

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15738

研究課題名(和文)ステロイドが与える免疫チェックポイント阻害剤による抗腫瘍免疫応答への影響

研究課題名(英文)Effects of steroids on anti-tumor immune response induced by immune checkpoint inhibitors

研究代表者

前田 優香 (Maeda, Yuka)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：20757223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫チェックポイント阻害剤によるがん治療成果は著しいが、免疫の恒常性のバランスを崩すことから重篤な副作用も問題視されている。特に自己免疫疾患関連副作用(irAE)が発症し、稀に劇症化する。irAEに対して免疫抑制剤であるステロイド投与が基本であるが、ステロイドの抗腫瘍免疫応答への影響はこれまで詳細な検討がなされていなかった。本研究で研究代表者らは、免疫チェックポイント阻害剤により惹起された免疫応答によるirAEに対してステロイド投与をした際、Shared抗原優位な状況ではそれらの抗原に対するメモリーT細胞の合成が脂肪酸代謝経路を介して阻害されているという新たな知見を報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Neo抗原が多い患者は免疫チェックポイント阻害剤が効きやすいという報告は多い。しかし本研究から、これまでの単純な“奏功と副作用のコントロール”の理解から一歩踏み込んだ見解を得た。免疫療法が奏功しメモリーT細胞が機能している患者に対しては、irAEが生じてもステロイド剤によるNeo抗原特異的メモリーT細胞合成阻害が生じないため、抗腫瘍免疫応答は影響を受けず、自己に対する過剰な免疫応答であるirAEのみを抑えることができると考えられる。医師らが、ステロイド投与によって生じる生理現象を深く理解することは、がん免疫療法が安全かつ適切に取り扱われる事であり、結果として質の高い医療の提供に繋がる。

研究成果の概要(英文)：The results of cancer treatment with immune checkpoint inhibitors are remarkable in limited patients. However, immune checkpoint inhibitors are also associated with serious side effects, especially immune related adverse events (irAEs), which are often deleterious. Although steroids, which are immunosuppressive agents, are the basic treatment for irAEs, the effect of steroids on the anti-tumor immune response has not been investigated in detail. In the present study, we demonstrated for the first time that steroid treatment of irAEs induced by immune checkpoint inhibitors prevents the synthesis of memory T cells against these antigens in the presence of shared antigens. Furthermore, steroids inhibit the synthesis of memory T cells with low-affinity TCR through the fatty acid metabolism pathway.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：免疫チェックポイント阻害剤 irAE ステロイド

1. 研究開始当初の背景

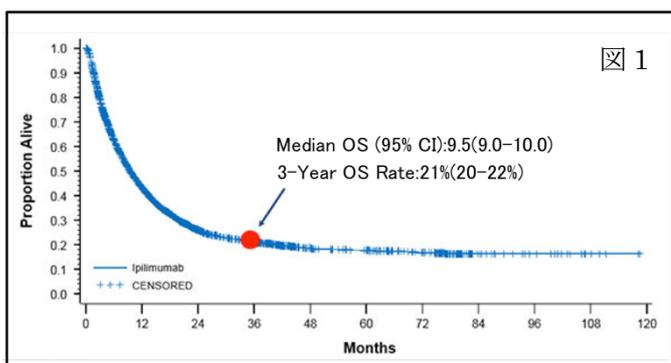


図 1

データに基づきヒトでも臨床試験が展開され、2010年に第3相臨床試験で抗CTLA-4抗体が転移性悪性黒色腫患者で抗腫瘍効果を示し、予後を改善することが報告された。これらのデータに基づき、2011年米国FDA(Food and Drug Administration)は、完全ヒト化抗体製剤である抗CTLA-4抗体(一般名:イピリムマブ)を切除不能・転移性悪性黒色腫に対する治療薬として承認をした。米国に遅れること3年、本邦でも切除不能・転移性悪性黒色腫の治療薬として承認された。

