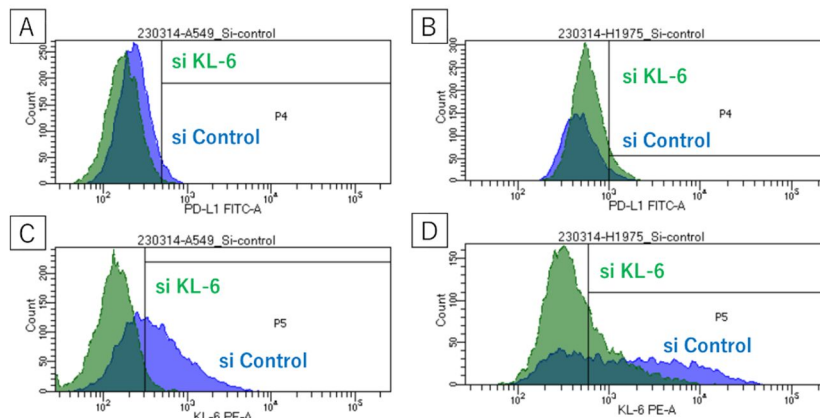
図1. 無増悪生存期間



(2) 肺癌細胞株におけるMUC1 (KL-6)の発現とNivolumabの治療効果の評価

本来は肺癌患者の胸水細胞から肺癌細胞株を樹立させる予定であったが、コロナ禍の影響もあり、実際に実験に用いることのできるような検体の採取は難しかった。そのため、複数の肺癌細胞株(A549, HCC827, H1975)を購入し、PD-L1およびKL-6の発現をフローサイトメトリーを用いて評価した。A549はKL-6が高発現している一方で、PD-L1の発現は殆ど見られなかった。H1975はKL-6が発現しており、PD-L1も少し発現していた。これら2つの細胞株に対してsiRNAを用いて、KL-6をノックダウンしたところ、両者ともにKL-6の発現は抑制された(図2C, D)もののPD-L1の発現に大きな変化は得られなかった(図2A, B)。

図2 細胞株のPD-L1、KL-6発現



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 1件）

1. 著者名 Masatomo Ueda, Masashi Namba, Kentaro Tokumo, Tadashi Senoo, Wataru Okamoto, Masami Yamauchi, Noboru Hattori, Kazuhiko Sugiyama	4. 巻 14
2. 論文標題 Conversion from Positive to Negative EGFR Mutation due to Clonal Selection during Long-Term Treatment with Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors: A Case Report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Case Reports in Oncology	6. 最初と最後の頁 1447-1453
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000518246	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 大崎 慶子, 難波 将史, 徳毛 健太郎, 三谷 英範, 帖佐 啓吾, 山内 理海, 岡本 渉, 粟井 和夫, 杉山 一彦	4. 巻 74
2. 論文標題 急速に増大する左肩甲骨腫瘍のCTガイド下針生検が診断に有用であった肺癌の1例	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 広島医学	6. 最初と最後の頁 381-384
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 -

1. 著者名 Namba M, Masuda T, Takao S, Terada H, Yamaguchi K, Sakamoto S, Horimasu Y, Miyamoto S, Nakashima T, Iwamoto H, Ohshimo S, Fujitaka K, Hamada H, Awai K, Hattori N.	4. 巻 58
2. 論文標題 Extent of pulmonary fibrosis on high-resolution computed tomography is a prognostic factor in patients with pleuroparenchymal fibroelastosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 465-472
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.resinv.2020.05.009	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 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 難波 将史, 徳毛 健太郎, 杉山 一彦
2. 発表標題 STK11/KEAP1変異による治療抵抗性が疑われた肺癌患者の一例
3. 学会等名 第62回肺癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M Namba, K Tokumo, M Yamauchi, H Nakahara, Y Urabe, C. Nelson Hayes, Y Teratani, R Kobayashi, R Itamura, M Motonaga, K Yamaguchi, S Sakamoto, T Masuda, K Fujitaka, W Okamoto, K Arihiro, E Hiyama, N Hattori, T Hinoi, K Sugiyama
2. 発表標題 Current status and future challenges of lung cancer genome medicine at our hospital
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M Namba, K Tokumo, M Yamauchi, W Okamoto, K Sugiyama
2. 発表標題 A case of thymoma with systemic capillary leak syndrome that responded to high-dose steroid therapy
3. 学会等名 第19回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 難波 将史
2. 発表標題 HRCT所見における線維化の広がりにはPleuroparenchymal Fibroelastosisの予後不良因子である
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
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
---------------------------	-----------------------	----

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