

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | 次世代免疫チェックポイント分子の生物学的背景の理解と腫瘍免疫微小環境への影響                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Sub Title        | Uncovering the biology of new immune-checkpoint molecule inhibitor and that impact for micro immune microenvironment                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Author           | 高松, 公晴(Takamatsu, Kimiharu)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Publisher        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Publication year | 2024                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Jtitle           | 科学研究費補助金研究成果報告書 (2023. )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| JaLC DOI         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Abstract         | <p>転移性腎細胞癌において既存の分子標的治療薬には初期から抵抗性を示す症例が存在しており、医学的障壁となっている。新規癌免疫療法としてLAG-3抗体が上市された。我々はさらに新規免疫チェックポイント分子TIGITに着目し、その発現と転移性腎癌の予後との関係、免疫環境を評価した。その結果TIGIT発現群は予後良好であり、TIGIT発現群ではCD8, FOXP3発現が高く、疲弊化した免疫環境を認め、PD-1/PDL1発現が高く、他の免疫チェックポイント分子の発現との相関が伺え、CD68, CD163発現が高く、抑制系のマクロファージ環境が示唆された。この微小環境は他コホートでも確認された。</p> <p>Cancer immuno therapy brought the great benefit to medical oncology, however some metastatic renal cell carcinoma (mRCC) patients showed primary resistance. In recent years, anti-LAG-3 antibody has been launched as a new treatment. We evaluated the clinical impact and the immune-microenvironment related with the other novel immune-chckpoint molecule, TIGIT in mRCC patients. The result showed high TIGIT expression mRCC patients showed good prognosis. High TIGIT expression was related with higher CD8+, FOXP3+, that showed exhausted T cell environment, with higher PD-1+, PD-L1+, that showed TIGIT is corelated with other immunecheckpoint molecules, and with higher CD68, CD163, that showed tumor associated immune-repressive environment. This clinical impact and TIGIT related immune-microenvironment characterics was varidated in the other clinical trial cohort.</p> |
| Notes            | <p>研究種目：若手研究<br/>研究期間：2022～2023<br/>課題番号：22K16794<br/>研究分野：癌免疫微小環境</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| Genre            | Research Paper                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| URL              | <a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22K16794seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22K16794seika</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16794

研究課題名（和文）次世代免疫チェックポイント分子の生物学的背景の理解と腫瘍免疫微小環境への影響

研究課題名（英文）Uncovering the biology of new immune-checkpoint molecule inhibitor and that impact for micro immune microenvironment

研究代表者

高松 公晴（Takamatsu, Kimiharu）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・訪問研究員

研究者番号：00649874

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）：転移性腎細胞癌において既存の分子標的治療薬には初期から抵抗性を示す症例が存在しており、医学的障壁となっている。新規癌免疫療法としてLAG-3抗体が上市された。我々はさらに新規免疫チェックポイント分子TIGITに着目し、その発現と転移性腎癌の予後との関係、免疫環境を評価した。その結果TIGIT発現群は予後良好であり、TIGIT発現群ではCD8、FOXP3発現が高く、疲弊化した免疫環境を認め、PD-1/PDL1発現が高く、他の免疫チェックポイント分子の発現との相関が伺え、CD68、CD163発現が高く、抑制系のマクロファージ環境が示唆された。この微小環境は他コホートでも確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TIGITは次世代癌免疫療法の標的分子として注目されるが、その免疫微小環境は不明である。今回我々はTIGIT発現の臨床的有用性に始まり、微小環境の特徴を評価し、かつそれを複数の大規模コホートで確認した。この結果はこれまでに腎細胞癌では報告されておらず、ここに学術的意義がある。また、新規癌免疫療法は一定の効果を認める一方で、効果を認めない症例が一定数存在することが特徴である。治療有効または治療不応が予測される症例を選出するためにはその生物学的評価が重要となる。本研究成果は高額な新規癌免疫療法を適切な患者に届けることで、医療経済へのメリットにも繋がることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Cancer immuno therapy brought the great benefit to medical oncology, however some metastatic renal cell carcinoma (mRCC) patients showed primary resistance. In recent years, anti-LAG-3 antibody has been launched as a new treatment. We evaluated the clinical impact and the immune-microenvironment related with the other novel immune-checkpoint molecule, TIGIT in mRCC patients. The result showed high TIGIT expression mRCC patients showed good prognosis. High TIGIT expression was related with higher CD8+, FOXP3+, that showed exhausted T cell environment, with higher PD-1+, PD-L1+, that showed TIGIT is corelated with other immunecheckpoint molecules, and with higher CD68, CD163, that showed tumor associated immune-repressive environment. This clinical impact and TIGIT related immune-microenvironment characteristics was varidated in the other clinical trial cohort.

