

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15551

研究課題名(和文) 悪性黒色腫の新規免疫的解析に基づくがん免疫療法継続基準の開発

研究課題名(英文) Immunological assay for development of a novel treatment guideline in malignant melanoma

研究代表者

西川 博嘉(Nishikawa, Hiroyoshi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10444431

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、免疫チェックポイント阻害剤治療に対するレスポンドーおよびノンレスポンドー患者検体を用いた免疫応答の比較検討により、臨床効果と関わる免疫応答を検討した。末梢血を用いた網羅的な免疫関連分子発現解析により、CD4陽性CD27陽性Fas陰性セントラルメモリーT細胞の治療後の増加が治療効果と相関することが明らかになった。また腫瘍局所の解析では、レスポンドーではエフェクターのCD8陽性T細胞、ノンレスポンドーではCD4陽性制御性T細胞が優位となっていることが示され、今後は多数症例や前向きでの検討を実施し、薬剤投与の判断基準に展開する。

研究成果の概要(英文)：In this study, immunological responses associated with clinical responses by immune checkpoint inhibitors, particularly anti-PD-1 monoclonal antibodies (mAb) were investigated. Comprehensive analyses by CyTOF with peripheral blood samples revealed that the increase of CD27+ Fas-CD4+ central memory T cells after anti-PD-1 mAb treatment was associated with favorable clinical courses. Additionally, the balance of immune responses in tumors corresponded to clinical responses; high effector CD8+ T cells in responders and high immune suppressive CD4+ regulatory T cells in non-responders, respectively. Prospective studies with larger cohorts should be the next step for developing a new treatment guideline.

研究分野：腫瘍学、免疫学

キーワード：がん免疫療法 CD4+ T細胞 制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体といった免疫チェックポイント阻害剤は、臨床試験で劇的な治療効果を示し、悪性黒色腫治療において重要な位置を占めつつある。これらのがん免疫療法はいくつかの点で従来の殺細胞性抗がん剤治療と異なることが明らかになってきている。進行期の患者でも臨床効果がええられることや Tail plateau と呼ばれる長期に渡る臨床効果が期待される反面、投与された患者の一部(20-30%程度)でしか治療効果が見られないことが問題となっている。併用療法による治療効果の向上も試みられているが、依然として半数を超える患者で、十分な治療効果が得られていない。よってバイオマーカーによる患者の層別化の必要性が示唆されているが、現在まで適切なバイオマーカーの同定には至っていない。これは悪性黒色腫の腫瘍局所の免疫応答の解析技術が未熟で、これまで免疫チェックポイント阻害剤治療の臨床効果に関わる悪性黒色腫特異的 CD8+T 細胞応答の解析が十分になされてこなかったことが原因である。

免疫チェックポイント阻害剤治療は宿主の抗腫瘍免疫応答誘導に治療効果が依存しているため、腫瘍局所に CD8+T 細胞が浸潤していることが治療効果のバイオマーカーとなることが明らかになっている。さらに発がん過程の遺伝子変異の蓄積により生じたアミノ酸変異部位が新たな抗原(neo 抗原)、つまり外来抗原として CD8+T 細胞に認識されることが重要であることも報告されてきている。

研究代表者らは、悪性黒色腫局所検体の処理技術を確立し、局所に浸潤している制御性 T 細胞(Treg)ががん抗原特異的免疫応答を抑制し、腫瘍増殖の促進にかかわることを明らかにしてきた(Sugiyama D, Nishikawa H et al, *PNAS*, 2013)。また悪性黒色腫で認められる自己由来がん抗原 Melan A/MART-1 特異的 CD8+T 細胞が Treg により末梢性免疫寛容(免疫不応答)に陥っているが、外来抗原由来 CD8+T 細胞には、Treg による免疫寛容が誘導されないことを報告した(Maeda Y, Nishikawa H et al, *Science*, 2014)。

以上より、本研究では免疫チェックポイント阻害剤治療を受けた悪性黒色腫患者検体を用いて、免疫チェックポイント阻害剤治療の治療効果と関連する免疫応答について検討し、患者各々の状態に合わせた適切ながん免疫療法(個別化医療)につなげることが重要である。

2. 研究の目的

悪性黒色腫に対して臨床応用が進んでいる免疫チェックポイント分子阻害剤治療では、前述の様に治療効果が十分に見られない症例も存在するため、治療適応の判断が難しい。現在では、保険適応となるほぼ全ての患者が免疫チェックポイント分子阻害

