日本医療研究開発機構
次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
（患者層別化マーカー探索技術の開発）
事後成果報告書

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）アミノ酸プロファイルによるがん免疫微小環境の代謝リプログラミング評価とがん免疫治療患者層別化技術の開発

（英　語）Evaluation of metabolic reprogramming in tumor immune microenvironment through amino-acid profiling and its application for stratifying patients under cancer immunotherapy

研究開発実施期間：令和元年 10 月 30 日～令和 6 年 3 月 31 日

研究開発代表者　氏名：（日本語）笹田　哲朗

（英　語）Sasada Tetsuro

研究開発代表者　所属機関・部署・役職：

（日本語）地方独立行政法人神奈川県立病院機構 神奈川県立がんセンター 臨床研究所 がん免疫療法研究開発学部・部長

（英　語）Kanagawa Cancer Center, Research Institute, Director of Division of Cancer Immunotherapy

II 研究開発の概要

免疫チェックポイント阻害薬（ICI: 抗 PD-1/PD-L1 抗体）が各種がんに対して臨床応用され、がん治療におけるパラダイムシフトが起きている。ただし、ICI の臨床効果は患者間で一定でないうえに重篤な免疫関連有害事象を合併する可能性があるため、効果の期待できる患者を的確に選別するための層別化技術の開発が望まれている。また、ICI は非常に高額(約 1000 万円/年)であるため、対象患者選別・治療休止の判断等に有用な患者層別化マーカーを用いた "個別化免疫治療"の開発は医療経済的にも喫緊の課題といえる。現在、日常臨床で使用されている ICI 治療患者層別化技術（PD-L1 発現、遺伝子変異数の解析）には腫瘍組織が用いられるが、進行がん患者での腫瘍組織採取は困難な場合も多く、また、組織検体特有の不均一性などの問題もあり予後予測精度は高くない。本研究の目的は、血中アミノ酸プロファイル解析により ICI 治療患者の層別化を可能とする高精度マーカー・技術を開発することである。本研究の成果は以下のとおりである。

研究開発項目①：アミノ酸プロファイルを用いた ICI 治療患者層別化技術の最適化

ICI 治療を行う進行再発肺がん患者において探索・検証の 2 段階の臨床試験を実施し、血漿アミノ酸・代謝物濃度を用いた層別化マーカーを臨床開発することを目的とした。非小細胞肺がん患者を対象に探索的臨床試験を実施（2022 年 2 月～2021 年 2 月に前向きコホート研究として 104 例を登録）し、ICI 治療開始前後の血漿アミノ酸・代謝物濃度を解析するとともに、臨床データを取得した。、血漿アミノ酸・代謝物の変動や全生存期間（OS）との相関が ICI・抗がん剤併用群と ICI 単剤治療群との間で異なることから、治療群別に解析し最大 4 種のアミノ酸・代謝物の組み合わせによる OS 判別式を作成した。ICI・抗がん剤併用群での OS 判別式（10 種）を作成するとともに、全集団を対象とし ICI 治療への抗がん剤上乗せ効果の判別にも有用な共変量モデル（10 種）、層別モデル（10 種）による OS 判別式を作成し、知財化した（2022 年 4 月特許出願）が、最終的には、ICI・抗がん剤併用群での OS 判別性能に加え、ICI 単剤群での OS 判別性能も考慮して、3 種の判別式を開発候補とした。さらに、探索的臨床試験で得られた候補判別式の性能・再現性を検証するために、非小細胞肺がん患者を対象に検証的臨床試験を実施（2022 年 3 月～2023 年 12 月に前向きコホート研究として 143 例を登録）した。中間解析として 3 種の候補判別式の OS 判別性能を解析した結果、2 つの判別式で極めて高い再現性が確認された。今度、2024 年 12 月まで予後追跡を継続したのち、最終解析を行う予定である。

アミノ酸プロファイルの変化および ICI 効果との相関を来すメカニズムを解明するために、末梢血単核球(PBMC)の（単一細胞）遺伝子発現解析、血漿中液性因子の網羅的解析、末梢血免疫細胞の phenotype 解析、腸内細菌叢メタゲノム解析、等を実施した。PBMC の bulk RNA-Seq 解析、単一細胞 RNA-Seq（scRNA-Seq）解析により、OS 判別式を構成するアミノ酸・代謝物の制御にかかわる遺伝子群を同定するとともに、OS 判別式と末梢血・腫瘍局所での免疫細胞プロファイルとの相関を明らかとした。また、血漿中液性因子を網羅的に解析し、機械学習により 14 種のサイトカインと臨床情報 7 因子を用いて、高精度な OS 予測モデルを構築した。さらに、腫瘍検体での遺伝子発現を解析し、予後良好因子として OS 判別式に選択されるアミノ酸・代謝物の血漿中濃度は、抑制性腫瘍微小環境と負の相関することを明らかとした。なお、アミノ酸・代謝物濃度と血漿中液性因子（サイトカイン）、末梢血免疫細胞の phenotype、腸内細菌叢メタゲノムとの相関を解析したところ、OS 予測判別式を構成するアミノ酸・Trp 代謝物群は免疫活性化・抑制に関与する多数のサイトカイン・免疫細胞と正あるいは負に強く相関した。これらの結果から、血漿中アミノ酸・代謝物が免疫系細胞の活性化、サイトカイン分泌などを制御することにより ICI 応答性に関与しているものと思われた。

