

固形がんに対する抗CCR4抗体療法第Ia/Ib相医師主導治験

分担研究課題: 抗CCR4抗体投与と制御性T細胞の関連の解析

研究分担者 西川 博嘉 大阪大学 特任准教授

研究要旨

ヒト化抗CCR4モノクローナル抗体(Mogamulizumab/KW-0761)は、脱フコシル化技術によりADCC活性を飛躍的に高めた抗体で、CCR4を発現する成人T細胞白血病・リンパ腫(ATL)に対する治療薬として承認されている。一方、これまで様々ながん抗原分子を標的とした臨床研究が行われ、がんワクチン療法が宿主に抗原特異的免疫を誘導することが明らかになっているが、臨床効果は限定的である。この原因としてがん組織に浸潤しているリンパ球中の制御性T細胞(Tregs)に注目が集まっている。つまり、がんワクチン療法によって誘導されたがん抗原特異的T細胞の抗腫瘍活性が、Tregsによって抑制されるため、十分な臨床効果をあげられないと考えられており、Tregsのコントロールはがん免疫療法が克服すべき大きな課題である。

がん組織に浸潤するTregsにCCR4が強発現していることから、本事業ではヒト化抗CCR4モノクローナル抗体を投与することにより、これらのTregsが減少しエフェクターT細胞の活性化といった抗腫瘍免疫応答の活性化が誘導されるか、またそれらが臨床効果につながるかを検討する。

今年度は本分担研究により、1)がん組織に浸潤しているCCR4+Tregsを詳細に解析すると共に、それらのTregsを除去することにより、がん抗原特異的エフェクターT細胞の活性化が可能かを検討した。(POCの確立)また、2)ヒトTregアッセイ方法を標準化すると共に、ヒト化抗CCR4モノクローナル抗体投与によりCCR4+Tregsが除去されるかを、標準化されたアッセイ方法により解析した。

A. 研究目的

現在進行中の種々のがん免疫療法は、一部の患者で臨床効果を示すものの、大多数の患者では満足すべき臨床効果をあげていない。その原因としてがん組織中に多数の制御性T細胞(Tregs)が浸潤し、抗腫瘍免疫応答を抑制していることがあげられる。

ヒトCD4+Tregsは遺伝子発現およびマーカーの上でも多様であることが明らかとなってきたが、CD4、FOXP3およびCD45RA(もしくはCD45RO)発現を組み合わせることにより、CD4+TregsをCD4+CD45RA+FOXP3<sup>low</sup>Tregs(ナイーブ型)とCD4+CD45RA-FOXP3<sup>high</sup>Tregs(エフェクター型)に分けられることが明らかになっている(Miyara et

al. Immunity 30:899-911 2009)。本分類によりエフェクター型Tregsに分画される部分にCCR4が高発現していることが明らかになっている。よってヒト化抗CCR4モノクローナル抗体投与によりこれらのTregsの動態を末梢血およびがん組織で解析することが本治験において抗体の効果判定の一つとして必須である。加えて、このTregアッセイ方法を標準化することが抗CCR4抗体の実用化を進める上では重要である。

一方でヒト化抗CCR4モノクローナル抗体投与により、がん抗原に加えて広範な免疫応答の誘導・活性化が期待される。よって特定のがん抗原への免疫応答を検討することに加えて網羅的な免疫反応への影響を解析する必要がある。

## B. 研究方法

書面にて同意が得られた健康人、がん患者およびヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与を受けた患者の末梢血より単核球を比重遠心法により単離し、解析に用いた。

単核球より CD4+ および CD8+ T 細胞を分離し、がん・精巢抗原特異的 T 細胞誘導を検討した。一部の培養では、CCR4+ 細胞を除去した後にがん・精巢抗原特異的 T 細胞応答を検討した。また誘導された NY-ESO-1 特異的 T 細胞のエフェクター機能も検討した。

ヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与を受けた患者の末梢血単核球を CD4、CD25、CD45RA、FOXP3 を用いて Tregs を同定し、さらに CCR4 発現をフローサイトメトリーにて検討した。

