

ドライン」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を踏まえ、国立がん研究センターにおける動物取扱の取り決めを遵守して、事前に動物実験委員会承認を得た後に行う。本施設では、教育研究に関わる生命倫理ならびに安全管理に関する問題を審議して、これらが適切に遂行されるように、倫理審査委員会が設置され規則が整備されている。

C. 研究結果

フローサイトメトリーを用いた解析により、抗 CD4 抗体 5mg/kg 投与後 1 日でマウス末梢血中の CD4⁺T 細胞が急激に減少することを確認した。この結果から抗 CD4 抗体投与後 1 日で OVA ペプチドワクチンを初回免疫し、その 7 日後に追加免疫をする治療スケジュールを選択した。追加免疫後 7 日で IFN- γ ELISPOT を行った結果、OVA ペプチドワクチン単独群と比較して抗 CD4 抗体と OVA ペプチドワクチン併用群で OVA ペプチド特異的 CTL の頻度の明かな増加を確認した。

D. 考察

IFN- γ ELISPOT の結果から抗 CD4 抗体とペプチドワクチンの併用による特異的 CTL の頻度の増加を確認した。その作用機序に関しては抗 CD4 抗体によって Treg や免疫抑制性マクロファージ等が除去されたことにより免疫抑制機構が解除されたなどが考えられる。これを抗体染色を用いたフローサイトメトリーにより解析する。また、移植腫瘍の治療実験では腫瘍内への CTL の浸潤が腫瘍縮小効果にとって重大な要因となると考えられる。これに関しても免疫染色等によって解析する。

E. 結論

IFN- γ ELISPOT の結果から抗 CD4 抗体とペプチドワクチンの併用によるペプチド特異的 CTL 誘導効果増強の可能性を示すことができた。今後は移植腫瘍による治療実験で、抗 CD4 抗体とペプチドワクチンの併用による腫瘍縮小効果の有無を検討すると同時に作用機序の解析を行い、ペプチドワクチン療法に抗 CD4 抗体を併用して得られる効果増強について検証する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Sawada Y, Sakai M, Shirakawa H, Nobuoka D, Nakatsura T. Analysis of cytotoxic T lymphocytes from a patient with hepatocellular carcinoma who showed a clinical response to vaccination with a glypican-3-derived peptide. *Int J Oncol.* 43 (4) :1019-1026, 2013.
2. Sawada Y, Komori H, Tsunoda Y, Shimomura M, Takahashi M, Baba H, Ito M, Saito N, Kuwano H, Endo I, Nishimura Y, Nakatsura T. Identification of HLA-A2 or HLA-A24-restricted CTL epitopes for potential HSP105-targeted immunotherapy in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 31 (3) :1051-1058, 2014.
3. Suzuki S, Shibata K, Kikkawa F, Nakatsura T. Significant Clinical Response of Progressive Recurrent Ovarian Clear Cell Carcinoma to Glypican-3-derived Peptide Vaccine Therapy: Two Case Reports. *Hum Vaccin Immunother.* 10 (2) :1-6, 2014.

2. 学会発表

1. 肝細胞がんと小児がんに対するペプチドワクチン療法の開発. 中面哲也. コアシンポジウム がんペプチドワクチン療法の最近の進歩と臨床応用の展望. 第 72 回日本癌学会 (横浜). 2013 年 10 月 3 日-5 日.
2. Glypican-3 ペプチドワクチン投与によって誘導されたペプチド特異的 CTL の腫瘍内浸潤の証明. 吉川聡明、下村真菜美、酒井麻友子、大藤和也、高橋真理、澤田雄、信岡大輔、中面哲也. 第 72 回日本癌学会 (横浜). 2013 年 10 月 3 日-5 日.
3. リンパ球減少誘導後のホメオスタティックプロリファレーションを利用した癌抗原特異的免疫療法の増強を目指した検討. 藤浪紀洋、吉川聡明、澤田雄、下村真菜美、岩間達章、中面哲也. 第 72 回日本癌学会 (横浜). 2013 年 10 月 3 日-5 日.

4. Possibility of immunotherapy Targeting EGFR T790M Mutation for EGFR TKI-resistant Non-Small Cell Lung Cancer. Ofuji K, Yoshikawa T, Tada Y, Sakai M, Shimomura M, Yamada T, Sasada T, Nakatsura T. The International Symposium on Immunotherapy (London), Oct. 11-12, 2013.
5. 癌ペプチドワクチンの展望:企業治験と医師主導臨床治験. 中面哲也. 第26回日本バイオセラピー学会(盛岡). 2013年12月5日-6日.
6. 非小細胞肺癌におけるEGFR-TKIに対する耐性獲得変異EGFR T790M由来抗原の免疫原性の評価. 大藤和也, 吉川聡明, 下村真菜美, 多田好孝, 酒井麻友子, 中面哲也. 第26回日本バイオセラピー学会(盛岡). 2013年12月5日-6日.
7. CTLおよび $\gamma\delta$ T細胞の細胞移入療法と効果増強を目指した検討. 粕谷匡史, 下村真菜美, 多田好孝, 吉川聡明, 安部良, 中面哲也. 第26回日本バイオセラピー学会(盛岡). 2013年12月5日-6日.
8. 放射線治療との融合も期待される最近のがん免疫療法の進歩. 中面哲也. 第5回日本放射線外科学会(高崎). 2014年1月18日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

医師主導第1相臨床試験（医師主導治験）の計画、および、
臨床サンプルを用いた抗CD4抗体の効果の検証を目的とした臨床研究計画書の作成

研究分担者 北野滋久 国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター先端医療科 医員
研究分担者 中面哲也 国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター免疫療法開発分野 分野長
研究分担者 塚崎邦弘 国立がん研究センター東病院血液腫瘍内科 科長
研究分担者 佐藤暁洋 国立がん研究センター早期・探索臨床研究センター臨床試験支援室 室長
研究分担者 渡邊協孝 国立がん研究センター東病院治験管理室 治験事務局長

研究要旨

我々は、東京大学、IDAC セラノステイクス株式会社とともに、新規がん免疫療法として抗CD4抗体療法の臨床試験（医師主導治験）を計画している。近年、抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体をはじめとするT細胞免疫抑制の解除を狙った抗体療法が開発され成功をおさめてきている。しかしながら、両剤とも進行性メラノーマに対する単剤での奏効率は15～30%と限られ、有効性の高いがん免疫治療薬を創出するためには、がん患者体内で起こっているがん免疫応答の逃避機構解除を試みるのが期待されている。これまでの動物モデルでの研究、健常人血液検体での *in vitro* での研究から、本抗体を投与することによって、がん患者においても腫瘍免疫抑制に関わる制御性T細胞（CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺T細胞）、MDSC (myeloid derived suppressor cells) を同時に除去し抗腫瘍効果を高めることが期待されている。