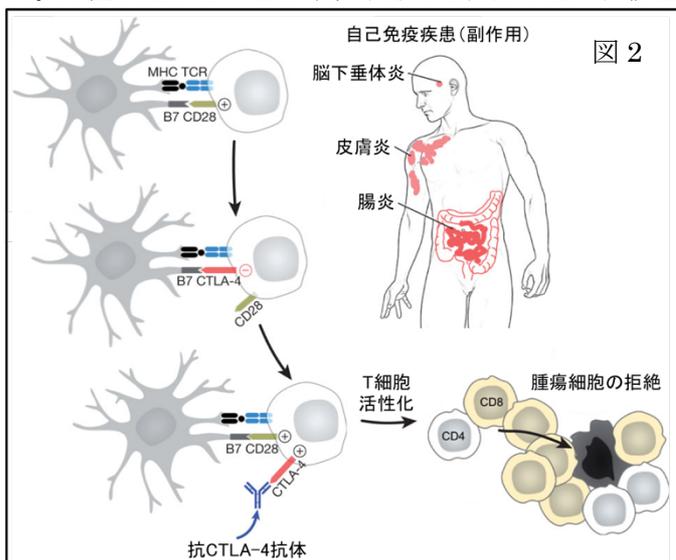


図 2

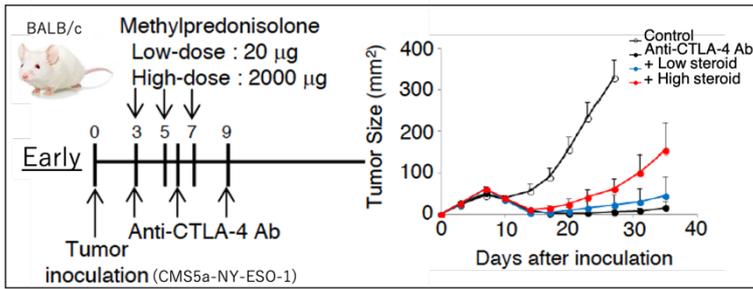
Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4 : CD152)は免疫抑制分子として1987年にフランスのグループによって同定された(Burnet JF et al.Nature 328:267-270, 1987)。その後マウスモデルで抗CTLA-4抗体を用いて免疫抑制シグナルをブロックすることにより、エフェクターT細胞活性が上昇し、抗腫瘍免疫応答の増強(腫瘍拒絶)につながる事が明らかになった(Leach DR et al.Science 271:1734-1736, 1996)。マウスモデルの抗CTLA-4抗体登場以前の切除不能・転移性悪性黒色腫の生存中央値は7~8ヶ月程度であった。しかし、2014年に公表された長期にわたる(10年)生存追跡データによると、20%で投与を終了してもなお10年以上にわたり生存を維持しているケースが存在することが明らかになった(図1:Hidi Sらによる報告,2014)。飛躍的な効果を得た抗CTLA-4抗体による治療であるが、投与後の重篤な自己免疫疾患関連副作用(irAE)が問題となっている(図2:Mellman I at al.Nature, 2011より改変)。CTLA-4は活性化したT細胞の表面に発現することが知られているが、そのほかにも免疫抑制・自己免疫寛容に重要な制御性T細胞(Regulatory T cell:Treg)上にも発現している。

Tregは生体の恒常性を維持するために過剰なT細胞活性を制御している。Tregの転写因子であるFOX3遺伝子の突然変異により先天的に生体内に機能性Tregが存在しないIPEX症候群(immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome)では、罹病した男児の大多数は生後1~2年で重篤な自己免疫疾患・代謝異常で死亡する。特に現在臨床で使用されている抗CTLA-4抗体のアイソタイプがIgG1であり、抗体依存性細胞障害活性(Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity:ADCC)活性が高くCTLA-4のシグナルブロックと共にCTLA-4発現細胞自体の除去能も有している。そのため、CTLA-4を発現するTregが除去され自己免疫疾患が生じる。自己免疫疾患が生じた場合、免疫抑制を目的としたステロイド投与がなされる。免疫チェックポイント阻害剤により賦活化した免疫(自己免疫-がんは自己抗原をもち生体としては自己として認識されているために通常は免疫からの攻撃を避けている)を抑制するためにステロイドが投与されるという矛盾した治療が行われている。さらに、ステロイドが抗腫瘍免疫に与える影響はこれまで詳細に検討されていない。

