

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15373

研究課題名（和文）血中代謝物に着目したPD-1阻害薬の効果予測バイオマーカー開発基盤構築

研究課題名（英文）Establishment of a biomarker for predicting the efficacy of PD-1 inhibitors focusing on blood metabolites.

研究代表者

長谷 拓明 (hase, hiroaki)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：80779926

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：免疫チェックポイント阻害剤の効果予測するため、PD-1阻害薬ニボルマブ投与前の肺癌患者血清を分析し、特にリゾホスファチジルコリンの濃度がニボルマブ反応性の有力な指標である可能性を見出した。リゾホスファチジルコリンはTRPV2アゴニスト作用を持つことから、「TRPV2アゴニスト作用」を持つ既存薬プロベネシドと抗PD-1抗体の併用投与がマウスモデルで腫瘍抑制効果を示す結果を得た。これにより、ニボルマブの効果予測としてリゾホスファチジルコリンをバイオマーカーとして投薬効果を予測、さらに効果高める新たな治療法の開発につながる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リゾホスファチジルコリンが免疫チェックポイント阻害剤ニボルマブに対する反応性を示すバイオマーカーとしての可能性を見出したことにより、代謝変容と免疫応答の関連性に新たな視点をもたらした。また、プロベネシドのリポジショニングの可能性を示したことで個別化医療の新たな展開も期待できる。今後、リゾホスファチジルコリンの血中濃度に基づき、患者の治療反応性を事前に評価できるようになれば、効果的な治療法の早期適用により、患者の生存率と生活の質（QOL）の向上が期待でき、医療経済学メリットも期待できるようになる。

研究成果の概要（英文）：To predict the effect of immune checkpoint inhibitors, we analyzed the serum of lung cancer patients prior to administration of the PD-1 inhibitor nivolumab and found that the concentration of lysophosphatidylcholine in particular may be a powerful indicator of nivolumab responsiveness. Since lysophosphatidylcholine has TRPV2 agonist activity, the results showed that the combination administration of probenecid, an existing drug with "TRPV2 agonist action," and anti-PD-1 antibody showed tumor suppression in a mouse model. These results indicate that lysophosphatidylcholine may be used as a biomarker to predict the efficacy of nivolumab and may lead to the development of new treatments to further enhance the efficacy of nivolumab.

研究分野：オミックス

キーワード：がん バイオマーカー 免疫チェックポイント オミックス

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤は、がん細胞が免疫システムから逃避するために備えた免疫チェックポイント分子をブロックすることで、免疫系によるがん細胞の認識と排除を促進する。近年、広くがんの治療に使用されているが、奏効率は2割~3割と云われており、投薬効果を予測する方法論や投薬効果を高める方法論の確立が課題である。そこで現在、マイクロサテライト不安定性を指標に生検検査キットが開発され、患者層別化の判断基準として利用されている。しかしながら、患者の身体的負担が大きく、検査結果の堅牢性に課題も指摘されているため、より簡便かつ安定した免疫チェックポイント阻害剤効果予測マーカーが求められている。

代謝物は、エネルギー生産、解毒、シグナル伝達などの重要な機能を果たすために細胞によって作られ使用される一群の分子である。細胞・組織の状態の変化によってプロファイルが異なってくるため、健康状態の把握や病態に伴う異常を反映する。また、血液、尿など侵襲性の低い検体で検証可能であることから安全に利用できるバイオマーカーとして有望視されている。そして、代謝産物には特有の生理機能も知られている。例えばがん細胞で亢進した解糖系に伴う乳酸増多は免疫抑制性マクロファージの誘導を起こすこと、グルタミン枯渇はがん細胞の免疫チェックポイント分子発現誘導を起こすなどの報告がある。すなわち、代謝産物は病態の進行状況を示すバイオマーカーおよび病態形成に寄与する分子と期待できる。

2. 研究の目的

我々は複数の質量分析装置を駆使し包括的な代謝物およびリン脂質を中心とした脂質さらにプロテオーム解析からなるマルチオミクス解析系を整えた。そこでこの基盤技術を利用し、本研究ではバイオマーカー候補代謝物を探索し、血中濃度が調節される機序等の検討を通じ、PD-1阻害薬の有効患者を予測する体制基盤の構築と新規併用療法の開発を目指し研究を開始した。本研究は将来がん患者が受けられる医療の質やQOLの向上、また医療費負担といった社会的問題に対して解決策の一助となることが期待できると考える。