### (倫理面への配慮)

本研究は大阪大学研究倫理審査会にて審査され、承認されたプロトコールに準拠して行った。また、すべての検体は書面での同意が得られたのち採取されたものを研究に用いた。

## C. 研究結果

抗 CCR4 抗体による活性型 Tregs 除去によるがん免疫療法の POC の確立

a. 腫瘍局所には CCR4+ 活性型 Tregs が浸潤している

ヒト Tregs の分類法を用いて、悪性黒色腫患者検体を解析した。腫瘍局所に浸潤している Tregs は活性型 (Fr2:CD4+CD45RA-FOXP3high) であり、末梢血に存在する Tregs と異なっていた。つまり、末梢血には活性型 Tregs とナイーブ Tregs (Fr1:CD4+CD45RA+FOXP3low) の両者が存在していたが、腫瘍局所に浸潤する Tregs の大部分は活性型 Tregs であった。腫瘍局所に存在する活性型 Tregs を除去するため、特異的に発現している分子の検索を行ったところ、悪性黒色腫局所に浸潤している活性化型 Tregs は、ケモカインレセプター 4 (CCR4) を強発現していた。腫瘍局所の活性型 Tregs は、マウスで CCR4 の発現が報告されている Th2 および Th17 サブセットなどのヘルパー T 細胞よりも CCR4 を強発現していた。

b. CCR4+ 活性型 Tregs 除去により NY-ESO-1 特異的 T 細胞誘導が認められる

抗 CCR4 抗体を用いた活性型 Tregs の選択的除去 (全ての Tregs を除去するわけではない) が、NY-ESO-1 特異的免疫応答に与える影響を検討した。健康人では、CD4+ T 細胞からがん・精巢抗原 NY-ESO-1 特異的 T 細胞を誘導することが出来ないことが明らかになっている (Gnjatic S, Nishikawa H et al. *Adv Cancer Res.* 95: 1-30 2006)。そこで、健康人由来 PBMCs から CCR4+ 活性型 Tregs を除去し、NY-ESO-1 特異的 CD4+ T 細胞誘導を検討した。NY-ESO-1 特異的 CD4+ T 細胞誘導が 43.8% で認められた。

また、免疫応答が抑制されているがん患者での検討を行うため、NY-ESO-1 を発現しているが NY-ESO-1 に対する免疫応答を惹起できない悪性黒色腫患者由来の PBMCs で同様のアッセイを行った。未処理の CD4+ T 細胞からは NY-ESO-1 特異的 CD4+ T 細胞が誘導できなかったが、活性型 Tregs を除去された CD4+CCR4- T 細胞からは NY-ESO-1 特異的 CD4+ T 細胞が 37.5% の患者で誘導された。

さらに、NY-ESO-1 特異的 CD8+ T 細胞に対する影響を検討した。悪性黒色腫患者由来の CCR4+ 活性型 Tregs を除去した末梢血単核球と除去しない末梢血単核球を用いて NY-ESO-1 特異的 CD8+ T 細胞誘導を検討した。活性型 Tregs を除去された末梢血単核球からは、NY-ESO-1 特異的 CD8+ T 細胞誘導が増強した。

### Treg の機能評価技術の確立と解析

前述したように、抗体投与後に活性型 Tregs の体内での動態を正確に解析することが、抗 CCR4 抗体を実用化する上で極めて重要である。CD4、CD25、FOXP3 および CD45RA を組み合わせ、より厳密に Tregs を定義できる。この Treg アッセイ方法を標準化するため、本事業に参画する 10 施設の研究室間でプロトコールを共有し、アッセイおよび解析の安定化、標準化の可能性を検討した。

まず当施設 (大阪大学免疫学フロンティア研究センター) でアッセイしたデータを 10 施設に送付し、解析方法の標準化を行った。当初、解析にばらつきが認められたが、プロトコールの共有により改

善された。次にアッセイ方法の標準化を行った。プロトコルの共有化によりばらつきなくアッセイ及び解析が可能で、本 Treg アッセイ方法の標準化が本研究班内で達成されたと考えられた。

次に本方法を用いて、ヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与を受けた患者の末梢血を解析した。全ての患者で活性型 Tregs の減少が認められた。

#### D. 考察

抗 CCR4 抗体ががん局所に浸潤する Tregs を選択的に除去し、効果的に抗腫瘍免疫応答を増強可能な特異的抗体であると考えられた。これまで抗 CCR4 抗体を投与された患者末梢血で CCR4+ 活性型 Tregs の減少が認められている。欧米各国で先行する抗 CTLA-4 抗体療法のデータから、がん局所での Tregs の減少と臨床効果との相関が明らかになっており、今後はさらにがん局所での活性型 Tregs の動態を明らかにすることが重要であると考えられた。

また、本事業では Treg アッセイ方法を標準化することが極めて重要な要素である。今年度、本事業に参画する10施設で Treg アッセイ方法の標準化が達成されたことは極めて重要であり、今後は本手法の検査機関等への導出もしくはキット化を検討していく必要があると考えられた。

