

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07207

研究課題名(和文) 新規抗体医薬適用患者における免疫モニタリング法の整備とその臨床応用に関する研究

研究課題名(英文) Immune monitoring of circulating immune cells in the blood of patients with malignant solid tumors treated with checkpoint inhibitors

研究代表者

山下 万貴子 (YAMASHITA, Makiko)

公益財団法人がん研究会・有明病院 がん免疫治療開発部・研究員

研究者番号：00380668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、各種Lineage細胞・T細胞およびミエロイド細胞の量と性状を解析できるマルチカラーフローサイトメーター用パネルを構築し、実際に、健康人および固形がん患者由来の末梢血中リンパ球の解析を行った。その結果、健康人に比べ、がん患者ではT細胞上の各種チェックポイント分子の発現が上昇し、一方、ミエロイド系細胞ではPD-L1の発現のみが上昇していたが、その他の分子の発現には顕著な差は確認されなかった。このことから、がん患者では末梢血中リンパ球が疲弊状態にあり、また、抗腫瘍免疫においてPD-1/PD-L1経路が重要な役割を担っていることが推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん生体における免疫応答は、マウスモデルでは非常に詳細な解析がなされているものの、実際の実地臨床においては、がん患者自身の免疫機能の実態についてほとんど知られることがないまま治療が行われている。ヒトにおける薬剤投与後の免疫応答性はマウスでは再現できないことは広く知られており、よって患者由来検体の解析を通じてヒト生体内での疾患病態を直接的に検討することは非常に重要である。本研究により、患者の免疫病態をモニタリングするための基盤整備が進めば、そのエフェクター機能やそれを制御する各種免疫細胞のポピュレーションの変化を、実際に薬剤が投与される患者において経時的にモニタリングすることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we constructed a panel that can analyze the quantity and properties of various lineage cells, T cells, and myeloid cells using a multicolor flow cytometer that can stain up to 18 colors simultaneously. As a result of analysis and comparison of lymphocyte populations in peripheral blood of healthy subjects and patients with solid tumors using the panel, it was confirmed that the expression of various checkpoint molecules on T cells was up-regulated in cancer patients compared to healthy subjects, which is consistent with previous reports. On the other hand, in myeloid cells, the expression of PD-L1 was upregulated in cancer patients, but there were no significant differences in the expression of other molecules. These results suggest that the PD-1/PD-L1 pathway plays an important role in anti-tumor immunity, as T cells in circulating lymphocytes are exhausted in cancer patients, and PD-L1 expression in myeloid cells tends to be higher in cancer patients.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 免疫モニタリング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、免疫チェックポイント分子を標的とした抗体医薬によるがん免疫療法が、その優れた臨床効果と汎用性、また、比較的高い認容性などの点から急速に発展し、多くのがん種において臨床応用が検討されている。これら抗体療法は、患者体内における免疫応答を利用して(活性化させて)がんを攻撃する方法にもかかわらず、投与患者個別に免疫病態が把握されることなく治療が進められている。また、いずれの抗体薬も個人差が認められ、半数以上の患者で十分な臨床効果が見られないが、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。我々は、これまでに、独自に開発した機能アッセイ法を用いて薬剤投与前の免疫機能と治療効果との関連性を見いだしており、抗体医薬の効果予測において、患者免疫病態を事前に把握することは重要であると考えている。さらに、近年の抗体療法において、副作用として免疫関連有害事象の出現が度々指摘されており、抗体療法の顕著な臨床効果は副作用の出現可能性と表裏一体であることも明らかになりつつある。一方、近年、治療前のリンパ球/単球比が化学療法の予後予測マーカーとして有用である可能性がいくつか報告されている。また我々の解析からも、抗体療法適用患者において、リンパ球/単球比が臨床効果との相関が高い傾向が得られている。このことはつまり、患者免疫病態を捉えるには、特定の細胞の数や機能だけでなく、免疫全体のバランスを捉えることも重要であることを示唆している。

2. 研究の目的

そこで本研究では、患者免疫状態を包括的に評価することを目的とし、その基本技術の構築と基盤整備を進める。

単球やマクロファージ・樹状細胞などのミエロイド系細胞は、がんの進行に重要な役割を担っているリンパ球の1種である。申請者はこれまでに、単球自身が免疫調節機能を持つことを明らかとしており、さらに、近年、マウスモデルにおいて、単球が肺癌の転移に関与するとの報告もある。そこで本研究では、新たに単球や樹状細胞などのミエロイド系細胞解析用抗体パネルを作成し、抗体療法におけるミエロイド系細胞の臨床効果と性状変化との関連性について検証する。