3. 研究の方法

PD-1 阻害薬ニボルマブの投与前肺がん患者血清について四重極型液体クロマトグラフ質量分析計を用いた包括的な代謝物およびリン脂質の測定を行いバイオマーカー候補の探索を行った。さらにOrbitrap Tribrid 質量分析計により血清中タンパク質の網羅的解析を行った。これら検討を経て、リゾホスファチジルコリンに着目するに至った。リゾホスファチジルコリンにはTRPV2 アゴニスト作用が知られていることから、同作用を有する既存薬であるプロベネシドの抗PD-1抗体との併用投与効果をマウス肺がん細胞株皮下移植モデルを用いて評価した。

4. 研究成果

PD-1 阻害薬ニボルマブに対し奏功を示した肺がん患者血清 10 例と非奏功例 10 例の薬剤投与前血清について代謝物の包括的解析を行った(図 1A)。続いてニボルマブ奏功 22 例および非奏功 20 例の肺がん患者血清について包括的リン脂質測定を実施した(図 1B)。血中におけるこれら低分子種のプロファイルはニボルマブ奏功例と非奏功例間で異なるプロファイルとなっている可能性が示され、特にリゾホスファチジルコリン類の奏功例における高濃度が示唆された(図 2)。

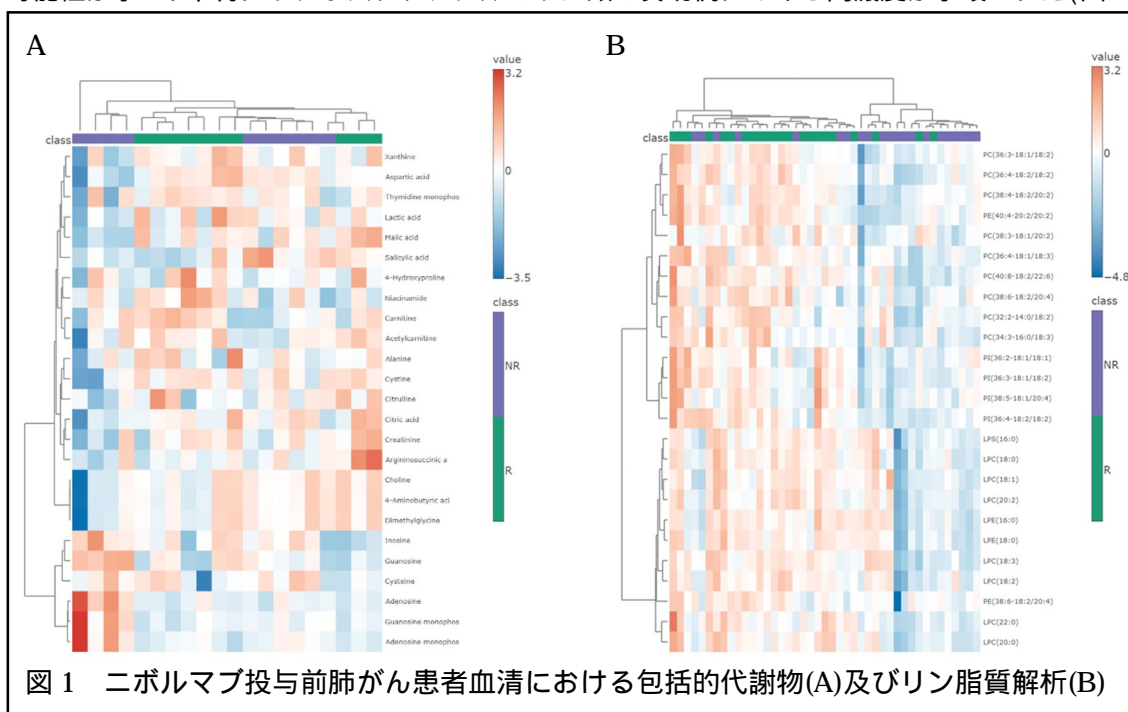


図 1 ニボルマブ投与前肺がん患者血清における包括的代謝物(A)及びリン脂質解析(B)