2. 研究の目的

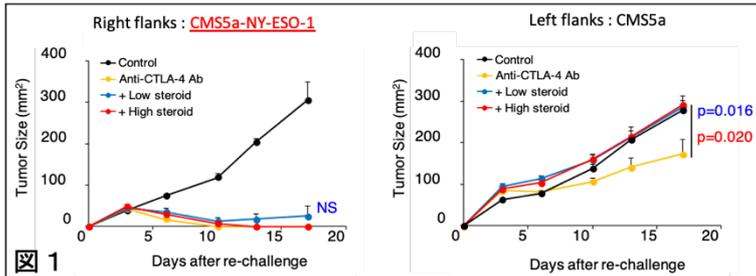
免疫を賦活化し自身の免疫細胞によりがんを駆逐しようという試みが多く報告されている。とりわけ、免疫チェックポイント阻害剤による治療効果は著しい。抗CTLA-4抗体による悪性黒色腫に対する治療では、これまで生存平均期間が7ヶ月程度の症例が奏功例では10年以上生存期間を維持している症例も報告されている。しかし、免疫チェックポイント阻害剤は免疫の恒常性のバランスを崩すことから重篤な副作用も問題視されている。特に自己免疫疾患関連副作用(irAE)が発症し、稀に劇症化する。irAEに対して免疫抑制剤であるステロイド投与が基本であるが、ステロイドの抗腫瘍免疫応答への影響はこれまで詳細な検討がなされていない。本研究では、ステロイドが免疫チェックポイント阻害剤による抗腫瘍効果に与える影響の検討を行う。

### 3. 研究の方法

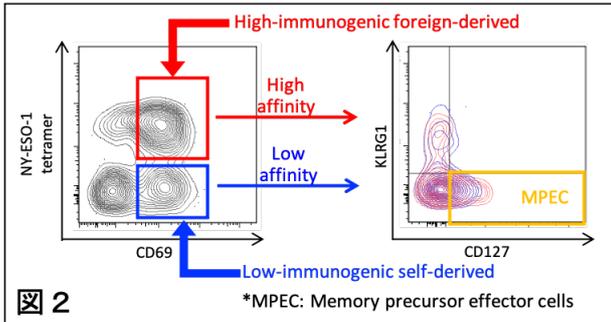


の通りである。また、メモリーT細胞の検討時は、腫瘍拒絶をしたマウスのみを抽出しマウス線維肉腫細胞株 parental tumor (CMS5a)・CMS5a-NY-ESO-1 を左右背部へ担がんを行った。また、臨床データは Memorial Sloan Kettering Cancer Center (Dr. Jedd D Wolchok)より提供頂き、マウス実験で得られた知見と患者データとの比較を行った。

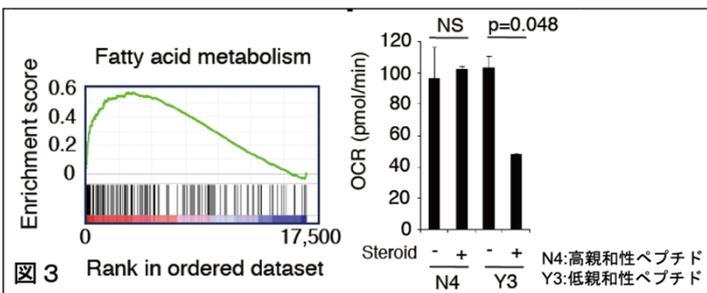
### 4. 研究成果



ラグが生じる場合があるため、抗腫瘍性のメモリーT細胞の合成について検討した。腫瘍拒絶をしたマウスの背部に再度 CMS5a-NY-ESO-1 と反対側の背部に parental tumor である CMS5a を担がんした。初回担がん時と同じ細胞株に対してはメモリーT細胞が有効に機能し腫瘍は拒絶されたが、parental tumor に対しては全くメモリーT細胞が機能せず腫瘍は増悪した。マウスにとって NY-ESO-1 は外来抗原であり、免疫原性の高い Neo 抗原が発現しているとみなされる。一方で、parental tumor では shared 抗原のみが発現している (一般的に腫瘍に発現している腫瘍抗原は自己抗原 (shared 抗原) である)。以上の検討より、ステロイド投与によって shared 抗原に対するメモリーT細胞の機能が低下することが示唆された (図1)。



ていなかった。また、ステロイドのレセプターである GR は TCR シグナルによってリン酸化されるため、Shared 抗原では GR がリン酸化されないために核内へ移行する。核内への移行後どの遺伝子の転写を抑制しているのかを、網羅的遺伝子発現解析を用いて検討した。GSEA によりステロイド剤の有無と相関関係にある遺伝子群を抽出したところ、Shared 抗原特異的 T細胞において脂肪酸代謝関連遺伝子群の発現が低下していた。さらに、代謝環境を測定する細胞外フラックスアナライザーを用いてエネルギー代謝を酸化的リン酸化で評価したところ、酸素消費速度 (OCR) がステロイド投与により有意に低下することを見出した (図3)。



