

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16750

研究課題名(和文)腎細胞癌における免疫チェックポイント阻害薬の治療効果を予測するバイオマーカー探索

研究課題名(英文) Investigation of Biomarkers to Predict the Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Renal Cell Carcinoma

研究代表者

嘉島 相輝 (Kashima, Soki)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50842952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腎癌は、最もICIの治療効果が高い癌種の一つであるにもかかわらず、他癌種と比較してTMBが少なく、DNAミスマッチ修復機構のMSI陽性頻度が低い癌種として知られ、既知のバイオマーカーの有効性は限定的である。これを克服するために、我々は治療前腫瘍組織およびICI治療前後の末梢血を解析し、疲弊CD8 T細胞の割合が治療前後で有意に変化し、奏功群ではICI治療2週間後の血漿effector cytokineが有意に上昇し、さらに非奏功群で腫瘍浸潤Foxp3+細胞割合が有意に高頻度であることを見出した。我々は、腎癌におけるICI治療効果を予測しうる早期バイオマーカーとして新規分子および細胞群を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎癌において、継時的な末梢血単核球細胞の表現型解析・血漿中のマルチプレックスタンパク解析・tissue microarrayによる免疫染色解析を同一患者由来のサンプルで網羅的に行った報告は過去に無く、本研究が初の試みである。我々はこの多面的アプローチにより、腎癌におけるICI治療効果を予測しうる早期バイオマーカーとして新規分子および細胞群を同定した。今後は本研究で同定したバイオマーカーを用いて前向きな検討で早期に免疫チェックポイント阻害薬の治療効果が予測できるかどうかを評価することで、現状における腎癌のICI治療効果予測の課題を解決できる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Numerous studies of other solid tumors have investigated predictive biomarkers for ICI response, including tumor mutation burden (TMB) and the presence of microsatellite instability due to defects in DNA mismatch repair genes. While these biomarkers have predictive value in high TMB tumors, they are not associated with ICI efficacy in patients with modest TMB tumors like renal cell carcinoma (RCC). To address these challenges and uncover biomarkers of therapeutic response to ICIs in RCC, we analyzed the tumor microenvironment in treatment-naïve tissue, and paired peripheral blood both pre- and post-ICI treatment. We found that exhausted CD8 T cells showed significant changes in responders (R) versus non-responders (NR), effector cytokines were significantly upregulated in the plasma of R, and Foxp3+ cells were significantly more frequent in pre-treatment specimens of NR. We identified specific molecules and subclusters that could potentially predict the efficacy of ICI therapy in RCC.

研究分野：腫瘍免疫学

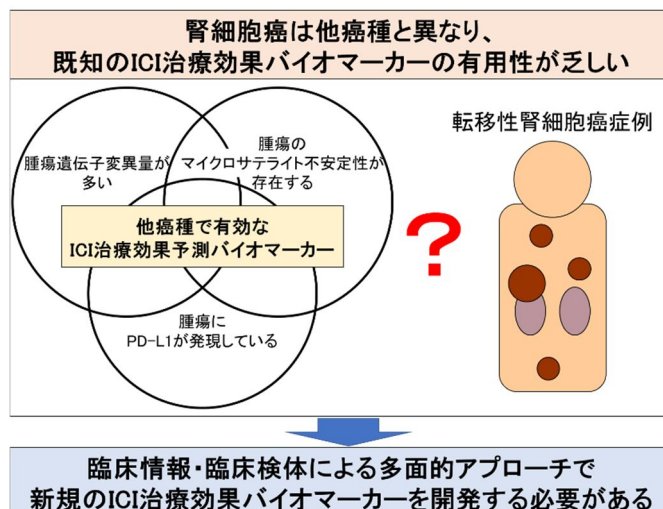
キーワード：腎細胞癌 腫瘍免疫 免疫チェックポイント阻害薬 腫瘍微小環境 バイオマーカー CD8 T細胞 制御性T細胞 抗PD1抗体

