

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08744

研究課題名(和文) 抗PD-1抗体治療の効果を示す直接的バイオマーカーの検索

研究課題名(英文) Identification of biomarkers that accurately predict the effect of anti-PD-1 therapy

研究代表者

猪爪 隆史 (Inozume, Takashi)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：80334853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗PD-1抗体治療の効果の中心を担う重要な腫瘍特異的T細胞だけを活性化するために重要な分子を探索した。網羅的解析によって腫瘍特異的T細胞に選択的に発現され、その制御に直接関わる分子を複数同定した。その一つ、TIGITについてはがん細胞側に発現されるそのリガンド、CD155と結合して、抗PD-1抗体治療の効果を弱めていることを証明した。そのほかの候補分子についても解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、抗PD-1抗体の臨床判断に役立つような鋭敏なバイオマーカーはない。その理由として、腫瘍内の腫瘍特異的T細胞の性質や機能を直接に評価する研究がほとんど行われてこなかったことが挙げられる。今回の研究では、腫瘍内の腫瘍特異的T細胞を正確に同定してフォーカスし、網羅的に解析した。解析対象を重要なT細胞のみに絞ることで、従来では見つけることができなかった鋭敏なバイオマーカーや治療標的としての候補分子を発見した。

研究成果の概要(英文)：In this study we have explored molecules that play important roles in activation of tumor specific T cells. Eventually, we have identified several molecules selectively expressed on tumor specific T cells, and controlling activation of T cells. We have shown that one of such molecules, TIGIT attenuate the effect of anti-PD-1 therapy via interaction with CD155 on tumor cells.

研究分野：メラノーマ、癌免疫、免疫チェックポイント阻害剤

キーワード：メラノーマ PD-1 TIL 腫瘍特異的T細胞 バイオマーカー CD155 TIGIT

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗 PD-1 抗体投与を受けた進行期メラノーマ患者は、転移巣がすべて消失する群、縮小した腫瘍が残存したまま年単位で生存する群、一度は縮小するが再発や新生の転移病巣によって死亡する群、始めから全く効果を示さない群、に分かれる。抗 PD-1 抗体は患者体内、とくに治療前に腫瘍周囲に浸潤している T 細胞を活性化させる薬剤である。したがって、効果の有無、強さ、持続期間は、薬剤の投与量や期間よりも、患者自身のがんに対する T 細胞反応の強さによって決まるのが特徴である。しかし上記のと一部の患者については投与を中断、中止しても効果が持続することが示されているにもかかわらず、中止すべき事情が無い限り投与継続せざるを得ないのが現状である。一方、¹については再発腫瘍、新生腫瘍に強い治療抵抗性が誘導されている事が示唆されている。例えば、がん細胞が T 細胞に認識されるために必要ながん抗原の減少、必須の分子である MHC class I の消失である(Riaz et al., 2017, Cell 171, 939-949)。こうした現象が起きてしまうとやはり T 細胞免疫によるがん制御は不可能であるが、こうしたケースでも投与が継続されてしまう事があり、問題視されている。

抗 PD-1 抗体の長期奏効、あるいは治療抵抗性獲得のメカニズム解明、バイオマーカー探索については、動物モデルや *in vitro* 実験、患者血清や末梢血単核球を用いた研究が存在するが、決定的な知見はまだ得られていない。その最大の理由一つは、抗 PD-1 抗体投与を受けた患者の腫瘍組織そのものを、適切な方法によって直接解析した研究が少ないためと考えられる。そのため、進行期メラノーマ患者に対する抗 PD-1 抗体治療の過程で得られた切除腫瘍サンプルの解析が求められていたが、本邦では設備の面や実験技術の面で困難な事が多く、行われてこなかった。

2. 研究の目的

抗 PD-1 抗体治療中の患者における上記¹、それぞれの臨床状況において、腫瘍内のがん細胞、それを攻撃しているがん特異的 T 細胞、それぞれの状態および機能を網羅的に解析し、比較することで、長期効果が得られるケースと無効、ないしは一時的な効果しか得られないケースを見分ける直接的なバイオマーカーを探し、また治療抵抗性を起こす重要因子を同定する。