平成25年度は、国立がん研究センターで臨床試験を施行する立場として、①臨床サンプル（がん患者由来血液検体）を用いた本抗体の *in vitro* での効果を検証するために臨床研究計画書を作成し、②固形がんを対象とした第1相臨床試験（医師主導治験）における対象疾患、投与スケジュールをはじめとする臨床試験のデザインについて議論を重ねた。

平成26年度は、各担当者の研究成果をもとにして臨床試験のデザインを決定し、国立がん研究センターで実施予定の第1相臨床試験（医師主導治験）のプロトコールおよび付随するIC文書・SOPを準備し、治験薬概要書の作成を行っていく。

A. 研究目的

新規がん免疫療法として抗CD4抗体療法の臨床試験の実施に向け、進行がん患者検体を用いた前臨床試験を行うための研究計画書を作成すること。

国立がん研究センターで実施予定の医師主導第1相臨床試験（医師主導治験）に向けて、試験のデザインを議論し、プロトコールを作成すること。

B. 研究方法 および C. 研究結果

ヘルシンキ宣言および厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」に従って、ヒト検体での研究計画書を作成した。国立がん研究センターにおいて、

進行がん患者で本抗体によるCD4陽性T細胞、単球（CD4弱陽性）、免疫抑制作用をもつ制御性T細胞やMDSC (Myeloid derived suppressor cells) の減少効果、CCR4(-)CD4(+)白血球細胞への殺細胞効果について臨床サンプルを用いた *in vitro* での検証を行うことを計画した。各担当者と議論を重ね、さらに統計家の協力を得て研究計画書の作成を済ませ、当センターの研究倫理審査委員会に提出する。

臨床試験のデザインについても議論を行った。CD4陽性細胞除去による免疫抑制解除を目的とした固形腫瘍におけるFirst in Humanでの第1相臨床試験の対象疾患として、Proof of concept

(POC)の確認できるがん種が望ましいと考えられた。すなわち、本抗体投与前後で患者腫瘍組織を比較し、CD4 発現細胞である制御性 T 細胞、MDSC が減少し、その結果として CD8 陽性 T 細胞 (細胞傷害性 T 細胞) の浸潤が増加しているかどうかを腫瘍局所でモニタリングするために、治療経過中に生検ができる腫瘍が望ましいと考えられた。これまで免疫療法の開発が最も進んでいる悪性黒色腫をはじめ、消化器癌が候補として挙げられた。また、将来的な治療ターゲットとして ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) 効果によって抗腫瘍効果が期待される CD4 陽性造血器腫瘍も候補として挙げられ、前述の CCR4 (-) CD4 (+) 白血病細胞への殺細胞効果についても現時点から検証して行くことになった。一過性とはいえ免疫担当細胞である CD4 陽性 T 細胞を減少させる治療であるため、治験薬の投与スケジュール、考える毒性のマネージメントについて十分配慮の上、試験デザインを確立していく。

D. 考察 および E. 結論

平成 26 年度からは、担当者の各種研究成果、前臨床試験の結果をもとに、試験デザインを決定し、第 1 相臨床試験 (医師主導治験) の治験計画書を念頭にした GLP 安全性試験を計画し PMDA の対面助言を受け治験の準備を進めて行く予定である。さらに、ICH-GCP に沿った質の高い治験計画書および付随する IC 文書・SOP、治験薬概要書を作成していく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kitano S, Tsuji T, Liu C, Hirschhorn-Cymerman D, Kyi C, Mu Z, Allison JP, Gnjjatic S, Yuan JD, Wolchok JD. Enhancement of tumor-reactive cytotoxic CD4+ T cell responses after ipilimumab treatment in four advanced melanoma patients. *Cancer Immunol Res.* 1:235-244, 2013.
2. Callahan MK, Masters G, Pratilas CA, 別紙 4

Ariyan C, Katz J, Kitano S, Russell V, Gordon RA, Vyas S, Yuan J, Gupta A, Wigginton JM, Rosen N, Merghoub T, Jure-Kunkel M, Wolchok JD. Paradoxical activation of T cells via augmented ERK signaling mediated by a RAF inhibitor. *Cancer Immunol Res.* 2:70-79, 2014.

2. 学会発表

1. Kitano S, Tsuji T, Liu C, Hirschhorn-Cymerman D, Kyi C, Mu Z, Allison JP, Gnjjatic S, Yuan JD, Wolchok JD. Enhancement of tumor-reactive cytotoxic CD4+ T cell responses after ipilimumab treatment in four advanced melanoma patients. 21st Annual Cancer Research Institute International Cancer Immunotherapy Symposium. *CANCER IMMUNOTHERAPY 2013: Dynamics of Host-Tumor Interaction (New York)*. Sep. 30 -Oct. 2, 2013.
2. Immunomonitoring for anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) therapy in metastatic melanoma. Kitano S, Yuan J, Tada K, Itoh A, Ueda R, Hashimoto H, Mostow MA, Lesokhin AM, Wolchok JD, Heike Y. 第17回日本がん免疫学会 (山口). 2013年 7月3日-5日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
松島綱治 上羽悟史 寺島裕也	第I部 第1章 腫瘍免疫における免疫担当細胞と免疫分子の役割 3. 腫瘍会合性マクロファージ	河上 裕	実験医学	羊土社	東京	2013	31 (12) :48-52
Postow MA, Yuan J, Kitano S, Lesokhin AM, Wolchok JD.	Markers for anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) therapy in melanoma.	Magdalena Thurin, Francesco M. Marincola	Molecular Diagnostics for Melanoma: Methods in Molecular Biology.	Springer Science	NY, USA	2014	83-95

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Toda E, Terashima Y, Esaki K, Yoshinaga S, Sugihara M, Kofuku Y, Shimada I, Suwa M, Kanegasaki S, Terasawa H, Matsushima K.	Identification of a binding element for the cytoplasmic regulator FROUNT in the membrane-proximal carboxy-terminal region of chemokine receptors CCR2 and CCR5.	Biochem J	457 (2)	313-22	2014
Hosoi A, Matsushita H, Shimizu K, Fujii SI, Ueha S, Abe J, Kurachi M, Maekawa R, Matsushima K, Kakimi K.	Adoptive cytotoxic T lymphocyte therapy triggers a counter-regulatory immunosuppressive mechanism via recruitment of myeloid-derived suppressor cells.	Int J Cancer	34 (8)	1810-22	2013
Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M, Honda K.	Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota.	Nature	500 (7461)	232-6	2013