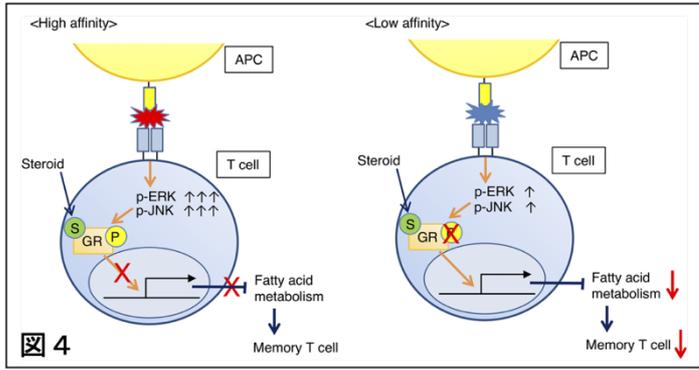
しかし、その後活性化したT細胞がメモリーT細胞になると脂肪酸が利用されることが知られている。本

すでに研究代表者らは、抗 CTLA-4 抗体投与により腫瘍が退縮するマウスモデルを樹立している。抗 CTLA-4 抗体の投与群と w/o ステロイド投与群での腫瘍増殖を観察し腫瘍退縮前・退縮中・再増悪時に腫瘍内にどのような T 細胞が浸潤しているのかを検討する。基本的なマウスモデルは左図

同系マウス由来の腫瘍 CMS5a にヒト癌抗原である NY-ESO-1 を強制発現させた CMS5a-NY-ESO-1 をマウスに担がんし、day3 より抗 CTLA-4 抗体とステロイドを投与したところステロイド高容量投与群での腫瘍増悪が観察された。腫瘍の増悪時期にタイム

成にどのような影響を与えているのか、メモリー前駆細胞 (MPEC) について検討した。NY-ESO-1 特異的 T細胞と Shared 抗原特異的 T細胞中の MPEC の頻度をステロイド投与の有無で比較したところ、Shared 抗原特異的 T細胞で有意に低下していた (図2)。人為的に T細胞レセプター (TCR) 親和性がコントロールできるペプチドを用いて TCR 下流シグナルを検討したところ、低親和性の Shared 抗原特異的 T細胞では十分にシグナルが伝達され

細胞外フラックスアナライザーを用いてエネルギー代謝を酸化的リン酸化で評価したところ、酸素消費速度 (OCR) がステロイド投与により有意に低下することを見出した (図3)。ナイーブ T細胞が抗原に暴露された際、細胞増殖にはグルコースなどが利用される。しかし、その後活性化したT細胞がメモリーT細胞になると脂肪酸が利用されることが知られている。本



研究より、免疫チェックポイント阻害剤により惹起された免疫応答による irAE に対してステロイド投与をした際、Shared 抗原優位な状況ではそれらの抗原に対するメモリーT細胞の合成が阻害されていることが世界で初めて明らかされた。ヒトではどのように予後と関連しているのかどうか、共同研究先の Memorial Sloan Kettering Cancer Center での臨床データを用いて検討した。悪性黒色腫患者 86 名に対して抗 CTLA-4 抗体を投与

した患者において、Neo 抗原が多い High mutation burden 群では、Neo 抗原が少ない Low mutation burden 群に比べて、ステロイド剤の投与による生存率が有意に高いことが分かった。マウスを用いた検討と同様の傾向を示している。本研究により、ステロイドが脂肪酸代謝経路を介して低親和性 TCR を持つメモリーT細胞の合成を阻害しているという新たな知見を報告することができた (図 4)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akihiro Tokunaga, Daisuke Sugiyama, Yuka Maeda, Allison Betof Warner, Katherine S Panageas, Sachiko Ito, Yosuke Togashi, Chika Sakai, Jedd D Wolchok, Hiroyoshi Nishikawa	4. 巻 12
2. 論文標題 Selective Inhibition of Low-Affinity Memory CD8 + T Cells by Corticosteroids	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Exp Med.	6. 最初と最後の頁 2701-2713
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20190738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前田優香
2. 発表標題 免疫抑制-制御性T細胞とステロイド
3. 学会等名 第28回日本色素細胞学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田優香
2. 発表標題 がん免疫-基礎研究から臨床応用の可能性
3. 学会等名 第58回日本リンパ網内系学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田優香
2. 発表標題 Elucidation of the antigen-specific immunosuppression mechanism in the tumor microenvironment
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------