3. 研究の方法

抗 PD-1 抗体治療前、治療後のメラノーマ組織からの tumor digest 作成、がん細胞株樹立、および腫瘍特異的 T 細胞の同定と増幅

生検可能な複数の転移巣をもつ進行期メラノーマ患者より治療前転移組織を生検する。そして治療開始後に、顕著な縮小を示した転移組織を生検する。治療が効かず増大、あるいは縮小後に増大に転じた転移組織も生検する。生検した組織は、酵素によって単細胞レベルまで分解し、細胞株凍結保存液にて小分けにして凍結保存する。このサンプルはがん細胞、浸潤リンパ球など腫瘍環境内の細胞すべてをほぼ *in vivo* の状態で保存したものであり、適切に保存すればいつでもあらゆる網羅的解析、機能的解析が可能である。そして各サンプルからがん細胞株と浸潤 T 細胞株を樹立し、がん細胞株に反応する T 細胞クローンを単離、刺激抗体と feeder を使って増殖させ、5'RACE 法を用いて、その T 細胞の T 細胞受容体遺伝子型を同定する。

経過の各ポイントにおいて網羅的ながん細胞、がん特異的 T 細胞の機能、状態評価を行い、長期奏効例や治療抵抗性を示す直接的バイオマーカを探る

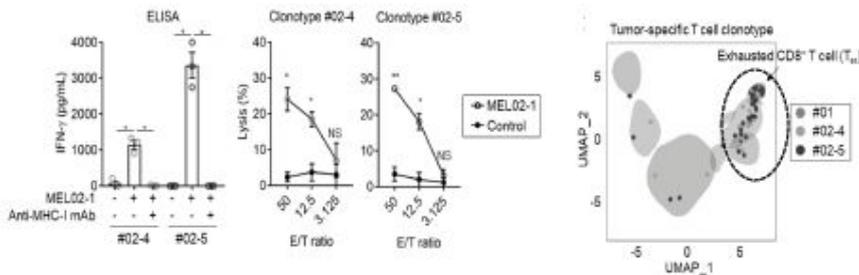
治療前と治療開始後での転移組織より得た腫瘍消化液の凍結ストックを用いて、がん細胞のエクソームシーケンスによるネオ抗原などの量的、質的变化を解明する。また浸潤 T 細胞の T 細胞受容体遺伝子型のレパトア解析、single cell RNA sequence によるがん特異的 T 細胞の量的、質的变化も解析する。この際に で同定したがん特異的 T 細胞の T 細胞受容体遺伝子型が、多様な浸潤 T 細胞の中で、注目すべき腫瘍特異的 T 細胞のマーカーとなる。さらに各ポイントで樹立した浸潤 T 細胞株とがん細胞株の共培養実験を行い、腫瘍特異的 T 細胞の活性化時のサイトカイン放出能、腫瘍殺傷能などの機能の変化を客観的に定量評価する。そして、各ポイントにおいて腫瘍特異的 T 細胞および、がん細胞に発現される表面マーカーや液性因子の中から、長期奏効あるいは治療抵抗性とよく関連する分子を選択し、直接的バイオマーカ候補とする。最終的に、多くの症例においてバイオマーカ候補と、抗 PD-1 抗体による治療後の臨床経過との関連を調べ、バイオマーカとしての有用性を検証する。