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

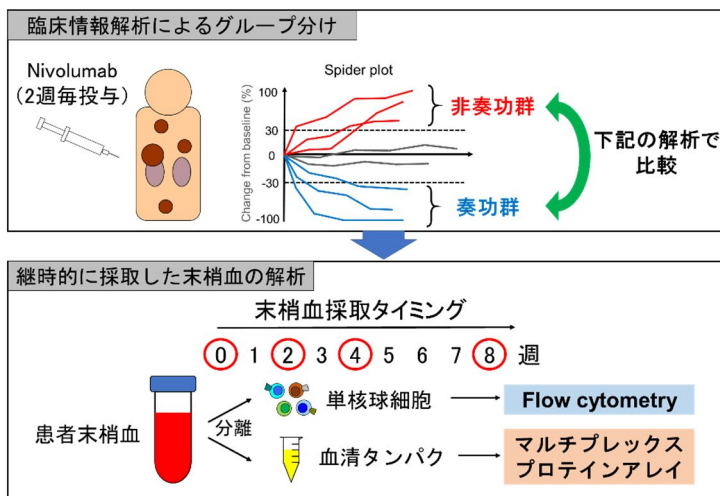
1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害薬 (immune checkpoint inhibitor: ICI) が新たな癌治療選択肢として登場したが、固形癌における奏効率は約 11 ~ 40%と決して高くなく (N Engl J Med 2015, Lancet 2017) 重篤な免疫関連有害事象を発症し得ることも課題となっている。この問題を解決するために世界中で治療効果予測バイオマーカの探索が行われた結果、腫瘍遺伝子変異量 (tumor mutation burden: TMB) が多い場合と、DNA ミスマッチ修復機構のマイクロサテライト不安定性 (Microsatellite Instability: MSI) が存在する場合に治療が奏功する可能性が高いことが明らかとなった (Le DT et al, N Engl J Med 2015; Le DT et al, Science 2017)。しかし既知のバイオマーカと ICI 治療効果が相関しない症例は数多く報告されており、より精度の高い新規バイオマーカの開発が求められている。特に腎細胞癌は、最も ICI 治療効果が高い癌種の一つであるにも関わらず、他癌種と比較して TMB が少なく MSI 陽性の頻度が低い癌種として知られており、既知の ICI 作用メカニズムとは異なる機構の関与が示唆されている (Schumacher TN et al, Science 2015; Miao D et al, Science 2018)。そこで、臨床情報および臨床検体による免疫学的な解析による、新たな免疫チェックポイント阻害薬の治療効果予測バイオマーカの開発が求められる。



2. 研究の目的

本研究では、当院の臨床情報と継時的・体系的に採取された腎細胞癌患者検体を用いて、腫瘍因子と宿主因子の双方に対する分子生物学的および免疫学的な網羅解析を行い、既知のマーカー陰性患者における免疫チェックポイント阻害薬治療の奏功・非奏功を予測するための新規バイオマーカを探索する。