我々のこれまでの解析から、抗体療法適用患者において、特定のリンパ球だけでなく、免疫全体のバランスを捉えることが重要であることを示唆している。また、がん免疫における重要なエフェクター細胞は腫瘍局所におけるがん反応性 T 細胞と考えられているが、近年の研究より、末梢血中における NK 細胞や B 細胞、各種抑制細胞群など、様々なリンパ球ががん免疫応答の調節に関与していることが報告されている。そこで、本研究では、T 細胞だけでなく、その他の様々なポピュレーションを含めた免疫バランスの変化を経時的にモニタリングし、患者免疫病態と臨床効果との相関を検証する。

将来的には、本研究において構築したシステムを利用して免疫モニタリングを実施し、がん患者における免疫状態データバンクを構築することを目指す。

3. 研究の方法

まずは、市販の健常人由来末梢血単核球を用いて、新規解析パネルを構築する。また、検体の処理や保存方法などを決定し、当研究室における免疫モニタリングシステム構築のための基礎データを揃える。

一般的に、末梢血中における単球 (monocyte: Mo) は”classical Mo”と呼ばれる inflammatory Mo と”non-classical Mo”と呼ばれる patrolling Mo の少なくとも 2 種類に分類できる。ヒトにおいては、両者を特定する master regulator は同定されていないものの、CD14、CD16、CCR2 などの発現で分画できると言われているため、単球の性状解析に適した抗体クローンおよび標識色素の組み合わせを検討し、新規パネルに追加する。また、単球を含むミエロイド系細胞における各種チェックリスト分子のリガンドの発現は、がん免疫において重要であることから、それらを解析できるパネルを構築する。

限られた患者血液検体から多くの情報をより効率的に取得するために、最大 18 色もしくは 27 色を同時に染色できるマルチカラーフローサイトメーター (BD LSR Fortessa X-20, BD Symphony) を用いた解析系を確立する。解析項目としては、上記も含め、下記のような項目を含めたパネル

を構築する。

- ・ T 細胞：CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞、naïve T/memory T/effector T など、Th1/Th2/Th17 など
- ・ B 細胞、NK 細胞、ミエロイド系細胞などその亜集団
- ・ 各種免疫抑制性細胞群：制御性 T 細胞、骨髄由来抑制性細胞、腫瘍関連マクロファージなど
- ・ 免疫チェックポイント分子およびそのリガンド

また、マルチカラーフローサイトメーターを用いた解析の安定性および再現性についても検証する。

4 . 研究成果

>最大 17 色のマルチカラーフローサイトメーター用解析パネルの構築 (Table 1)

- ・ 各種 Lineage 検出用のパネル

このパネルでは、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) における様々なリンパ球サブセットをスクリーニングするために、17 色のカラーパネルを開発した。このパネルを使用することで、T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、NKT 細胞、単球・樹状細胞の各種亜集団を含む多様なリンパ球サブセットおよびその表現型を検出することが出来るようになった。具体的には、naïve, central memory / effector memory および effector CD4⁺T 細胞 / CD8⁺T 細胞、classical / non-classical Mo, myeloid / plasmacytoid DC および cross-presenting DC などのサブポピュレーションを同定し、それぞれにおける PD-L1 / PD-L2 および CD86 などの分子の発現を検出することが出来るように設定した。

- ・ T 細胞性状解析のためのパネル

このパネルでは、様々な T 細胞の性状を T 細胞分化マーカー (CCR7, CD45RA, CCR6, CCR4, CXCR3, Foxp3, CD62L) と組み合わせて測定することを目的として、17 色のカラーパネルを開発した。このパネルで測定できる性状解析マーカーには、チェックポイント分子 (CTLA-4, PD-1, LAG3) 活性化および共刺激分子 (CD28, ICOS) などが含まれる。さらに、Ki67 により、最近活性化した T 細胞の同定と分析が可能になるよう設定した。

- ・ ミエロイド系細胞の性状解析のためのパネル

これまで解析が不十分であったミエロイド系細胞のフェノタイプを解析するためのパネルを新規に構築した。このパネルでは、ミエロイド系細胞を介した免疫応答を制御する分子 (チェックポイント分子のリガンド) を発現する細胞をカタログ化することを目的として、17 色のカラーパネルを開発した。具体的には、myeloid / plasmacytoid DC および cross-presenting DC における各種チェックポイントリガンド分子 (PD-L1, PD-L2, B7-1, B7-2, 4-1BBL, ICOSL, Galectin-9) の複合的な発現を測定することであり、これらの分子の多くは、前臨床または臨床開発中の標的分子またはそのリガンドであるため、チェックポイント阻害薬のバイオマーカーあるいは作用機序解明のためにも有用と考えられる。

