

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
H25年度 総括研究報告書

がん免疫逃避機構を標的にした次世代型免疫治療の
臨床応用と新規バイオマーカーの探索に関する研究

研究代表者 小西 郁生
研究分担者 松村 謙臣
研究分担者 濱西 潤三

京都大学大学院 医学研究科 婦人科学産科学

研究要旨

高齢化社会の中で、がんによる死亡は増加し続けており、難治性がん患者に対する現行の抗がん治療(手術、化学療法、放射線治療)に代わるあるいは補完するような新規治療法の開発が求められている。近年のがん分子生物学の急速な進歩とともに、がんに対する免疫応答やそのメカニズムを応用した新規治療が非常に注目されている。我々は卵巣がんにおいて、免疫抑制因子 Programmed cell death 1 (PD-1) のリガンド PD-L1 を発現して宿主免疫から逃れる、免疫逃避機構の存在が、その進展や転移過程において重要な分子であることを示してきた。さらに PD-L1 シグナルを阻止することでがん免疫の再活性化を目指す全く新しい概念に基づいた免疫治療の研究開発を行ってきた。このような、分子シグナルを標的とする治療法の開発においては、従来のように縮小効果のみを指標にした開発プロセスでは不十分であり、より詳細な解析に基づいた作用メカニズム、副作用の発現機序、治療効果予測を確立することで、はじめて効率的な臨床導入が可能になる。一方、このような研究は、企業単独で行うことは難しく、大学のような学術的な役割をもつ研究機関が主体となって複合体を形成し、有機的に研究を進めることが必要である。

本研究は、平成 23 年度から開始した、プラチナ製剤耐性の進行・再発卵巣がんに対して完全ヒト型抗 PD-1 抗体を用いた臨床第 II 相医師主導治験の実施と同時に、臨床・基礎両面から包括的な免疫学的解析を行い、治療効果予測や効果判定、有効患者選択、副作用などのバイオマーカーを同定し、得られた成果により迅速な薬剤承認申請に結び付けることを目的とする。すなわち、企業から薬剤と治験に必要な安全性情報の提供を受け、臨床部門としての産婦人科と大学内トランスレーショナルリサーチ部門を中心に治験を行うと共に、さらに免疫基礎部門が協力して治療前後の検体を用いた基礎・臨床両面から免疫学的解析を行って、新規がん免疫療法における有効性や安全性に関するバイオマーカーの開発を同時に行う。これにより、将来的に卵巣がんのみでなくあらゆるがん腫において、抗体療法の安全な臨床適用が可能となる。またメカニズム解析に基づき、既存の治療法との相乗効果を期待した併用療法による新規治療法の開発も並行して行うことも期待できる。

以上から、当研究によって、我が国が米国などに遅れをとっているがんの免疫療法が新たな治療モダリティとして広く受け入れられ、また単に薬剤のみでなく、有用なバイオマーカーをともに提供するという新しい薬剤・医療開発のかたちをもたらし、国内・外問わずその学術的影響は大きいと考えられる。

A. 研究目的

がんによる死亡は年々増加しており、卵巣癌を含む難治性がんに対する早急な対応が求められている。このような背景の中で、免疫療法は有望な新規治療の一つとして考えられているが、現在まで期待通りの臨床効果を得られていない。その最大の理由として、癌細胞がみずから免疫を抑制し、宿主免疫から逃れる『免疫逃避機構』の存在がある。我々は、これを司る代表的な免疫抑制因子の Programmed cell death 1 (PD-1) およびそのリガンド PD-L1・L2 に関する研究を継続しており、その同定から機能解析、さらにマウスにおける癌治療実験での有効性を明らかにした。特に卵巣癌の多くが PD-L1 を発現し腫瘍局所での免疫能を低下させ、患者の予後を不良にしていることを示してきた。そこで現在、我々はこの PD-1/PD-L1 経路を阻害して免疫の再活性化を誘導するという、免疫療法では全く新しい概念に基づいたがん治療の臨床応用を目指している。

本研究における第1の目的は、本研究期間内に当科で行う卵巣癌患者を対象にした抗 PD-1 抗体を用いた臨床第 II 相医師主導治療を行う過程で、これまで当科で治療してきた卵巣癌腫瘍検体や採血検体を用いた PD-1/PD-L1 経路にかかわる網羅的遺伝子解析による患者選択マーカーの探索および動物実験を用いた検証だけでなく、実際の治療薬投与前後での被験者検体を用いて、直接的に新規治療薬のバイオマーカーを探索することである。すなわち、治療薬の有効

性を検証するだけでなく、有効な患者を選択するためのマーカーや早期に有効性を予測するサロゲートマーカーの検索が極めて重要であると考え、治験と同時に治験者の検体を用いて、オーミクス解析による詳細かつ網羅的な免疫学的解析を行ない、治療上有効なバイオマーカーを同定する。これらによって得られた解析データから、単に薬剤の治験にとどまらず、薬剤を有効に臨床導入するためのコンパニオン診断薬に資するマーカーを探索することにより、新たな診断・治療プラットフォームの一括した提供を目指す。

B. 研究方法

<ヒト卵巣癌細胞株および臨床検体を用いたバイオマーカー探索>

腫瘍組織の PD-L1 発現が治療効果予測のバイオマーカーの一つであることが示唆されており、卵巣癌における(1)PD-L1 発現メカニズム解明、(2)発現測定の精度管理方法を検討することとした。