研究開発項目②：マウス移植腫瘍モデルでのアミノ酸プロファイルと ICI 効果の相関メカニズムの解明

臨床試験で同定された患者層別化に有用なアミノ酸プロファイルおよび ICI 効果との相関をマウス移植腫瘍モデルで再現し、そのメカニズムを詳細に検討することにより、アミノ酸プロファイルによる層別化の理論的裏付

けの確立を目的とした。マウス移植腫瘍モデルにおいて、血漿・腫瘍組織間でアミノ酸・代謝物濃度に正の相関が認められ、腫瘍微小環境における代謝変動が血漿アミノ酸プロファイルに反映されることが示された。また、ICI 治療効果予測に有用な血漿中アミノ酸プロファイルと強く相関した遺伝子 X が、アミノ酸プロファイル変化を介して ICI 治療効果を制御する可能性をマウス移植腫瘍モデルで示した。

<u>研究開発項目③：アミノ酸プロファイルを用いた ICI 治療患者層別化技術の実用化</u>

研究開発項目①で肺がん患者を対象に実施した探索的臨床試験において、アミノ酸・代謝物分析値の組み合わせによる OS 予測判別式を作成し、知財化（2022 年 4 月に基礎出願、2023 年 4 月に PCT 国際出願）した。また、本技術の実用化に向けて、標準化したアミノ酸・代謝物分析系を臨床 GLP 認証検査会社に技術移管しバリデーションデータを取得した。

アミノ酸・代謝物分析値の組み合わせによる多変量判別アルゴリズムを薬事申請するための評価パッケージや検証的臨床試験の進め方に関して PMDA 相談を繰り返して実施（全般相談 6 回、開発前相談 1 回）した。治療薬の選択指標として薬事申請するには「本技術により層別化された患者での治療薬有無による RCT 試験での生存率の評価」が必要である等の助言・指導を受けたが、既承認薬の RCT 試験に対する倫理的な懸念等から試験デザインとして実施困難と判断された。したがって、本技術の診断補助検査としての認知度を高め RCT 試験実施に向けてのエビデンスを蓄積するために、本事業終了後（2025 年度）に自由診療研究検査として事業化を進める計画とした。味の素㈱では健診領域におけるアミノ酸プロファイル検査サービスを自由診療事業として実施しているが、その事業基盤を活用して臨床展開する予定である。

アミノ酸プロファイルを用いた ICI 治療患者層別化技術の汎用性を高めるため、ICI 治療をうける進行・再発胃がん・食道がんを対象とした探索的臨床試験を実施（2021 年 2 月～2023 年 12 月に 122 例を患者登録）した。最大 4 種のアミノ酸・代謝物の組み合わせにより、高い OS 判別性能を有する多変量判別式を作成した。また、肺がん探索的臨床試験で作成した OS 判別式が、胃がんにおいても有意な判別性能を有することが確認された。さらに、ICI 単剤治療をうけた進行・再発尿路上皮がん（72 例）の保存血液検体を用いて高い OS 判別性能を有する多変量判別式を作成した。また、肺がん探索的臨床試験で作成した OS 判別式が、尿路上皮がんにおいても有意な判別性能を有することが確認された。以上の結果から、肺がん探索的臨床試験で作成した OS 判別式は他がん種（胃がん・尿路上皮がん）においても一定の判別性能を示したが、OS 判別に最適なアミノ酸・代謝物の組み合わせは各がん種間で異なるものと示唆された。

<u>研究開発項目④：高精度または簡便・低コストなアミノ酸プロファイル新規診断薬・医療機器の開発</u>

微量 Trp 代謝物の高精度測定法として、LC-MS/MS 質量分析法を開発し標準化した。臨床検体分析としての標準化を行う目的で臨床検査会社へ技術移管し、分析法バリデーションデータを取得した。また、臨床試験において適用しているアミノ酸分析用の検体 SOP に従うことで、Trp 代謝物の血中安定性が確保されることを確認した。標準化した分析法を用いて、研究開発項目①・③の臨床試験登録患者検体のアミノ酸・代謝物分析を実施し、ICI 治療効果を予測する高精度で再現性の高い多変量判別式を作成可能であることを確認した。

層別化因子として選択された複数のアミノ酸・代謝物に関して簡便・低コストの分析を可能とするために、アミノ酸分析法と代謝物分析法の統合分析法を開発した。

Since clinical responses to immune checkpoint inhibitors (ICIs: anti-PD-1/PD-L1 antibodies) are not consistent among patients, it is desirable to develop a stratification technique to accurately select patients who are likely to benefit from ICIs. The purpose of this study is to develop a reliable stratification technique in ICI-treated patients by analysis of plasma amino acid profiles. The results are as follows.