Hashimoto S, Ogoshi K, Sasaki A, Abe J, Qu W, Nakatani Y, Ahsan B, Oshima K, Shand FH, Ametani A, Suzuki Y, Kaneko S, Wada T, Hattori M, Sugano S, Morishita S, Matsushima K.	Coordinated changes in DNA methylation in antigen-specific memory CD4 T cells.	J Immunol	190 (8)	4076-91	2013
Onai N, Kurabayashi K, Hosoi-Amakie M, Toyama-Sorimachi N, Matsushima K, Inaba K, Ohteki T.	A Clonogenic Progenitor with Prominent Plasmacytoid Dendritic Cell Developmental Potential.	Immunity	38 (5)	943-57	2013
Suzuki H, Fukuhara M, Yamaura T, Mutoh S, Okabe N, Yaginuma H, Hasegawa T, Yonechi A, Osugi J, Hoshino M, Kimura T, Higuchi M, Shio Y, Ise K, Takeda K, Gotoh M.	Multiple therapeutic peptide vaccines consisting of combined novel cancer testis antigens and anti-angiogenic peptides for patients with non-small cell lung cancer.	J Trans Med	11 (1)	97	2013
Takahashi K, Takeda K, Saiki I, Irimura T, Hayakawa Y.	Functional roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-DR5 interaction in B16F10 cells by activating the nuclear factor- κ B pathway to induce metastatic potential.	Cancer Sci	104 (5)	558-562	2013
Aruga A, Takeshita N, Kotera Y, Okuyama R, Matsushita N, Ohta T, Takeda K, Yamamoto M.	Long-term vaccination with multiple peptides derived from cancer-testis antigens can maintain a specific T-cell responses and achieve disease stability in advanced biliary tract cancer.	Clin Cancer Res	19 (8)	2224-2231	2013
Asahara S, Takeda K, Yamao K, Maguchi H, Yamaue H.	Phase I/II clinical trial using HLA-A24-restricted peptide vaccine derived from KIF20A for patients with advanced pancreatic cancer.	J Transl Med	11 (1)	291	2013
Okuyama R, Aruga A, Hatori T, Takeda K, Yamamoto M.	Immunological responses to a multi-target vaccine composed of peptides of cancer testis antigens and vascular endothelial growth factor receptors in patients with advanced pancreatic cancer.	OncoImmunology	2 (11)	e27010	2013

Suzuki N, Hazama S, Ueno T, Matsui H, Shinoda Y, Iida M, Yoshimura K, Yoshino S, Takeda K, Oka M.	A phase I clinical trial of vaccination with KIF20A-derived peptide in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic cancer.	J Immunother	37 (1)	36-42	2014
Yoshimura S, Tsunoda T, Osawa R, Harada M, Watanabe T, Hikichi T, Katsuda M, Miyazawa M, Tani M, Iwahashi M, Takeda K, Katagiri T, Nakamura Y, Yamaue H.	Identification of an HLA-A2-restricted epitope peptide derived from hypoxia-inducible protein 2 (HIG2).	PLoS ONE	9 (1)	e85269	2014
Aruga A, Takeshita N, Kotera Y, Okuyama R, Matsushita N, Ohta T, Hatori T, Takeda K, Yamamoto M.	Phase I clinical trial of multiple-peptide vaccination for patients with advanced biliary tract cancer.	J Transl Med	12 (1)	61	2014
Hazama S, Nakamura Y, Takeuchi H, Suzuki N, Tsunedomari R, Inoue Y, Iizuka N, Yoshino S, Takeda K, Shinozaki H, Kamiya A, Furukawa H, Oka M.	A phase I study of combination vaccine treatment of five therapeutic epitope-peptides for metastatic colorectal cancer; safety, immunological response, and clinical outcome.	J Transl Med	12 (1)	63	2014
Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Sawada Y, Sakai M, Shirakawa H, Nobuoka D, Nakatsura T.	Analysis of cytotoxic T lymphocytes from a patient with hepatocellular carcinoma who showed a clinical response to vaccination with a glypican-3-derived peptide.	Int J Oncol	43 (4)	1019-1026	2013
Sawada Y, Komori H, Tsunoda Y, Shimomura M, Takahashi M, Baba H, Ito M, Saito N, Kuwano H, Endo I, Nishimura Y, Nakatsura T.	Identification of HLA-A2 or HLA-A24-restricted CTL epitopes for potential HSP105-targeted immunotherapy in colorectal cancer.	Oncol Rep	31 (3)	1051-1058	2014
Suzuki S, Shibata K, Kikkawa F, Nakatsura T.	Significant Clinical Response of Progressive Recurrent Ovarian Clear Cell Carcinoma to Glypican-3-derived Peptide Vaccine Therapy: Two Case Reports.	Hum Vaccin Immunother	10 (2)	1-6	2014

Kitano S, Tsuji T, Liu C, Hirschhorn-Cymerman D, Kyi C, Mu Z, Allison JP, Gnjatic S, Yuan JD, Wolchok JD.	Enhancement of tumor-reactive cytotoxic CD4+ T cell responses after ipilimumab treatment in four advanced melanoma patients.	Cancer Immunol Res	1	235-244	2013
Callahan MK, Masters G, Pratilas CA, Ariyan C, Katz J, Kitano S, Russell V, Gordon RA, Vyas S, Yuan J, Gupta A, Wigginton JM, Rosen N, Merghoub T, Jure-Kunkel M, Wolchok JD.	Paradoxical activation of T cells via augmented ERK signaling mediated by a RAF inhibitor.	Cancer Immunol Res	2	70-79	2014

研究成果の刊行物・別刷

3. 腫瘍会合性マクロファージ

松島綱治, 上羽悟史, 寺島裕也

本稿では、がん免疫・細胞療法の改善をめざして、がんの微小環境/stromaを構成する主な細胞でがんの悪性化・病態制御、担がんに伴う免疫抑制に深くかかわる細胞として再認識されている腫瘍会合性マクロファージ (tumor-associated macrophage : TAM) についてその起源, M1/M2マクロファージ, MDSC (myeloid-derived suppressor cell) との関連, 臨床的意義, TAMを標的としたがん免疫・細胞療法の改善の可能性について概説する。