(1)卵巣癌の PD-L1 発現誘導のメカニズム解明:ヒト卵巣癌細胞の PD-L1 遺伝子発現とがんゲノム変異との相関解析について、ヒト卵巣癌細胞株のマイクロアレイおよびゲノムシーケンスデータ解析の結果、PD-L1 を高発現している細胞株のうち既知のゲノム変異を評価した。一方で卵巣癌患者の半数以上の症例で PD-L1 高発現しているため、ヒト卵巣癌の PD-L1 発現は、生体内でガン進展やがん治療の経過中に誘導されている

可能性が示された。そこで、今年度は抗がん剤治療の経過における PD-L1 発現変化を以下のように解析した。すなわち抗がん剤治療による卵巣癌細胞の PD-L1 発現変化の解明を目的に、抗がん剤治療の経過中の卵巣癌癌性腹水中の腫瘍細胞の PD-L1 発現を解析し経時的変化を解析した。さらに in vitro での卵巣癌細胞株への抗がん剤添加培養のマイクロアレイデータから優位に上昇する遺伝子、遺伝子群をピックアップした。

(2) 免疫組織染色による PD-L1 発現解析・評価の精度管理法の確立

腫瘍組織の PD-L1 発現が治療効果予測のバイオマーカーであることが示唆されており、免疫染色による PD-L1 発現解析・評価法を、臨床的に「研究 grade」から「診断グレード grade」への精度管理向上を目指した。

< 医師主導治験の被験者検体を用いたバイオマーカー探索の開始 >

「再発・進行卵巣癌に対する抗 PD-1 抗体 (Nivolumab) を用いた免疫療法の臨床第 II 相、医師主導治験」(UMIN000005714; 現在症例登録中) の治験薬投与前後や治療効果を認めた症例について、(1) 血清サイトカインや血球分画解析および(2) 末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析を行った。

C. 研究結果

< ヒト卵巣癌細胞株および臨床検体を用いたバイオマーカー探索 >

(1) 卵巣癌の PD-L1 発現誘導のメカニズム解明として、抗がん剤治療の経過中の卵巣癌癌性腹水中の腫瘍細胞の PD-L1 発現を

解析した結果、抗がん剤投与前には PD-L1 が発現していなかったが、投与直後に再度腹水を採取できた症例において PD-L1 発現が誘導していた。そこで in vitro での卵巣癌細胞株の抗がん剤添加培養実験を行い、網羅的遺伝子発現解析を行った結果、ある種の転写因子経路活性が増強しかつ PD-L1 発現が増強していた。これらは NF- κ B-p65 の siRNA を行うことにより反証できた。すなわち卵巣癌では抗がん剤治療の経過中にもダイナミックに PD-L1 発現が変化している可能性が示唆された。本知見は現在論文報告の準備をしている。

(3) 免疫組織染色による PD-L1 発現解析・評価の精度管理法の確立

腫瘍組織の PD-L1 発現が治療効果予測のバイオマーカーである可能性が示唆されており、従来の研究室での免疫染色による PD-L1 発現解析・評価法を、より臨床的に「診断グレード grade」へ近づけるべく、今後は某検査会社と基礎研究室との共同研究によって精度管理確立を進める予定にしている。また本治験腫瘍検体や次相試験(現在未定)においても検証できる準備を始めている。

< 医師主導治験の被験者検体を用いたバイオマーカー探索の開始 >

「再発・進行卵巣癌に対する抗 PD-1 抗体 (Nivolumab) を用いた免疫療法の臨床第 II 相、医師主導治験」(UMIN000005714) の治験薬投与前後や治療効果を認めた症例で被験者採血検体を用いた解析をおこなった(現在被験者登録中であるため、一部のみの解析)。

(1) 採血検体を用いて、血清サイトカイン測定および血球分画解析

被験者検体の治験経過中に、血清サイトカイン測定および血球分画解析を行った結果、治験薬投与前後でサイトカインが有意に変化した症例はなかった。

(2) 末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析

被験者検体の末梢血単核球の網羅的遺伝子発現解析を行った結果、治験薬の投与前後において、既報の免疫抑制関連の遺伝子群が有意に変化することがわかった。一方で、T cell gene signature や B cell gene signature については、有意な変化はなかった。すなわち抗 PD-1 抗体投与により、新たに別の免疫抑制因子が発動もしくは顕在化し、新たながん免疫抑制が働く可能性が示唆された。また、まだ数例ではあるが有効例を認めており、それらと治療に反応しなかった無効例との比較によって、有効例で、サイトカイン gene signature が上昇していることがわかった。まだプレリミナリーな結果であるが、有効例では末梢血における末梢血単核球分画におけるサイトカイン gene signature を検出することにより、治療効果予測ができる可能性が示唆されており、今後追試していく予定である。またさらに登録終了後に全症例を対象に有効性と安全性(有害事象)について、末梢血を用いた網羅的解析を行う予定にしており、上記だけでなくさらなる新規細胞分画、遺伝子、遺伝子群 gene signature を探索していく予定である。

D. 考察

本治験で用いられている抗 PD-1 抗体は、

阻害抗体であり、卵巣癌よりも先行して他種のがんで臨床試験が先行しており、世界中で革新的な変化を与える治療法であると期待されている。

しかしながら、先行している国外の治験同様、当科での検討にても、本治験薬が、全ての患者に対して有効性を示すわけではない。そこで今回、単一遺伝子の動きだけでなく、複数個の共通した遺伝子変化 (gene signature) を、新たなバイオマーカーとしてとらえる、という全く新しいコンセプトを見出すことができた。

またさらに PD-1 のノックアウトマウスでは、多種の自己免疫疾患が認められることもあり、今後想定していないような有害事象が発生することも危惧される。そのため、効果だけでなく、特に重篤や、頻度が高い有害事象については、それらを規定するようなバイオマーカーも同時並行で今後検討する必要があると考えられる。