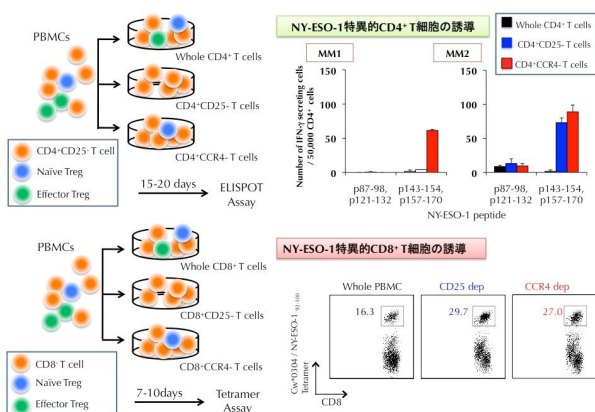


図2 活性型 Treg 除去はがん抗原特異的 CD4/CD8+ T 細胞誘導を増強する

#### E. 結論

これまで、Tregs は抗腫瘍免疫応答を抑制しているため、全ての Tregs を除去する必要があると考えられてきたが、活性型 Tregs という一部を標的とすることで十分ががん抗原特異的免疫応答

の増強がみられ、抗腫瘍活性増強につながることが明らかになった。一方で、一部の Tregs(主に naive Tregs)は残存するため、Tregs 本来の機能である自己に対する免疫応答をコントロールすることができ、副作用を軽減することが出来る可能性も示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

英文

1. [Nishikawa H](#), Sakaguchi S; Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* Jan 9;27:1-7 2014. doi: 10.1016/j.coi.2013.12.005.
2. Wada H, Isobe M, Kakimi K, Mizote Y, Eikawa S, Sato E, Takigawa N, Kiura K, Tsuji K, Iwatsuki K, Yamasaki M, Miyata H, Matsushita H, Uono H, Seto Y, Yamada K, [Nishikawa H](#), Pan L, Venhaus R, Oka M, Doki Y, Nakayama E.; Vaccination With NY-ESO-1 Overlapping Peptides Mixed With Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in Patients With Cancers Expressing the NY-ESO-1 Antigen. *J Immunother.* 2014Feb-Mar;37(2):84-92. doi: 10.1097/CJI.000000000000017.
3. Sugiyama D, [Nishikawa H](#), Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, Ezoe S, Kanakura Y, Sato E, Fukumori Y, Karbach J, Jager E and Shakaguchi S; Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+ regulatory T cells, evoking anti-tumor immune responses in humans. *Proc. Natl. Acad Sci USA.* 110(44):17945-17950 2013. (Corresponding Author). doi: 10.1073/pnas.1316796110.
4. Atarashi K, Tanoue T, Suda W, Oshima K, Nagano Y, [Nishikawa H](#), Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Oille B, Sakaguchi S Taniguchi T, Morita H, Hattori M and Honda K; Treg induction by a rationally selected Clostridia cocktail from the human microbiota. *Nature.* 500 (7461):232-236 2013. doi: 10.1038/nature12331.
5. Hirayama M\*, [Nishikawa H](#)\*, Nagata Y, Tsuji T, Kato T, Kageyama S, Ueda S, Sugiyama D, Hori S, Sakaguchi S, Ritter G, Old LJ, Gnajatic S, and Shiku H.; Overcoming regulatory T-cell suppression by a lyophilized preparation of Streptococcus pyogenes. *Eur J Immunol.* 43 (4):989-1000 2013 \*Equal contribution,

(Corresponding Author). doi:  
10.1002/eji.201242800.

6. Adeegbe DO, Nishikawa H.; Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Frontiers in Immunology*. 4:190 2013 (Corresponding Author). doi: 10.3389/fimmu.2013.00190.
7. Noguchi T, Ritter G, Nishikawa H.; Antibody-based therapy in colorectal cancer. *Immunotherapy*. 5 (5):533-545 2013 (Corresponding Author). doi: 10.2217/imt.13.35.
8. Muraoka D, Nishikawa H., Noguchi T, Wang L, Harada N, Sato E, Luescher I, Nakayama E, Kato T, Shiku H.; Establishment of animal models to analyze the kinetics and distribution of human tumor antigen-specific CD8+ T cells. *Vaccine*. 31(17):2110-2118 2013 (Corresponding Author). doi: 10.1016/j.vaccine.2013.02.056.
9. Fujiwara S, Wada H, Kawada J, Kawabata R, Takahashi T, Fujita J, Hirao T, Shibata K, Makari Y, Iijima S, Nishikawa H., Jungbluth A, Nakamura Y, Kurokawa Y, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Nakayama E, Mori M, and Doki Y.; NY-ESO-1 antibody as a novel tumor marker of gastric cancer. *Br J Cancer* 108 (5):1119-1125 2013. doi: 10.1038/bjc.2013.51.
10. Liu B, Ohishi K, Orito Y, Nakamori Y, Nishikawa H., Ino K, Suzuki K, Matsumoto T, Masuya M, Hamada H, Mineno J, Ono R, Nosaka T, Shiku H, Katayama N.; Manipulation of human early T lymphopoiesis by coculture on human bone marrow stromal cells: Potential utility for adoptive immunotherapy. *Exp Hematol*. 41(4):367-376 2013. doi: 10.1016/j.exphem.2012.12.001.

