

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07252

研究課題名（和文）免疫療法の効果持続に関わる因子の基盤的検討

研究課題名（英文）Basic evaluation and investigation of the factors linked to the long term response to immunotherapies

研究代表者

小山 正平（Koyama, Shohei）

国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・ユニット長

研究者番号：80767559

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）：本研究課題は、免疫チェックポイント阻害薬（抗PD-1抗体および抗CTLA-4抗体）に対して長期奏効が期待される非小細胞肺癌および悪性黒色腫を中心として、一旦治療が奏功した症例の中から、その効果が長期に持続した症例と持続しなかった症例に関して、腫瘍浸潤免疫細胞および末梢血単核球細胞の免疫学的特徴を比較し、免疫チェックポイント阻害薬投与後の長期奏効と関わるバイオマーカーの樹立を目的とする。特に腫瘍浸潤T細胞と末梢血T細胞で共通するT細胞受容体をもつ細胞に焦点をあて、T細胞マーカーの網羅的解析を行い、長期奏効に関わる分子メカニズムを明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ICIの適応が多様ながんに拡大され、多くのがん種で標準治療の1つとして使用されるようになったが、本来免疫療法の利点である長期奏効が得られる症例は限定的である。我々は、ICIの長期奏効例におけるT細胞の時間的・空間的变化をトレースすることで長期奏効と関連するT細胞上の複数のバイオマーカー候補を同定した。さらに、がん細胞上に発現する神経ガイダンス因子セマフォリンがT細胞上のプレキシンを介して細胞遊走や共刺激・活性化を制御することを解明した。これまで詳細な機能が不明であったセマフォリン・プレキシン相互作用に関する新しい知見により、今後がん免疫療法の効果改善のための治療標的として期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research project is to establish biomarkers associated with long-term response to immune checkpoint inhibitors (ICIs) including anti-PD-1 antibodies and anti-CTLA-4 antibodies in patients with non-small cell lung cancer and malignant melanoma, who are expected to have long-term response to ICIs. Immunological characteristics of tumor-infiltrating immune cells and peripheral blood mononuclear cells in patients who initially showed therapeutic response to ICIs are compared between patients whose response sustained long term and those whose response did not sustain long term. We will especially focus on T cells with T-cell receptors shared by tumor-infiltrating T cells and peripheral blood T cells, and perform a comprehensive analysis of T-cell markers to elucidate the molecular mechanisms involved in long-term response.

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薬 CD8陽性T細胞 神経ガイダンス因子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

複数のがんに対して免疫チェックポイント阻害剤(Immune checkpoint inhibitors: ICIs)に代表されるがん免疫療法が承認されると共に、治療初期の抵抗性を克服する目的から、化学療法との併用治療が1次治療として一般的に用いられている。しかしながら、ICIの単剤治療でも、十分長期に奏功する症例が報告されており(Gettinger S et al J Clin Oncol 2018)、長期の治療効果という観点から、化学療法の併用が優先されるべき患者サブセットを抽出する層別化マーカーは知られていない。このような背景から、ICI単剤治療で重要であった治療開始時の奏功・非奏功を予測するための層別化マーカーに対し、長期治療効果に関わる因子の同定が急務となっている。つまり長期奏功を目指す際、どのような患者では併用治療が推奨され、どのような患者では単剤治療で十分と判断できるのか、その理論的な指標が求められている。しかしながら、そのような指標を見出す前提として、どのようにしてICIによって長期の治療効果が獲得されるのか、そのメカニズムの詳細を理解することが必須である。そこで本研究課題では、核心をなす学術的「問い」として、どのように長期の治療効果が維持されるのか、なぜ長期に効果を認めたにも関わらず再発することがあるのか、長期奏功に至る症例は他の症例と比べてどのような特徴があるのか、を提起しこれらの問いに対する科学的根拠となる知見を集積することを目指す。