治験後半開始にあたり、被験者検体からの比較オミクス解析が可能となるため、より多くの情報が今後抽出できる可能性があり、今回得られた解析方法を駆使してさらなるバイオマーカー探索と検証を行っていく。

E. 結論

卵巣癌における PD-L1 を軸とした腫瘍局所の免疫環境は、発がん課程から、さらに腫瘍細胞の宿主免疫への働きかけから変化することが示唆され、さらにその変化が卵巣癌の抗がん剤治療にも関与していることが新たに示すことができた。今後は、実際の被験者検体を用いて、免疫環境の変化をより詳細にとらえ、新規治療や現行の抗がん剤治療の補完を念頭に病態解明から治療開発をす

すめることは非常に重要であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

< 英文 >

1. Himoto Y, Fujimoto K, Kido A, Matsumura N, Baba T, Daido S, Kiguchi K, Shitano F, Konishi I, Togashi K. Int J Gynecol Cancer. 2014 May;24(4):751-7. doi: 10.1097/IGC.000000000000124. Assessment of the early predictive power of quantitative magnetic resonance imaging parameters during neoadjuvant chemotherapy for uterine cervical cancer.
2. Fujii S, Kido A, Mikami Y, Matsumura N, Konishi I, Togashi K. Peritumoral enhancement in endometrial cancer on dynamic contrast-enhanced imaging: Radiologic-pathologic correlation. J Obstet Gynaecol Res. 2014 May;40(5):1445-9. doi: 10.1111/jog.12318. Epub 2014 Mar 9.
3. Koshiyama M, Matsumura N, Baba T, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Konishi I. Two cases of recurrent ovarian clear cell carcinoma treated with sorafenib. Cancer Biol Ther. 2014 Jan;15(1):22-5. doi: 10.4161/cbt.26608. Epub 2013 Oct 21.
4. Yamaguchi K, Huang Z, Matsumura N, Mandai M, Okamoto T, Baba T, Konishi I, Berchuck A, Murphy SK. Epigenetic determinants of ovarian clear cell carcinoma biology. Int J Cancer. 2013 Dec 31. doi: 10.1002/ijc.28701. [Epub ahead of print]
5. Yamanoi K, Matsumura N, Kido A, Baba T, Hamanishi J, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Abou Taleb H, Togashi K, Konishi I. A novel diagnostic criterion for lymph node metastasis in cervical cancer using multi-detector computed tomography. Gynecol Oncol. 2013 Dec;131(3):701-7. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.10.014. Epub 2013 Oct 19. PMID: 24145112
6. Eto T, Saito T, Shimokawa M, Hatae M, Takeshima N, Kobayashi H, Kasamatsu T, Yoshikawa H, Kamura T, Konishi I. Status of treatment for the overall population of patients with stage IVb endometrial cancer, and evaluation of the role of preoperative chemotherapy: a retrospective multi-institutional study of 426 patients in Japan. Gynecol Oncol. 2013 Dec;131(3):574-80. doi: 10.1016/j.ygyno.2013.08.036. Epub 2013 Sep 7.
7. Taga A, Kondoh E, Hamanishi J, Kawasaki K, Fujita K, Mogami H, Konishi I.

- Transverse fundal uterine incision for delivery of extremely low birth-weight infants. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013 Nov 7.
8. Amano Y, Mandai M, Baba T, Hamanishi J, Yoshioka Y, Matsumura N, Konishi I.
Recurrence of a carcinoid tumor of the ovary 13 years after the primary surgery: A case report. *Oncol Lett.* 2013 Nov;6(5):1241-1244. Epub 2013 Aug 6. PMID: 24179502 [PubMed]
 9. Okamoto T, Mandai M, Matsumura N, Yamaguchi K, Kondoh H, Amano Y, Baba T, Hamanishi J, Abiko K, Kosaka K, Murphy SK, Mori S, Konishi I.
Hepatocyte nuclear factor-1 β (HNF-1 β) promotes glucose uptake and glycolytic activity in ovarian clear cell carcinoma. *Mol Carcinog.* 2013 Sep 17. doi: 10.1002/mc.22072. [Epub ahead of print] PMID: 24105991
 10. Takamatsu S, Matsumura N, Baba T, Mandai M, Mikami Y, Konishi I.
Humoral hypercalcemia caused by uterine corpus carcinosarcoma consisting of squamous cell carcinoma in its epithelial component. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014 Jan;40(1):263-7. doi: 0.1111/jog.12136. Epub 2013 Sep 5.
 11. Kawamura Y, Kondoh E, Hamanishi J, Kawasaki K, Fujita K, Ueda A, Kawamura A, Mogami H, Konishi I.
Treatment decision-making for post-partum hemorrhage using dynamic contrast-enhanced computed tomography. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014 Jan;40(1):67-74. doi: 10.1111/jog.12123. Epub 2013 Aug 12. PMID: 23937115
 12. Nishikawa A, Kondoh E, Hamanishi J, Yamaguchi K, Ueda A, Sato Y, Konishi I.
Ileal perforation and massive intestinal haemorrhage from endometriosis in pregnancy: case report and literature review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013 Sep;170(1):20-4. doi: 10.1016/j.ejogrb.2013.04.018. Epub 2013 Jun 10. PMID: 23763952
 13. Tan TZ, Miow QH, Huang RY, Wong MK, Ye J, Lau JA, Wu MC, Bin Abdul Hadi LH, Soong R, Choolani M, Davidson B, Nesland JM, Wang LZ, Matsumura N, Mandai M, Konishi I, Goh BC, Chang JT, Thiery JP, Mori S.
Functional genomics identifies five distinct molecular subtypes with clinical relevance and pathways for growth control in epithelial ovarian cancer. *EMBO Mol Med.* 2013 Jul;5(7):983-98. doi: 10.1002/emmm.201201823. Epub 2013 May 13.

