

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 名前 西川 博嘉 所属 大阪大学 職名 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、ヒト化抗CCR4モノクローナル抗体投与による活性化型Tregs除去を、標準化されたアッセイ方法により解析した。ヒト化抗CCR4モノクローナル抗体投与により末梢血および腫瘍局所から活性化型Tregsの減少が認められた。

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+FOXP3lowTregs(ナイーブ型)とCD4+CD45RA-FOXP3highTregs(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

エクター型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。

本分担研究では上記のうち制御性T細胞の動態の免疫学的検討を行うことを目的とする。

## B. 研究方法

書面にて同意が得られたヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与を受けた患者の末梢血および腫瘍浸潤細胞より単核球を比重遠心法により単離し、解析に用いた。

単核球を CD4、CD25、CD45RA、FOXP3 抗体を用いて Tregs を同定し、さらに抗 CCR4 抗体投与による変動を時系列で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、すべての検体は本治験参加施設において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

ヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与による活性化型 Tregs 除去

a. ヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与により末梢血活性化型 Tregs が除去される

ヒト Tregs の分類法を用いて、ヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体を投与された患者 (Ia 層 10 名、Ib 層 7 名) の末梢血検体を解析した。全症例において投与 5 週目では活性化型 Tregs の有意な減少が認められた。この活性化型 Tregs の減少は、がん腫に関わらず認められるとともに、いずれの抗体の投与量 (0.1 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg) でも認められた (図 1)。

一方で病態の安定により投与を継続された患者では、再発前に活性化型 Tregs の頻度の上昇が認められた (図 2)。

活性化Tregs除去効果 疾患別経過 活性化Tregs除去効果 投与量別経過

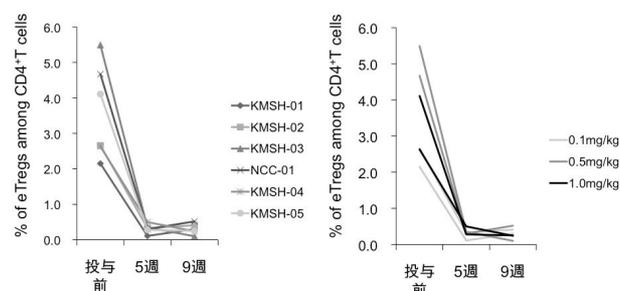


図 1 活性化型 Tregs 除去効果のまとめ

KMSH-02 0.1mg/kg投与群 肺癌

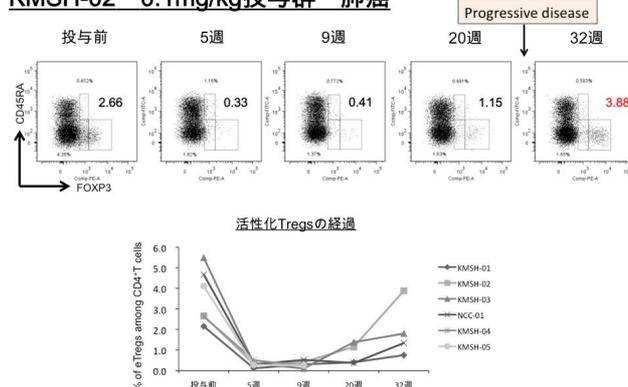


図 2 長期のヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与による活性化型 Tregs の動態

b ヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与により腫瘍局所の活性化型 Tregs が減少する

ヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体を投与された患者のなかで、Ib 層登録 OUH-10 において、投与前後で腫瘍局所の生検検体が得られた。ヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与前では末梢血 (4.27%) および腫瘍局所 (11.3%) と高頻度の活性化型 Tregs が認められた。投与終了後には末梢血では活性化型 Tregs が 0.23% に除去されるとともに、腫瘍局所においても 3.96% に減少が認められた (図 3)。