申請者の所属する研究室は、これまでTILを用いた治療開始時の奏功・非奏功を予測するバイオマーカーについて、悪性黒色腫、肺がんに共通する指標として、CD8<sup>+</sup>T細胞のPD-1陽性率とTregのPD-1陽性率のバランスの重要性を報告してきた(Kumagai S et al. Nat Immunol 2020)。この論文で報告した奏功例には、長期に治療効果が持続する場合と途中で再発する場合が含まれることから、PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞やPD-1<sup>+</sup>Tregのsubsetが治療効果持続に何らかの影響を与えていることが示唆される。ただ長期奏功例においては、腫瘍は縮小・消失を伴うため、末梢血を用いたモニタリングが必須となる。申請者は、これまで抗PD-1抗体を投与された患者末梢血を用いて、投与中止後も長期に抗PD-1抗体がT細胞に結合していることを明らかにした。さらに抗体が結合しているT細胞と結合していないT細胞を分けて免疫学的に網羅解析する手法を開発した(JCI insight 2018)。またマウスモデルに関しては、申請者がKras/p53(KP)遺伝子変異陽性のトランスジェニックマウスから樹立した肺がん細胞株(KP細胞株)(J Thorac Oncol 2017)が保有している。KP細胞株は、非自己蛋白の生成につながる遺伝子変異が少なく、抗PD-1抗体単剤治療では効果が認められない。そのためアルキル化薬であるエチルニトロソウレアを用いて遺伝子変異を化学的に誘導し、新たに抗PD-1抗体感受性のKP細胞株を作成した。この抗PD-1抗体感受性のKP細胞株のマウスに移植したモデルは、臨床的な長期奏功を良く再現しており、治療後の効果持続メカニズムを解析するために大変有用なツールである。

以上のような学術的背景および申請者の研究バックグラウンドから、本研究計画を着想し、最終的に上述の学術的「問い」に対して新しい知見を見出すことを目標とする。

### 2. 研究の目的

ICIの中でも抗PD-1/PD-L1抗体に対して長期奏功が得られた悪性黒色腫および肺がん患者から、治療前と治療経過中に採取した、すでに保存済の臨床検体を用いたT細胞の経時的な免疫学的解析によって、どのようにICIの長期の治療効果が維持されるのか、長期奏功に至る症例では、非奏功の症例や途中で再発する症例と比べてどのような特徴があるのかに焦点をあて、特にがん抗原特異的T細胞クローンの末梢血中の動態および特徴の変化に着眼して検討する。さらに、臨床的な長期奏功を再現するマウスモデルを用いて、がん細胞の再投与(再発モデル)や遺

伝子組み換え技術などを用いて、長期メモリーの関与を含めた詳細なメカニズム解析を行う。最終的に、上述の「問い」に対して新たな知見を見出すことを目指す。

### 3. 研究の方法

本研究計画では、(1) 本研究室で培われてきた TIL の解析技術を用いて、がん抗原特異的な T 細胞クローンを見出す検討を行う (TCR レパトア解析によりクローナルに増殖している活性化 T 細胞を判定。さらに同じ検体から細胞株の樹立及びがん細胞の遺伝子変異に基づくペプチド作成しそれらによる刺激実験を行う)。(2) (1) で検出したがん抗原特異的 T 細胞クローンが、患者末梢血でどれ位の頻度・期間に渡って検出されるか、抗 PD-1 抗体の結合という観点から解析する。(3) 末梢血で検出された (2) のクローンの頻度やマーカーについて、時間経過および臨床効果と合わせて免疫学的特徴を追跡する。(4) (1) ~ (3) は臨床検体を用いた解析であり、併行して、抗 PD-1 抗体感受性の KP 細胞株を用いたマウスモデルを用いて (3) で認められた分子が生体内でどのような機能をもつか検討する。マウスモデルでは、T 細胞だけでなく腫瘍中に浸潤する骨髄球系細胞の関与も評価するとともに、TIL と PBMC の比較検討から、TIL 中の CD8 陽性 T 細胞や制御性 T 細胞 (Treg) のどのような特性が、長期奏功例の患者末梢血に反映されるのか、奏功後の再発に関連するののかについても評価を行う。