14. Kharma B, Baba T, Mandai M, Matsumura N, Murphy SK, Kang HS, Yamanoi K, Hamanishi J, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Konishi I. Int J Cancer. 2013 Nov;133(9):2234-44. doi: 10.1002/ijc.28220. Epub 2013 May 25.
15. Kharma B, Baba T, Mandai M, Matsumura N, Murphy SK, Kang HS, Yamanoi K, Hamanishi J, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Konishi I. Utilization of genomic signatures to identify high-efficacy candidate drugs for chemorefractory endometrial cancers. Int J Cancer. 2013 Nov;133(9):2234-44. doi: 10.1002/ijc.28220. Epub 2013 May 25. PMID: 23595697
- <和文>
1. 京都がん研究会メールマガジン 2013年11月号
「**卵巣がんに対する抗PD-1抗体を用いた新規分子標的治療の医師主導治験**」
濱西潤三 小西郁生
 2. [産科と婦人科 80\(4\)](#): 510 -512 2013
卵巣癌の腫瘍局所における包括的な免疫環境の解析と治療応用への基礎的研究
濱西 潤三
 3. 産科と婦人科 2014年 Vol.81 No.2
2014-01-17
がん免疫療法の最前線
- 再発・進行卵巣がんに対する抗PD-1抗体を用いた免疫療法
2. <学会発表>
 1. 第21回 きたの産婦人科セミナー
卵巣癌における“がん免疫機構”の解明と次世代型免疫療法の臨床応用に向けて平成25年1月26日
北野病院 きたのホール 濱西潤三
 2. KCOG 婦人科分科会
特別講演「卵巣癌におけるがん免疫逃避機構を標的にした新規治療開発」
～抗PD-1抗体を用いた免疫療法の臨床応用～
平成25年3月22日 濱西潤三
 3. 第17回日本がん免疫学会学術講演会
PD-1 / PD-L1 経路を標的とした卵巣癌に対する新規治療の臨床応用と展望～Chemo-Immunotherapy の基礎的検討～平成25年7月5日 宇部市
 4. AACR Advances in Ovarian Cancer Research From Concept to Clinic - Cancer Immunology September 18-21, 2013 J.W. Marriott Marquis Miami Miami, FL
Induction of PD-L1 expression by cytotoxic agents through activation of NF-kB signal. Junzo Hamanishi
 5. 72nd JCA (日本癌学会) 2013.10.3
Yokohama Symposia on Specific Tumors
Development of novel therapy targeting immune escape in ovarian cancer.~

- Immunotherapy using anti PD-1 antibody ~ Junzo Hamanishi
6. 京都産婦人科研究会 特別講演
当科における卵巣癌に対する新しい治療の試み ~ 抗 PD-1 抗体を用いた分子標的治療の臨床応用 ~
京都センチュリーホテル
平成 25 年 10 月 19 日 瀨西潤三
 7. 第 51 回 日本癌治療学会学術集会
PD-1 / PD-L1 シグナルを標的とした卵巣癌に対する免疫化学療法の基礎的検討 平成 25 年 10 月 23 日
京都国際会議場 瀨西潤三
 8. 2013/11/09 京都国際ホテル
京都産婦人科医会 学術研修会特別講演 当科における子宮頸癌への新しい取り組み 瀨西潤三
 9. 2013/11/14 京都ホテルオークラ
京都小児科・産婦人科座談会
ワクチン接種普及に向けて ~ 生後 2 カ月からのワクチンデビューの推進と子宮頸がん予防ワクチンの適正接種に向けて ~ 瀨西 潤三
 10. 2013/12/6 いわて県民情報交流センター
第 26 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 日本バイオセラピー学会・日本癌免疫学会合同シンポジウム
「がん免疫抑制・免疫疲弊の克服卵巣癌におけるがん免疫逃避機構を標的にした新しい治療戦略 ~ PD-1 / PD-L1 経路を標的とした新規免疫療法 ~
瀨西潤三
 11. 2013.12.13 Kyoto
The 3rd Biennial Meeting of ASGO / The 55th JSGO Meeting
The 55th JSGO Grant Seminar “Comprehensive analysis of immune status in ovarian cancer patients: Toward development of novel chemo-immunotherapy”
Junzo Hamanishi
 12. 2014/2/20 ウェスティン都ホテル京都
第 15 回 京都臨床腫瘍内科懇話会
卵巣癌治療への新たな挑戦 ~ 抗 PD-1 抗体 (Nivolumab) を用いた医師主導治験への道標 ~
 13. 2014/3/7 京都教育文化センター
第 27 回京都がん研究会ミニ レクチャー
抗 PD-1 抗体 (Nivolumab) を用いた医師主導治験 ~ 卵巣癌への新しい治療開発を目指して ~

・ 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

がん免疫逃避機構を標的にした次世代型免疫治療の臨床応用と新規バイオマーカーの探索に関する研究

研究分担者 清水 章 京都大学 教授

研究要旨 抗 PD1 抗体の投与によりがん細胞の免疫逃避を阻止する次世代型免疫治療を実用化することを目指し、治療効果の判定、治療効果の予測に有用な新規バイオマーカーを探索する。プラチナ抵抗性の再発卵巣がんを対象に、遺伝子発現を含む免疫反応の指標となる多数のマーカーを検索し、抗 PD1 抗体を投与された被験者と投与を受けていない患者のおける差、予後および治療効果との相関など検討することで新規バイオマーカーの探索を試みる。このような解析の前提となる抗 PD1 抗体を投与された被験者を抗 PD1 抗体製剤の早期第2相治験を医師主導で行うことによって得る。