研究分野：癌免疫微小環境

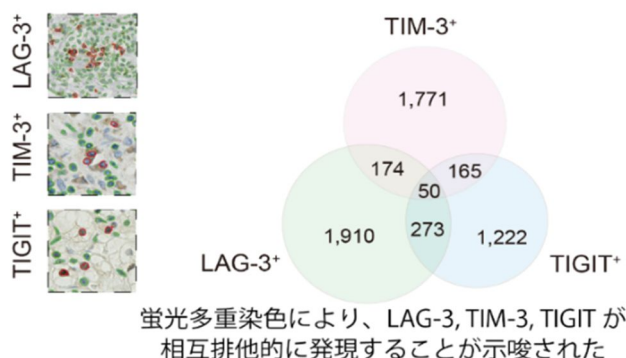
キーワード：腎細胞癌 癌免疫微小環境 TIGIT 免疫チェックポイント阻害剤

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞は免疫チェックポイント分子と呼ばれるタンパク質を発現し、リンパ球の攻撃から逃れている。この癌免疫逃避機構を司る免疫チェックポイント分子 (IR: immune inhibitory receptor) として PD-1 や CTLA-4 が同定され、第一世代 IR 阻害剤 (PD-1/PD-L1, CTLA-4 阻害剤) が開発された。第一世代 IR 阻害剤は転移性腎癌を含む多くの癌種で薬物療法の主軸となったが、治療初期から抵抗性を示す症例が問題となっている。現在次世代 IR 阻害剤の開発が行われており、LAG-3 (lymphocyte activation gene 3)、TIM-3 (lymphocyte activation gene 3)、TIGIT (T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains) が治療標的分子として注目される。

先行研究で申請者は、淡明細胞型腎細胞癌組織 289 例を用いて新規 IR3 分子 (LAG-3, TIM-3, TIGIT) の発現強度を単一細胞ごとに評価し、世界で初めて LAG-3, TIM-3, TIGIT の発現が相互排他性を有すること (図 1)、LAG-3, TIM-3, TIGIT により淡明細胞型 RCC は分類可能であり、この新規分類が非淡明細胞型 RCC や他 14 種の固形癌、腎細胞癌転移巣でも応用可能であること。LAG-3 優位発現群が予後不良であり、LAG-3 優位群は免疫細胞が疲弊した腫瘍免疫微小環境を有することを報告した (*Takamatsu K (1st), et al. Nat Commun 2021, IF:16.6*)。

図 1. 免疫染色、蛍光多重染色による single-cell 解析

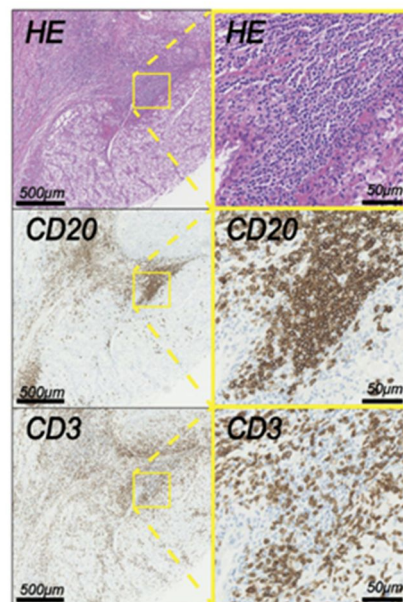


## 2. 研究の目的

その後の研究で申請者は LAG-3 高発現群の特徴を明らかにするために遺伝子解析を行った。その結果 LAG-3 群では ATM, CDKN1/2A, TP53 の発現が高いことを見出した。しかし、これらの遺伝子は LAG-3 高発現によって引き起こされる結果であり、LAG-3 高発現を誘導する因子についてはいまだ不明である。この結果から申請者は腎細胞癌で LAG-3 高発現を生み出す生物学的背景は何かを研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