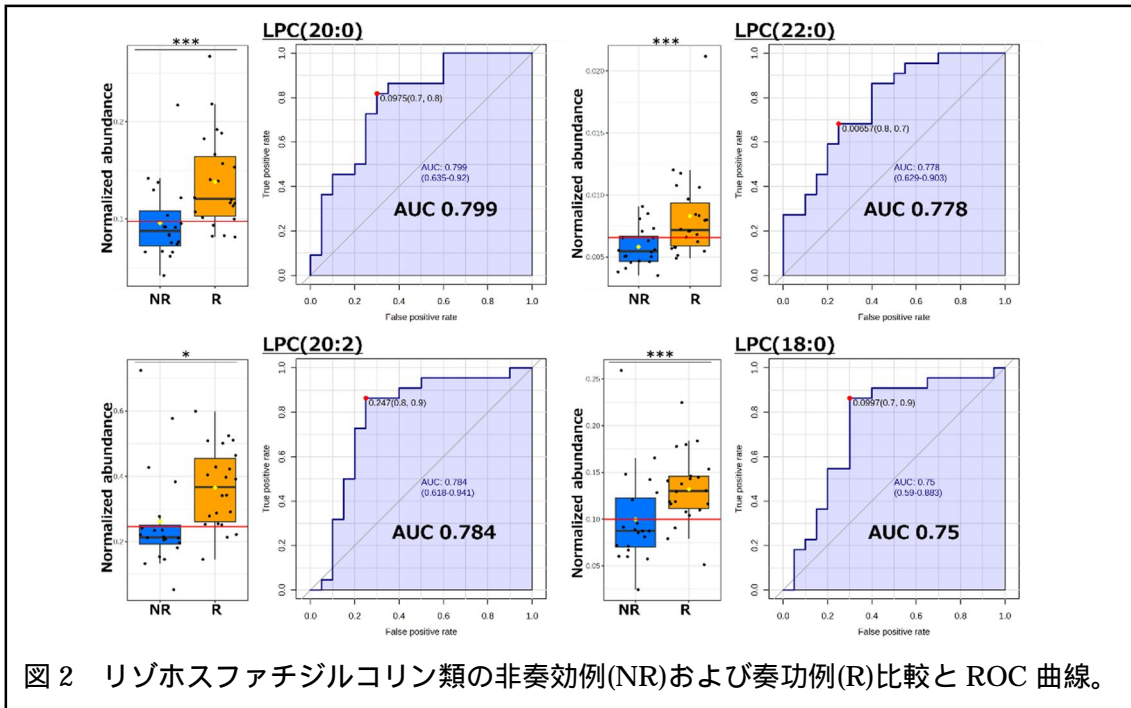


図2 リゾホスファチジルコリン類の非奏効例(NR)および奏効例(R)比較とROC 曲線。

同コホートにおける血清中タンパク質の網羅的解析を行った結果、ニボルマブ投与前において血中タンパク質は奏効例と非奏効例間でプロファイルの異なる傾向にある可能性が示唆され(図 3A)、特に CRP や SAA2 といった急性期タンパク質について非奏効例では血中レベルが奏効例に比べ高い傾向にあることが示された(図 3B,C)。この血中リン脂質およびプロテオームデータをオミックスデータの統合手法のひとつである DIABLO により解析すると、血中タンパク質やリン脂質のプロファイルに基づきニボルマブへの感受性を分類できる可能性が示唆された(図 3D)。