A. 研究目的

がん細胞が、免疫反応を抑制する PD1-PDL1 信号を生成して免疫逃避することを標的とし、抗 PD1 抗体の投与により免疫逃避を解除する、次世代型の免疫治療を実用化することを目指し、このために必須な治療効果の判定、治療効果の予測に有用な新規バイオマーカーを探索する。

B. 研究方法

免疫反応は高度に生物種特異的であるので、抗 PD1 抗体を投与された被験者と一般的化学療法を受けた患者にける差を検索することで、はじめて臨床的に有用な、ヒトにおけるマーカーの探索が可能となる。解析の前提となる抗 PD1 抗体を投与された被験者を得るために、抗 PD1 抗体製剤の早期第2相治験を医師主導で実施し、一般的化学療法を受けた患者からの試料とともに解析に資する。このために必要な臨床試験への支援を行い、解析に必要な患者由来試料を蓄積、保管する。

(倫理面への配慮)

必要な倫理委審査 (IRB 審査) などを経て治験届を PMDA に提出し、受理されている。目標患者数を達成するための試験期間延長と、他がん種を対象に我が国ならびに米国において実施されている臨床試験からの情報等をもとに臨床試験計画書等の改訂を行い、計画変更届等必要な手続きを行った。治験参加者と一般的化学療法を受けた患者からの試料を解析する研究について、別途倫理審査を受け承認を得ている。

C. 研究結果

抗 PD1 抗体を投与する医師主導治験は保の順調に実施され、抗 PD1 抗体を投与された被験者および一般的化学療法を受けた患者からのマーカー探索用試料が収集されている。抗 PD1 抗体を投与する医師主導治験においては、低用量群への被験者登録を完了し、安全性を確認した上で高用量群への移行をおこない、目標症例数の登録を完了した。

D. 考察

抗 PD1 抗体製剤の早期第2相治験を医師主導で実施するため、多岐にわたる臨床試験支援が的確に行われ、目標症例数の被験者登録を完了、順調に試料の収集が行われている。

E. 結論

高度に生物種特異的なバイオマーカーの探索にはヒトを対象とした研究が必須である。その前提となる早期第2相治験を医師主導で実施するためには、多岐にわたる臨床試験支援を、時機を逃さず的確に行うことが不可欠である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Annal. Surg. Oncol. 20 巻, 2213-2218 (2013)

Biochem. Biophys. Acta-General Sub. 1830 巻, 4046-4052 (2013)

Tissue Engineer. Part A 19 巻, 17-18, (2013)

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

いずれも該当なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

がん免疫逃避機構を標的とした次世代型免疫治療における新規バイオマーカーの探索に関する研究

研究分担者 岡崎 拓 徳島大学 教授

研究要旨

がんの免疫療法は難治性がんに対する新規治療法として注目されてきたが、現在まで期待されたほどの効果は得られていない。我々は、免疫抑制受容体 PD-1 (Programmed cell death-1) が、がんによる免疫逃避機構に強く関与していることを見出したことから、PD-1 阻害によるがん免疫の再活性化を目指した新規治療法の開発を行ってきた。これまでの我々の基礎検討において、抗 PD-1 阻害抗体による治療効果が、使用するがん細胞株の種類およびマウスの系統によって大きく異なったことから、本研究では、抗 PD-1 阻害抗体による治療効果を予測し得るバイオマーカーを探索するとともに、抗 PD-1 阻害抗体と組み合わせることにより相乗効果を示す治療法の開発を目的とする。これにより、抗 PD-1 阻害抗体の効果が期待される患者を選別するとともに、抗 PD-1 阻害抗体単独では効果が期待されない患者にはより効果的な治療法を提供することが可能になると期待されるため、その臨床的および学術的意義は大きいと考えられる。

A. 研究目的

がんによる死亡は年々増加しており、難治性がんに対する早急な対応が求められている。免疫療法は有望な新規治療法と考えられているが、現在まで期待通りの臨床効果は得られていない。その最大の理由として、癌細胞がみずから腫瘍免疫応答を抑制し、宿主免疫から逃れる『免疫逃避機構』の存在があると考えられる。マウスを用いた実験において、免疫抑制受容体 PD-1 (Programmed cell death-1) の機能を阻害することによりがん免疫が増強され、効率的にがんが拒絶されたことから、がんによる免疫逃避機構において PD-1 が中心的な役割を果たしていると考えられる。そこで、PD-1 阻害によるがん免疫の再活性化を目指した新規治療法の開発を行ってきた。

これまでの我々の基礎検討において、抗 PD-1 抗体による治療効果が、使用するがん細胞株の種類およびマウスの系統によって大きく異なったことから、本研究では、抗 PD-1 抗体による治療効果を予測し得るバイオマーカーを探索するとともに、抗 PD-1 阻害抗体と組み合わせることにより相乗効果を示す治療法の開発を目的とする。

B. 研究方法

1) PD-1 による抑制効果を検知するマーカーの探索

これまでに、がん細胞の表面上に PD-1 リガンドが発現している場合には、抗 PD-1 阻害抗体が治療効果を示す可能性が高いことを示唆する結果が得られているが、リンパ球側の

バイオマーカーについては、ほとんど解析されていない。そこで、PD-1 により抑制を受けている T 細胞を効果的に検出する目的で、T 細胞の活性化状態を可視化するシステムの構築を試みている。プロモーター配列、使用する細胞株、刺激条件等について、様々な組み合わせで比較検討を行った。