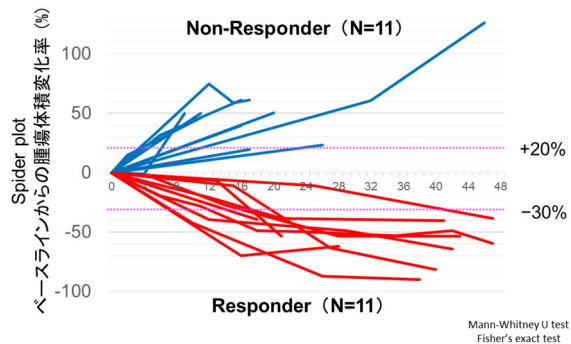


3. 研究の方法

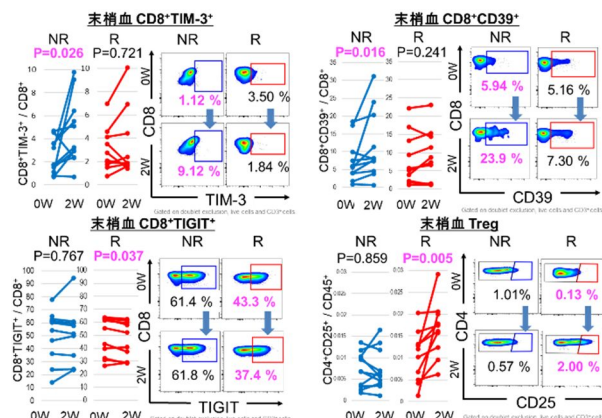
- 1) 転移性腎細胞癌に対して抗 PD-1 抗体・Nivolumab 治療を受けた患者 51 例について、ICI 治療開始前と比較した ICI 治療開始後の CT 画像検査で腫瘍体積変化率を継続的に解析し、30%以上の腫瘍縮小を認めた奏功群と、30%以上の腫瘍増大を認めた非奏功群に分類した。両群の患者特性(年齢、性別、Performance Status、病理学的因子、ステージ、転移先臓器、転移個数、末梢血臨床検査データ等)を比較し、臨床的に ICI 治療奏功と相関する因子を探索した。
- 2) 奏功群・非奏功群について、ICI 治療前から治療開始後にかけて継続的に採取保存した末梢血単核球細胞(治療前、治療開始後 2 週目、4 週目、8 週目)を flow cytometry を用いて解析し、結果を両群で比較して有意に差のある細胞群や分子を同定した。解析対象細胞は CD8 陽性キラーT 細胞、CD4 陽性ヘルパーT 細胞、NK 細胞、制御性 T 細胞、B 細胞等とし、解析対象分子は、各種チェックポイント分子、増殖および活性化マーカー、ケモカインレセプター、転写因子とした。
- 3) 奏功群・非奏功群について、末梢血単核球細胞と同じタイミングで ICI 治療前から治療開始後にかけて継続的に採取保存した血漿について、Luminex を用いてサイトカイン・ケモカイン・チェックポイントを含めた 33 分子を対象とした multiplex protein array を行い、血漿タンパク結果を両群で比較して有意に差のある分子を同定した。
- 4) 奏功群・非奏功群の両群間で末梢血単核球細胞解析・血清タンパク解析で差のあった因子を統合して、ICI 治療効果に相関のある細胞群および分子の絞り込みを行った。こうして同定した細胞群および分子マーカーに対して、ICI 治療開始前の腫瘍ホルマリン固定パラフィンブロックを用いた tissue microarray を行うことで、同定した末梢血マーカーが腫瘍局所の免疫環境の一部を反映しているかどうかについての validation を行った。

4. 研究成果

- 1) 臨床情報の解析の結果、奏功群は 11 例、非奏功群は 11 例であった。両群間の患者背景(年齢、性別、Performance Status)および臨床検査値(病理学的因子、ステージ、転移先臓器、転移個数、末梢血臨床検査データ)に有意差を認めなかった。以上より、臨床情報のみを用いた ICI の治療効果予測は困難であると考えられた。

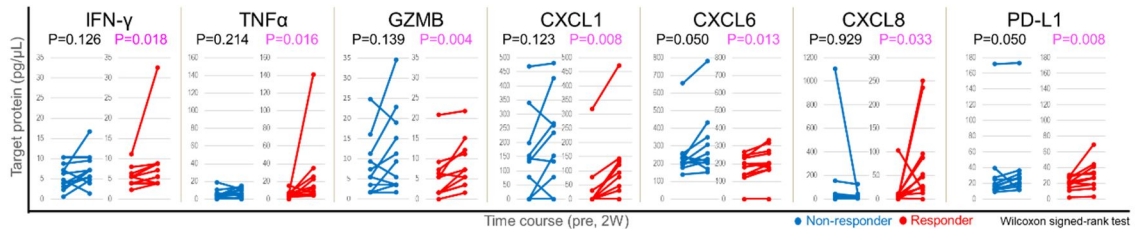


- 2) ICI 治療前後の末梢血単核球細胞における flow cytometry 解析の結果、非奏功群において治療開始 2 週目の時点で CD8+TIM-3+ および CD8+CD39+ 細胞の割合が有意に上昇していた ($p = 0.026$, $p = 0.016$)。一方、奏効群では 2 週目時点で CD8+TIGIT+ 細胞の割合が有意に