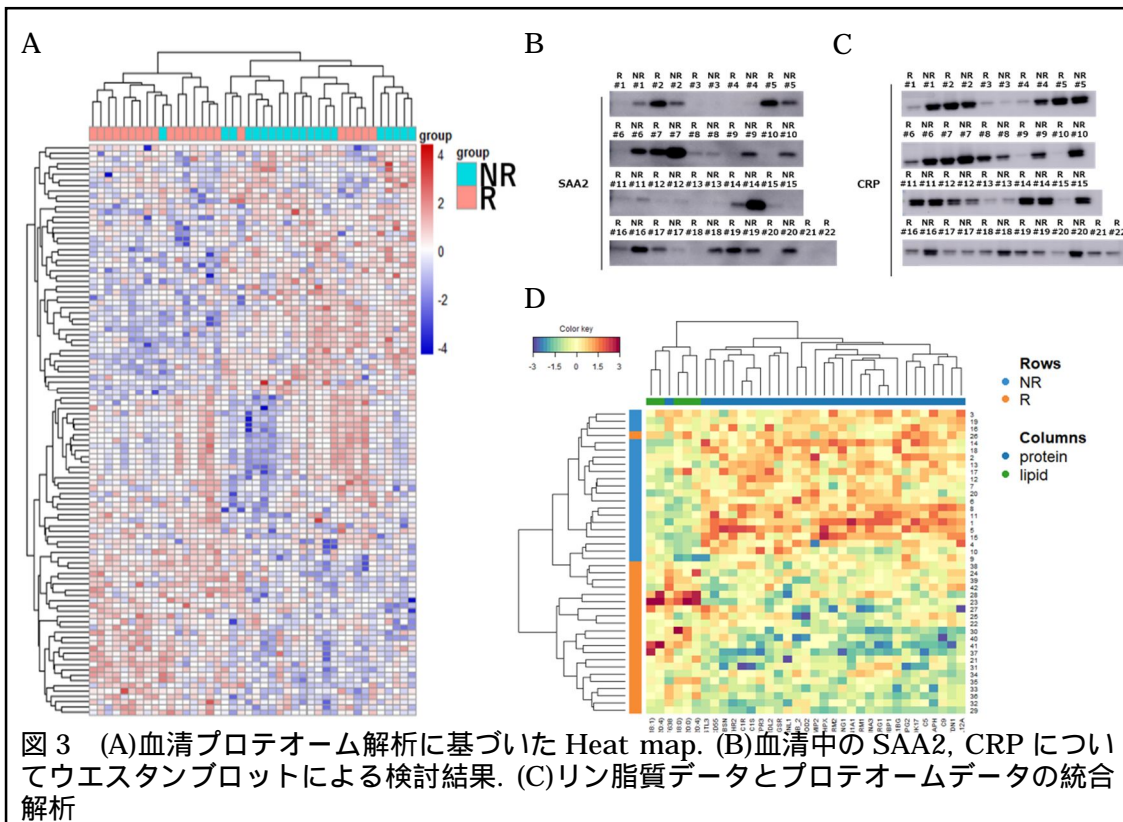


図3 (A)血清プロテオーム解析に基づいた Heat map. (B)血清中のSAA2, CRP についてウエスタンブロットによる検討結果. (C)リン脂質データとプロテオームデータの統合解析

免疫チェックポイント阻害剤への感受性と血中急性期タンパク質量に関連性があることはすでにいくつかの報告があったが、リゾホスファチジルコリンのバイオマーカーの可能性を論じた報告は無く、新たにバイオマーカー候補として見出した。そこで、リゾホスファチジルコリンに着目し以降の検討を行った。

血中リゾホスファチジルコリン増加の背景を探索する目的で、免疫チェックポイント阻害剤への感受性を示すことが知られているマウス肺がん細胞株 3LL および非感受性であることが報告されている KLN205 細胞をそれぞれ C57BL/6 マウスおよび DBA/2 マウスの背部皮下に移植した際の血中リゾホスファチジルコリン量を四重極型液体クロマトグラフ質量分析計を用いて測定した。結果、3LL 移植マウスにおいてはコントロールマウスに比べリゾホスファチジルコリンの増加傾向が示された(図 4A)。他方で KLN205 移植時においては血中リゾホスファチジルコリン量に変化は見られない結果であった(図 4B)。現時点で詳細な機序は不明であるので今後の検討が必要であるが、がん細胞のもつ特性が血中リゾホスファチジルコリン量に反映されている可能性が考えられ、免疫チェックポイント阻害剤への感受性と関連したものである可能性が示唆された。