昨年度までに実施したマイクロアレイによる網羅的発現解析の結果から、抗原受容体刺激により発現が誘導される遺伝子の全てが PD-1 によって抑制される訳ではないことを明らかとした。そこで、PD-1 により効率的に発現が抑制される遺伝子の転写調節領域を用いることにより、PD-1 による抑制を可視化するシステムの構築を試みた。

2) 抗 PD-1 阻害抗体と組み合わせることにより相乗効果を示す治療法の開発

PD-1 阻害は、がん免疫を増強する反面、自己免疫を惹起する可能性がある。PD-1 欠損マウスが、マウスの系統により異なる種類の自己免疫疾患を自然発症することから、PD-1 欠損による免疫応答の活性化には、PD-1 欠損以外の遺伝要因や環境要因が大きく影響を与えたと考えられる。最近我々は、LAG-3 (Lymphocyte activation gene-3) という別の免疫抑制受容体が PD-1 と協調的に自己免疫を制御していることを見出した。他のグループによって、がん免疫応答の制御においても PD-1 と LAG-3 が協調的に働くと報告されているが、そのメカニズムについてはほとんど分かっていない。DO11.10 細胞株を用いて、LAG-3 による抗原受容体刺激に対する抑制活性を観察できる実験系をこれまでに作製するとともに、PD-1 と LAG-3 を同時に介在させることにより、相加相乗的な抑制効果を観察できることを見出している。昨年度までに実施した発現解析

の結果から、抗原受容体刺激による各種遺伝子の発現誘導に対する PD-1 と LAG-3 の抑制は、遺伝子によって抑制の程度が異なることを見出した。そこで、LAG-3 により効率的に発現が抑制される遺伝子の転写調節領域を用いることにより、LAG-3 による抑制を可視化するシステムの構築を試みた。これにより、細胞の活性化状態、PD-1 による抑制、LAG-3 による抑制を同時にモニターできるシステムの構築を試みた。

(倫理面への配慮)

動物実験にあたっては「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守するとともに、徳島大学動物実験委員会において許可を得た後、徳島大学動物実験管理規則に則って行った。

遺伝子改変動物の使用等、組換え遺伝子実験にあたってはカルタヘナ議定書、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律を遵守するとともに、徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会において許可を得た後、徳島大学遺伝子組換え実験安全管理規則に則って行った。

C. 研究結果

1) PD-1 による抑制効果を検知するマーカーの探索

これまで、レポーターの蛍光タンパク質として EGFP を使用して来たが、同時に複数の条件で細胞の状態を評価するためには、EGFP とは異なる特性を有する蛍光タンパク質を使用する必要がある。そこで、BFP、AmCyan、mCherry、tdTomato、Crimson、Dimer2、dsRed2 を検討した。その結果、蛍光強度と検出器の観点から、EGFP、BFP、Crimson およ

び Dimer2 の4種類の蛍光色素を同時に使用することにより、最大4種類の条件で細胞の状態を同時に評価できるようになった。

昨年度、DO11.10 細胞株において、抗原刺激により発現量が 2 倍以上上昇し、かつ、PD-1 により50%以上、発現誘導が抑制される遺伝子を 1,465 個、PD-1 による抑制効果が10%以下の遺伝子を 406 個、同定している。その中で、PD-1 による抑制効果が特に強い遺伝子及び弱い遺伝子を 4 個選別し、それらの転写調節領域をクローニングして、検討した。その結果、遺伝子 A の転写調節領域を用いたレポーター(以下レポーターA)が、PD-1 による抑制を鋭敏に検出し得ることを見出した。

2) 抗 PD-1 阻害抗体と組み合わせることにより相乗効果を示す治療法の開発

昨年度、DO11.10 細胞株において、抗原刺激により発現量が 2 倍以上上昇し、かつ、LAG-3 により50%以上、発現誘導が抑制される遺伝子を 1,431 個、LAG-3 による抑制効果が10%以下の遺伝子を 428 個、同定している。その中で、LAG-3 による抑制効果が特に強い 3 遺伝子、及び上述の 4 遺伝子について、各々の転写調節領域を検討した。その結果、レポーターB が、LAG-3 による抑制を鋭敏に検出し得ることを見出した。一方、レポーターC は、LAG-3 による影響をほとんど受けなかった。また、PD-1 はレポーターB を抑制したが、レポーターC は中程度にしか抑制しなかった。さらに、LAG-3 はレポーターA を抑制しなかった。

D. 考察

昨年度までは、抗原受容体刺激により活性化を受けることが知られている転写因子のモ

デル認識配列を用いてレポーターの作製を試みていたが、特に標識率が高い条件では、PD-1 存在下でもレポーター遺伝子の弱い発現が確認され、PD-1 による抑制を受けた細胞を明確に分離することが困難であった。今回、マイクロアレイを用いた網羅的発現解析の結果を基に、PD-1 により発現誘導が強力に抑制される遺伝子の転写調節領域を用いることにより、PD-1 による抑制を受けた細胞と受けていない細胞を、より明確に分離できるようになった。しかし、標識率が昨年度までのものよりも低いため、縦列化等により、標識効率の向上を試みている。

昨年度の発現解析から、抗原受容体刺激によって多くの遺伝子が発現誘導を受けるものの、その全てが PD-1 あるいは LAG-3 によって均一に抑制される訳ではないことが明らかとなったが、今年度は、その特性を利用して、PD-1 及び LAG-3 による抑制を可視化して判別できるシステムの構築を試みた。遺伝子 A、B、C の転写調節領域、及び異なる色の蛍光色素を用いることにより、PD-1 によって抑制を受けている T リンパ球(Alow、Blow、Cint)、LAG-3 によって抑制を受けている T リンパ球(Ahigh、Blow、Chigh)、両者による抑制を受けていない T リンパ球(Ahigh、Bhigh、Chigh)、及び全く抗原刺激を受けていない T リンパ球(Alow、Blow、Clow)を分離することが可能となった。現時点では、レポーターC の標識率はほぼ 100%であるが、それ以外のものは標識率が低いため、判定の精度が条件によっては必ずしも高く無い。また、上述の組み合わせでは、PD-1 と LAG-3 の両者によって抑制を受けている細胞を判別することができないため、今後、別の遺伝子の転写調節領域も検討する予定である。