## OUH-10 Tregs除去効果

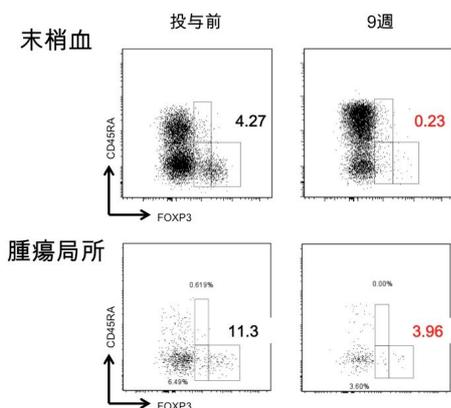


図 3 ト化抗 CCR4 モノクローナル抗体投与による腫瘍局所活性化型 Tregs の減少

### D. 考察

ヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体の投与により末梢血の活性化型 Tregs が十分に除去されることが明らかになった。また腫瘍局所においても活性化型 Tregs の著大な減少が認められた。しかしながら腫瘍局所では末梢血に比較して活性化型 Tregs の除去効率は低く、今後 CCR4 発現レベルの違い、CCR4 分子の変異の可能性および腫瘍局所への ADCC 活性に関わる細胞 (NK 細胞や単球など) 浸潤なども含めた検討が必要であると考えられた。

また、本治療では病態が安定した患者ではヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体の継続投与がなされたが、1回/4週の投与になると活性化型 Tregs の頻度が上昇し、それに伴い病態の進行が認められた。これはヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体による活性化型 Tregs 減少により、がん細胞と免疫系とで保たれていた平衡状態が活性化型 Tregs の増加とともに崩れ、がん細胞の免疫系からの逃避、がん細胞増殖に至った可能性が考えられ、今後の検討課題と考えられた。

### E. 結論

ヒト化抗 CCR4 モノクローナル抗体 (0.1 mg/kg-1.0 mg/kg) 投与によりがん腫に関わらず活性化型 Tregs が末梢血から除去された。また1例ではあるが、腫瘍局所でも活性化型 Tregs が著名に減少することが示された。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 英文

1. Maeda Y, Nishikawa H, Sugiyama D, Ha D, Hamaguchi M, Saito T, Nishioka M, Wing JB, Adeegbe D, Katayama I and Shakaguchi S; Regulatory T cells drive autoimmune T cells into a distinct T-cell subpopulation functionally anergic and expressing CTLA-4. **Science**. 346(6216):1536-1540 2014 (Corresponding Author). doi: 10.1126/science.aaa1292.
2. Matsumoto M, Baba A, Yokota T, Nishikawa H, Ohkawa Y, Kayama H, Kallies A, Nutt SL, Sakaguchi S, Takeda K, Kurosaki T and Baba Y.; "Interleukin-10-Producing Plasmablasts Exert Regulatory Function in Autoimmune Inflammation. **Immunity**. 41(6):1040-1051 2014 doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.016.
3. Nishikawa H, Sakaguchi S; Regulatory T cells in cancer immunotherapy. **Curr Opin Immunol**. Jan 9;27:1-7 2014.
4. Ito Y, Hashimoto M, Hirota K, Ohkura N, Morikawa H, Nishikawa H, Tanaka A, Furu M, Ito H, Fujii T, Nomura T, Yamazaki S, Morita A, Vignali DAA, Kappler JW, Matsuda S, Mimori T, Sakaguchi N and Sakaguchi S.; Detection of T-cell responses to a ubiquitous cellular protein in autoimmune disease. **Science**. 346(6207):363-368 2014 doi: 10.1126/science.1259077.
5. Saito T, Wada H, Yamasaki M, Miyata H, Nishikawa H, Sato E, Kageyama S, Shiku H, Mori M, Doki Y.; High expression of MAGE-A4 and MHC class I antigens in tumor cells and induction of MAGE-A4 immune responses are prognostic markers of CHP-MAGE-A4 cancer vaccine. **Vaccine**. 32(45):5901-5907 2014

6. 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, Udono 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.** Feb-Mar;37(2):84-92 2014. doi: 10.1097/CJI.000000000000017.

和文

- (1) 杉山 大介、西川博嘉  
制御性 T 細胞および免疫チェックポイント分子の解除による抗腫瘍免疫応答増強の可能性  
がん分子標的治療 2014;12:84-88.
- (2) 島津 裕、西川博嘉  
制御性 T 細胞によるがん抗原特異的 T 細胞の抑制  
癌と化学療法 2014;41:1057-1061
- (3) 長瀬博次、西塔拓郎、和田 尚、西川博嘉  
抑制性 T 細胞の同定と機能評価  
Surgery Frontier 2014;21:70-75
- (4) 杉山 大介、西川博嘉  
成人 T 細胞白血病に対する免疫療法  
血液フロンティア 2014;63-69
- (5) 西川博嘉  
制御性 T 細胞とがん免疫療法  
臨床血液 2014;55:475-481
- (6) 西川博嘉、坂口志文  
ヒト制御性 T 細胞の解析  
医学のあゆみ 2015.252.69-74
- (7) 西川博嘉