はじめに

がんの進展に関する基本機序が解明され、新しい技術が導入・治療法が改善されどんどん新薬が開発されているにもかかわらずがんによる死亡は一向に減らず、医療費も減少していない現状にがん研究者としてどう応えるかが問われている。窒素マスタード以来の“がん細胞も病原体”という考え〔Paul Ehrlichの“魔法の弾丸”(magic bullet)理論〕に基づくがん化学療法には大きな限界があることが1980年代に明らかになった。近年の分子標的治療薬もEhrlich理論への回帰であって、決してがんの治癒をもたらすことはなく、がん幹細胞(もし存在するとして)を標的とした治療もその例外ではないだろう¹⁾。困ったことにがん細胞

は非常に多様であり、かつ炎症を伴うがんの微小環境によりがん細胞は変幻自在であり、ありとあらゆる抗がん剤に対する抵抗性を獲得する²⁾³⁾。

がんの免疫療法においても従来の抗原非特異的アジュバント療法、がん抗原非特異的NK/LAK/TILからがん特異的ペプチド療法、樹状細胞療法、CTL/CAR-T療法に至るまで大きな感心が寄せられている。しかし、がん特異性を求める限りPaul Ehrlich理論への回帰であり、がん抗原の発現低下、がん細胞膜上からのMHC-Iの消失などに対処できない⁴⁾。一方、最近では直接がん細胞を標的とする抗体療法のみならず、がんの微小環境/stroma^{*1}を制御し担がん時の免疫抑制状態を抗CTLA-4, PD-1/PD-L1抗体などで解除するだけで臨床効果があることが判明している^{5)~7)}。

■ マクロファージ研究の歴史, 起源に関する論争

マクロファージの歴史は1863年von Recklinghausenが脊椎動物の結合組織内にアメーバ様単核細胞として見出したことにはじまり、1892年にはMetchnikoffにより急性炎症に伴う食細胞マクロファージと

【キーワード&略語】

がん, マクロファージ, 起源, 動態, 免疫制御

MDSC : myeloid-derived suppressor cell
(骨髄由来抑制細胞)

TAM : tumor-associated macrophage
(腫瘍会合性マクロファージ)

Tumor-associated macrophages

Kouji Matsushima/Satoshi Ueha/Yuya Terashima : Department of Molecular Preventive Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo (東京大学大学院医学系研究科分子予防医学)

ミクローファージ (好中球に相当) の組織集積が記載され、炎症の本質とされた。Metchnikoffは種々の臓器にマクローファージが存在し生体防御にかかわるとする「食細胞学説」を打ち立てた。1924年にはAschoffは「細網内皮系統 (網内系: reticuloendothelial system) 説」を提唱、1970年代まで広く支持された。

一方、Aschoffのもとに留学した赤崎とその弟子・小島らにより組織球と細網内皮細胞は個体発生、形態、機能上も異なる細胞であることが明らかにされた。

他方、「マクローファージ単球由来説」は1925年のSabinらの仕事にさかのぼり、超生体染色により骨髄内に母細胞を有する血液単球が組織内でマクローファージに分化するとされた。この考えは、天野らにより支持され、天野は炎症時のみならず正常組織に存在するマクローファージも単球由来とする単球論を展開した(1948年)。1969年オランダのライデンで単球性食細胞に関する国際会議で炎症巣に浸潤するマクローファージのみならず正常状態で種々の組織に存在するマクローファージのすべてが骨髄内の前駆細胞に起源をもつ血液単球由来〔単球性食細胞系 (mononuclear phagocyte system: MPS)〕と結論された。この説はその後Langevoort, そしてvan Furthにより推進され、欧米では広く受け入れられた。

一方、日本の高橋、内藤らは胎生初期 (マウスではd8) 卵黄囊で開始する原始造血に伴う原始/胎生マクローファージが発生し卵黄囊から胎児組織に移住、そこで増殖し組織マクローファージになるとした。胎児肝では最初卵黄囊由来原始造血ではじまり (d10) その後AGM領域由来恒久造血に置き換わる (d12.5)。肝造血の最初からマクローファージが存在し、肝類洞が形成されると胎生マクローファージは類洞内へ移動、肝原基内の胎生マクローファージは増殖し、他の胎児組織の供給源になる。この卵黄囊由来の胎生マクローファージは成熟個体になっても各組織に存在し恒常的に組織マクローファージの供給源となる (これらマクローファージの起源に関する記載は高橋らの書籍を主に参考にした)⁸⁾。

最近、van Furthの流れを汲みGordonの弟子であるGeissmanらはlineage tracing技術を用いてマウス組織マクローファージの相当部分が骨髄造血幹細胞からではなく卵黄囊マクローファージ由来であることを確認した⁹⁾。造血幹細胞-単球由来炎症性マクローファージ

(炎症組織に浸潤する) と正常時にも存在する組織マクローファージの起源に関する長いバトルによりやく終止符が打たれたのでは、と思われる。

2 腫瘍会合性マクローファージ (TAM)

1983年Virchowはがん組織に存在するリンパ網内系細胞の存在をはじめて見出し、慢性炎症に伴って発生したがんの起源を反映するとして¹⁰⁾。TAM (tumor-associated macrophage) はこの腫瘍会合性リンパ網内系細胞の大半を占め、近年がんの増殖・浸潤・転移、がん組織の血管新生制御のみならず担がん宿主における重要な免疫制御細胞として注目を浴びている。甲状腺がん、肺がん、肝がん、乳がん、ホジキン病など多くのがん腫でTAM浸潤度と予後不良の関連が報告されている¹¹⁾。

例えば、高波らは肺腺がんにおける5年生存とCD68⁺TAMの逆相関を¹²⁾、ChenらはこのTAMが血管新生因子としてのCXCL8 (IL-8) の供給源になっていることを報告している¹³⁾。非小細胞性肺がんにおいても95%のCD68⁺TAMがstromaに存在しCD68⁺CD163⁺CD204⁺M2様の表現型を示す、と報告されている¹⁴⁾。これらのTAMはVEGF, MMP-9, IL-10, TREM-1を発現する。われわれも駒込病院の戸井らとの共同研究で乳がん組織におけるケモカイン^{※2}CCL2 (MCAF/MCP-1) とマクローファージ浸潤、血管新生、予後不良に関して報告した¹⁵⁾。しかしながら、TAMはいつも予後不良因子というわけではなく切除がんのがん部位 (tumor islet) のCD68⁺HLA-DR⁺iNOS⁺TNF- α ⁺MRP8/14⁺M1様マクローファージはstromaに多いCD68⁺CD163⁺CD204⁺M2様マクローファージと比べて予後良好因子とする報告もある¹⁶⁾。

※1 stroma

がんの微小環境を構成する浸潤マクローファージ、Tリンパ球などの白血球と線維芽細胞、血管内皮細胞などからなる。がんの足場を提供し、増殖、浸潤、転移、病態を制御する。

※2 ケモカイン

さまざまな白血球サブセットの生体内移動、活性化を制御するサイトカインである。1980年代後半に吉村と松島らによりプロトタイプCXCL8 (IL-8) とCCL2 (MCAF/MCP-1) が精製・同定され、現在では50種類ほどの大きな分子ファミリーを形成することが知られている。また、それらの受容体も20に及ぶ。

TAMはVEGF, IL-8などの産生を介して血管新生を促進し, EGF産生によりがんの浸潤・転移を促進し, 化学療法剤への抵抗性をもたらす。一方, YM1, FIZZ1発現M2様形質を示しIL-12産生が低くIL-10, TGF- β 高産生でTreg浸潤に関与するとされるCCL22 (MDC)も産生する。さらに, PGE₂産生, PD-L1 (PD-1 ligand 1), Arginase-1を発現しこれらによってがん局所におけるNK, CTLなどによる細胞性免疫を強く抑制する^{17) 18)}。

3 骨髄由来抑制細胞 (MDSC)

最近, Gabrilovichによって担がん時がん局所のみならず脾臓, 末梢血にも増加する免疫抑制性CD11b⁺Gr-1⁺ミエロイド細胞が, 担がんに伴う免疫抑制細胞として再認識されMDSC (myeloid-derived suppressor cell) と呼称され, 広く受け入れられている¹⁹⁾。しかしながら彼らが当初用いたCD11b⁺Gr-1⁺ミエロイド細胞は完全に単球由来マクロファージと好中球の混在であり, われわれはこの細胞集団が何ら新規の細胞集団ではなくがん部位における炎症反応に伴いケモカインCCL2 (MCAF/MCP-1) とその受容体CCR2依存的に組織浸潤した単球由来マクロファージと好中球であることを2008年のBloodに報告した²⁰⁾。その後, 国際的にはMDSCにはCD11b⁺Gr-1^{int/du1}-Ly6C^{hi}マクロファージタイプとCD11b⁺Gr-1^{hi}Ly-6C^{int}好中球タイプがあることが定説になっている²¹⁾。

しかし, いまだに組織常在性マクロファージと単球由来マクロファージに関する混乱 (無理解) が存在する。また, もう1つの腫瘍会合性ミエロイド細胞としての抗原提示細胞 (dendritic cell: DC) の同定があいまいであり単にMHC-II⁺CD11b⁺CD11c⁺とされており, 真のDCと浸潤マクロファージが区別できていない。われわれは, がん部位に存在するCCR7⁺MHC-II⁺CD11b⁺CD11c⁺が真のDCで腫瘍浸潤機序も, 機能も, 所属リンパ節への移動機序もマクロファージとは全く異なることを認めている (未発表)。

4 TAMの生体内動態

TAMは, 骨髄および骨髄外における単球新生とそれに引き続く単球の臓器間移動という一連の動的な過程を経て腫瘍局所へ主にCCR2依存的に動員される。近

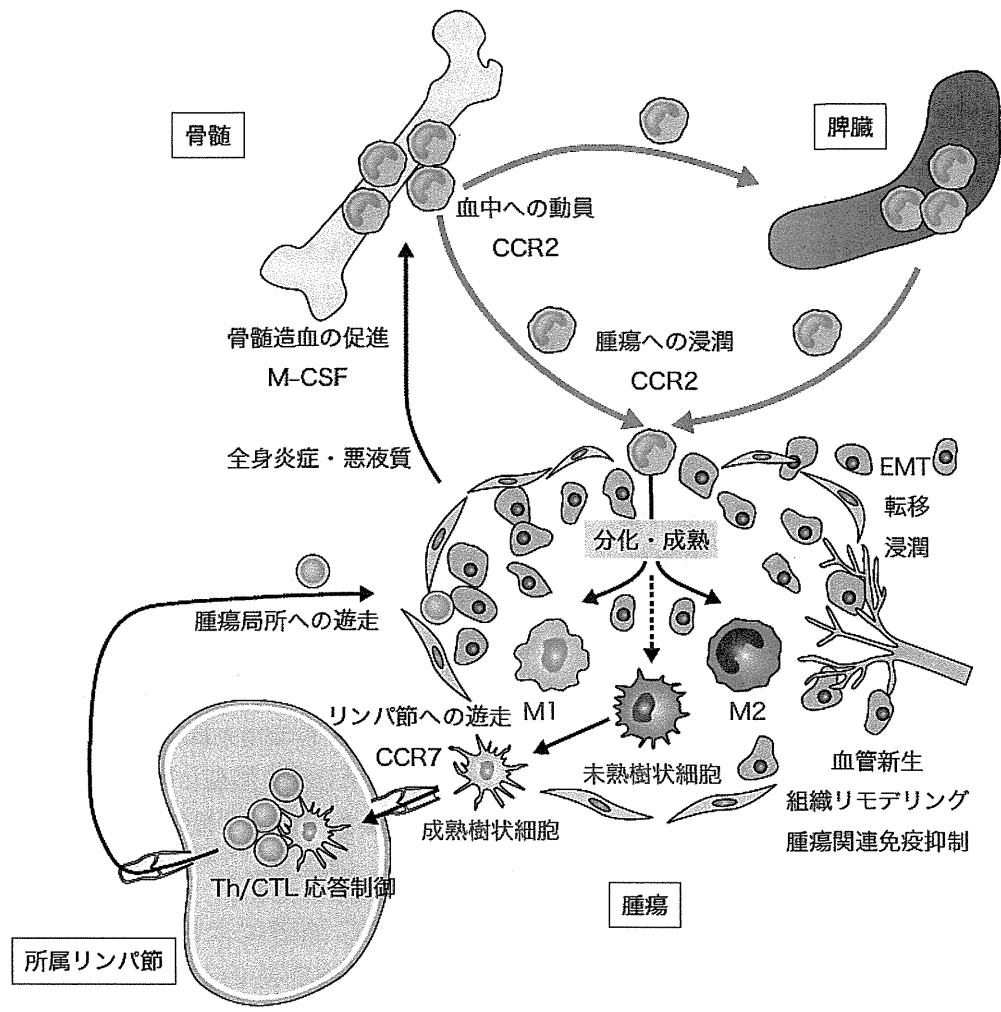
年, TAMの起源として, 脾臓から動員される単球 (splenic reservoir monocyte) の重要性が示唆されている²²⁾が, TAMの起源について骨髄由来単球と脾臓由来単球の相対的寄与度は未解明であった。