今回作製したレポーターシステムを用いるこ

とにより T 細胞の活性化をより鋭敏かつ正確にモニターできるようになれば、抗 PD-1 抗体による治療前及び治療中のがん患者において PD-1 が実際にどの臓器のどのような種類の細胞で、どの程度機能しているかを判定できると期待される。それにより、より効率的な使用方法の確立に役立つとともに、より効果的な治療法の開発につながるものと期待される。

E. 結論

抗 PD-1 阻害抗体は、がんの治療に対して革新的な変化を与えると期待される。しかし、抗 PD-1 抗体による治療効果は、使用するがん細胞株の種類およびマウスの系統によって大きく異なることから、抗 PD-1 阻害抗体による T 細胞の活性化レベルを鋭敏かつ正確にモニターし、治療効果を予測する方法を開発するとともに、抗 PD-1 阻害抗体の効果をより高める治療法を開発することが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Taku Okazaki, Shunsuke Chikuma, Yoshiko Iwai, Sidonia Fagarasan, Tasuku Honjo., A rheostat for immune

responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application., Nat. Immunol. 14(12):1212-1218, 2013

2. 学会発表

1. Taku Okazaki. Regulation of autoimmunity by immuno-inhibitory receptors., The 3rd Bizan immunology symposium, Tokushima, February 14th, 2014
2. Daisuke Sugiura, Il-mi Okazaki, Taku Okazaki. Molecular analyses of an inhibitory co-receptor, LAG-3., The 3rd Bizan immunology symposium, Tokushima, , February 14th, 2014
3. 杉浦大祐、免疫抑制受容体 LAG-3 による T 細胞活性化制御機構の解析、第 12 回四国免疫フォーラム、香川県さぬき市、2013 年 6 月 22 日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

PD-1 欠損マウスを用いた、バイオマーカー探索の基礎的検討

研究分担者 竹馬 俊介 京都大学 免疫ゲノム医学 助教
研究協力者 RUI YUXIANG 京都大学 博士課程大学院生

研究要旨

がんにおける、PD-1 阻害療法の副作用として起こり得る、アレルギーや自己免疫様症状の、環境危険因子や早期検出を可能にするバイオマーカーを検討するため、PD-1 欠損マウスに既知の自己抗原を投与し、同時投与でT細胞反応に影響するような因子を検討した。その結果、結核死菌を投与した PD-1 欠損マウス由来のマクロファージは、炎症性サイトカインである IL-6 を大量に産生し、これが T 細胞に作用して IL-17 を産生する炎症性 T 細胞への分化を起しやすくなる事がわかった。結核の不顕性感染や、それに類する(マイコバクテリア属)微生物学的因子が疑われるがん患者においては、思わぬ副作用としての自己免疫症状が起こり易い可能性があり、このような患者への PD-1 阻害薬投与は、より慎重に行う必要があること、自己免疫の兆候をいち早く察知するマーカーとして、免疫細胞から産生される IL-6 の定量が有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒト型 PD-1 抗体療法は、がんに対する有効な免疫増強治療法として国内外で精力的に開発が進められている。PD-1 阻害による免疫増強の副作用として、一部の患者には、アレルギーや自己免疫様症状が現れることが予測され、投与初期に自己免疫疾患の兆候をとらえるバイオマーカーを得ることが出来れば有用であると考えられる。また、自己免疫疾患の危険因子として、患者の先天性因子だけでなく、基礎疾患や不顕性感染といった環境因子が考えられる。当研究では、不顕性感染の代表である、結核菌の菌体抗原が危険性因子となる可能性を、PD-1 欠損マウスを用いて検討した。

B. 研究方法

PD-1 欠損マウスおよび野生型マウスより脾細胞を調整し、結核死菌を添加して培養を行った。これを抗原提示細胞として用い、O_H TCRトランスジェニックマウスマウスのT細胞を特異的抗原(OVA323-339)にて刺激した。3日間培養後、T細胞を **Phorbol** 12-Myristate 13-acetate および ionomycin で6時間刺激し、蛍光標識 CD4 および TCR V₂ 抗体で表面標識した。4%パラホルムアルデヒド固定後、0.1%サポニンを含む FACS 緩衝液で洗浄、細胞内に産生された IL-17 を、特異的抗体で染色し、結核菌を経験した細胞の T 細胞分化に与える影響を検討した。培養液中に産生されるサイトカインを、BD 社が提供する Cytometric Beads Array (CBA)アッセイを用いて定量した。培養中に、抗 IL-6 レセプター抗

体を添加し、IL-6 の作用を中和した状態で、同様に Th17 分化を評価した。また、野生型マウスに、PD-1 欠損 RAG2 欠損マウスの骨髄および野生型 CD4 陽性 T 細胞を移植し、非リンパ球でのみ PD-1 を欠損するマウスを作製、ここに結核死菌と自己ペプチド(MOG35-55)を投与して、実験的自己免疫性脳脊髄炎を誘導した。病勢を観察し、定法によって点数化して評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、京都大学医学研究科の定める動物実験実施要綱、および京都大学動物実験指針を遵守して行った。また、PD-1 欠損マウスは、組み換え DNA 技術を用いて作出されており、事前に、京都大学組み換え DNA 実験委員会の承認を得たうえで行った。