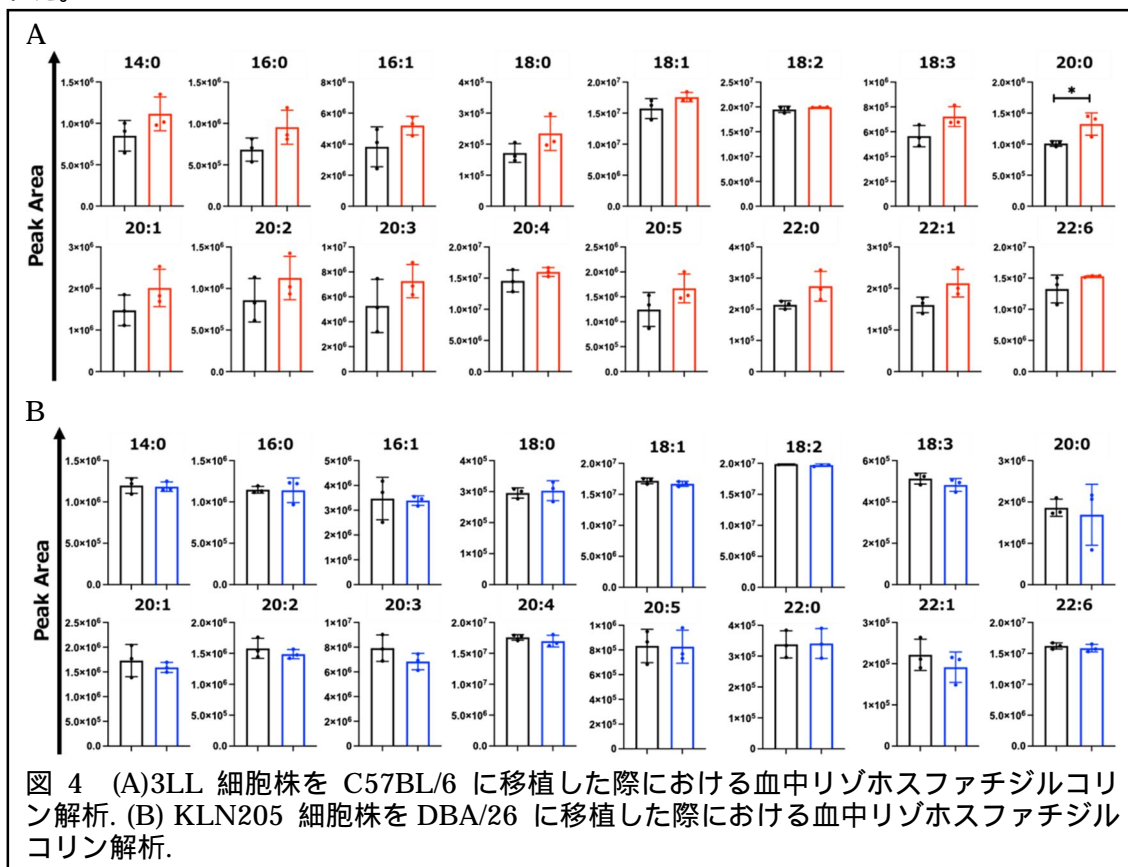


図 4 (A)3LL 細胞株を C57BL/6 に移植した際における血中リゾホスファチジルコリン解析. (B) KLN205 細胞株を DBA/26 に移植した際における血中リゾホスファチジルコリン解析.

リゾホスファチジルコリンは TRPV2 アゴニスト作用を有する事が報告されている。ニボルマブ奏功例では非奏効例に比べリゾホスファチジルコリン血中濃度が高い点を鑑みると、その生理活性がニボルマブ感受性に寄与している可能性が推察される。そこで、TRPV2 アゴニスト作用をもつ薬剤を PD-1 阻害剤と併用することで治療効果を高められる可能性を想起した。プロベネシドは高尿酸血症薬として臨床利用されている既存薬であり、TRPV2 アゴニスト作用を有する事が知られている。そこで 3LL 移植モデルマウスに対し抗 PD-1 抗体とプロベネシドの併用投与が腫瘍形成に与える影響を検討した。結果、併用投与時において最も腫瘍形成を抑制された(図 5)。このことから、プロベネシドを PD-1 阻害剤と併用するドラッグリポジショニングに応用できる可能性が示唆された。