そこでわれわれは, UV照射により蛍光特性が緑から赤へ変換される蛍光タンパク質 “KikGR” (Kikume Green-Red) を全身性に発現する遺伝子改変マウスを用いて3LL皮下腫瘍モデルを作製した。脾臓または骨髄にUV照射し, 照射臓器に存在するLy-6C^{hi}炎症性単球を色変換した後, 経時的に脾臓, 骨髄, 末梢血, 腫瘍に存在する赤色細胞を追跡した。いずれの臓器を照射した場合でも, 1時間以内に赤色細胞が末梢血に出現し, その後腫瘍, 脾臓, 骨髄へ再分布したが, 腫瘍へ動員される単球数としては骨髄由来単球が脾臓由来単球を大きく上回った。数学的処理により算出した末梢血から腫瘍への移行効率, 腫瘍局所における残存時間も骨髄由来単球が脾臓由来単球を上回っていた。これらの結果は, 骨髄から腫瘍に動員される単球がTAMの主要な起源であることの確固たる証拠を与えるものと考えられる (未発表)。

5 TAM/MDSC制御によるがん免疫・細胞療法の改善

CCR2依存的に腫瘍局所に浸潤し, M2/MDSC様形質・機能を獲得するTAMを制御することは, がん免疫・細胞療法の治療効果をあげるうえで非常に重要, と想定される。マウスにおけるがんワクチン療法において, TAMをクロドロン酸リポソームで除去することにより抗腫瘍効果が亢進することが確認されている²³⁾。CCR2は非常に適切なTAM阻害分子標的となりうると思われるのでその開発が期待される。

われわれは, 2005年CCR2とCCR5の細胞内領域に結合し遊走シグナルを調節する分子「フロント」(FRONT)を発見した^{24) 25)}。CCR2はTAMのがん部位への動員を制御し, CCR5は線維芽細胞および間葉系幹細胞の移動を制御することで, ともにがん細胞の増殖と転移促進に関与する。「フロント」を阻害することで両方の受容体シグナルを同時に抑制することができれば, これまでないがん微小環境制御を通じた化学療法やがん免疫療法における抗がん作用の増強が期待できる。さらに, われわれは現在抗体依存性細胞



腫瘍会合性マクロファージ (TAM)

	M1	M2/MDSC
特徴	IFN- γ シグネチャー	IL-4シグネチャー
シグナル	STAT1/3のリン酸化	STAT6のリン酸化
表面分子	CD68, HLA-DR, iNOS, MRP8/14, MARCO	CD68, CD163, CD204, CD206, RELMa, YM-1, FIZZ1, MMP-7/9, Arginase-1, PGE ₂
機能分子	IL-12, TNF- α	VEGF, EGF, IL-6, IL-10, TGF- β , CXCL8, CCL22, PD-L1

図 TAMの動態とその抑制

腫瘍会合性マクロファージ (TAM) の主な起源は骨髄でつくられる単球であり、担がん時腫瘍部位で産生される CCR2 リガンド (CCL2/MCAF/MCP-1) により血中への動員が亢進する。一部、脾臓を介して炎症組織としての腫瘍部位に浸潤し、がんの微小環境の中でいわゆる M2 タイプにシフトし、機能的には MDSC ともよばれる形質を示し免疫抑制のみならず、がんの悪性化に貢献する

傷害 (ADCC) 活性を賦与したヒト型化抗 CD4 抗体の開発を計画しているが、この抗体投与により担がん状態における免疫抑制を強力にもたらす CD4⁺T リンパ球のみならず CD4⁺単球も除去できる。このように、今後担がん時の免疫抑制を解除する手段を提供し新たながん免疫・抗体・細胞療法の革新的な改善を図りたい。

おわりに

近年 Treg 以外の担がん時の免疫抑制・制御細胞として注目されている TAM/MDSC の起源に関して混乱を整理する意味も込めてマクロファージ研究の歴史、起源に関する論争についても概説した。また、TAM/M1 vs. M2/MDSC に関してもわれわれの考えを記述し、その担がん時生体内移動についても最近の知見を紹介した。そのサマリーを図に示す。正しい理解に基づき、TAM/MDSC 制御によるがん免疫・細胞療法の大幅な改善がもたらされることを期してやまない。

文献

- 1) Goldstein, I. et al. : Trends Mol. Med., 18 : 299-303, 2012
- 2) Straussman, R. et al. : Nature, 487 : 500-504, 2012
- 3) Wilson, T. R. et al. : Nature, 487 : 505-509, 2012
- 4) Landsberg, J. et al. : Nature, 490 : 412-416, 2012
- 5) Hodi, F. S. et al. : N. Eng. J. Med., 363 : 711-723, 2010
- 6) Topalian, S. L. et al. : N. Eng. J. Med., 366 : 2443-2454, 2012
- 7) Brahmer, J. R. et al. : N. Eng. J. Med., 366 : 2455-2465, 2012
- 8) 『生命を支えるマクロファージ』(高橋 潔, 内藤 眞/編),

文光堂, 2001

- 9) Schulz, C. et al. : Science, 336 : 86-90, 2012
- 10) Mantovani, A. et al. : Immunol. Today, 13 : 265-270, 1992
- 11) Bingle, L. et al. : J. Pathol., 196 : 254-265, 2002
- 12) Takamami, I. et al. : Oncology, 57 : 138-142, 1999
- 13) Chen, J. J. et al. : J. Clin. Oncol., 23 : 953-964, 2005
- 14) Chung, F. T. et al. : Int. J. Cancer., 131 : E227-235, 2012
- 15) Ueno, T. et al. : Clin. Cancer. Res., 6 : 3282-3289, 2000
- 16) Ohri, C. M. et al. : Eur. Respir. J., 33 : 118-126, 2009
- 17) Mantovani, A. et al. : Trends Immunol., 23 : 549-555, 2002
- 18) Qian, B. & Pollard, J. W. : Cell, 141 : 39-51, 2010
- 19) Gavrillovich, D. I. & Nagaraj, S. : Nat. Rev. Immunol., 9 : 162-174, 2009
- 20) Sawanobori, Y. et al. : Blood, 111 : 5457-5466, 2008
- 21) Youn, J.-I. et al. : J. Immunol., 181 : 5791-5802, 2008
- 22) Swirski, F. K. et al. : Science, 325 : 612-616, 2009
- 23) Predina, J. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110 : E415-E424, 2013
- 24) Terashima, Y. et al. : Nat. Immunol., 6 : 827-835, 2005
- 25) Toda, E. et al. : J. Immunol., 183 : 6387-6394, 2009