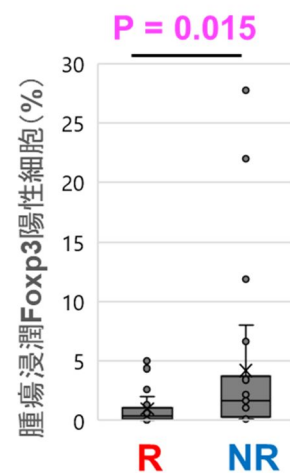


低下し ($p = 0.037$) また CD4+CD25+細胞 (制御性 T 細胞 : Treg) の割合が有意に増加していた ($p=0.005$)。その他のサブタイプおよび分子、またその他のタイムポイントにおいては両群間の有意差を認めなかった。

- 3) Luminex を用いた multiplex protein array 血漿タンパク解析では、奏功群において免疫チェックポイント阻害薬治療 2 週後に下図に示す effector cytokines および IFN 誘導性分子の有意な上昇を認めた。



- 4) Tissue microarray を用いた免疫染色による解析では、両群間で、治療前の腫瘍浸潤 CD8 陽性細胞割合に有意差を認めず、また治療前の PD-L1 陽性細胞, PD-L2 陽性細胞の割合においても有意差を認めなかった。RCC において腫瘍浸潤 CD8 T 細胞が ICI 治療の予後を予測しない事に関してはこれまでに報告されており (Nat Med. 2020 Jun;26(6):909-918) 本解析結果も既報と一致する結果であった。また、PD-L1 陽性と ICI 治療効果との相関についても、RCC の各種 ICI 臨床試験 (CheckMate214, CheckMate9ER, CheckMate025, JAVELIN RENAL 101, IMmotion151, CLEAR, KEYNOTE-426) で否定されており、我々の結果も既報と一致していた。一方、今回の Tissue microarray 解析で、非奏功群において ICI 治療前の腫瘍浸潤 Foxp3 陽性細胞が有意に高頻度であることを見出した。



