

令和 6 年 5 月 6 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18152

研究課題名（和文）FGL1産生メカニズムに着目した抗PD-1抗体療法耐性泌尿器癌克服のための研究

研究課題名（英文）Analysis for mechanism of FGL1 expression to overcome anti-PD1 therapy resistance urological cancer

研究代表者

高木 敏男（Toshio, Takagi）

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：00385387

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：転移性腎細胞がんにおける免疫チェックポイント阻害剤治療において血清FGL1が治療効果・予後と相関があるかどうかを解析し、治療後2-3週の血清FGL1が予後と相関することが示された。また腫瘍浸潤T細胞上のLAG3発現をフローサイトメトリーを用いて検出し臨床病理学的所見との相関を解析した。CD4陽性T細胞上のLAG3発現は臨床病理学的所見との相関を認めなかったが、CD8陽性T細胞上のLAG3発現が高齢・進展症例・high grade症例で有意に上昇していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究の社会的意義は、腎細胞がん治療におけるFGL1とLAG3の重要性を明らかにすることで今後の個別化されたがん治療に向けた情報として重要な点にある。免疫チェックポイント分子による免疫抑制メカニズムや臨床所見との相関性を明らかにすることで、将来的には免疫チェックポイント阻害剤治療の効果を最大化し、患者の生活の質を向上させる治療戦略を開発する基盤を提供することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In the treatment of metastatic renal cell carcinoma with immune checkpoint inhibitors, the analysis revealed a correlation between serum FGL1 levels and treatment efficacy and prognosis, particularly demonstrating a correlation between serum FGL1 levels at 2-3 weeks post-treatment and prognosis. Furthermore, the expression of LAG3 on tumor-infiltrating T cells was detected using flow cytometry, and its correlation with clinicopathological findings was analyzed. While the expression of LAG3 on CD4-positive T cells did not correlate with clinicopathological findings, a significant increase in LAG3 expression on CD8-positive T cells was observed in elderly, advanced-stage, and high-grade cases.

研究分野：泌尿器がん

キーワード：泌尿器がん 腎がん 免疫チェックポイント阻害剤 FGL1 LAG3

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん治療に免疫チェックポイント阻害剤 (Immune checkpoint inhibitor; ICI) が使用されるようになり、多くの進行がんで高い効果を示している。しかしその効果は 15-30% の患者に限定されており、治療抵抗性の患者に対する治療法を開発することが喫緊の課題である。現在広く臨床的に使用されている ICI は、抗 CTLA4 抗体及び抗 PD1 抗体であり、それらは T 細胞の活性化を抑える負のシグナルを遮断することで抗腫瘍効果を増強している。しかし、他の免疫チェックポイント分子によって T 細胞の疲弊が生じている可能性が考えられ、それが ICI の治療の抵抗性につながっているともいわれている (Curr Opin Immunol. 2014 Apr;27:89-97)。

Lymphocyte-activation gene 3 (LAG3, CD223) は、活性化した T 細胞表面上に存在する膜貫通型タンパク質であり (Immunity. 2016 May 17;44(5):989-1004)、T 細胞のエフェクター機能を負に制御する (J Immunol. 2005 Jan 15;174(2):688-95)。さらに LAG3 は細胞の疲弊のマーカーとしても報告されている (J Exp Med. 2017 Feb;214(2):381-400)。これまでこの LAG3 のリガンドとしては MHC-class II などが報告されていたが、Fibrinogen-like protein 1 (FGL1) が新たなリガンドとして報告された。非小細胞肺癌患者の血清中では健常人と比較して FGL1 濃度が上昇しており、また抗 PD-1 抗体による治療を受けた非小細胞肺癌の患者と転移性メラノーマの患者では、血清 FGL1 濃度が高い群は低い群よりも予後不良であった。さらにマウスの xenograft model では、抗 PD-1 抗体投与に加えて FGL1-LAG3 経路を遮断することで、抗 PD-1 抗体投与単独よりも良好な腫瘍抑制効果が得られた (Cell. 2019 Jan 10;176(1-2):334-347.e12)。このように FGL1 及び LAG3 はバイオマーカーとしてのみならず治療標的としても有用な分子と考えられている。

### 2. 研究の目的

本研究は、担癌モデルマウスを用いて担癌状態ではどの臓器がどのようにして FGL1 を産生し、腫瘍浸潤 T 細胞の疲弊と腫瘍組織の増大に寄与しているのかを明らかにするとともに、ICI 治療において FGL1 や LAG3 がバイオマーカーになりうるかについて腎細胞がん症例を対象に解析することを目的とする。