<筆頭著者プロフィール>

松島綱治：1978年3月，金沢大学医学部卒業。'82年3月，金沢大学大学院医学研究科修了(分子免疫学)，医学博士。'82年～'90年，米国NIH留学。'90年～'97年，金沢大学がん研究所薬理部教授。'96年～現在，東京大学医学部・大学院医学系研究科分子予防医学教授。現在，国際炎症学会連合会長，日本免疫学会理事，マクロファージ分子細胞生物学研究会会長。主な研究テーマ：炎症・免疫反応のケモカイン，サイトカインによる制御機序の解明とそれを通じた病気の新しい予防，治療方法の確立。趣味：ゴルフ，山歩きとワイン。

Markers for Anti-cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) Therapy in Melanoma

Michael A. Postow, Jianda Yuan, Shigehisa Kitano,
Alexander M. Lesokhin, and Jedd D. Wolchok

Abstract

Therapeutic strategies that block Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) enhance antitumor immunity and prolong the lives of patients with metastatic melanoma. However, only a subset of patients benefit, and responses are often delayed due to heterogeneous response kinetics. Ongoing monitoring of the immunologic effects of therapy and correlating these immunologic changes with patient outcomes continue to be important goals to better identify possible mechanisms of clinical activity of these agents. This chapter introduces the major areas of investigation in monitoring patients treated with CTLA-4 blockade and provides specific details of our experience performing selected assays.

Key words Ipilimumab, Tremelimumab, CTLA-4, Immunologic response biomarkers, Absolute lymphocyte count, Inducible costimulator, Myeloid-derived suppressor cells, NY-ESO-1 antigen

1 Introduction

Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) is an inhibitory molecule that is expressed on the cell surface of activated T cells and is essential for the maintenance of immunologic homeostasis. Therapeutic strategies that block CTLA-4 have been shown to increase immunologic responses and augment antitumor immunity. Two antibodies that block CTLA-4, ipilimumab (Yervoy™, Bristol-Myers Squibb, Princeton, NJ) and tremelimumab (MedImmune, Gaithersburg, MD), have been evaluated in phase III clinical trials where an overall survival (OS) benefit for patients with metastatic melanoma treated with ipilimumab has been demonstrated [1, 2].

Despite this improvement in OS, only a subset of patients benefit from CTLA-4 blockade. Some patients experience mechanism-based toxicity, referred to as immune-related adverse events (irAEs) or adverse events of special interest (AEOSI) [3].

We and others have been interested in assessing the immunologic status of patients undergoing therapy with CTLA-4 blockade to understand presumed mechanisms of antitumor immunity and/or AEOSI induced by these agents.

In this chapter, we first introduce the major efforts investigating quantifiable immunologic parameters associated with benefit and toxicity from CTLA-4 blockade. We then share detailed methods of the standard operating procedures we use to perform these immunologic assays. We conclude by sharing specific aspects of our experience as it pertains to the methods described. Though ipilimumab and tremelimumab have both been evaluated as CTLA-4 blocking therapies, we have chosen to focus the majority of this chapter on selected markers relevant to ipilimumab, the current commercially approved CTLA-4 blocking antibody and the agent with which we have had the most extensive experience.

1.1 Absolute Lymphocyte Count

The absolute lymphocyte count (ALC) is a readily accessible value in nearly all clinical laboratories as it constitutes part of the complete blood count (CBC) routinely performed by automated analyzers. Several retrospective analyses have shown that the ALC correlates positively with improved clinical outcomes following ipilimumab therapy. In the largest analysis, 379 patients from three phase II trials were analyzed [4]. Patients who achieved clinical benefit from ipilimumab (stable disease ≥ 24 weeks, partial response, and/or complete response) had a greater mean increase in ALC after starting therapy than patients who had progressive disease ($p=0.0013$). Similar results were found prospectively in 64 patients [4].

The ALC has also been shown to correlate with overall survival. In a separate study, 51 patients treated with ipilimumab at 10 mg/kg whose ALC was $\geq 1,000/\mu\text{L}$ prior to the third dose of ipilimumab had improved survival compared to patients whose ALC $< 1,000/\mu\text{L}$ [5]. This finding was similar for 137 patients treated with ipilimumab at 3 mg/kg, even when adjusting for M-stage, lactate dehydrogenase (LDH), and number of prior therapies [6]. Since the ALC reflects a heterogeneous lymphocyte population including T cells, B cells, and to a lesser degree, natural killer (NK) cells, the specific cell population predominantly responsible for the association with clinical benefit and overall survival in these analyses remains the subject of ongoing evaluation.

1.2 Analyses of Specific T Cell Populations

Flow cytometry analyses of lymphocyte subpopulations in the peripheral blood and tumor have revealed suggestions of the most relevant lymphocyte subsets that correlate with benefit from ipilimumab. One study of 35 patients showed that patients who achieved clinical benefit from ipilimumab had a greater absolute increase in the number of CD8+ T cells compared to patients who did not benefit ($p=0.0294$). The absolute increase in CD4+ T cells

did not differ significantly between patients who achieved clinical benefit and those who did not ($p=0.2237$) [7].

The type and degree of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) have also been investigated. Earlier investigations into ipilimumab biomarkers revealed that the ratio of CD8+ T cells to Forkhead Box P3 (FoxP3)+T regulatory cells was associated with therapy-induced tumor necrosis [8]. These results are consistent with a dedicated biomarker study of ipilimumab, where an increase in TIL during therapy was associated with a higher likelihood of clinical benefit ($p=0.005$) [9].

Cell surface marker expression on T cells has also been examined to further characterize T cell responses during CTLA-4 therapy. Increased levels of the human leukocyte antigen (HLA)-DR and CD45RO on CD4+ and CD8+ T cells in peripheral blood after ipilimumab treatment have been reported in several studies [10–13]. There was no correlation, however, between the elevation of HLA-DR or CD45RO and clinical response to ipilimumab. An independent study of 12 patients treated with tremelimumab suggested similar effects, although there was some correlation with clinical benefit in this small cohort [14].

