

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(がん関係研究分野)

**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**

平成 23 年度～25 年度 総合研究報告書

平成 26(2014)年 5 月

研究代表者 小西 郁生

目 次

I. 総括研究報告

1. がん免疫逃避機構を標的にした次世代型治療の臨床応用と
新規バイオマーカーの探索に関する研究
小西 郁生
松村 謙臣
瀨西 潤三 ----- 1

II. 分担研究報告

1. 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
清水 章 ----- 13
2. 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
岡崎 拓 ----- 15
3. 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
竹馬 俊介 ----- 21

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 25

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 28

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
(がん関係研究分野)

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

研究者名簿

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	小西 郁生	京都大学大学院 医学研究科 婦人科学産科学	教授
研究分担者	万代 昌紀	近畿大学医学部産科婦人科	教授
	清水 章	京都大学 臨床研究総合センター 開発企画部	教授
	岡崎 拓	徳島大学 医学研究科 免疫・分子生物学	教授
	松村 謙臣	京都大学大学院 医学研究科 婦人科学産科学	准教授
	竹馬 俊介	京都大学大学院 医学研究科 免疫ゲノム医学	助教
	濱西 潤三	京都大学大学院 医学研究科 婦人科学産科学	助教

I. 総合研究報告書

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)
総合研究報告書

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実用化においては、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実用化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。

B. 研究方法

1) 免疫学的評価法の確立のための基礎的検討

卵巣がん治療モデルにおけるバイオマーカー探索：マウス卵巣癌細胞において PD-L1 発現による免疫への作用メカニズム解明を行い、さらに *in vivo* にて同系マウスへの腫瘍増殖抑制の有無および生存期間を検討した。次に腫瘍の PD-L1 発現による免疫細胞における遺伝子発現の変化の網羅的解析を行い、PD-1/PD-L1 経路阻害におけるゲノムワイドな遺伝子発現変化を検討した。

卵巣癌患者における免疫状態の評価法の確立

本研究における治験対象者のコントロールとして、卵巣癌患者 70 例の腫瘍部の免疫状態や末梢血中の各種免疫細胞 (末梢血単球分画: PBMC) の免疫染色や網羅的遺伝子解析により、個別の患者の局所および全身の免疫状態を評価する。すなわち PD-L1、PD-L2 をはじめとする卵巣癌細胞における複数の免疫抑制因子の発現および、腫瘍内浸潤免疫細胞 (CD4、CD8、CD57 [NK 細胞]、CD1a [樹状細胞]、Foxp3 [制御性 T 細胞]、PD-1 陽性細胞) の免疫組織染色を行い、これら多因子による階層的クラスター解析を用いて卵巣癌症例をその免疫状態によりグループ化し、各グループ間の臨床病理因子 (含腹膜播種) および予後との関係を検討した。

2) 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

卵巣癌細胞株を用いた PD-L1 発現に関連する遺伝子の解明とバイオマーカー探索

これまでの研究成果から、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 阻害抗体の治療効果が期待できる可能性が示唆されているが、どの程度の卵巣癌で発現が認められるのかは、またどのようなメカニズムで発現しているのかは知られていない。そこで、ヒト卵巣癌細胞株を含む悪性腫瘍細胞株 990 株の DNA 発現遺伝子発現マイクロアレイデータを用いて、PD-L1 発現とそれに相関する遺伝子・遺伝子群の発現を解析した。さらに PD-L1 高発現の細胞株について遺伝子変異解析もおこなった。さらに細胞株への各種サイトカイン (IL-2, IL-6, IL-10, TNF α , TGF- β , INF- γ) 添加による PD-L1 発現の誘導性を検討した。

卵巣癌腫瘍部およびがん性腹水 (腹膜播種) 細胞の PD-L1/PD-1 経路の解析と阻害検討

次に当科での 50 症例の卵巣癌腫瘍部の DNA 発現マイクロアレイによる PD-L1 発現を検討したが、免疫細胞の PD-L1 発現が無視できなく、正確な腫瘍の PD-L1 発現の正確な評価が困難であった。そこで、卵巣癌細胞株の DNA 発現マイクロアレイから PD-L1 高発現株に特徴的な複数の遺伝子群 (PD-L1 signature) の同定を検討した。さら

に免疫細胞から IFN- γ による発現が変化する遺伝子群 (IFN- γ signature) を rIFN- γ 添加による不死化卵巣上皮細胞の培養細胞を用いて検討した。腫瘍内の免疫状態を腫瘍組織の遺伝子マイクロアレイにより評価できるようにした。これらを用いて、卵巣癌組織の遺伝子発現マイクロアレイにより簡便かつ正確に、腫瘍の PD-L1 発現やその発現を誘導する局所環境にあるかどうかを評価するシステムを構築できた。なおこれらの gene signature をスコア化できる ssGSEA 解析によって、PD-L1 スコアと予後との関係を検討した。

卵巣癌における PD-L1 発現測定の精度管理確立の検討
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、免疫染色の精度管理向上を検討した。

3) 卵巣癌に対す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
本公募申請以前 (平成 21 年) から当院臨床研究総合センター (旧探索医療センター) との共同研究により、抗 PD-1 抗体 (Nivolumab) を用いて、化学療法抵抗性の再発・進行卵巣癌患者を対象とした新規免疫療法の第 II 相臨床試験の準備を進めると同時に、被験者検体の採取を行うための疫学研究整備を行った。

本研究補助をもとに、平成 23 年 9 月より本研究補助を頂き、「再発・進行卵巣癌に対する

抗 PD-1 抗体を用いた免疫療法の臨床第 II 相試験治験登録開始 (UMIN 登録 UMIN000005714)」を医師主導治験として開始した。被験者検体を、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。なお現在治験中であるため、一部のみの解析。

(倫理面への配慮)

本研究において、臨床研究に関する倫理指針に準拠し、治験は GCP 基準を順守し、学内倫理委員会および治験審査委員会の承認ののち、厚生労働省医薬品医療機器総合機構に届出を行ない、承認を受けて行なう。重篤な有害事象が発生した場合、院内のみならず、厚生労働省の医薬品等安全性情報報告制度により厚生労働省にも報告し、適切に対応する。また治験以外の臨床研究は、学内医の倫理委員会の承認のもと、所定文書にて患者の同意を得て行なう。さらに本研究における動物実験は、厚生労働省の所管する実施期間における動物実験等の実施に関する基本指針に準拠し、本学動物実験施設の定める実験動物取扱い手順に則って行なう。

C. 研究結果

1) 免疫学的評価法の確立のための基礎的検討

卵巣がん治療モデルにおけるバイオマーカー探索: マウス卵巣癌細胞株の PD-L1 過剰発現株および発現抑制株を用いて CD8T 細胞による細胞傷害アッセイを行った結果、PD-L1 過剰発現株において免疫活性が抑

制される一方、PD-L1 発現抑制株では促進され、腫瘍増殖は抑制され生命期間も延長した。すなわち卵巣癌細胞の PD-1/PD-L1 経路の有無により、接触する免疫細胞 (CD8+T 細胞) の機能が大きく変化することから、免疫細胞の遺伝子発現もダイナミックに変化している可能性が示唆された。そこで担癌状態にあるマウス脾臓細胞や、腫瘍に接触させた免疫細胞の網羅的遺伝子発現解析をおこない、複数個の特徴を持つ遺伝子群 (gene signature) を抽出することが出来た。

卵巣癌患者における免疫状態の評価法の確立:

卵巣癌組織における局所免疫状態を解析において卵巣癌患者は免疫関連の 11 因子の発現 (免疫染色) のクラスター解析にて、免疫状態から 4 群 (クラスター) に分かれた。そのうち CD8T 細胞含め免疫細胞浸潤が多いクラスター 1 は、免疫抑制因子の発現が高い他の 3 群に比して有意に予後良好であった。一方、他の 3 クラスターは免疫細胞浸潤が少なく複数の免疫抑制因子の発現が高かった。特にクラスター 4 は腫瘍の PD-L1 発現が比較的高い集団であることから、PD-1 経路阻害が有望である集団として抽出された。

2) 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

卵巣癌細胞株を用いた PD-L1 発現に関連する遺伝子の解明とバイオマーカー探索

悪性腫瘍細胞株の DNA 発現遺伝子発現マイクロアレイ解析の結果、PD-L1 を高発現している悪性腫瘍細胞株の割合および、そのうち卵巣癌細胞株の割合はそれぞれ 10% 以

下でありそれ以外は低発現もしくは無発現であった。

また遺伝子変異サブ解析にてこれら高発現の細胞株はすでに報告のある MAPK や RAS/MEK/ERK 経路の変異を認めるものが多かったが、代表的な変異様式にないものも含まれていた。一方で、これまでに腫瘍部組織の検討では約 70% の症例で PD-L1 が高発現していたことから、培養条件での細胞株と生体内の腫瘍細胞では PD-L1 発現率にかなりの相違があることが判明した。

さらに、各種サイトカイン添加による卵巣癌細胞株における PD-L1 の誘導性について検討した結果、他のサイトカインでは誘導されないが IFN- γ 存在下でのみ PD-L1 発現が誘導されるものが多いことから、生体内では oncogenic に PD-L1 を発現しているがん細胞よりも、生体内の宿主との免疫反応において発現が上昇しているがん細胞のほうが多いことが示唆された。さらに抗 PD-1 抗体治療の有効性が期待できるバイオマーカーの一つとして PD-L1 発現と合わせて、その信号の上流にある IFN- γ および IFN- γ 関連遺伝子 (gene signature) は重要な因子であることがわかった。

卵巣癌腫瘍部およびがん性腹水 (腹膜播種) 細胞の PD-L1/PD-1 経路の解析と阻害検討

卵巣癌細胞株の DNA 発現マイクロアレイから PD-L1 高発現株に特徴的な PD-L1 関連遺伝子群 (signature) の同定をした。さらに不死化卵巣上皮細胞への rIFN- γ 添加後に発現変化する複数の遺伝子から gene signature (IFN- γ signature) を同定した。

これらの gene signature を用いて、腫瘍と免

疫細胞が混在する腫瘍組織の遺伝子マイクロアレイデータを検討する際に、腫瘍内の免疫状態を簡便かつ正確に、腫瘍の PD-L1 発現やその発現を誘導する局所環境にあるかどうかを評価するシステムを構築できた。なおこれらの gene signature をスコア化できる ssGSEA 解析によって、PD-L1 スコアが高い症例は予後不良であることがわかり、これまでの研究成果を裏付ける結果となるとともに、腫瘍部マイクロアレイを用いた症例選別 (PD-L1 signature 高発現、IFN- signature 高発現) に有用なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

卵巣癌における PD-L1 発現測定の精度管理確立の検討

従来の当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。

2) 卵巣癌に対する治験と被験者検体採取

医師主導治験のための組織の構築、プロトコール作成、学内医の倫理委員会・治験審査委員会の承認を得て、平成 23 年 6 月に医薬品医療機器総合機構に治験届を届出後、治験登録開始の準備を進めた。本研究補助を頂き、平成 23 年 9 月より予定通り、医師主導臨床第 II 相試験にて「再発・進行卵巣癌に対する抗 PD-1 抗体を用いた免疫療法の臨床第 II 相試験」の治験登録開始 (UMIN 登録 UMIN000005714) と並行して治験薬投与に伴う被験者の血液中の変化を網羅的に

解析し各種バイオマーカーを探索するために、被験者からの血液検体採取も同時に開始した。現在なお試験中であるため、前例の解析は終了していないが、(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にて、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、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

卵巣がん治療モデルにおいて、PD-1/PD-L1 経路の有無により、対応する免疫細胞の遺伝子変化の詳細が解析可能であり、またヒトでの抗 PD-1 抗体による PD-1 経路阻害によるものと共通の遺伝子・遺伝子群を抽出することができる。さらに卵巣癌患者における免疫状態の評価法からは、卵巣癌の腫瘍局所における免疫環境は患者の予後を左右する重要な要素であり、また PD-1/PD-L1 経路阻害が有効である可能性のある患者のグループが抽出できたことから、本解析は予後評価や治療法選択の指標に役立つ可能性が示唆された。

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の解明によって、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進展や転移、抗がん剤治療への効果にも関与している可能性を示すことができた。さらに、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、抗 PD-1 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

竹馬研究分担者研究成果から、不顕性感染などの微生物学的因子が、PD-1 抗体療法の際に自己免疫病を誘発する可能性が報告されたため、治験登録時に慎重に対応する。

G. 研究発表

1. 論文発表

< 英文 >

1. Yoshihara K, Tsunoda T, Shigemizu D, Fujiwara H, Hatae M, Fujiwara H, Masuzaki H, Katabuchi H, Kawakami Y, Okamoto A, Nogawa T, Matsumura N, Udagawa Y, Saito T, Itamochi H, Takano M, Miyagi E, Sudo T, Ushijima K, Iwase H, Seki H, Terao Y, Enomoto T, Mikami M, Akazawa K, Tsuda H, Moriya T, Tajima A, Inoue I, Tanaka K.
High-risk ovarian cancer based on 126-gene expression signature is uniquely characterized by down-regulation of antigen presentation pathway. Clin Cancer Res. 2012 Jan 12. [Epub ahead of print]

2. Yamamura S, Matsumura N, Mandai M, Huang Z, Oura T, Baba T, Hamanishi J, Yamaguchi K, Kang HS, Okamoto T, Abiko K, Mori S, Murphy SK, Konishi I. The activated transforming growth factor-beta signaling pathway in peritoneal metastases is a potential therapeutic target in ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2012 Jan 1;130(1):20-8.
3. Horiuchi A, Hayashi T, Kikuchi N, Hayashi A, Fuseya C, Shiozawa T, Konishi I. Hypoxia upregulates ovarian cancer invasiveness via the binding of HIF-1 α to a hypoxia-induced, methylation free hypoxia response element (HRE) of S100A4 gene. *Int J Cancer*. 2012 Jan 27. doi: 10.1002/ijc.27448.
4. Yoshioka Y, Ono M, Osaki M, Konishi I, Sakaguchi S. Differential effects of inhibition of bone morphogenetic protein (BMP) signalling on T-cell activation and differentiation. *Eur J Immunol*. 2011 Dec 5. [Epub ahead of print]
5. Takahashi Y, Sasaki H, Mogami H, Hamada S, Konishi I. Adjuvant combined paclitaxel and carboplatin chemotherapy for glassy cell carcinoma of the uterine cervix: report of three cases with clinicopathological analysis. *J Obstet Gynaecol Res*. 2011 Dec;37(12):1860-3.
6. Takahashi Y, Mogami H, Hamada S, Urasaki K, Konishi I. Alpha-fetoprotein producing ovarian clear cell carcinoma with a neometaplasia to hepatoid carcinoma arising from endometriosis: a case report. *J Obstet Gynaecol Res*. 2011 Dec;37(12):1842-6.
7. Mandai M, Matsumura N, Baba T, Yamaguchi K, Hamanishi J, Konishi I. Ovarian clear cell carcinoma as a stress-responsive cancer: influence of the microenvironment on the carcinogenesis and cancer. *Cancer Lett*. 2011 Nov. 28;310(2):129-33.
8. Ikeuchi T, Koyama T, Tamai K, Fujimoto K, Mikami Y, Konishi I, Togashi K. CT and MR features of struma ovarii. *Abdom Imaging*. 2011 Nov 4.
9. Shimizu M, Kondoh E, Ueda M, Kakui K, Tatsumi K, Konishi I. Secondary postpartum hemorrhage due to uterine artery pseudoaneurysm rupture in von Willebrand disease. *J Obstet Gynaecol Res*. 2011 Dec;37(12):1887-90. Epub 2011 Oct 14.
10. Takatsu A, Shiozawa T, Miyamoto T, Kurosawa K, Kashima H, Yamada T, Kaku T, Mikami Y, Kiyokawa T, Tsuda H, Ishii K, Togashi K, Koyama T, Fujinaga Y, Kadoya M, Hashi A, Susumu N, Konishi I. Preoperative differential diagnosis of minimal deviation adenocarcinoma and lobular endocervical glandular hyperplasia of the uterine cervix: a multicenter study of clinicopathology magnetic resonance imaging findings. *Int J Gynecol Cancer*. 2011 Oct;21(7):1287-96.
11. Minakami H, Hiramatsu Y, Koresawa M, Fujii T, Hamada H, Iitsuka Y, Ikeda T, Ishikawa H, Ishimoto H, Itoh H, Kanayama N, Kasuga Y, Kawabata M, Konishi I. et al Guidelines for obstetrical practice in Japan: Japan Society of Obstetrics and Gynecology (JSOG) and Japan Association of Obstetricians and Gynecologists (JAOG) 2011 edition. *J Obstet Gynaecol Res*. 2011 Sep;37(9):1174-97.
12. Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, Kikuchi N, Konishi I, Seki N, Shiozawa T. Laser-captured microdiscion-microarray analysis of the genes involved in endometrial carcinogenesis: stepwise up-regulation of lipocalin2 expression in normal and neoplastic endometria and its functional relevance. *Hum Pathol*. 2011 Sep; 42(9):1265-74.
13. Hamanishi J, Mandai M, Abiko K, Matsumura N, Baba T, Yoshioka Y, Kosaka K, Konishi I.

- The comprehensive assessment of local immune status of ovarian cancer by the clustering of multiple immune factors. *Clin Immunol.* 2011 Dec; 141 (3):338-47. Epub 2011 Sep 2.
14. Satoh H, Baba T, Mandai M, Suzuki A, Matsumura N, Konishi I. Primary squamous cell carcinoma of fallopian tube accompanied by gastric metaplasia of female genital tract: case report and review. *J Obstet Gynecol Res.* 2011 Aug;37(8).
 15. 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 May 13. doi: 10.1002/emmm.201201823. [Epub ahead of print] PMID: 23666744
 16. 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 chemo-refractory endometrial cancers. *Int J Cancer.* 2013 Apr 18. doi: 10.1002/ijc.28220. [Epub ahead of print] PMID: 23595697
 17. Shitano F, Kido A, Fujimoto K, Umeoka S, Himoto Y, Kiguchi K, Kondoh E, Mikami Y, Konishi I, Togashi K. Decidualized adenomyosis during pregnancy and post delivery: three cases of magnetic resonance imaging findings. *Abdom Imaging.* 2013 Feb 21. [Epub ahead of print] PMID: 23429961
 18. Mikami Y, Minamiguchi S, Teramoto N, Nagura M, Haga H, Konishi I. Carbonic anhydrase type IX expression in lobular endocervical glandular hyperplasia and gastric-type adenocarcinoma of the uterine cervix. *Pathol Res Pract.* 2013 Mar;209(3):173-8. doi: 10.1016/j.prp.2012.12.003. Epub 2013 Feb 4. PMID: 23391777
 19. Abiko K, Mandai M, Hamanishi J, Yoshioka Y, Matsumura N, Baba T, Yamaguchi K, Murakami R, Yamamoto A, Kharma B, Kosaka K, Konishi I. PD-L1 on tumor cells is induced in ascites and promotes peritoneal dissemination of ovarian cancer through CTL dysfunction. *Clin Cancer Res.* 2013 Mar 15;19(6):1363-74. doi: 0.1158/1078-0432.CCR-12-2199. Epub 2013 Jan 22. PMID: 23340297
 20. Furuta N, Kondoh E, Yamada S, Kawasaki K, Ueda A, Mogami H, Konishi I. Vaginal delivery in the presence of huge vulvar varicosities: a case report with MRI evaluation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013 Apr;167(2):127-31. doi: 10.1016/j.ejogrb.2012.11.024. Epub 2012 Dec 31. PMID: 23287636
 21. Chigusa Y, Kondoh E, Mogami H, Nishimura F, Ujita M, Kawasaki K, Fujita K, Tatsumi K, Konishi I. TP-Binding Cassette Transporter A1 Expression Is Decreased in Preeclamptic Placentas. *Reprod Sci.* 2012 Dec 28. [Epub ahead of print] PMID: 23275468
 22. Suzuki A, Kariya M, Matsumura N, Baba T, Yagi H, Mandai M, Konishi I, Fujii S. Expression of p53 and p21(WAF-1), apoptosis, and proliferation of smooth muscle cells in normal myometrium during the menstrual cycle: implication of DNA damage and repair for leiomyoma development. *Med Mol Morphol.* 2012 Dec;45(4):214-21. doi: 10.1007/s00795-011-0562-3. Epub 2012 Dec 7. PMID: 23224600
 23. Mandai M, Matsumura N, Baba T, Suzuki A, Konishi I. Clinical management of fallopian tube cancer]. *Nihon Rinsho.* 2012 Jun;70 Suppl 4:664-9. Japanese. No abstract available. PMID: 23156329

24. Mandai M, Hamanishi J, Abiko K, Yoshioka Y, Konishi I. [Immunological aspect of metastasis of ovarian cancer]. *Nihon Rinsho*. 2012 Jun;70 Suppl 4:5 07-11. Japanese. No abstract available. PMID: 23156299
25. Matsumura N, Mandai M, Baba T, Konishi I. [Molecular mechanisms of peritoneal dissemination in ovarian cancer]. *Nihon Rinsho*. 2012 Jun;70 Suppl 4:4 98-501. Japanese. No abstract available. PMID: 23156297
26. Baba T, Ogawa M, Konishi I. [Clinical biomarkers of endometrial cancer]. *Nihon Rinsho*. 2012 Jun;70 Suppl 4:3 72-6. Japanese. No abstract available. PMID: 23156273
27. Konishi I. [Cervical cancer treatment: current perspective]. *Nihon Rinsho*. 2012 Jun;70 Suppl 4:1 91-3. Japanese. No abstract available. PMID: 23156240
28. Kawamura A, Kondoh E, Hamanishi J, Kawamura Y, Kusaka K, Ueda A, Kawasaki K, Fujita K, Mogami H, Konishi I. Cervical clamp with ring forceps to prevent prolapse of an intrauterine balloon in the management of postpartum hemorrhage. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013 Mar;39(3):733-7. doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.02017.x. Epub 2012 Oct 29. PMID: 23106866
29. Huang RY, Chen GB, Matsumura N, Lai HC, Mori S, Li J, Wong MK, Konishi I, Thiery JP, Goh L. Histotype-specific copy-number alterations in ovarian cancer. *BMC Med Genomics*. 2012 Oct 18;5: 47. doi: 10.1186/1755-8794-5-47. PMID: 23078675
30. Ueda Y, Mandai M, Matsumura N, Baba T, Suzuki A, Yoshioka Y, Kosaka K, Konishi I. Adenoid cystic carcinoma of skene glands: a rare origin in the female genital tract and the characteristic clinical course. *Int J Gynecol Pathol*. 2012 Nov;31(6):596-600. doi:10.1097/PGP.0b013e31824d357e. PMID: 23018210
31. Yamanoi K, Mandai M, Suzuki A, Matsumura N, Baba T, Yoshioka Y, Kosaka K, Konishi I. Synchronous primary corpus and ovarian cancer: High incidence of endometriosis and thrombosis. *Oncol Lett*. 2012 Sep;4(3):375-380. Epub 2012 Jun 22. PMID: 22970036
32. Eto T, Saito T, Kasamatsu T, Nakanishi T, Yokota H, Satoh T, Nogawa T, Yoshikawa H, Kamura T, Konishi I. Clinicopathological prognostic factors and the role of cytoreduction in surgical stage IVb endometrial cancer: a retrospective multi-institutional analysis of 248 patients in Japan. *Gynecol Oncol*. 2012 Nov; 27(2):338-44. doi: 10.1016/j.ygyno.2012.08.012. Epub 2012 Aug 19. PMID: 22910693
33. Kobayashi F, Kondoh E, Hamanishi J, Kawamura Y, Tatsumi K, Konishi I. Pyomayoma during pregnancy: a case report and review of the literature. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013 Jan;39 (1):383-9. doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.01947.x. pub 2012 Jul 29. PMID: 22845799
34. Chigusa Y, Tatsumi K, Kondoh E, Fujita K, Nishimura F, Mogami H, Konishi I. Decreased lectin-like oxidized LDL receptor 1 (LOX-1) and low Nrf2 activation in placenta are involved in preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Oct;9 7(10):E1862-70. doi: 10.1210/jc.2012-1268. Epub 2012 Jul 12. PMID: 22791762
35. Ueda Y, Kondoh E, Kakui K, Hamanishi J, Ueda M, Nishikawa A, Tatsumi K, Konishi I. Serial magnetic resonance imaging of placenta percreta with bladder involvement during pregnancy and postpartum: a case report. *J Obstet Gynaecol Res*. 2013 Jan;39(1):359-63. doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.01899.x.

- Epub 2012 Jun 4.PMID: 22672446
36. Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, Sudo T, Nishimura R, Ishiko O, Shiozawa T, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Konishi I. Potential role of LMP2 as an anti-oncogenic factor in human uterine leiomyosarcoma: morphological significance of calponin h1. *FEBS Lett.* 2012 Jun 21;586(13):1824-31. doi: 10.1016/j.febslet.2012.05.029. Epub 2012 May 29.PMID: 22659265
 37. Kondoh E, Shimizu M, Kakui K, Mikami Y, Tatsumi K, Konishi I. Deciduous can cause remarkable leukocytosis and obscure abdominal pain. *J Obstet Gynaecol Res.* 2012 Dec;38(12):1376-8. doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.01879.x. Epub 2012 May 21.PMID: 22612308
 38. Taki M, Baba T, Mandai M, Suzuki A, Mikami Y, Matsumura N, Konishi I. Solitary fibrous tumor arising slowly in the vulva over 10 years: case report and review. *J Obstet Gynaecol Res.* 2012 May;38(5):884-8. doi: 10.1111/j.1447-0756.2011.01792.x. Epub 2012 Mar 26.PMID: 22449361
 39. Horie A, Fujiwara H, Sato Y, Suginami K, Matsumoto H, Maruyama M, Konishi I, Hattori A. Laeverin/aminopeptidase Q induce trophoblast invasion during human early placentation. *Hum Reprod.* 2012 May;27(5):1267-76. doi: 10.1093/humrep/des068. Epub 2012 Mar 8. PMID: 22402206
 40. Himoto Y, Fujimoto K, Kido A, Matsumura N, Baba T, Daido S, Kiguchi K, Shitano F, Konishi I, Togashi K. Assessment of the early predictive power of quantitative magnetic resonance imaging parameters during neoadjuvant chemotherapy for uterine cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2014 May;24(4):751-7. doi: 10.1097/IGC.0000000000000124.
 41. 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.
 42. 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.
 43. 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]
 44. 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 lymphnode 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
 45. 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.
 46. 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.

47. 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]
48. 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
49. 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.
50. 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
51. 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
- <和文>
- 「卵巢癌の播種・進展と免疫環境との関連分子を標的とした免疫法の開発」
万代昌紀、瀨西潤三、安彦郁、松村謙臣、馬場長、小阪謙三、吉岡弓子、小西郁生
産婦人科の実際 61巻2号 201-205, 2012
 - 「【特集】稀な婦人科がんの診療戦略ー:8 子宮内膜間質肉腫(低悪性度)」
鈴木彩子, 万代昌紀, 小西郁生
*産婦人科の実際*60巻8月号 1163-1167, 2011
 - 「「今月の臨床 子宮頸癌 - 予防と妊孕性温存のための治療戦略」: 予防戦略 2. HPVワクチンの投与対象」
鈴木彩子, 小西郁生 *臨床婦人科産科*65巻10号
 - 「子宮体癌の術前評価と手術方法の選択」
馬場 長, 万代昌紀, 小西郁生
OGS now 子宮体癌・卵巢癌の手術基本術式と腫瘍進展に応じた戦略, メジカルビュー社, p8-13, 2011
 - 「再発卵巢癌・腹膜癌に対するペグ化リポソーマルドキソルピシンの治療効果と有害事象の解析」
原田 文, 松村謙臣, 小林史昌, 馬場 長, 鈴木彩子, 小阪謙三, 万代昌紀, 小西郁生
産婦人科の進歩 63巻3号, p277-83, 2011
 - 「当科における進行子宮頸癌に対する手術療法についての検討」
上田優輔, 鈴木彩子, 松村謙臣, 馬場長, 小阪謙三, 万代昌紀, 小西郁生
産婦人科の進歩 63巻3号, p364-67, 2011
 - 「トラケクトミー手術手技を学ぶ汎汎性子宮頸部摘出術(radical trachelectomy)における骨盤内リンパ節郭清術」
小西郁生, 鈴木彩子, 松村謙臣, 馬場 長, 万代昌紀 *産婦人科の進歩* 63巻3号, p378-81, 2011
 - 「子宮ポリープ状異型腺筋腫(atypical polypoid adenomyoma, APAM)の取り扱い」
馬場 長, 小西郁生 *産婦人科の進歩* 63巻2号, p197-201, 2011
 - 「エンドメトリオーシスと卵巢癌 子宮内膜症から発生する卵巢癌の生物学的特徴 明細胞腺癌に高発現するHNF-1 β 遺伝子の機能解析から」
万代昌紀, 岡本尊子, 松村謙臣, 山口建, 馬場 長, 瀨西潤三, 小西郁生
日本エンドメトリオーシス学会会誌 32巻,

- p39-42, 2011
10. 「[婦人科がんのMolecular Biology] cancer stem cell」万代昌紀、馬場 長、松村謙臣、小西郁生 産科と婦人科 78巻1号, p95-100, 2011
 11. 「[卵巢がんに関する最新トピックス] 卵巢類内腺癌update」万代昌紀、鈴木彩子、松村謙臣、馬場長、小西郁生 産婦人科の実際 59巻10号, p1485-92, 2011
 12. 「広汎子宮全摘術 - 本手術を安全に始めるために - 第49回日本婦人科腫瘍学会記録 ミートザエキスパート14」万代昌紀、小西郁生 日本婦人科腫瘍学会雑誌 29:286-291, 2011
 13. 「婦人科がん免疫療法の現状」万代昌紀 化療ニュース 19:1-3, 2011
 14. 「ゴナドトロピンと卵巢癌の発生」万代昌紀、黒田英樹、小西郁生 産科と婦人科 78:324-331, 2011
 15. 「子宮内膜症の癌化における微小環境の役割と遺伝子発現への影響」万代昌紀、山口建、松村謙臣、馬場長、濱西潤三、小西郁生 日本臨床社 子宮腺筋症・子宮内膜症における最新の動向 p109-114, 2011
 16. 卵巢腫瘍合併妊娠. 周産期医学編集委員会(編), 周産期医学必修知識(第7版). 近藤 英治, 巽 啓司, 小西 郁生 Pp202-203, 東京医学社, 東京, 2011
 17. 婦人科がん 最新の研究動向, 小西郁生: 序文. 小西郁生 (編), pp1-2, 日本臨床社, 東京, 2012
 18. 子宮体がん 子宮体癌の検診・診断 腫瘍マーカー、バイオマーカー 馬場 長、小川まどか、小西郁生 (編), 婦人科がん 最新の研究動向, pp372-376, 日本臨床社, 東京, 2012
 19. IV. 卵巢がん 卵巢癌の転移機構 播種性転移の分子機構. 松村謙臣、万代昌紀、馬場 長、小西郁生 (編), 婦人科がん 最新の研究動向, p498-501, 日本臨床社, 東京, 2012

総説

1. 婦人科悪性腫瘍の診療over view. (“婦人科悪性腫瘍の診断治療アップデート”). 小西 郁生: 産婦人科の実際 61:291-293, 2012
2. 悪性腫瘍患者へのART治療. (シリーズで学ぶ最新知識“合併症を有する不妊症患者のマネジメント -ARTのために-”) 朝倉 寛之, ニコラス S. マクロン, 小西 郁生: 産婦人科の実際 61:1963-1969, 2012
3. 卵巢明細胞腺癌における特異的遺伝子発現と分子標的治療への展開. (“卵巢明細胞腺癌と子宮内膜症-分子生物学的アプローチと治療戦略の展望”). 万代 昌紀, 山口 建, 松村 謙臣, 岡本 尊子, 天野 泰彰, 馬場 長, 小西 郁生: 産科と婦人科 79:1279-1284, 2012
4. HPVワクチン後の子宮頸がん. (“産婦人科医療の未来の予測”). 小西 郁生 産婦人科の実際 61:1429-1434, 2012
5. 卵巢癌. (“産婦人科の薬剤使用プラクティス:病態別処方 婦人科編 腫瘍”) 松村 謙臣, 馬場 長, 小西 郁生: 産婦人科の実際 61:1806-1815, 2012

<和文>

1. 「卵巢がんに対する抗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 京都がん研究会メールマガジン2013年11月号
2. 産科と婦人科 80(4): 510 -512 2013 卵巢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 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・進行卵巢がんに対する抗PD-1抗体を用いた免疫療法

・ 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)
(総合)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 臨床研究総合センター 開発企画部 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した。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た。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た。

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た。抗 PD1 抗体を投与する医師主導治験において、

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った。試験期間を延長し、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、試料の収集が順調に行われている。

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かつ、極めて重要な位置を占める。本研究では、このような支援により、治験の完遂が間近であり、収集した試料の解析による、予後および治療効果に関する新規バイオマーカーの探索を可能にした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

J. Immunol. 186 巻, 6515-6520 (2011)

Exp. Hematol. 39 巻, 424-433 (2011)

J. Transl. Med. 巻, 55 (2011)

Am. J. Transl. Res. 4 巻, 52-59 (2011)

Scientific Reports 2 巻, 642 (2012)

Bone 50 巻, 69-78 (2012)

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)

第18回臨床薬理講習会(平成23年12月、於浜松)「臨床研究の信頼性確保」:臨床研究の
プロトコール立案(臨床薬理 43 巻3号・
2012)

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)
(総合)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 岡崎 拓
徳島大学 免疫・分子生物学 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 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。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ことを目的とした。また、自己免疫疾患の発症制御において PD-1 と協調的に機能することを見出している免疫抑制受容体 LAG-3 の阻害剤をはじめ、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した。本研究期間内には、マイクロアレイを用いた発現解析により PD-1 と LAG-3 の抑制特性が異なることを見出した。また、PD-1 或いは LAG-3 によって発現誘導が強く抑制される遺伝子の転写調節領域を利用することにより、各々の機能をモニターできるレポーターシステムを構築した。今回得られた情報及び構築したシステムを用いることにより、PD-1 が機能している細胞を分離して解析できるようになれば、抗 PD-1 阻害抗体による治療効果の予測が可能になるとともに、より効果的な治療法の開発につながると期待される。

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った。そこで、抗 PD-1 抗体による治療効果を治療前或いは治療開始後早期に予測し得るバイオマーカーを探索することが重要である。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。

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 欠損以外の遺伝的要因や環境要因が大きく影響を与えと考えられる。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。がん免疫における抗原は、多くの場合自己の抗原であるため、がん免疫においても PD-1 と LAG-3 が協調的に働くと考えられる。そこで、LAG-3 をはじめとした他の免疫抑制シグナルを PD-1 と同時に阻害することにより、PD-1 阻害抗体による抗腫瘍効果を増強し得ると期待される。

B. 研究方法

1) T 細胞株を用いた機能解析

I-Ad 拘束性にニワトリ卵白アルブミン由来ペプチドを認識する DO11.10 細胞株、I-Ek 拘束性に蛾シトクローム C 由来ペプチドを認識する 2B4.11 細胞株等の T 細胞株を用いて、抗原特異的な T リンパ球の活性化に対する PD-1 及び LAG-3 の抑制効果を評価した。具体的には、適合するハプロタイプの MHC を発現した細胞を抗原提示細胞として用い、抗原ペプチドを提示させ、各 T 細胞株を刺激した。刺激開始後、6~24 時間の時点で細胞を回収し、マイクロアレイ解析及びフローサイトメトリー解析を行った。また、培養上清を回収し、IL-2 等のサイトカインを定量した。抗原提示細胞と T 細胞の量と比率、抗原ペプチドの濃度、刺激時間等を増減させることにより刺激の強度を変えて検討した。

DO11.10 細胞株と 2B4.11 細胞株は、恒常的に PD-1 を発現していたため、抗原提示細胞に PD-1 リガンドを強制発現させることにより、PD-1 介在の有無を制御した。両細胞株とも LAG-3 は

恒常的に発現していなかったため、レトロウイルスベクターを用いて過剰発現させて、LAG-3 介在の有無を制御した。

2) マイクロアレイによる発現解析

DO11.10 細胞株を用いて、6 条件((1)無刺激、(2)PD-1 と LAG-3 の介在無しでの刺激、(3)PD-1 のみ介在下での刺激、(4)LAG-3 のみ介在下での刺激、(5)PD-1 と LAG-3 両者介在下での刺激、(6)MHC クラス II に対する阻害抗体存在下での刺激)における遺伝子発現をマイクロアレイ解析により網羅的に解析した。具体的には、刺激開始後 12 時間の時点で T 細胞のみを回収し、RNA を調製し、アジレント社のマイクロアレイを用いて全遺伝子の発現を比較した。

3) モノクローナル抗体の作製

マウス LAG-3 の細胞外領域をヒト IgG の Fc 領域と融合させたキメラタンパク質を発現するプラスミドベクターを作製し、293T 細胞に一過性に強制発現させた。培養上清からプロテイン A セファロースを用いてキメラタンパク質を回収した。得られたキメラタンパク質を LAG-3 欠損マウスに免疫した。免疫したマウスからリンパ球を回収してミエローマ細胞株 SP2/o と融合させた。LAG-3 を強制発現させた細胞株に対する反応性を指標にして、抗 LAG-3 抗体産生細胞株を得た。得られたクローンについて、LAG-3 に対する結合強度、機能阻害活性等を検討した。

4) レポーター細胞の作製

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 NF-AT、NF- κ B、AP-1 等の転写因子が結合する配列を 1 個あるいは複数個重複させて EGFP、BFP、AmCyan、mCherry、tdTomato、Crimson、Dimer2、dsRed、LacZ、あるいは CRE 組換え酵素の上流に配置したプラスミドベクターを作製した。また、CRE 組換え酵

素により EGFP を発現するプラスミドベクターを作製した。各発現プラスミドベクターを DO11.10 細胞株に導入した後、特異的な抗原を用いて刺激し、蛍光タンパク質の発現頻度と強度或いは LacZ の酵素活性を定量した。

上述の転写因子結合配列に加え、PD-1 や LAG-3 により発現誘導が強く抑制される遺伝子の転写調節領域を用いて、各種レポータープラスミドを作製し、検討した。得られた結果を基に、用いる転写調節領域の長さ、重複数等を調節し、改良を試みた。

C. 研究結果

1) 抗原刺激による各種遺伝子の発現誘導に対する PD-1 と LAG-3 の抑制効果

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、リンパ球側のバイオマーカーの探索を試みた。

抗原刺激により、複数の情報伝達経路が活性化されることが知られているが、具体的に PD-1 や LAG-3 がどういった経路を、どのようなタイミングで、どれくらいの効率で抑制するかは、ほとんど分かっていない。そこで、抗原刺激による各種遺伝子の発現誘導に対する影響を指標に、各抑制受容体の機能的な違いを検討した。DO11.10 細胞株においては、抗原刺激により発現量が 2 倍以上上昇した遺伝子の数は 2,358 個であった。そのうちの 1,465 遺伝子は、PD-1 により 50% 以上、発現誘導が抑制されていた。一方、406 遺伝子は、PD-1 による抑制効果が 10% 以下であった。例えば、IL-2 遺伝子は抗原刺激により発現量が 15.3 倍に増加していたが、PD-1 介在時には 3.2 倍の増加にとどまり、約

85% の発現誘導抑制が確認された。また、PD-1 介在時に発現量が 4 倍以上亢進する遺伝子が 613 遺伝子、認められた。

2) PD-1 による抑制効果を検知するマーカーの探索

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 NF-AT、NF- κ B、AP-1 等の転写因子が結合する配列を検討したところ、刺激強度を調整することにより、活性化細胞を効率的に標識できる条件を見出したが、PD-1 による抑制効果の判定には不適であった。

上述の通り、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。

LAG-3 については、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。

また、同時に複数の条件で解析するために、

BFP, AmCyan, mCherry, tdTomato, Crimson, Dimer2, dsRed2 等、他の蛍光タンパク質を検討したところ、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。

3) 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

これまでに 16 種類の抗マウス LAG-3 モノクローナル抗体を得ることに成功した。そのうち、6 種類が試験管レベルで良好な機能阻害活性を示した。そのうちの一つは、既に市販されている抗体(クローン名:C9B7W)と比較して、親和性が 10 倍以上高く、阻害活性もより高いことが確認された。

また、ヒト LAG-3 についても、これまでに 18 種類の抗ヒト LAG-3 モノクローナル抗体を得ることに成功し、複数のクローンが強い阻害活性を有していることが確認できている。

D. 考察

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が、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。また、一部の遺伝子については、発現がむしろ誘導されていた。PD-1 による発現誘導抑制効果が特に強い遺伝子、ほとんど抑制されない遺伝子、むしろ発現が誘導される遺伝子等に注目して解析することにより、PD-1 阻害抗体による T 細胞の活性化をより鋭敏かつ正確にモニターできる可能性がある。それにより、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れば、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。

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。そこで、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たところ、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。

また、PD-1 と LAG-3 が発現誘導を抑制する遺伝子の種類が異なることを利用し、PD-1 及び LAG-3 による抑制を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 (A_{low}, B_{low}, C_{int})、LAG-3 によって抑制を受けている T リンパ球 (A_{high}, B_{low}, C_{high})、両者による抑制を受けていない T リンパ球 (A_{high}, B_{high}, C_{high})、及び全く抗原刺激を受けていない T リンパ球 (A_{low}, B_{low}, C_{low}) 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。今後、実際にマウス生体内等で利用するには、縦列化等により標識高率を向上させる必要があると思われる。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。

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. Sugino Yoshio, Nishikawa Nobuyuki, Yoshimura Koji, Kuno Sadako, Hayashi Yukio, Yoshimura Naoki, Okazaki Taku, Kanematsu Akihiro, Ogawa Osamu. BALB/c-Fcgr2bPdc1 mouse expressing anti-urothelial antibody is a novel model of autoimmune cystitis. *Sci Rep.* 2012;2:317.
2. Iwamoto Satoru, Kido Masahiro, Aoki Nobuhiro, Nishiura Hisayo, Maruoka Ryutaro, Ikeda Aki, Okazaki Taku, Chiba Tsutomu, Watanabe Norihiko. IFN- γ is reciprocally involved in the concurrent development of organ-specific autoimmunity in the liver and stomach. *Autoimmunity.* 2012 Mar;45(2):186-198.
3. Hisako, Ueda Yoshiyasu, Sawa Yukihiisa, Jeon Seong Gyu, Ma Ji Su, Okumura Ryu, Kubo Atsuko, Ishii Masaru, Okazaki Taku, Murakami Masaaki, Yamamoto Masahiro, Yagita Hideo, Takeda Kiyoshi. Intestinal CX3C chemokine receptor 1high

(CX3CR1high) myeloid cells prevent T-cell-dependent colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Mar ;109(13):5010-5015.

4. Satoru Iwamoto, Masahiro Kido, Nobuhiro Aoki, Hisayo Nishiura, Ryutaro Maruoka, Aki Ikeda, Taku Okazaki, Tsutomu Chiba, Norihiko Watanabe, “TNF- α is essential in the induction of fatal autoimmune hepatitis in mice through upregulation of hepatic CCL20 expression”, *Clin Immunol*, vol. 146, No. 1, pp.15-25, 2013
 5. 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. 岡崎 拓、自己免疫疾患のゲノム解析、第8回宮崎サイエンスキャンプ、宮崎、2012年2月17日
 2. Taku Okazaki、Regulation of autoimmunity by immuno-inhibitory receptors、New horizons in immune system、Tokushima、February 9th、2012
 3. 岡崎 拓、*aida* マウスを用いた自己免疫疾患発症制御機構の解析、第7回自己免疫疾患研究会、東京、2012年7月7日
 4. Taku Okazaki、Immuno-inhibitory receptors in the regulation of autoimmunity、2013 SKKU International Symposium on Molecular Medicine、Suwon、Korea、

- February 28th, 2013
5. 岡崎一美、杉浦大祐、高橋涼香、梶原雄、岡崎 拓、PD-1 欠損マウスを用いた自己免疫疾患のゲノム解析、第11回四国免疫フォーラム、高知県南国市 2012 年 6 月 9 日
 6. 岡崎 拓、免疫抑制受容体による免疫応答の制御、第4回 東京編・徳島大学研究者との集い、東京、2012 年 7 月 27 日
 7. Il-mi Okazaki and Taku Okazaki, Genetic reconstitution of autoimmunity in mice, The Second Immunology Symposium at the University of Tokushima, Tokushima, January 25th, 2013
 8. Taku Okazaki, Immuno-inhibitory receptors in the regulation of autoimmunity, The Second Immunology Symposium at the University of Tokushima, Tokushima, January 25th, 2013
 9. Il-mi Okazaki, Daisuke Sugiura, Suzuka Takahashi, Takeo Kajihara, Taku Okazaki, Identification of new therapeutic targets by genetic dissection and reconstitution of autoimmune diseases in mice, JST-CREST International Symposium, Tokyo, February 12-13th, 2013
 10. Taku Okazaki. Regulation of autoimmunity by immuno-inhibitory receptors., The 3rd Bizan immunology symposium, Tokushima, February 14th, 2014
 11. 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
 12. 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

(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
(総合)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

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。この治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、結核菌抗原を投与した PD-1 欠損マウス由来のマクロファージが、炎症性サイトカインである interleukin(IL)-6 を大量に産生し、これが T 細胞に作用して IL-17 を産生する自己反応性 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T細胞性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

(環境因子による自己免疫反応の検討)

PD-1 欠損マウスに、結核死菌単独、あるいは結核死菌と、マウス脳ミエリタンパク由来)自己ペプチド(MOG35-55)を投与し、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発症を 30 日間観察した。病勢を観察し、定法によって点数化し、評価した。また、投与後、8 日後、30 日後のマウスよりT細胞を調整し、このT細胞を同系マウスの脾臓細胞、および MOG35-55 で再刺激した。培養上清を採集し、BD 社の cytometric bead array 法を用いて、抗原特異的なサイトカイン産生を測定した。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複製、ここに結核死菌と MOG35-55 を投与して、実験的 EAE を誘導した。

(炎症性 T 細胞産生能の評価とメカニズム解析)

PD-1 欠損マウスおよび野生型マウスに結核死菌を投与して、7~8 日後に脾臓細胞を調整し、これを抗原提示細胞として用い、OTH 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 V α 2 抗体で表面染色を施した。この細胞を、4%パラホルムアルデヒド固定後、0.1%サボンを含む 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。いくつかの実験では、結核菌を投与しないマウスから、脾臓細胞を調整し、マクロファージの表面抗原である CD11b を認識する磁気ビーズで標識、ミルテニ社の AUTO MACS で分離した。分離したマクロファージには、試験管内で結核菌を投与し、前述の T 細胞との共培養に用いた。また、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、Th17 分化に与える影響を評価した。

(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いるため、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

PD-1 欠損マウスに結核死菌(250 \square g/マウス)を投与すると、同時に投与した自己抗原である、MOG35-55 に対して、強い反応が惹起

され、野生型マウスに起こる EAE と比較して早期発症、重症化が見られることがわかった。野生型マウスでは、低用量の結核死菌(50 \square g/マウス)では EAE が起らなかったが、PD-1 欠損マウスでは半数以上が発症した。試験管内の再刺激実験において、PD-1 欠損マウスでは MOG35-55 に対する IL-17 の産生が更新しており、PD-1 欠損マウスでは結核菌に対する 17 型ヘルパー T 細胞(Th-17)型の免疫反応が更新していることが示唆された。

次に、PD-1 欠損マウスを結核死菌単独で免疫したマウスより 8 日後に脾臓細胞を分離し、これを抗原提示細胞として、抗原特異的ナイーブ T 細胞を分化させる実験を行った。結果、結核死菌を経験した 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、有意に多くの Th-17 を分化させる事が明らかとなった。試験管内で、PD-1 欠損マウス由来のマクロファージを結核死菌により刺激すると、野生型マクロファージに比べ、高濃度の IL-6 を放出することがわかった。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 Th-17 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と比較して、Th-17 型反応の亢進を伴う、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、トル様受容体を刺激して、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

竹馬 俊介 本庶 佑 PD-1の機能が
がん分子標的治療 2014 12(1) 51-56

Okazaki T, **Chikuma S**, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol.* 2013 Dec;14(12):1212-8

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.

竹馬 俊介 TRIM28による自己炎症性 T細胞の制御 **医学のあゆみ** 2013 245(8):665-6 2013

Hara-Chikuma M, **Chikuma S**, Sugiyama Y, Kabashima K, Verkman AS, Inoue S, Miyachi Y. Chemokine-dependent T cell migration requires aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide uptake. *J Exp Med.* 2012 Sep 24;209(10):1743-52

Chikuma S, Suita N, Okazaki IM, Shibayama S, Honjo T. TRIM28 prevents autoinflammatory T cell development *in vivo*. *Nat. Immunol.* 13 : 596-603, 2012.

Qin H, Suzuki K, Nakata M, **Chikuma S** et

al. “Activation-induced cytidine deaminase expression in CD4+ T cells is associated with a unique IL-10-producing subset and increase with age.” PLoS One vol.6, online publication (e29141), 2011.

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

竹馬 俊介「抗PD-1抗体によるがん治療法」日台癌のトランスレーショナル研究シンポジウム. 神戸 2012年11月21日.

竹馬 俊介「核内因子 TRIM28 による自己炎症性 T 細胞の制御」北海道大学獣医学部 学術交流資金群講演会「自己免疫疾患研究の最先端」札幌 2012年11月1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

・ 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

<平成 23 年度>

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamamura S, Matsumura N, Mandai M, Huang Z, Oura T, Baba T, Hamanishi J, Yamaguchi K, Kang HS, Okamoto T, Abiko K, Mori S, Murphy SK, Konishi I.	The activated transforming growth factor-beta signaling pathway in peritoneal metastases is a potential therapeutic target in ovarian cancer.	Int J Cancer.	130	20-28	2012
Mandai M, Matsumura N, Baba T, Yamaguchi K, Hamanishi J, Konishi I.	Ovarian clear cell carcinoma as a stress-responsive cancer: influence of the microenvironment on the carcinogenesis and cancer.	Cancer Lett.	210	129-133	2011
Hamanishi J, Mandai M, Abiko K, Matsumura N, Baba T, Yoshioka Y, Kosaka K, Konishi I.	The comprehensive assessment of local immune status of ovarian cancer by the clustering of multiple immune factors.	Clin Immunol.	141	338-347	2011
万代昌紀、濱西潤三、安彦郁、松村謙臣、馬場長、小阪謙三、吉岡弓子、小西郁生	卵巣癌の播種・進展と免疫環境との関連分子を標的とした免疫法の開発	産婦人科の実際	61巻2号	201-205	2012
万代昌紀、馬場長、松村謙臣、小西郁生	「【婦人科がんの Molecular Biology】 cancer stem cell」	産科と婦人科	78巻1号	95-100	2011
万代昌紀	婦人科がん免疫療法の現状	化療ニュース	19	1-3	2011

< 平成24年度 >

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Abiko K, Mandai M, Hamanishi J, Yoshioka Y, Matsumura N, Baba T, Yamaguchi K, Murakami R, Yamamoto A, Kharma B, Kosaka K, Konishi I.	PD-L1 on tumor cells is induced in ascites and promotes peritoneal dissemination of ovarian cancer through CTL dysfunction.	Clin Cancer Res.	19(6)	1363-1374	2013
Huang RY, Chen GB, Matsumura N, Lai HC, Mori S, Li J, Wong MK, Konishi I, Thiery JP, Goh L.	Histotype-specific copy-number alterations in ovarian cancer.	BMC Med Genomics.			2012
Matsumoto K, Katsumata N, Saito I, Shibata T, Konishi I, Fukuda H, Kamura T.	Phase II study of oral etoposide and intravenous irinotecan for patients with platinum-resistant and taxane-pretreated ovarian cancer: Japan Clinical Oncology Group Study 0503.	JPN J Clin Oncol	42(3)	222-225	2012
Horiuchi A, Hayashi T, Kikuchi N, Hayashi A, Fuseya C, Shiozawa T, Konishi I.	Hypoxia upregulates ovarian cancer invasiveness via the binding of HIF-1 α to a hypoxia-induced, methylation-free hypoxia response element of S100A4 gene.	Int J Cancer.	131(8)	1755-67	2012
Yoshioka Y, Ono M, Osaki M, Konishi I, Sakaguchi S.	Differential effects of inhibition of bone morphogenic protein (BMP) signalling on T-cell activation and differentiation.	Eur J Immunol	42(3)	749-59	2012

< 平成25年度 >

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	15(1)	22-25	2014
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
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
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.	5(7)	983-98	2013
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	133(9)	2234-44.	2013
濱西 潤三	卵巢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	産科と婦人科	80(4)	510-512	2013
濱西 潤三	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	産科と婦人科	Vol.81	No.2	2014

・ 研究成果の刊行物・別刷