### 3. 研究の方法

マウスの泌尿器がん細胞株 (Renca) をマウスに皮下移植し、血清中の FGL1 濃度を測定する。さらに FGL1 が担癌宿主のいずれかの臓器由来であるのかを確認するために、腫瘍組織およびがん細胞株移植前後の全身臓器から RNA を抽出し、FGL1 遺伝子発現を比較することで担癌状態における FGL1 産生源を見出す。また、免疫組織染色によりタンパク質レベルの発現でも確認する。

転移性または進行性腎細胞がんにおいて、ICI 治療を行った症例を対象に、血清中の FGL1 濃度を ELISA 法で測定し、血清 FGL1 濃度と治療効果・予後との関係について解析する。また、手術検体における腫瘍浸潤 T 細胞上の LAG3 発現をフローサイトメトリーにより解析し、T 細胞上の LAG3 発現と臨床病理学的因子、全身治療の治療効果及び予後との相関性について解析する。

### 4. 研究成果

マウス泌尿器がん細胞株の Renca を BALB/c マウスの皮下に移植し、経時的に血液採取を行った。コントロールとして同月齢の Renca の皮下移植を行わない BALB/c マウスからも同じタイミングで血液採取を行った。採取した血液から血清を抽出し、Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) 法を用いて FGL1 の測定を行った。Renca 皮下移植マウスの血清中 FGL1 は経時的

に増加を認めましたが、コントロール群においても増加を認め、有意な差がなかった。そのため Renca を用いたモデルマウス作成は今回の実験には適さないと判断した。現在他の細胞株を用いて、モデルマウス作成を継続している。

現在転移性腎細胞がんの全身治療では、1次治療としてICIの併用療法(I0+I0)又はICIとチロシンキナーゼインヒビターとの併用療法(I0+TKI)が使用される場合が多い。本研究では1次治療としてI0+I0及びI0+TKI治療を行った転移性腎細胞がん患者28症例より投与前、投与2-3週後、投与3ヶ月後に血液採取を行った。採取血液から血清を抽出し、ELISA法を用いて血清FGL1の測定を行い、治療効果及び予後との相関を解析した。画像診断の効果判定による最良効果がcomplete response(CR)、partial response(PR)の症例とstable disease(SD)、progressive disease(PD)の症例における血清FGL1を比較したが、治療前血清、治療後2-3週血清、治療後3ヶ月血清のいずれも有意な差を認めなかった。一方、全生存期間との相関を Kaplan-Meier法で解析すると、治療後2-3週血清でFGL1高値の症例は、有意に予後不良であった。治療前、治療後3ヶ月の血清FGL1と全生存期間との間に有意な相関はなかった。

次に腫瘍浸潤T細胞上のLAG3発現と臨床病理学的因子との相関を解析した。外科切除した腎細胞がん58検体を使用した。これらの検体をシングルセルサスペンションとし、フローサイトメトリーにてT細胞に発現するLAG3を解析した。T細胞はCD4陽性T細胞とCD8陽性T細胞に分けて解析した。LAG3の発現の評価は該当細胞中のMean Fluorescence Intensity(MFI)を用いた。CD4陽性T細胞のLAG3発現は年齢、性別、組織型、病理病期、Fuhrman gradeとの相関を認めなかった。一方CD8陽性T細胞のLAG3発現は高齢、進展症例、high grade症例で有意に上昇していた。上記58症例中、1次治療でICIを使用した16症例において、CR+PR症例とSD+PD症例でCD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞上のLAG3発現を比較したが、有意な差は認めなかった。また無増悪生存期間、全生存期間との相関も認めなかった。

本研究では、担癌状態でFGL1がどのように産生されT細胞を抑制するのか、またFGL1とT細胞上のLAG3が臨床病理学的因子と相関するかどうかについて解析し、全身治療後2-3週血清FGL1と腎細胞がんの予後が相関していること、CD8陽性T細胞上のLAG3発現が高齢、進展症例、high grade症例で上昇していることを示した。これらのデータは、新規ICI治療を含めた腎細胞がんの新たな治療戦略の基礎データになりうると考える。

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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田洋典、時田大輔、石山亮、池田敬至、石原弘喜、橋秀和、吉田一彦、飯塚淳平、平井敏仁、山下万貴子、北野滋久、長嶋洋治、溝口幸宏、青木一教、近藤恒徳、高木敏男
2. 発表標題 腎細胞がんにおける腫瘍免疫微小環境のフローサイトメトリーによる解析
3. 学会等名 第87回日本泌尿器科学会東部総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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