### 4. 研究成果

3で記述した(1)~(4)についてそれぞれの成果を記述する。

(1~3) 悪性黒色腫・非小細胞肺癌に対して免疫チェックポイント阻害薬(抗PD-1抗体単剤)を受けた患者から、治療前後で回収した腫瘍浸潤リンパ球および末梢血を用いてシングルセル解析を行った。腫瘍浸潤T細胞および末梢血T細胞で共通して検出される10種類の表面マーカーをバイオマーカーの候補分子として絞り込むことができた。長期奏功との関連性について、これまでに大阪大学および国立がん研究センターで保存していた長期臨床効果が紐づいた末梢血PBMCを用いて、候補分子のうち、どの分子の発現頻度が長期奏功の予測因子として有効であるか確認を進めている。またこの候補分子は、腫瘍浸潤T細胞ではPD-1陽性のサブセットであり、抗PD-1抗体が結合しているサブセットであることが分かった。

(4) (1~3) の探索を実施している中で、がん細胞側に発現するいくつかの分子についても T 細胞の相互作用という観点から長期奏功に関わることが明らかになった。非小細胞肺癌の検体を用いた検討から、末梢血中の好中球が多いことは、長期奏功が出現しにくい因子であることを見出すとともに ( 現在好中球の特定の分子が腫瘍浸潤 T 細胞の stemness を抑制することを明らかにした )、非小細胞肺癌細胞における神経ガイダンス因子が腫瘍浸潤 T 細胞の共刺激および T 細胞における免疫代謝を制御することによって ICI の感受性に影響を与えることを、ヒト検体およびマウスモデルで実証した。肺癌細胞におけるセマフォリン 4A は、特に腫瘍浸潤の CD8 陽性 T 細胞にプレキシシン B を介し、mTORC1 シグナルおよびポリアミン合成が誘導され、抗原特異的な T 細胞のエフェクター機能および増殖が改善することを示した (Naito Y, Koyama S (責任著者) et al. *Science Advances*. 2023 May 19;9(20):eade0718. )。さらに頭頸部がん細胞のセマフォリン 6D は、特に腫瘍浸潤の CD8 陽性 T 細胞にプレキシシン A を介して、T 細胞の腫瘍内への浸潤そのものを抑制することで ICI 耐性に寄与することを明らかにした (Hirai T, Koyama S (責任著者) et al. *JCI insight*. 2024 Feb 8;9(3):e166349. )。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hirai Takashi, Naito Yujiro, Koyama Shohei et al	4. 巻 9
2. 論文標題 Sema6D forward signaling impairs T cell activation and proliferation in head and neck cancer	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.166349	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 Naito Y et al	4. 巻 -
2. 論文標題 Tumor-derived semaphorin 4A improves PD-1 blocking antibody efficacy by enhancing CD8+ T-cell cytotoxicity and proliferation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.ade0718	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 Kumagai S, Koyama S, Itahashi K, Tanegashima T, et al	4. 巻 40(2)
2. 論文標題 Lactic acid promotes PD-1 expression in regulatory T cells in highly glycolytic tumor microenvironments	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Cell.	6. 最初と最後の頁 201,218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ccell.2022.01.001.	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 Masuhiro K, Tamiya M, Fujimoto K, Koyama S, Naito Y, Osa A, Hirai T, Suzuki H, Okamoto N, Shiroyama T, Nishino K, Adachi Y, Nii T, Kinugasa-Katayama Y, Kajihara A, Morita T, Imoto S, Uematsu S, Irie T, Okuzaki D, Aoshi T, Takeda Y, Kumagai T, Hirashima T, Kumanogoh A.	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Bronchoalveolar lavage fluid reveals factors contributing to the efficacy of PD-1 blockade in lung cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JCI Insight.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/jci.insight.157915.	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------