4. 研究成果

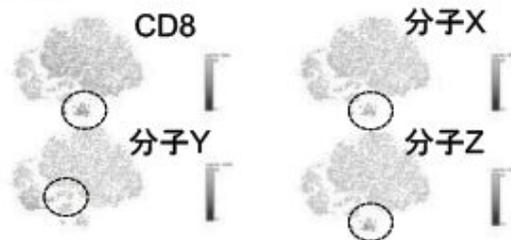
抗 PD-1 抗体治療前、治療後のメラノーマ組織ペア、再発症例の再発病変組織を用いて tumor digest、がん細胞株、腫瘍浸潤 T 細胞株を 4 ペア作成した。がん細胞株と腫瘍浸潤 T 細胞株を共培養し、腫瘍浸潤 T 細胞の中の腫瘍特異的 T 細胞を同定、クローニングし、それぞれの腫瘍特異的 T 細胞の T 細胞受容体(TCR)遺伝子型を同定した。ここで最初に保存した Tumor digest を用い、T 細胞を抽出した上で single cell RNA sequence 解析を行い、フェノタイプによって T 細胞をクラスタリングし、その中から腫瘍特異的な TCR 遺伝子型をもつ T 細胞の所属するクラスターを同定した(図 1)。そして最終的に、このクラスターの遺伝子発現プロファイルより、腫瘍特異的 T 細胞に選択的に発現され、その制御に直接関わる分子を複数同定した。その中にはすでに腫瘍内で腫瘍特異的 T 細胞に発現されることが知られている Exhaustion marker の PD-1, TIGIT, LAG3 など含まれていたため、今回の研究手法の有効性が証明された。TIGIT についてはがん細胞側に発現されるそのリガンド、CD155 が抗 PD-1 抗体の治療抵抗性に関与することを、追加 140 例の免疫染色にて証明した。また腫瘍内で腫瘍特異的 T 細胞に発現される新規分子も複数同定し、現在それらを利用した新規がん免疫療法の開発に向けてさらなる検証を行っている。さらにより多くの新規症例についても、同様の手法による新規分子の検索を継続中である。

図 1

培養腫瘍細胞株と培養TILを用いて腫瘍特異的T細胞クローン(#2-4, #2-5)とそのTCR遺伝子配列を同定した。Tumor digestからscRNA-seqとTCR遺伝子配列解析を行い腫瘍特異的T細胞が集簇するクラスター (点線囲み)が存在することを発見した



腫瘍特異的T細胞が集簇するクラスター (点線囲み)に特異的に発現される分子 (X, Y, Z)を同定した



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagasaki Joji, Inozume Takashi, Yamashita Kazuo, Kawazu Masahito, Nishikawa Hiroyoshi, Togashi Yosuke et al	4. 巻 38
2. 論文標題 PD-1 blockade therapy promotes infiltration of tumor-attacking exhausted T?cell clonotypes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110331 ~ 110331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110331	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawashima Shusuke, Inozume Takashi, Kawazu Masahito, Togashi Yosuke et al.	4. 巻 9
2. 論文標題 TIGIT/CD155 axis mediates resistance to immunotherapy in patients with melanoma with the inflamed tumor microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal for ImmunoTherapy of Cancer	6. 最初と最後の頁 e003134 ~ e003134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/jitc-2021-003134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirano Tomoko, Honda Tetsuya, Kanameishi Shuto, Honda Yuki, Egawa Gyohei, Kitoh Akihiko, Nakajima Saeko, Otsuka Atsushi, Nomura Takashi, Dainichi Teruki, Yaguchi Tomonori, Inozume Takashi, Kataoka Tatsuki R., Tamada Koji, Kabashima Kenji	4. 巻 148
2. 論文標題 PD-L1 on mast cells suppresses effector CD8+ T-cell activation in the skin in murine contact hypersensitivity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 563 ~ 573.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2020.12.654	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokomichi H, Inozume T, Wada M, Asai J, Igaki H, Namikawa K, et al.	4. 巻 3
2. 論文標題 Concordance and Discordance Rates of V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1 (BRAF) V600E Status in Metastatic against Primary Lesion of Melanoma: A Meta-analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JMA Journal	6. 最初と最後の頁 274 ~ 279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31662/jmaj.2020-0016	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 -