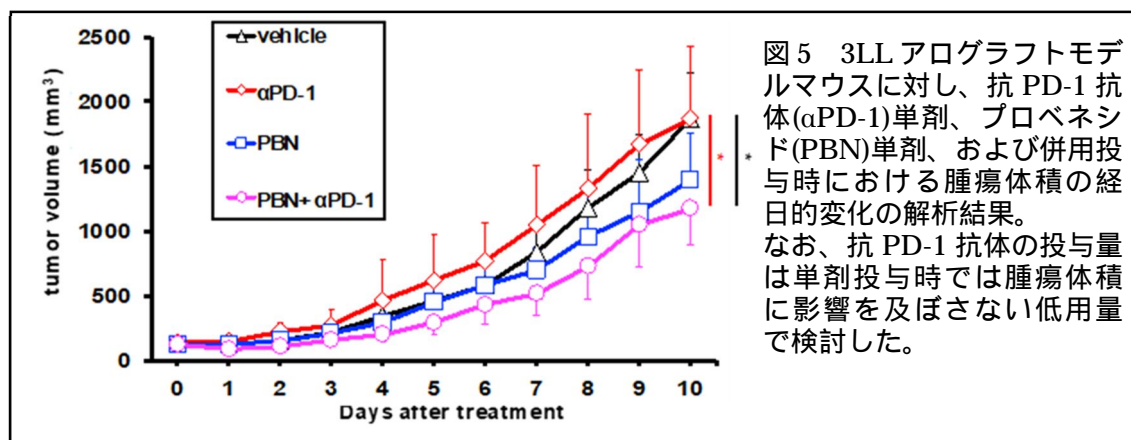


図 5 3LL アログラフトモデルマウスに対し、抗 PD-1 抗体(αPD-1)単剤、プロベネシド(PBN)単剤、および併用投与時における腫瘍体積の経日的変化の解析結果。なお、抗 PD-1 抗体の投与量は単剤投与時では腫瘍体積に影響を及ぼさない低用量で検討した。

プロベネシドと抗 PD-1 抗体併用による抗腫瘍効果の機序を検討する目的で腫瘍組織のプロテオーム解析を行った(図 6A)。ここから抗 PD-1 抗体とプロベネシドの併用投与によりミトコンドリアの機能変化や核酸合成経路における変化が示唆され(図 6B)、腫瘍組織に対しプロベネシド投与は代謝経路の変化を伴い抗 PD-1 阻害剤の抗腫瘍効果増強に寄与したものと推察された。

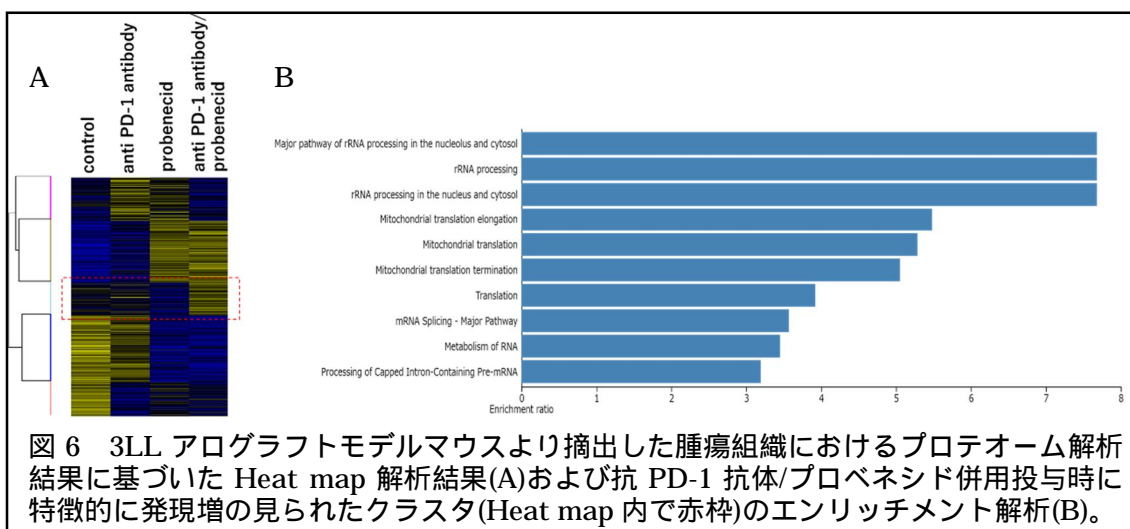


図 6 3LL アログラフトモデルマウスより抽出した腫瘍組織におけるプロテオーム解析結果に基づいた Heat map 解析結果(A)および抗 PD-1 抗体/プロベネシド併用投与時に特徴的に発現増の見られたクラスター(Heat map 内で赤枠)のエンリッチメント解析(B)。

本研究から、ニボルマブ奏功例と非奏功例間においては薬剤投与前の時点にて血中脂質やタンパク質のプロファイルが異なり、特に血中リゾホスファチジルコリンのニボルマブ有効性予測バイオマーカーの可能性、プロベネシドとの併用投与が PD-1 阻害剤の薬効増強に寄与する可能性を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田代敦也、神宮司健太郎、長谷拓明、辻川和丈
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害剤の治療効果を予測する代謝物バイオマーカー探索 非小細胞肺癌患者血清の解析によるバイオマーカー候補の選定
3. 学会等名 第 73 回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田代 敦也、長谷 拓明、神宮司 健太郎、辻川 和丈
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害剤の治療効果を予測する生体低分子バイオマーカー探索
3. 学会等名 日本薬学会年会144年会
4. 発表年 2023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
---------	---------