1. Optimization of stratification technique by amino acid profiling in ICI-treated patients.

The objective is to conduct clinical development of a stratification technique using plasma amino acid/metabolite concentrations through exploratory and validation two-stage clinical studies in patients with advanced/recurrent non-small cell lung cancer (NSCLC) treated with ICIs. In the exploratory clinical study (104 patients were enrolled from February 2021 to February 2022), we developed overall survival (OS) discrimination formulas based on combination of up to four types of amino acids/metabolites and applied for a patent for them in April 2022. Furthermore, in the validation clinical study (143 patients were enrolled from March 2022 to December 2023), we verified the performance and reproducibility of the discriminant formulas obtained in the exploratory clinical study.

Using blood, stool, and tumor tissue samples from the patients enrolled in the clinical studies, we performed (single-cell) RNA-Seq analysis of peripheral blood mononuclear cells, comprehensive analysis of plasma humoral factors, phenotype analysis of peripheral blood immune cells, and metagenomic analysis of intestinal microflora. From these analyses, we identified genes involved in the regulation of amino acids/metabolites that constitute the OS discriminant formulas. In addition, we found that plasma amino acids/metabolites important for OS prediction were correlated positively or negatively with many cytokines and/or immune cells in peripheral blood, suggesting that plasma amino acids/metabolites may be involved in ICI responsiveness by regulating systemic immune cell activation and cytokine secretion.

2: Elucidation of the correlation mechanism between amino acid profiles and ICI effects in mouse transplant tumor models.

We aimed to develop mechanistic insights of the correlation between amino acid profiles and ICI effects in mouse transplant tumor models. A positive correlation between plasma and tumor tissue was observed in the concentrations of amino acids/metabolites that constituted the OS discriminant formulas in the clinical trials, suggesting that metabolic changes in the tumor microenvironment might be reflected by the plasma amino acid profiles. In addition, we demonstrated that a gene X strongly correlated with plasma amino acid profiles useful for predicting ICI treatment efficacy regulates responses to ICI treatment possibly through amino acid profile changes in a mouse transplant tumor model.

3. Practical application of the stratification technology by amino acid profiling in ICI-treated patients.

PMDA consultations were repeated (6 general consultations and 1 pre-development consultation) on the evaluation package for filing a regulatory application for the OS discrimination algorithm based on amino acid/metabolite analysis and on how to proceed with validation clinical trials. The PMDA provided advice and guidance on the need to "evaluate the survival rate in an RCT study of patients stratified by this technology with and without a therapeutic drug" in order to file a regulatory application as a standard therapeutic drug selection index, but such study design was judged to be difficult to implement due to ethical concerns about RCT studies of already approved drugs. Therefore, in order to increase the recognition of this stratification technology as an adjunctive diagnostic test and accumulate evidence for conducting an RCT test, we decided to proceed with the commercialization of this technology as an unrestricted research test in FY2025.

In order to increase the versatility of the stratification technology by amino acid profiling in ICI-treated patients, new formulas with high OS discrimination performance were developed by using

blood samples from ICI-treated advanced/recurrent gastric and esophageal cancer patients (122 patients) and urothelial carcinoma patients (72 patients). In addition, the OS discrimination formulas developed in the NSCLC exploratory clinical study were shown to have a certain level of discrimination performance in other cancer types (gastric cancer and urothelial carcinoma), but it was suggested that the optimal combination of amino acids/metabolites for OS discrimination may differ among cancer types.

4. **Development of new diagnostic reagents and medical devices for amino acid profiling with high accuracy, simplicity, and low cost**

LC-MS/MS mass spectrometry was developed and standardized as a highly accurate method for measuring trace Trp metabolites. The technology was transferred to a clinical laboratory company for standardization of analysis of clinical specimens, and validation data of the analytical method was obtained. Furthermore, it was confirmed that the blood stability of Trp metabolites was ensured by following the sample SOP for amino acid analysis already applied in the clinical studies. Using the standardized analytical methods, we conducted amino acid/metabolite analysis of specimens from patients enrolled in the clinical studies and confirmed that it is possible to create highly accurate discriminant formulas to predict ICI treatment efficacy. In order to enable simple and low-cost analysis of multiple amino acids/metabolites selected for the discriminant formula, we developed an integrated analysis method of the selected amino acids/metabolites.