#### 和文

1. 前田優香、西川博嘉: 成人 T 細胞白血病・リンパ腫における免疫応答 **臨床免疫・アレルギー科**, 59:367-376 2013
2. 杉山大介、西川博嘉: 免疫抑制の克服による抗腫瘍免疫応答増強の可能性 **医学のあゆみ**, 244:800-807 2013
3. 西塔拓郎、西川博嘉: Tregs 制御による抗腫瘍免疫応答増強の可能性 **医学のあゆみ**, 246: 913-920 2013

4. 西岡めぐみ、西川博嘉: 制御性 T 細胞による抗腫瘍免疫抑制 そのコントロールによる効果的ながん免疫療法の可能性 **実験医学** 31, 1864-1872 2013

#### 2. 学会発表

##### 海外

- (1)Nishikawa H.: Potential of combination immunotherapy targeting regulatory T cells, Cancer Immunotherapy Consortium, April 25<sup>th</sup>, 2013, Washington DC
- (2) Sugiyama D, Nishikawa H., Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, Ezoe S, Kanakura Y, Sato E, Fukumori Y, Karbach J, Jager E and Shakaguchi S.: Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3+CD4+regulatory T cells and augments anti-tumor immune responses in humans. 21<sup>st</sup> Annual CRI International Cancer Immunotherapy Symposium, Sep30 - Oct 2, 2013, New York, NY

##### 国内

##### シンポジウム

- (1) 西川博嘉: 制御性 T 細胞を標的としたがん免疫療法 第 29 回日本皮膚悪性腫瘍学会 シンポジウム 2013 年 8 月 9 日 山梨県甲府市
- (2) 西川博嘉: Treg による免疫抑制の基礎 第 22 回日本組織適合性学会 シンポジウム 2013 年 9 月 15 日 福島県福島市
- (3) Nishikawa H.: Regulatory T cells: Friends or foes for cancer. 18<sup>th</sup> Japanese Foundation for Cancer Research International Symposium on Cancer Chemotherapy シンポジウム 2013 年 12 月 4 日 東京都
- (4) 西川博嘉: がん免疫における制御性 T 細胞の役割 第 26 回日本バイオセラピー学会 シンポジウム 2013 年 12 月 6 日 岩手県盛岡市
- (5) Nishikawa H.: Control of Regulatory T cells in anti-tumor immunity. The 29<sup>th</sup> Nagoya International Cancer Treatment Symposium シンポジウム 2014 年 2 月 9 日 愛知県名古屋市

##### 一般講演

(1) 杉山大介、西川博嘉、前田優香、西岡めぐみ、種村 篤、片山一朗、江副幸子、金倉 譲、坂口志文: エフェクター型制御性 T 細胞の選択的除去による抗原特異的免疫応答の増強、第 17 回日本がん免疫学会 2013 年 7 月 3 日~5 日 山口県宇部市

(2) 杉山大介、西川博嘉、前田優香、西岡めぐみ、種村 篤、片山一朗、江副幸子、金倉 譲、坂口志文: Selective depletion of effector-type CD4+regulatory T cells efficiently induces anti-tumor immune responses. 第 72 回日本癌学会 2013 年 10 月 4 日 神奈川県横浜市

(3) 西塔卓郎、和田 尚、磯部みどり、垣見和宏、榮川伸吾、大植祥弘、西川博嘉、森 正樹、土岐裕一郎、岡三喜男、中山睿一: NY-ESO-1 重複長鎖ペプチドを用いたがんワクチン第 1 相臨床試験. 第 72 回日本癌学会 2013 年 10 月 4 日 神奈川県横浜市

(4) 榮川伸吾、垣見和宏、磯部みどり、和田 尚、上中明子、葛島清隆、西川博嘉、鵜殿平一郎、岡三喜男、中山睿一: NY-ESO-1f ペプチドワクチンによる抗体・CD4・CD8T 細胞免疫応答の誘導. 第 72 回日本癌学会 2013 年 10 月 4 日 神奈川県横浜市