- ・ ミエロイド系細胞解析用パネルを使った検体の解析

上記のミエロイド系細胞用パネルを使用して、健常人および固形がん患者の末梢血単核球の解析・比較を行った。その結果、健常人に比べ、がん患者では T 細胞上の各種チェックポイント分子の発現が上昇していることが観察され、これまでの各種報告と一致することを確認できた。また、肺癌において相関が報告されている CD62L 低発現細胞が、実際に、固形がん患者において増加していることも確認できた。一方、ミエロイド系細胞では、今回調べたがん患者群において PD-L1 の発現上昇が確認されたものの、その他のチェックポイント分子のリガンド発現には顕著な差は確認されなかった。以上の結果より、がん患者では、腫瘍局所だけでなく、末梢血中循環免疫細胞においても T 細胞が疲弊状態にあることが確認できた。一方で、血液中のミエロイド系細胞には強い疲弊状態は確認されなかったが、血液中でも、健常人に比べがん患者のミエロイド系細胞における PD-L1 の発現が高かったことから、抗腫瘍免疫において PD-1 / PD-L1 経路が重要な役割を担っていることが示唆された (論文準備中)。

>最大 27 色のマルチカラーフローサイトメーター用への解析パネルのアップデート

このパネルでは、ヒト末梢血単核細胞における様々なリンパ球サブセットをスクリーニングするために、さらに、28 色のカラーパネルを開発した。このパネルを使用することで、複数のスクリーニングパネルにサンプルをかけることなく、上記 Lineage パネルや T 細胞パネルと同等の内容を 1 つのパネルのみで検出することが可能となり、より少量の検体にも対応することが可能となった。

Table 1. 17 色マルチカラーフローサイトメーターにて検出出来る細胞群および分子群

Lineage パネル	T パネル	DC パネル
-------------	-------	--------

populations	populations	populations
CD3 ⁺ T cells	CD3 ⁺ T cell	myeloid DC
CD4 ⁺ T cells	CD4 ⁺ T cell	plasmacytoid DC
CD8 ⁺ T cells	-naïve	cross-presenting DC
CD19 ⁺ B cells	-central memory	
NK cells	-effector memory	
minor NK cells	-effector	
NKT cells	-effector Treg	
classical Mo	-naïve Treg	
non-classical Mo	-Th1	
MDSC	-Th2	
myeloid DC	-Th17	
plasmacytoid DC	CD8 ⁺ T cell	
cross-presenting DC	-naive	
	-central memory	
	-effector memory	
	-effector	
markers	markers	markers
CD86	CTLA-4	PD-L1
PD-L1	PD-1	PD-L2
PD-L2	LAG3	CD80
CCR2	ICOS	CD86
CCR5	CD28	4-1BBL
	Ki67	ICOSL
		Galectin-9

※NK; natural killer, MDSC; myeloid-derived suppressor cell, DC; dendritic cell

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Kitano S, Nakayama T, Yamashita M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitors in Melanoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Oncol.	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） 10.3389/fonc.2018.00270. eCollection 2018.	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 Aoki H, Ueha S, Shichino S, Ogiwara H, Shitara K, Shimomura M, Suzuki T, Nakatsura T, Yamashita M, Kitano S, Kuroda S, Wakabayashi M, Kurachi M, Ito S, Doi T, Matsushima K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Transient Depletion of CD4+ Cells Induces Remodeling of the TCR Repertoire in Gastrointestinal Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Immunol Res	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） 10.1158/2326-6066.CIR-20-0989	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 Shitara K, Ueha S, Shichino S, Aoki H, Ogiwara H, Nakatsura T, Suzuki T, Shimomura M, Yoshikawa T, Shoda K, Kitano S, Yamashita M, Nakayama T, Sato A, Kuroda S, Wakabayashi M, Nomura S, Yokochi S, Ito S, Matsushima K, Doi T.	4. 巻 7
2. 論文標題 2.First-in-human phase 1 study of IT1208, a defucosylated humanized anti-CD4 depleting antibody, in patients with advanced solid tumors.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Immunother Cancer	6. 最初と最後の頁 195-201
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40425-019-0677-y	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 -

〔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
---------	---------