LAG3 高発現腫瘍を対象とするため、新規転移性腎細胞癌患者を集積し、LAG-3, TIGIT, CD8, CD20 発現について評価した。評価の過程で、CD20 陽性 B 細胞が集簇し濾胞を形成する組織があることに申請者は気付いた。現在の癌免疫療法は T 細胞系を活性化することで抗腫瘍効果を得ている。しかしながら、癌免疫機構は T 細胞系のみならず、B 細胞やマクロファージ環境も存在する。B 細胞は成熟して抗腫瘍効果を発揮する際に三次リンパ様構造 (Tertiary lymphoid structures; TLS) と呼ばれる濾胞構造を形成することが知られている。研究当時、抗 LAG-3 抗体と抗 PD1 抗体の合剤が上市され、悪性黒色腫で使用が認められた。上記の社会背景から、研究者は TLS について評価を行った。その結果、105 サンプル中 33 例 (31%) に TLS を認めた。リンパ球は腫瘍辺縁から腫瘍中心へ浸潤していくと考えられている。そのためリンパ球の分布には意味があると考えられる。そこで腫瘍辺縁と腫瘍中心に分けて TLS の分布を評価した。その結果辺縁のみ 24 例 (23%)、中心のみ 4 例 (4%)、辺縁と中心 5 例 (5%) という結果であった。(右図) その後研究者は TLS の有無と臨床的予後の関係性を評価した。さらに TLS の生物学的背景を明らかにするため遺伝子解析とメチル化解析を行い、genetic/epigenetic アプローチを試みた。TLS の有無と薬物療法の効果の関連性を評価するため、薬物療法が行われた 59 例を対象に各転移臓器での治療後の腫瘍縮小効果を評価した。その結果、腎細胞癌における TLS の特徴は既に報告されていた肺がんの TLS の特徴とは異なることが示唆された。TLS の評価方法はいまだ確立されておらず、この違いが我々の TLS 評価法に由来するものである可能性もあった。そこで我々は別腫