以上より、我々はフローサイトメトリー解析において非奏功群および奏功群のそれぞれで、特定の exhaustion marker を発現する CD4 および CD8 T 細胞の割合が治療開始前後で有意に変化している事を同定し、これらの免疫サブセットは免疫チェックポイント阻害薬治療の直接の影響を受けていると考えられる細胞集団であることが示唆された。また血漿解析では、奏功群で免疫チェックポイント阻害薬治療開始 2 週間後の effector cytokine の有意な上昇を認めた。さらに、非奏功群で腫瘍浸潤 Foxp3+細胞の割合が有意に高頻度であることを見出した。本研究では凍結保存した臨床検体と臨床情報を用いて後ろ向き検討を行い、腎癌における免疫チェックポイント阻害薬の治療効果を予測しうる早期バイオマーカーとして新規分子および細胞群を同定した。今後、同定したバイオマーカーを用いた前向きな検討で早期に免疫チェックポイント阻害薬の治療効果が予測できるかどうか評価し、本研究で得られた結果の妥当性の検証を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kashima S, Braun DA.	4. 巻 50
2. 論文標題 The Changing Landscape of Immunotherapy for Advanced Renal Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Urologic Clinics of North America	6. 最初と最後の頁 335 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ucl.2023.01.012	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 Takeda M, Kashima S, Fuchigami Y, Yoshino T, Kataoka TR, Yamasaki T, Kagamu H, Kobayashi T, Akamatsu S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Case Report: A Case of Renal Cell Carcinoma Unclassified With Medullary Phenotype Exhibiting a Favorable Response to Combined Immune Checkpoint Blockade	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 934991
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2022.934991	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 Kashima S, Patrick KA, Braun DA.	4. 巻 2
2. 論文標題 ASCO 2023 RECAP Combination Therapies Come of Age in Kidney Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 AUANews	6. 最初と最後の頁 32-33
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Numakura K, Sekine Y, Hatakeyama S, Muto Y, Sobu R, Kobayashi M, Sasagawa H, Kashima S, Yamamoto R, Nara T, Akashi H, Tabata R, Sato S, Saito M, Narita S, Ohyama C, Habuchi T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Primary resistance to nivolumab plus ipilimumab therapy in patients with metastatic renal cell carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 16837 ~ 16845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.6306	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 obayashi M, Numakura K, Hatakeyama S, Ishida T, Koizumi A, Tadachi K, Igarashi R, Takayama K, Muto Y, Sekine Y, Sobu R, Sasagawa H, Akashi H, Kashima S, Yamamoto R, Nara T, Saito M, Narita S, Ohyama C, Habuchi T.	4. 巻 28
2. 論文標題 Real clinical outcomes of nivolumab plus ipilimumab for renal cell carcinoma in patients over 75?years old	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1530 ~ 1537
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-023-02394-y	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 蘇武竜太、嘉島相輝、小林瑞貴、山本竜平、奈良健平、沼倉一幸、齋藤満、成田伸太郎、羽瀨友則
2. 発表標題 Exploration of predictive markers for the efficacy of immune checkpoint inhibitors in metastatic renal cell carcinoma
3. 学会等名 第51回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 嘉島相輝、蘇武竜太、藤山信弘、武田将司、小林瑞貴、山本竜平、奈良健平、沼倉一幸、齋藤満、成田伸太郎、赤松秀輔、井上高光、小林恭、羽瀨友則
2. 発表標題 新規癌患者由来マウスモデルを用いた 免疫チェックポイント阻害薬作用機構の網羅的解明と 治療効果予測バイオマーカーの開発
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryuta Sobu, Soki Kashima, Nobuhiro Fujiyama, Masashi Takeda, Mizuki Kobayashi, Ryohei Yamamoto, Taketoshi Nara, Kazuyuki Numakura, Mitsuru Saito, Shintaro Narita, Shusuke Akamatsu, Takamitsu Inoue, Takashi Kobayashi, Tomonori Habuchi
2. 発表標題 Identification of biomarkers and development of novel therapeutic targets to overcome resistance to immune checkpoint inhibitor in renal cell carcinoma
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryuta Sobu, Soki Kashima, Nobuhiro Fujiyama, Mizuki Kobayashi, Ryohei Yamamoto, Taketoshi Nara, Kazuyuki Numakura, Mitsuru Saito, Shintaro Narita, Takamitsu Inoue, Tomonori Habuchi
2. 発表標題 Exploring predictive biomarkers for the efficacy of immune checkpoint inhibitors in advanced renal cell carcinoma
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 蘇武竜太, 嘉島相輝, 奈良健平, 沼倉一幸, 齋藤 満, 成田伸太郎, 赤松秀輔, 井上高光, 小林 恭, 羽瀨友則
2. 発表標題 腎癌に対する免疫チェックポイント阻害薬の 不応性機構の探索と新規治療標的の開発
3. 学会等名 第32回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Soki Kashima
2. 発表標題 Renal Cancer: How to manage this situation?
3. 学会等名 European Association of Urology (EAU) Annual Congress 2022 (国際学会)
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
研究協力者	羽瀨 友則 (HABUCHI Tomonori) (00293861)	秋田大学・医学系研究科・教授 (11401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	成田 伸太郎 (Narita Shintaro) (40396552)	秋田大学・医学系研究科・准教授 (11401)	
研究協力者	齋藤 満 (SAITO Mitsuru) (80400505)	秋田大学・医学部附属病院・准教授 (11401)	
研究協力者	沼倉 一幸 (NUMAKURA KAZUYUKI) (90566415)	秋田大学・医学部附属病院・講師 (11401)	
研究協力者	藤山 信弘 (FUJIYAMA NOBUHIRO) (90603275)	秋田大学・医学部附属病院・准教授 (11401)	
研究協力者	南條 博 (NANJO Hiroshi) (70250892)	秋田大学・医学部附属病院・准教授 (11401)	
研究協力者	廣嶋 優子 (Hiroshima Yuko) (30770044)	秋田大学・医学部附属病院・助教 (11401)	
研究協力者	小代田 宗一 (KOYOTA Souichi) (80400480)	秋田大学・バイオサイエンス教育・研究サポートセンター・准教授 (11401)	

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