Inducible costimulator (ICOS) is expressed on the cell surface after T cell activation and plays a role in T cell expansion and survival [15]. Ipilimumab was administered as neoadjuvant therapy in a study of six patients with bladder cancer undergoing cystoprostatectomy. After ipilimumab treatment, the frequency of CD4+ T cells that expressed ICOS increased in both the peripheral blood and bladder tumor tissue [16]. In a retrospective analysis of 14 patients with melanoma, a sustained increase over 12 weeks of CD4+ ICOS^{hi} T cells in the peripheral blood correlated with improved survival [17]. These results are consistent with those from another study in which ipilimumab was shown to result in a pharmacodynamic increase in ICOS^{hi}, proliferating (Ki67+), CD4+ and CD8+ T cells [18]. In this study, decreased levels of Ki67+ CD8+ T cells were significantly associated with the development of irAEs.

1.3 Tumor Antigen-Specific Immunity

In addition to efforts monitoring T cell subpopulations during treatment with CTLA-4 blockade, characterization of antigen-specific antibody and T cell responses has similarly led to associations between immunologic changes and benefit from CTLA-4 therapy. Serological studies have evaluated antibody responses against a number of tumor-associated antigens, including, but not limited to MAGE, Melan-A, MART-1, gp-100, and tyrosinase. Humoral responses against the cancer-testis antigen, NY-ESO-1, however, have been the most thoroughly described.

NY-ESO-1 is a well-characterized cancer-testis antigen expressed in 30–40 % of melanomas [19]. In a study of 144

melanoma patients treated with ipilimumab (most of whom received ipilimumab at 10 mg/kg), the 22 who had a detectable antibody titer by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against NY-ESO-1 prior to ipilimumab were more likely to experience clinical benefit than those with no detectable NY-ESO-1 antibody titer (12/22; 55 % vs. 36/118; 31 %, respectively, $p=0.0481$) [20]. It is possible that antibody responses to NY-ESO-1 serve as a surrogate for broader mechanisms of antitumor immunity, rather than direct mediators.

Antigen-specific T cells have also been evaluated as a potential biomarker for CTLA-4 blockade. In a case report of a patient who experienced a complete remission to ipilimumab, a high percentage of melan-A-specific CD8+ T cells was seen in histologic analysis of regressing tumor tissue and in peripheral blood [21]. Though not all patients were treated with anti-CTLA-4 therapy, in another study, the prognostic value of functional T cells responding to the tumor-associated antigens NY-ESO-1 and Melan-A was evaluated. Of the 84 patients with metastatic melanoma, those who had increased functional T cells to NY-ESO-1 and Melan-A had improved survival by Cox regression analysis [22]. In the study of 144 ipilimumab treated patients with melanoma, NY-ESO-1-seropositive patients with associated CD8+ T cells experienced more frequent clinical benefit (10 of 13; 77 %) than those with undetectable CD8+ T-cell response (one of seven; 14 %; $p=0.02$; relative risk=5.4, two-tailed Fisher test), as well as a significant survival advantage ($p=0.01$; hazard ratio=0.2, time-dependent Cox model) [20]. Despite these findings, the presence of these cells supports, but does not confirm their mechanistic role in tumor control as they may be a surrogate for other mechanisms of antitumor immunity. Whether this finding is relevant in a population of patients who all receive anti-CTLA-4 therapy remains unknown.

1.4 Myeloid-Derived Suppressor Cells

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) are a heterogeneous population of immunosuppressive monocytic cells. Though MDSC have been described differently, in patients with melanoma, they are typically classified as CD14+/HLA-DR^{low/-} cells, based upon this cell population's ability to suppress lymphocyte function [23]. MDSC have been shown to be increased in patients with melanoma, and the quantity of MDSC has been shown to correlate with melanoma disease activity [24, 25].

We have been investigating MDSC as a biomarker for melanoma patients undergoing treatment with ipilimumab. In a pilot study of 26 patients with metastatic melanoma undergoing treatment with ipilimumab at 10 mg/kg, we evaluated the quantity and functional capabilities of MDSC in the peripheral blood.

Prior to ipilimumab treatment, a lower MDSC quantity was associated with improved overall survival (HR 1.07, $p=0.002$), even when adjusting for pretreatment ALC and lactate dehydrogenase (LDH) [26]. Efforts are ongoing to evaluate this finding in a larger cohort of patients and determine whether this finding is specific for ipilimumab treatment.

2 Materials

2.1 Peripheral Blood Collection, Cell Separation, and Cryopreservation

1. Cell Preparation Tubes (CPT) containing sodium heparin (BD Vacutainer, Franklin Lakes NJ).
2. RPMI 1640 media supplemented with L-glutamine (2 mM final, GIBCO/BRL), 25 % Human Serum Albumin(HSA) (Alpine Biologics).
3. Pooled Human Serum (PHS), heat inactivated at 56 °C for 30 min (Gemini Bio-Products, Woodland CA).
4. Dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich).
5. Autologous plasma.
6. Guava easyCyte flow cytometer to measure cell viability and count the cells (Millipore).

2.2 Monitoring of Activated T Cell Subpopulations by Flow Phenotype Staining

1. Fluorochrome labeled antibodies: CD278 (ICOS)-PE-Cy7, CD3-Pacific Blue, CD8-PE-Cy5, CD25-PE, and FOXP3-APC (eBioscience); and CD4-ECD (Beckman Coulter Inc.).
2. Fixation/Permeabilization solution (1×) for use prior to intracellular FOXP3 staining (eBioscience).
3. Permeabilization buffer (1×) for use following Fixation buffer, washing and cell suspension prior to FOXP3 staining (eBioscience).
4. Antibody Isotype controls for the appropriate fluorochrome-conjugated mouse IgG_{1a} or IgG_{2a} from same companies (eBioscience, Beckman Coulter and BD Bioscience).
5. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer: 1 % fetal calf serum (FCS) in 1× PBS EDTA (10 mM phosphate buffered saline, pH 7.4, 1 mM EDTA).
6. CYAN ADP High-Performance Flow Cytometer with multiple laser excitation sources with Summit software (Dako Cytomation California Inc., Carpinteria, CA).
7. FlowJo software for data analysis (version 9.2) (TreeStar, Inc.).