2. 学会発表

海外

- (1) Nishikawa H.: Regulatory T cells in anti-tumor immunity: Can they be controlled? 22nd Annual Cancer Immunotherapy Symposium. October 7<sup>th</sup>, 2014, New York (*Symposium*)
- (2) Adeegbe D, Sugiyama D, Maeda Y, Ha D, Matsutani T, Nishikawa H and Sakaguchi S: TCR repertoire reshaping emanating from therapeutic modalities involving Treg depletion and/or immune checkpoint blockade. 22nd Annual Cancer Immunotherapy Symposium. October 6<sup>th</sup>, 2014, New York
- (3) Saito T, Nishikawa H., Wada H, Mori M, Doki Y and Sakaguchi S: Association between FoxP3+ T cells and regulatory T cells in colorectal cancer 22nd Annual Cancer Immunotherapy Symposium. October 6<sup>th</sup>, 2014, New York

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 18 回日本がん分子標的治療学会シンポジウム 2014 年 6 月 27 日 宮城県仙台市
- (2) Hiro Yoshi Nishikawa: Importance of controlling regulatory T cells for successful cancer immunotherapy 第 18 回日本がん免疫学会シンポジウム 2014 年 7 月 30 日 愛媛県松山市
- (3) 西川博嘉: Regulatory T cell を介したがん免疫応答制御の克服の可能性、第 34 回日本分子腫瘍マーカー研究会シンポジウム 2014 年 9 月 24 日 神奈川県横浜市
- (4) 西川博嘉: 網羅的抗体反応測定法を用いた抗腫瘍免疫応答のモニタリング、第 42 回日本臨床免疫学会 6 学会合同シンポジウム 2014 年 9 月 25 日 東京都
- (5) Nishikawa H: Tregs in Cancer Immunotherapy、第 73 回日本癌学会 Core Symposium 2014 年 9 月 27 日 神奈川県横浜市

(6) 西川博嘉:制御性 T 細胞とがん免疫療法  
第 63 回日本血液学会 教育講演 2014 年 11 月 1  
日 大阪市

(7) 西川博嘉: がん免疫療法における制御性 T  
細胞 第 27 回日本バイオセラピー学会 シンポジ  
ウム 2014 年 12 月 4 日 大阪市

(8) 西川博嘉: がん免疫療法と制御性 T 細胞  
第 10 回日本がん分子標的治療学会 トランス  
レーショナルリサーチワークショップ 2015 年  
1 月 20 日 東京都

#### 一般講演

(1) 前田優香、西川博嘉、杉山大介、西塔拓  
郎、西岡めぐみ、Danbee H、坂口志文: 制御性  
T 細胞は腫瘍抗原特異的 CD8+T 細胞に特徴的な  
アネルギー状態を誘導する 第 18 回日本がん免  
疫学会 2014 年 8 月 1 日 愛媛県松山市

(2) Adeegbe D, Sugiyama D, Maeda Y, Ha D,  
Matsutani T, Nishikawa H and Sakaguchi S:  
Promotion of T cell dysfunction by regulatory T

cells in tumor; mechanisms and insights 第 18  
回日本がん免疫学会 2014 年 8 月 1 日 愛媛県  
松山市

(3) 杉山大介、前田優香、西塔拓郎、西岡め  
ぐみ、Danbee H、西川博嘉、坂口志文: 制御性  
T 細胞は腫瘍抗原特異的 CD8+T 細胞に特徴的な  
アネルギー状態を誘導する 第 73 回日本癌学会  
2014 年 9 月 25 日 神奈川県横浜市 (口頭発表)

(4) 岸裕幸、小林英治、杉山大介、西川博嘉、  
坂口志文、村口篤: メラノーマ患者および健常  
人 PBMC 中の CD4+T 細胞の単一細胞レベルでの  
レパトリー解析、第 73 回日本癌学会 2014  
年 9 月 25 日 神奈川県横浜市 (口頭発表)

(5) 西塔拓郎、西川博嘉、和田 尚、坂口志  
文、森正樹、土岐裕一郎: 大腸癌での制御性 T 細  
胞の予後への影響、第 73 回日本癌学会 2014  
年 9 月 27 日 神奈川県横浜市 (ポスター発表)