C. 研究結果

昨年度までに、PD-1 欠損マウスに結核死菌(250 μ g)を投与すると、同時に投与した脳由来ペプチドに対し、炎症性サイトカインである IL-17 を産生する T 細胞が多く産生され、野生型コントロールマウスに比較してはるかに強い自己免疫性脳脊髄炎が惹起されること、PD-1 欠損マウスの抗原提示細胞、特に、CD11b を表現するマクロファージは、野生型に比べ、Th-17 の分化に必須の IL-6 を多く産生することを見出している。この IL-6 と Th17 分化亢進の関係を調べるため、PD-1 欠損脾臓細胞を用いて抗原特異的 T 細胞を分化させる培養系において、IL-6 と、そのレセプターの結合を阻害する抗体を作用させた。この処置は、Th17 分化を阻害抗体の濃度依存性に抑制したため、PD-1 欠損マクロファージからの IL-6 産生が Th17 分化亢進に直接かかわっていることが明らかになった。また、骨髄移植法によって、マクロファージなど、非リンパ球系

細胞でのみ PD-1 を欠損するマウスを作製した。このようなマウスでは、PD-1 を発現するコントロールマウスに比較して、実験的脳脊髄炎の早期発症および重症化が観察された。

D. 考察

PD-1 欠損下では、マクロファージから通常より多くの IL-6 産生が起こり、自己反応性 T 細胞に作用して Th-17 細胞を分化させる可能性が示唆された。IL-6 は、PD-1 欠損マウスと野生型マウスで結核菌刺激後初期に差が見られた唯一のサイトカインであり、PD-1 抗体治療開始時の血清 IL-6 を測定すれば、免疫増強療法の副作用としての自己免疫疾患発症を予測できる可能性がある。

E. 結論

結核菌など、抗原提示細胞からの IL-6 を誘導する活性をもつ病原体、およびカビなどの環境因子は、潜在的に自己反応性 Th-17 の分化も起こす可能性を持っている。ここに PD-1 阻害を行うと、自己反応性 Th-17 の活性化を誘導し、思わぬ自己免疫病を発症する可能性がある。よって、患者における、不顕性感染などの微生物学的因子は、PD-1 抗体療法の際に慎重にモニタリングされる必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Stumpf M, Zhou X, **Chikuma S**, Bluestone JA Tyrosine 201 of the cytoplasmic tail of CTLA-4 critically affects T regulatory cell suppressive function. *Eur. J. Immunol.* 2014 Mar 20. [Epub ahead of print]

Nguyen T, Xu J, **Chikuma S**, Hiai H, Kinoshita K, Moriya K, Koike K, Marcuzzi GP, Pfister H, Honjo T, Kobayashi M.
Activation-induced cytidine deaminase is dispensable for virus-mediated liver and skin tumor development in mouse models.
Int. Immunol. 2014 Mar 15. [Epub ahead of print]

Rui Y, Honjo T, **Chikuma S**
Programmed cell death 1 inhibits inflammatory helper T-cell development through controlling the innate immune response. *P.N.A.S.* 2013 Oct 1;110(40):16073-8.

2. 学会発表

Rui Y, Honjo T, **Chikuma S**. PD-1 inhibits inflammatory helper T cell development through controlling the innate immune response. 日本免疫学会・学術集会 2013年12月11-13日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

がん免疫逃避機構を標的にした次世代型免疫治療の臨床応用と新規バイオマーカーの探索に関する研究

研究分担者 万代昌紀

所属機関名：近畿大学医学部産婦人科、主任教授

A. 研究目的

末梢血腫瘍細胞(CTC)の検出は乳癌患者を中心に診断のみならず治療効果判定や予後因子としてその有用性が文献報告されている。しかし卵巣癌における末梢血腫瘍細胞の検出については、その診断法や臨床的な意義について未だ不明である。今回われわれはテロメラーゼ特異的アデノウイルスを用いた卵巣癌の新規診断法について検討を行った。

B. 研究方法

卵巣癌患者 15 例(漿液性腺癌 7 例、粘液性腺癌 4 例、明細胞癌 2 例、類内膜腺癌 2 例)を対象に術前に末梢血 7.5ml を採取し、hTERT promoter および green fluorescence protein (GFP) 遺伝子を組み込んだテロメラーゼ特異的増殖型アデノウイルス OBP-401 を用いて、GFP 陽性細胞の蛍光顕微鏡下確認から、末梢血腫瘍細胞(CTC)の検出を行った。なお本検討は倫理委員会承認を受け、実施にあたっては被験者全員に事前に文書同意取得した。

C. 研究結果

D. 1. 上皮性卵巣癌の術前血液 15 例中 10 例 (67%) に GFP 陽性細胞が検出されたが、

健常人では 1 例も GFP 陽性細胞が検出されなかった。2. GFP 陽性細胞の検出率は病理組織型、FIGO 進行期、最大腫瘍径、腹水の有無、および腹膜播種と有意な関連性を認めなかった。3. GFP 陽性細胞は CA125 陰性例 3 例中 1 例、CA199 陰性例 10 例中 6 例で検出可能であった。4. 免疫組織染色を用いた検討において GFP 陰性と判定された全症例で原発巣に hTERT の発現をみとめた。

E. 結論

術前末梢血を用いたテロメラーゼ特異的増殖型アデノウイルスによる CTC の検出は、一定の臨床条件を有する卵巣癌患者の有用な術前直接診断法となりうると考えられ、特に計画的妊孕能温存治療、低侵襲治療、再発卵巣癌の早期診断等への応用が期待される。

F. 研究発表

論文発表

準備中

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし