

令和元年5月16日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16335

研究課題名(和文)メラノーマにおける抗PD-1抗体治療抵抗性に関わる分子の同定

研究課題名(英文) Identification of molecules that mediate acquired resistance for anti-PD-1 therapy

研究代表者

大沼 毅紘 (Ohnuma, Takehiro)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：80793116

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)：抗PD-1抗体によるメラノーマ治療では、最初に効果があっても途中で効果が無くなる現象が散見される。本研究では、長期効果があった病巣と途中で効果がなくなった病巣の状態を比較した。その結果、長期効果があった病巣ではすでにがん細胞が無くなっており、途中で効果がなくなった病巣ではT細胞の能力は維持されていたが、がん細胞がT細胞に認識されるときに必須の分子、MHC class Iが消失していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗PD-1抗体を用いて治療中のメラノーマ病巣内のがん特異的T細胞とがん細胞の状態を直接解析して明らかにした研究はまだ少ない。今回我々が得た知見は、免疫チェックポイント阻害剤を含むがん免疫療法の明らかな限界を示すと同時に、同様の研究をより多くの症例で実施することによって、抗PD-1抗体療法に本質的で臨床判断に役立つ有用なバイオマーカーをもたらす可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Relapses long after the initial positive responses during anti-PD-1 therapy are sometimes observed. In this study, we compared two metastatic lesions. Both lesions initially regressed by anti-PD-1 therapy, and then one of them started to grow long after the initial response. In the shrinking lesion, there was no tumor cells. On the other hands, in the relapsed lesion tumor cells lost expression of MHC class I, an essential molecule to be recognized T cells completely, regardless of the preserved function of tumor specific T cells in the lesion.

研究分野：皮膚科学

キーワード：抗PD-1抗体 治療抵抗性 MHC class I消失 腫瘍浸潤リンパ球 免疫チェックポイント阻害剤 メラノーマ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害剤(抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体)は画期的な癌治療薬として脚光を浴びている。薬剤自体が腫瘍増殖を抑制するのではなく、抑制シグナルを解除する事で活性化された T 細胞が継続的に腫瘍を縮小させるため、通常の抗がん剤よりも効果が持続するのが最大の特長である。実際に抗 PD-1 抗体治療を受けたメラノーマ患者の約 1 割は完全寛解(病変がすべて消失)となり、ほとんどは再発しない。それ以外、全体の 5 割程度の患者においても腫瘍の縮小や進行停止が数年単位で観察される。しかし完全寛解に至らなかった患者においては最終的に残存病変が増大に転じたり、新生病変が出現したりして、死に至るケースが多いことも分かってきた。従来、未治療の段階で免疫チェックポイント阻害剤の効果を予測するための免疫因子、腫瘍因子を検索する研究は盛んに行われてきたが、長期奏効後に腫瘍増大を引き起こす免疫因子、腫瘍因子を検討する研究はまだ十分に行われておらず、そのメカニズムを個々の症例ごとに解明する研究の必要性が高まっている。

### 2. 研究の目的

本研究では抗 PD-1 抗体治療を受け、一定期間奏効したメラノーマ患者の、増大に転じた病巣と縮小を維持している病巣の違い(腫瘍細胞生物学的相違、免疫環境の相違、浸潤免疫細胞の相違、発現する癌抗原の相違など)を網羅的に比較解析しつつ、治療抵抗性を克服する方法を開発する。