1. 著者名 Honobe Akiko, Sakai Kazuko, Togashi Yosuke, Ohnuma Takehiro, Kawamura Tatsuyoshi, Nishio Kazuto, Inozume Takashi	4. 巻 100
2. 論文標題 Heterogeneity in congenital melanocytic nevi contributes to multicentric melanomagenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 217 ~ 219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2020.09.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 NISHI KENSUKE, ISHIKURA SHUHEI, UMEBAYASHI MASAYO, MORISAKI TAKASHI, INOZUME TAKASHI, KINUGASA TETSUSHI, AOKI MIKIKO, NIMURA SATOSHI, SWAIN ANTHONY, YOSHIDA YOICHIRO, HASEGAWA SUGURU, NABESHIMA KAZUKI, SAKATA TOSHIYUKI, SHIRASAWA SENJI, TSUNODA TOSHIYUKI	4. 巻 40
2. 論文標題 Mutant KRAS Promotes NKG2D+ T Cell Infiltration and CD155 Dependent Immune Evasion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4663 ~ 4674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.14465	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 猪爪隆史	4. 巻 71
2. 論文標題 メラノーマの新たな治療標的	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 602-607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inozume Takashi, Yaguchi Tomonori, Ariyasu Ryo, Togashi Yosuke, Ohnuma Takehiro, Honobe Akiko, Nishikawa Hiroyoshi, Kawakami Yutaka, Kawamura Tatsuyoshi	4. 巻 139
2. 論文標題 Analysis of the Tumor Reactivity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in a Metastatic Melanoma Lesion that Lost Major Histocompatibility Complex Class I Expression after Anti-PD-1 Therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1490 ~ 1496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2019.01.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 猪爪隆史
2. 発表標題 メラノーマ病巣内でICIの効果に影響する因子の解析
3. 学会等名 第49回臨床免疫学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪爪隆史
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害剤の作用機序とバイオマーカー
3. 学会等名 第37回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪爪隆史
2. 発表標題 抗PD-1抗体 + 抗CTLA-4抗体併用療法のエビデンスと意義
3. 学会等名 第120回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪爪隆史
2. 発表標題 メラノーマと腫瘍免疫
3. 学会等名 第120回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Inozume Takashi et al.
2. 発表標題 Heterogeneity in congenital melanocytic nevi contributes to multicentric melanomagenesis
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Inozume Takashi
2. 発表標題 Biological and immunological characteristics of melanoma subtypes predominant in Japan
3. 学会等名 The 36th annual meeting of the Japanese skin cancer society (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪爪隆史ら
2. 発表標題 Heterogeneity in congenital melanocytic nevi contributes to multicentric melanomagenesis
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪爪隆史
2. 発表標題 メリットデメリットのバランスで考えるメラノーマ治療
3. 学会等名 第468回日本皮膚科学会北陸地方会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 猪爪隆史
2. 発表標題 メラノーマ研究と治療経験から考えるがん免疫療法
3. 学会等名 第24回日本がん免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Inozume
2. 発表標題 Biological and immunological characteristics of melanoma subtypes predominant in Japan
3. 学会等名 The 36th annual meeting of the Japanese skin cancer society（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 猪爪隆史
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害療法の 効率化に向けた研究
3. 学会等名 第118回日本皮膚科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪爪隆史, 富樫庸介, 有安亮, 谷口智恵, 大沼毅紘, 河上裕, 西川博嘉
2. 発表標題 抗PD-1抗体が著効した進行期メラノーマ におけるTILの機能解析
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 猪爪隆史
2. 発表標題 免疫抑制の観点から
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Inozume
2. 発表標題 Important issues in melanoma treatment and research to solve them
3. 学会等名 The 29th Annual Meeting of the Japanese Society for Pigment Cell Research（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Inozume, Yosuke Togashi, Ryo Ariyasu, Tomonori Yaguchi, Takehiro Ohnuma, Yutaka Kawakami, Hiroyoshi Nishikawa, Tatsuyoshi Kawamura
2. 発表標題 Identification and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes that may mediate anti-tumor response by nivolumab
3. 学会等名 The 44th annual meeting of Japanese Society for Investigative Dermatology
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Inozume, Tomonori Yaguchi, Ryo Ariyasu, Yosuke Togashi, Takehiro Ohnuma, Akiko Honobe, Hiroyoshi Nishikawa, Yutaka Kawakami, Tatsuyoshi Kawamura
2. 発表標題 Analysis of the tumor reactivity of tumor-infiltrating lymphocytes in a metastatic melanoma lesion that lost MHC class I expression after anti-PD-1 therapy
3. 学会等名 The 77 the annual meeting of Society for Investigative Dermatology
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学大学院医学研究院皮膚科学 HP
<https://www.m.chiba-u.ac.jp/dept/dermatology/>
<https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/dermatol/>

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
研究協力者	富樫 庸介 (Togashi Yosuke)	岡山大学・腫瘍微小環境学・教授 (15301)	

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
---------	---------