剤治療を受けているが、中には免疫関連副作用のみがみられ、治療効果が認められない症例も存在する。

本研究では、悪性黒色腫患者の免疫チェックポイント阻害剤治療に対するレスポナーおよびノンレスポナー患者検体を用いた免疫応答の比較検討により、臨床効果と関わる免疫応答を解明し、薬剤投与の判断基準策定につながる基盤データとすることを目的とする。本研究成果は、がん免疫療法の問題点の一つを解決し、より多くのがん種に適応が拡大される免疫チェックポイント分子阻害剤治療の適切な患者層別化が進み、社会的ニーズに大いに貢献することが期待される。

3. 研究の方法

本研究では、悪性黒色腫患者の免疫チェックポイント阻害剤(特に抗 PD-1 抗体)治療に対するレスポナーおよびノンレスポナー患者検体を用いて、免疫応答を解析し、抗 PD-1 抗体治療後の治療効果に与える影響を検討する。また、これらのデータを薬剤投与の判断基準につなげるための基盤検討とする。

1) 抗 PD-1 抗体により治療を受けた悪性黒色腫患者サンプルを採取し(discovery cohort)、CD4、CD8、CTLA-4、CCR7、CD45RA、FoxP3 等に対する抗体で染色し、フローサイトメーターおよび CyTOF で解析し、臨床効果と関連する T 細胞応答を網羅的に解析する。

2) 同様の解析を Validation cohort でも実施し、同定したバイオマーカーの有用性を検証する。

3) 悪性黒色腫および研究を進める上で免疫チェックポイント阻害剤が臨床応用された非小細胞肺癌の腫瘍局所検体を採取し、がん細胞(悪性黒色腫細胞)と免疫系が直接対峙する環境での免疫応答を検討する。とりわけ、局所に浸潤している Treg ががん抗原特異的免疫応答を抑制し、腫瘍増殖の促進にかかわることを明らかにしてきたことから(Sugiyama D, Nishikawa H et al, *PNAS*, 2013)、Treg に焦点を当てて、抗 PD-1 抗体治療に対するレスポナーおよびノンレスポナー患者での相違を検討する。特に Tregs については、CD4+FOXP3+T 細胞を FOXP3 発現レベルと CD45RA の発現によってナイーブ Tregs、活性化 Tregs および Non-Tregs に分ける我々が独自に見出した新規の分類法(Nishikawa H et al, *Curr Opin Immunol*, 2014)により検討する。

4. 研究成果

悪性黒色腫患者の抗 PD-1 抗体治療に対するレスポナー (Pt 1, 2) およびノンレスポナー (Pt 3, 4) 患者、それぞれ 2 名 (discovery cohort) の治療前後の末梢血検体を採取し、バイオマーカー探索を実施した。

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Age (years)/sex	68/male	86/male	59/male	45/male
Preceding treatment	Radiation therapy	None	None	Vemurafenib
Sites of metastases	LN, skin, lung, liver, spleen, adrenal glands	LN, bone	Lung	LN, lung, liver, bone
BRAF mutation status	No mutation	No mutation	No mutation	V600E mutation
Baseline LDH level (U/l)*	222	182	175	190
Best response to nivolumab	PR	SD	SD	PD

LDH, lactate dehydrogenase; LN, lymph nodes.
*Serum LDH level before treatment with anti-PD-1 mAb.

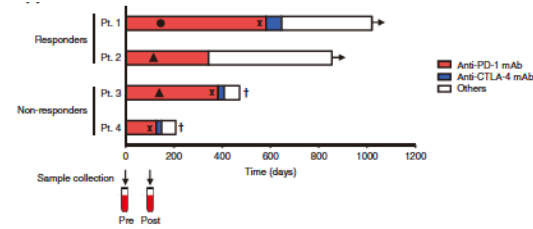


図 1 悪性黒色腫患者の臨床データと治療経過。

これらの 4 名の患者検体を 35 分子に対する抗体で染色し、抗 PD-1 抗体治療前後での免疫関連細胞 (CD45 陽性細胞) の動態を解析した。35 分子発現からクラスタリングを実施した。次に、レスポナー (Pt 1, 2) ではノンレスポナー (Pt 3, 4) 患者での比較解析を行ったところ、CD4+T 細胞の一部が治療後に増加していることが示された。一方で CD8+T 細胞には、変化が認められなかった。

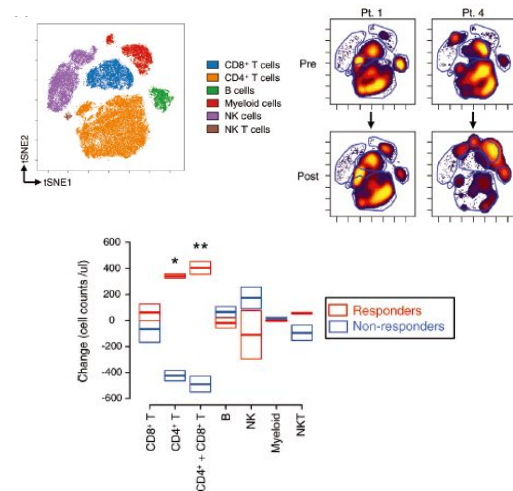


図 2 免疫関連細胞の変化の解析。免疫関連分子発現に基づき、末梢血を tSNE 解析によりクラスタリングし、治療前後で比較した (上段)。治療前後での各種免疫細胞の変化 (下段)。

CD4+T 細胞の重要性が示されたことから、より詳細な分画を同定するために、T 細胞の分化、活性化状態の解析を SPADE 解析で実施した。これにより CD4+T 細胞

をより細かな分画に分けることで、抗 PD-1 抗体治療前後の変化を検討した。35 分子の解析でも従来の naive (CD45RA+CCR7+)、central memory (CD45RA-CCR7+)、effector memory (CD45RA-CCR7-)、terminally differentiated (CD45RA+CCR7-) T cells の分画が得られるとともに、それぞれに対して詳細な分画が存在することが明らかになった。抗 PD-1 抗体治療では、3 つの node17、32、61 で変化が見られることが明らかになった。

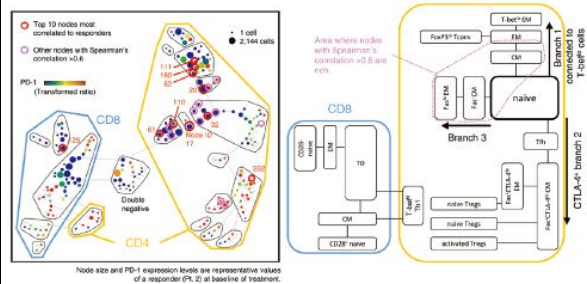


図 3 SPADE 解析による T 細胞分画解析。35 分子発現による T 細胞のクラスタリング解析を行い、抗 PD-1 抗体治療前後で変化の大きい node (node17、32、61) を同定した。

Node17、32、61 の分子発現をより詳細に解析するためにそれぞれの node の分子発現を解析した。Node17、32、61 は central memory CD4+T 細胞で、CD27+Fas-分画であることが明らかになった。

抗 PD-1 抗体治療前後でレスポナーでは central memory CD27+Fas-CD4+T 細胞が増加し、ノンレスポナーでは低下していることが明らかになった。

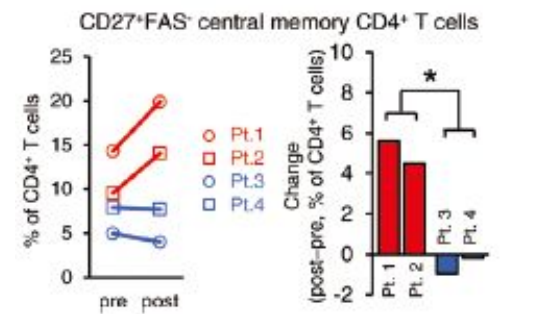
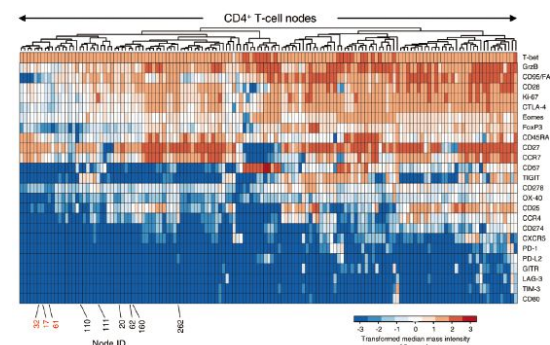


図 4 Node17、32、61 の分子発現と抗 PD-1

抗体治療前後での変化。それぞれの node の分子発現お heatmap。Node17、32、61 は central memory CD4+T 細胞で、CD27+Fas-分画であった(上段)。Central memory CD27+Fas-CD4+T 細胞の抗 PD-1 抗体治療前後の変化(下段)。

Discovery cohort で得られたデータを確認するため、別の cohort (validation cohort) で同様の検討を実施した。Validation cohort では、特に central memory CD27+Fas-CD4+ T 細胞の変化に着目して検討した。Discovery cohort 同様に validation cohort でも central memory CD27+Fas-CD4+ T 細胞の治療後の増加は臨床効果と相関していることが示された。

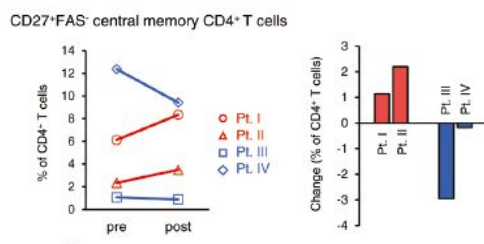


図5 Central memory CD27+Fas-CD4+T 細胞の抗 PD-1 抗体治療前後の変化。Validation cohort 4 名(レスポナー2 名、ノンレスポナー2 名)でも discovery cohort と同様の動態が認められた。

さらに腫瘍局所での免疫応答の抗 PD-1 抗体治療前後の変化を検討した。患者検体を治療効果に基づいて解析を実施したところ、臨床効果が認められた患者で、CD8+T 細胞優位であることが明らかになった。一方で臨床効果が認められなかった患者では Treg 優位であることが示された。

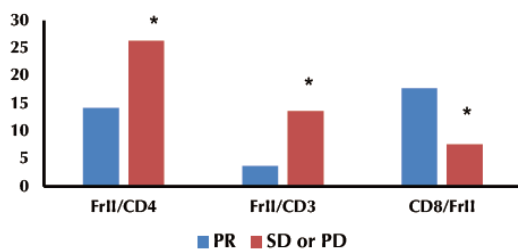


図6 腫瘍局所での Treg (Fr. II CD45RA-FoxP3highCD4+ T cells)と CD8+T 細胞比と抗 PD-1 抗体治療の臨床効果の関連。レスポナーでは CD8+T 細胞優位、ノンレスポナーでは Treg 優位であることが示された。PR: partial response、SD: Stable disease、PD: progressive disease.

本研究成果の中でバイオマーカー候補となることが示唆される因子(末梢血の Central memory CD27+Fas-CD4+T 細胞の変化、腫瘍局所の Treg の動態)同定され、当初の予定通り薬剤投与の判断基準につながるための基盤検討を実施できた。今後はより多数症例や前向き検討のため AMED 研究への展開を予定している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 15 件)

1. Takeuchi Y, Nishikawa H. (6 名中 6 番目). Clinical response to pd-1 blockade correlates with a sub-fraction of peripheral central memory cd4+ t cells in patients with malignant melanoma. *Int Immunol*, 2018;30(1):13-22. doi: 10.1093/intimm/dxx073. 査読有
2. Doki N, Nishikawa H, (25 名中 10 番目) et al. Clinical impact of pre-transplant gut microbial diversity on outcomes of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Ann Hematol*, 2017;96(9):1517-1523. doi: 10.1007/s00277-017-3069-8. 査読有
3. Enokida T, Nishikawa H. Regulatory t cells, as a target in anticancer immunotherapy. *Immunotherapy*, 2017;9(8):623-627. doi: 10.2217/imt-2017-0057. 査読有
4. Hamano Y, Nishikawa H, (29 名中 23 番目) et al. Classification of idiopathic interstitial pneumonias using anti-myxovirus resistance-protein 1 autoantibody. *Sci Rep*, 2017;7:43201. doi: 10.1038/srep43201. 査読有
5. Nagase H, Nishikawa H, (13 名中 8 番目) et al. Icos(+) foxp3(+) tils in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory t cells associated with helicobacter pylori. *Int J Cancer*, 2017;140(3):686-695. doi: 10.1002/ijc.30475. 査読有
6. Nishiwaki S, Nishikawa H, (19 名中 18 番目) et al. Efficacy and safety of autologous peripheral blood stem cell transplantation for philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: A study protocol for a multicenter exploratory prospective study (auto-ph17 study). *Medicine (Baltimore)*, 2017;96(52):e9568. doi: 10.1097/MD.00000000000009568. 査読有
7. Takeoka T, Nishikawa H, (21 名中 14 番目) et al. Ny-eso-1 protein cancer vaccine

- with poly-iclc and ok-432: Rapid and strong induction of ny-eso-1-specific immune responses by poly-iclc. **J Immunother**, 2017. doi: 10.1097/CJI.000000000000162. 査読有
8. Togashi Y, Nishikawa H. Regulatory t cells: Molecular and cellular basis for immunoregulation. **Curr Top Microbiol Immunol** 2017. doi: 10.1007/82_2017_58. 査読有
 9. Togashi Y, Nishikawa H. Suppression from beyond the grave. **Nat Immunol**, 2017;18(12):1285-1286. doi: 10.1038/ni.3870. 査読有
 10. Haseda F, Nishikawa H, (11 名中 3 番目) et al. Antibody to cmrf35-like molecule 2, cd300e a novel biomarker detected in patients with fulminant type 1 diabetes. **PLoS One**, 2016;11(8):e0160576. doi: 10.1371/journal.pone.0160576. 査読有
 11. Hayakawa Y, Nishikawa H, (19 名中 3 番目) et al. Report on the use of non-clinical studies in the regulatory evaluation of oncology drugs. **Cancer Sci**, 2016;107(2):189-202. doi: 10.1111/cas.12857. 査読有
 12. Kakihana K, Nishikawa H, (19 名中 10 番目) et al. Fecal microbiota transplantation for patients with steroid-resistant/dependent acute graft-versus-host disease of the gut. **Blood**, 2016. doi: 10.1182/blood-2016-05-717652. 査読有
 13. Okubo K, Nishikawa H, (18 名中 15 番目) et al. Identification of novel and noninvasive biomarkers of acute cellular rejection after liver transplantation by protein microarray. **Transplant Direct**, 2016;2(12):e118. doi: 10.1097/TXD.0000000000000630. 査読有
 14. Saito T, Nishikawa H, (22 名中 2 番目) et al. Two foxp3(+)/cd4(+) t cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. **Nat Med**, 2016;22(6):679-684. doi: 10.1038/nm.4086. 査読有
 15. Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory t cells in cancer immunity. **Int Immunol**, 2016;28(8):401-409. doi: 10.1007/82_2017_58. 査読有
- 〔学会発表〕(計 29 件)
1. 西川博嘉, Cancer Immunology and Future Direction of Immune(Checkpoint) Therapy, JSMO/ASCO Young Oncologist Workshop 2018 (招待講演)(国際学会) 2018/2/9, 東北大学東京分室
 2. 西川博嘉, Immuno-genome analyses to decipher anti-tumor immune responses, The 22nd Japanese Foundation for Cancer Research International Symposium on Cancer Chemotherapy (招待講演)(国際学会) 2017/12/14, 未来館
 3. 西川博嘉, がん微小環境における免疫抑制機構, 第 58 回日本肺癌学会学術集会 (招待講演) 2017/10/14, パシフィコ横浜
 4. 西川博嘉, Immune suppressive mechanisms as a target of effective cancer immunotherapy. 第 76 回日本癌学会学術集会 (招待講演) 2017/9/30, パシフィコ横浜
 5. 西川博嘉, Immune suppression in tumor microenvironment. 第 76 回日本癌学会学術集会 (招待講演) 2017/9/29, パシフィコ横浜
 6. 西川博嘉, How do we target the immunosuppressive cancer microenvironment? 第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会 (招待講演) 2017/7/29, 神戸コンベンションセンター
 7. 西川博嘉, The role of FoxP3+ T cells in colorectal cancer, 第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会 (招待講演) 2017/7/28, 神戸コンベンションセンター
 8. 西川博嘉, がん免疫における制御性 T 細胞の役割, 第 38 回日本炎症・再生医学会 (招待講演)(国際学会) 2017/7/19, 大阪国際会議場
 9. 西川博嘉, 肺癌に対する免疫応答解析と免疫療法への展開, 第 225 回日本呼吸器学会関東地方会 (招待講演) 2017/7/8, 秋葉原コンベンションホール
 10. 西川博嘉, がん微小環境に着目した新たながん免疫療法, 第 53 回日本肝臓学会 (招待講演) 2017/7/7, 京王プラザホテル
 11. 西川博嘉, 免疫チェックポイント阻害剤の基礎. 第 33 回日本皮膚悪性腫瘍学会 (招待講演) 2017/6/30, 秋田キャッスルホテル
 12. 西川博嘉, Immune suppressive microenvironment in cancer tissues, 第 21 回日本がん免疫学会 (招待講演) 2017/6/28, 幕張メッセ
 13. 西川博嘉, Complexity of immune suppressive microenvironment in cancers. The 36th Sapporo International Cancer Symposium (招待講演)(国際学会) 2017/6/24, 公益財団法人札幌がんセミナー
 14. 西川博嘉, がん局所の免疫抑制機構での制御性 T 細胞の役割, 第 21 回日本がん分子標的治療学会 (招待講演) 2017/6/15 九州大学医学部百年講堂
 15. 西川博嘉, Targeting

- immuo-suppressive cancer microenvironment for successful cancer immunotherapy, 第 6 回アジア太平洋肝胆膵学会 (招待講演)(国際学会) 2017/6/9, パシフィコ横浜
16. 西川博嘉, 腫瘍免疫の基礎 (新たな薬剤の開発に向けて), 第 116 回日本皮膚科学会総会 (招待講演) 2017/6/2, 仙台国際センター
17. 西川博嘉, がん免疫療法の効果促進に向けた試み, 日本癌学会市民公開講座 (招待講演) 2017/5/14, 北海道大学学術交流会
18. 西川博嘉, がん免疫分野とがん免疫療法の近年の進歩, 第 29 回日本内分分泌外科学会 (招待講演) 2017/5/1, 神戸国際会議場
19. 西川博嘉, がん免疫に関与するがん微小環境, 第 57 回日本呼吸器学会学術講演会 (招待講演) 2017/4/23 東京国際フォーラム
20. 西川博嘉, がん微小環境における免疫抑制機構, 第 54 回日本臨床分子医学会学術集会 (招待講演) 2017/4/14 東京国際フォーラム
21. Hiroyoshi Nishikawa, Targeting FoxP3+ T cells in Cancers: Friends or Foes? New York Academy of Science; Frontiers in Cancer Immunotherapy (招待講演)(国際学会) 2017/2/28 The New York Academy of Sciences, New York, USA
22. Maeda Y, Nishikawa H, Mano H. Perspective of T cell responses as predictive markers in cancer immunotherapy, 第 75 回日本癌学会, 2016/10/6-8 パシフィコ横浜
23. 西川博嘉, がん患者における免疫病態の最新知見とがん治療への応用, 第 44 回日本臨床免疫学会 (招待講演) 2016/9/8 京王プラザホテル
24. 西川博嘉, がん免疫療法でのバイオマーカーとしての免疫抑制細胞, 第 20 回日本がん免疫学会 (招待講演) 2016/7/29 大阪国際交流センター
25. 西川博嘉, Regulatory T cells as a target of cancer immunotherapy, 第 14 回日本臨床腫瘍学会 (招待講演) 2016/7/28 神戸国際展示場
26. 西川博嘉, Critical Role of Regulatory T cells in Cancer Immunotherapy for Hematologic Malignancies, The 5th JCA-AACR Special Joint Conference (招待講演)(国際学会) 2016/7/15 東京ベイ舞浜ホテル
27. 西川博嘉, がん免疫療法で誘導される免疫応答と免疫抑制の関連, 第 20 回日本がん分子標的治療学会 (招待講演) 2016/5/31 別府国際コンベンションセンター

28. 西川博嘉, Cell-depleting anti-CCR4 mAb therapy. The 7th JSH International Symposium (招待講演) (国際学会) 2016/5/13 淡路夢舞台国際会議場
29. 西川博嘉, Cancer Immunotherapy, 5th Japan Taiwan Oncology Phase I Trial Conference (招待講演)(国際学会) 2016/4/30 Evergreen International Convention Center, Taipei, Taiwan.

〔図書〕(計 1 件)

1. 監修; 上田龍三、編集; 西川博嘉 がん免疫療法ハンドブック, メディカルレビュー, 2016/7/15, 総ページ数 224.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/laboratory/basic-med/micro-immunology/immunology/

https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/cancer_immunology/index.html

<https://www.ncc.go.jp/jp/epoc/division/immunology/kashiwa/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 博嘉 (NISHIKAWA Hiroyoshi)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 10444431

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

山崎 直也 (YAMAZAKI Naoya)
国立がん研究センター中央病院
中央病院・皮膚腫瘍科・科長
研究者番号: 70501873

(4) 研究協力者

該当なし