### 3. 研究の方法

抗 PD-1 抗体投与中のメラノーマ患者から切除された奏効維持転移巣と奏効後増大に転じた転移巣の生検組織を用いて、以下を行った。

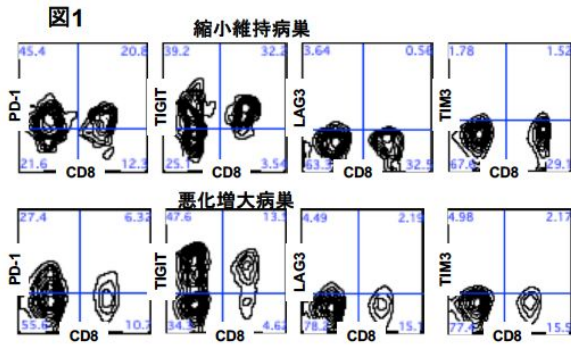
(1) 新鮮腫瘍消化液(single cell suspension)を作成し、T 細胞分画における活性化分子、抑制分子の発現レベル(PD-1, TIGIT, LAG-3, Tim3, BTLA, など)をフローサイトメトリーで解析した。同時に新鮮腫瘍消化液をウシ血清入り培地で長期培養してメラノーマ細胞株を樹立した。また高濃度 IL-2 を添加したヒト血清入り培地で培養し、腫瘍浸潤 T 細胞株を作成した。表面の T 細胞抑制分子の発現レベル(PD-1, TIGIT, LAG-3, Tim3, BTLA, など)をフローサイトメトリー解析で解析した。さらに樹立したメラノーマ細胞株で DNA Chip による mRNA 発現プロファイル解析を行った。

(2) 奏効後増大に転じた転移巣の腫瘍あるいは浸潤 T 細胞において、発現量の大きな変化が見られた分子が、この症例における治療抵抗性を担った可能性が高い。こうした遺伝子を強制発現して、自己腫瘍浸潤 T 細胞株からの認識がどう変化するか、確認する。

### 4. 研究成果

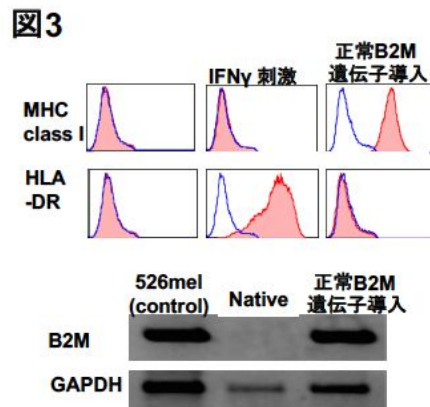
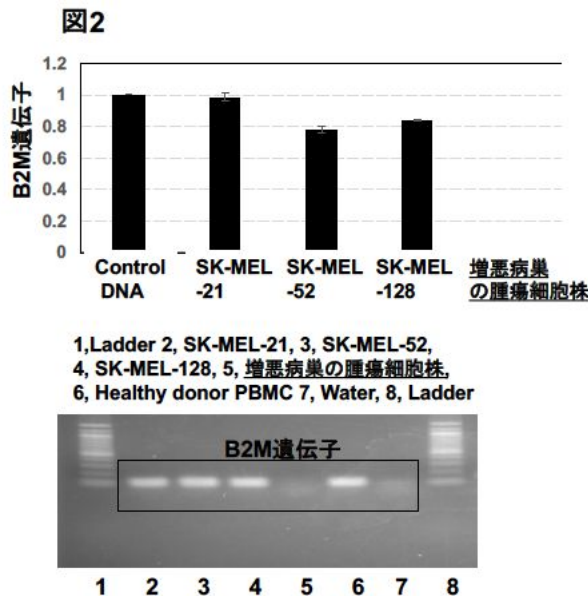
#### (1) 効果が維持される病巣と途中で悪化する病巣内の比較

抗 PD-1 抗体に対する治療抵抗性のメカニズムを解明するために、抗 PD-1 抗体治療にて病巣がすべて一旦縮小した進行期メラノーマ 1 例において、縮小を保っている病巣と数年後に急激に増大した病巣、それぞれの病巣の癌細胞の状況、浸潤リンパ球の状態や腫瘍反応性を比較した。縮小維持していた病巣は壊死組織とマクロファージで構成されており、メラノーマ細胞は残っていなかった。一方、増大、悪化した病巣は壊死組織、メラノーマ細胞、浸潤リンパ球より構成されていた。それぞれの浸潤 T 細胞の状態を比較すると、PD-1, TIGIT, LAG3 などの発現レベルは同等であった(図 1)。

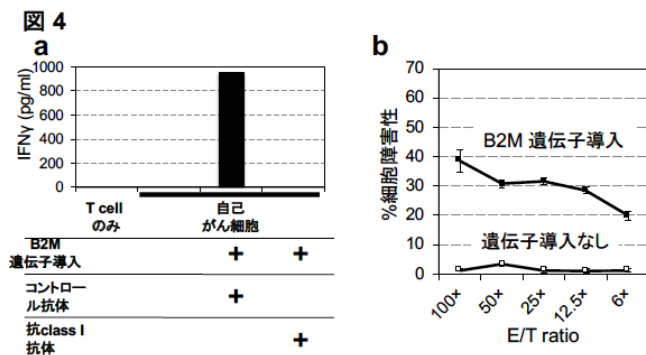


(2)途中で悪化する病巣のメラノーマ細胞とメラノーマ特異的 T細胞の機能解析

悪化した病巣よりメラノーマ細胞株と浸潤 T細胞の株を樹立した。これらを invitro で共培養すると、T細胞株の活性化や癌細胞の殺傷はほとんど見られなかった。T細胞からの認識に関する表面分子群のスクリーニングにて、全ての MHC class I 消失が観察されたため、MHC class I の共通コンポーネントである B2M の発現異常を考え、解析を行った。その結果、コピーナンバーアッセイにて DNA 上の B2M 遺伝子コード部位が欠損していること(図 2)、正常 B2M 遺伝子をこのがん細胞に導入すると MHC class I の発現が回復すること (図 3)、を確認した。



次に、悪化した病巣内の腫瘍特異的 T細胞の機能を評価した。上記の正常 B2M 遺伝子導入によって人工的に MHC class I を復活させた自己がん細胞に強く反応する T細胞クローンを増殖させて、改めて MHC class I を消失したがん細胞と共培養すると、全く認識されないことを、活性化 T細胞からのサイトカイン放出アッセイ (a) と、細胞傷害アッセイ (b) とで確認した (図 4)。



以上より、本研究で解析を行った症例の一つの病巣では、がん細胞ゲノム上の B2M 遺伝子の消失によって MHC class I の全消失が起こっており、その結果病巣内に浸潤する腫瘍特異的 T 細胞によって認識、制御されなくなった結果、治療抵抗性が生じた、という治療抵抗性メカニズムを証明することができた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Inozume T, Yaguchi T, Ariyasu R, Togashi Y, Ohnuma T, Honobe A, Nishikawa H, Kawakami Y, Kawamura T. 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. J Invest Dermatol. 査読あり, in press. doi: 10.1016/j.jid.2019.01.007.

(2) Ohnuma T, Matsuzawa T, Kinoshita M, Sano S, Kawamura T, Shimada S, Inozume T. Case of metastatic uveal melanoma in which an antitumor effect appeared after ipilimumab discontinuation due to autoimmune hypophysitis. J Dermatol. 査読あり, 2017;44(11):1325-6. doi: 10.1111/1346-8138.13692.

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 大沼毅紘、猪爪隆史ら イピリムマブ投与後に生じた自己免疫性下垂体炎の 1 例、第 69 回 日本皮膚科学会西部支部学術大会、2017 年 10 月 28 日、熊本県民交流会館パレア、熊本

(2) 大沼毅紘、猪爪隆史ら 右鼠径部に生じた BRAF 変位陽性の悪性黒色腫の 1 例、第 87 回 山梨地方会 2017 年 8 月 26 日、甲府古名屋ホテル、甲府

〔その他〕

ホームページ等

(1) 山梨大皮膚科ホームページにて研究グループ、内容紹介

<https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/dermatol/groupe/index.html>

(2) 2018/10/7 6:30 日本経済新聞 電子版に研究が紹介された

ノーベル賞のがん免疫薬、効力向上へ 進む研究

<https://www.nikkei.com/article/DGXMZ036186080V01C18A0TJM000/>

## 6 . 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：猪爪 隆史

ローマ字氏名：INOZUME, takashi

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、研究者個人に帰属されます。