瘍コホートとして膀胱癌 51 サンプルを用いて、TLS の評価を行い、その臨床的有用性について評価を行った。

同時に新規癌免疫療法の標的分子として TIGIT に着目し、TIGIT の癌免疫環境について詳細に評価を行った。

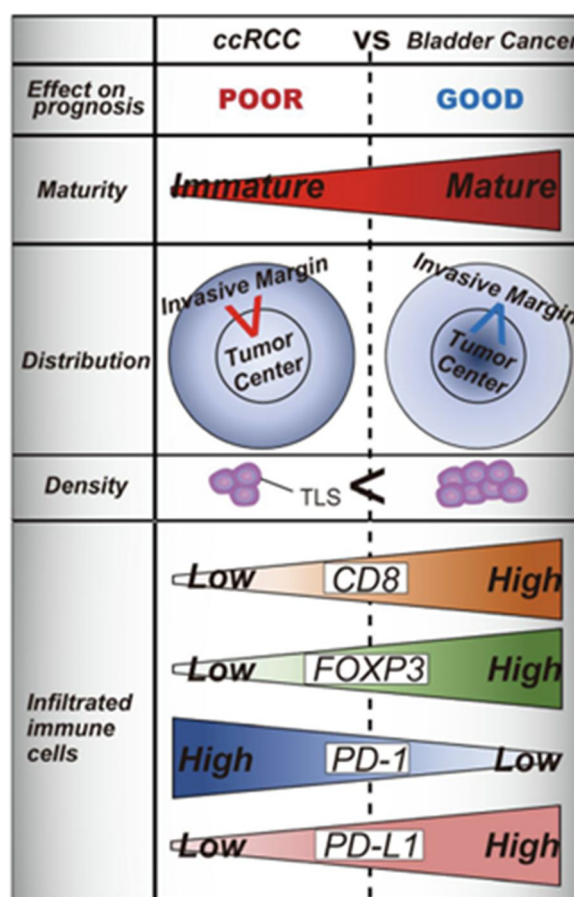
#### 4. 研究成果

105 例の転移性腎細胞癌患者の生存解析を行ったところ、TLS を有する群では予後不良であった。特に TLS 密度が高い症例で予後不良であることを認めた。続いて TLS の有無と遺伝子解析を行った。遺伝子解析の結果から癌制御に重要な PI3K-mTOR 経路、TP53/cell cycle 経路、クロマチンリモデリング経路、SWI/SNF 経路に分けて評価を行ったが、TLS の有無と関連する経路は認めなかった。メチル化解析の結果、TLS 陽性群では RNS ポリメラーゼ プロモーター、細胞間接着系が亢進していることが示された。さらに血管新生阻害剤であるチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) 治療前後での各転移臓器の腫瘍縮小評価を行った。その結果 TLS 陽性群では TKI 無効例 (最大効果が腫瘍増大、PD) が多かった (38% vs. 24%)。特に肺転移に限定すると、その違いはより大きなものになった。 (43% vs. 22%)。生存解析の結果、評価可能な転移巣を有しかつ TKI 治療を受けた 59 例では TLS 陽性群が TKI 治療開始からの生存期間が優位に短かった。 ( $p = 0.040$ )

これまでの報告では TLS 陽性群は予後良好と肺小細胞癌で報告されていた。そこで、膀胱癌 51 例を用いて同様に TLS の評価を行った。その結果膀胱癌においては TLS 陽性群が優位に予後良好であった ( $p = 0.043$ )。TLS は成熟するとともに抗原提示細胞や抗体産生能を獲得していくことが知られている。そこで我々は評価した TLS の成熟度合いについても評価を行った。今回我々は TLS を濾胞形成の有無と、濾胞形成かつ CD8 が周囲に集簇している程度から、early TLS, primary follicle-like TLS, secondary follicle-like TLS に分類した。その結果膀胱癌では early TLS 14 例 (27%)、primary follicle-like TLS 5 例 (10%)、secondary follicle-like TLS 9 例 (18%) を認めた。一方腎細胞癌ではすべてが early TLS に分類され、成熟した TLS が認められなかった。膀胱癌では TLS の成熟に伴い予後良好になっており、TLS の成熟度と予後の関連が示唆された。(右図) 以上の結果を Journal for immunotherapy of cancer に報告した。この結果は今後の癌免疫療法の発展に寄与すると考えられる。

また研究者は TIGIT に着目して癌免疫環境の評価を行った。その結果、TIGIT 高発現群では CD8+, FOXP3+ 陽性細胞が多く疲弊化した T 細胞環境を認め、PD-1+, PD-L1+ 細胞が多く、他の免疫チェックポイント分子発現との相関性が示唆され、CD68+, CD163+ 細胞が多く、主要関連の抑制された免疫環境が示唆された。同時に TIGIT 発現群は比較的予後良好であり、特に ICI 治療群ではその予後が良好であることが臨床試験コホートからも示唆された。さらに他癌種での免疫環境について公開データベースの RNAseq データを用いて解析を行い、悪性黒色腫と点性腎細胞癌では似た傾向を示すことを示した。同内容は第 61 回日本癌治療学会総会で報告した。TIGIT の癌免疫環境については現在詳細に検討を追加中である。

このように研究者は腎細胞癌の癌免疫環境について評価を行っており、その成果は今後の癌免疫療法の発展に寄与すると考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

|                                                                                                                                                                                                                                                  |                 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>Anno Tadatsugu, Tanaka Nobuyuki, Takamatsu Kimiharu, Hakozaiki Kyohei, Kufukihara Ryohei, Baba Yuto, Takeda Toshikazu, Matsumoto Kazuhiro, Morita Shinya, Kosaka Takeo, Mikami Shuji, Nishihara Hiroshi, Mizuno Ryuichi, Oya Mototsugu | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Prognostic role of the innate immune signature CD163 and “eat me” signal calreticulin in clear cell renal cell carcinoma                                                                                                              | 5. 発行年<br>2023年 |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Immunology, Immunotherapy                                                                                                                                                                                                       | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s00262-023-03369-8                                                                                                                                                                                            | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|                                                                                                                                                                              |                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>Kufukihara R, Tanaka N, Takamatsu K, Niwa N, Fukumoto K, Yasumizu Y, Takeda T, Matsumoto K, Morita S, Kosaka T, Hakozaiki K, Aimon E, Nishihara H, Mizuno R, Oya M | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Hybridisation chain reaction-based visualisation and screening for lncRNA profiles in clear-cell renal-cell carcinoma                                             | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>British Journal of Cancer                                                                                                                                          | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41416-022-01895-3                                                                                                                        | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|                                                                                                                                                                                       |                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>Masuda T, Tanaka N, Takamatsu K, Hakozaiki K, Takahashi R, Anno T, Kufukihara R, Shoji K, Mikami S, Shinojima T, Kakimi K, Tsunoda T, Aimon E, Nishihara H, Mizuno R, Oya M | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Unique characteristics of tertiary lymphoid structures in kidney clear cell carcinoma: prognostic outcome and comparison with bladder cancer                               | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>J Immunother Cancer                                                                                                                                                         | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1136/jitc-2021-003883                                                                                                                                   | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

|                                                                                                                                                               |                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>Izawa M, Tanaka N, Murakami T, Anno T, Teranishi Y, Takamatsu K, Mikami S, Kakimi K, Imamura T, Matsumoto K, Oya M                                  | 4. 巻<br>-       |
| 2. 論文標題<br>Single-Cell Phenotyping of CD73 Expression Reveals the Diversity of the Tumor Immune Microenvironment and Reflects the Prognosis of Bladder Cancer | 5. 発行年<br>2022年 |
| 3. 雑誌名<br>Laboratory Investigation                                                                                                                            | 6. 最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.labinv.2022.100040                                                                                                       | 査読の有無<br>有      |
| オープンアクセス<br>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<br>-       |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|                                                 |
|-------------------------------------------------|
| 1．発表者名<br>高松公晴                                  |
| 2．発表標題<br>腎細胞癌と固形癌の次世代免疫チェックポイント分子LAG3と腫瘍免疫微小環境 |
| 3．学会等名<br>第60回日本癌治療学会学術集会                       |
| 4．発表年<br>2022年                                  |

|                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------|
| 1．発表者名<br>高松公晴                                                    |
| 2．発表標題<br>次世代免疫チェックポイント分子(LAG-3, TIM-3, TIGIT)による腎細胞がん新規分類の臨床的有用性 |
| 3．学会等名<br>第109回日本泌尿器科学会総会                                         |
| 4．発表年<br>2022年                                                    |

|                                                 |
|-------------------------------------------------|
| 1．発表者名<br>高松公晴                                  |
| 2．発表標題<br>腎細胞癌における次世代免疫チェックポイント分子TIGITと腫瘍免疫微小環境 |
| 3．学会等名<br>第61回日本癌治療学会学術集会                       |
| 4．発表年<br>2023年                                  |

|                                                                                                                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1．発表者名<br>Kimiharu Takamatsu                                                                                                                                |
| 2．発表標題<br>Uncovering LAG-3 related tumor immunology in renal cell carcinoma and pan-cancer evaluation. American Society of Clinical Oncology Annual meeting |
| 3．学会等名<br>American Society of Clinical Oncology Annual meeting 2023                                                                                         |
| 4．発表年<br>2023年                                                                                                                                              |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|