

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07676

研究課題名(和文)「無細胞タンパク質合成系を用いた抗体作成」による免疫関連有害事象の病態解明

研究課題名(英文) Investigating whether antibody production contributes to immune-related adverse events using an acellular protein synthesis system

研究代表者

南 博信 (Minami, Hironobu)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：60450574

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)：免疫関連有害事象(irAE)発症にB細胞を介した抗原抗体反応が関与していることを示すため、抗CTLA-4抗体と抗PD-1抗体の併用療法を受けた患者でB細胞の動態を解析した。Grade 3以上のirAEを発症した5名ではirAEを発症しなかった患者と比べてCD21LowB細胞、形質芽球、形質細胞が大きく変化し有意差を認めた。

活性化B細胞が著増しirAE肝炎を発症した症例で、BCR遺伝子のレパトア解析を実施した。CD21Low分画B細胞でBCR遺伝子配列をコピー数順でランキングしirAE発症時に増加した配列を選定した。この配列はCD21Low分画B細胞のシングルセル解析では検出されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害薬の副作用である免疫関連有害事象(irAE)の発症リスクが高い抗CTLA-4抗体と抗PD-1抗体の併用療法を受けた患者のうち、重度のirAEを発症した患者では活性化B細胞サブセットが著増していたのに対し発症しなかった患者では変化がなかったことを示し、特定のirAEでコピー数が増大したBCRレパトアを特定できたことは、シングルセル解析では同じ配列が検出されなかったものの、irAEの発症にB細胞も関与していることを示唆するものであり、irAEの本態解明に資し発症予測や治療法開発につながるもので意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：To determine whether antigen-antibody reactions contribute to immune-related adverse events (irAE), B cell kinetics were analyzed in patients receiving a combination therapy of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies. Compared to patients who did not develop irAE, CD21LowB cells, plasmablasts, and plasma cells were significantly increased in 5 patients who experienced grade 3 irAE.

The BCR repertoire was analyzed in a patient who developed irAE hepatitis together with a dramatic increase in the number of activated B cells. BCR gene sequences of CD21LowB cells were ranked according to copy number, and 20 unique sequences with high copy numbers were selected for further analysis. However, single cell analysis did not detect these sequences in CD21LowB cells.

研究分野：Medical oncology

キーワード：免疫チェックポイント阻害薬 免疫関連有害事象 B細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんに対する免疫応答の理解と解明が進み、免疫チェックポイント分子である **Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4(CTLA-4)** および **Programmed cell death 1(PD-1)** の阻害薬 (**Immune checkpoint inhibitor: ICI**) が臨床応用されている。これら薬剤はがん治療で大きな成果を上げているが、免疫を賦活するこれらの薬物は、従来の抗がん薬では見られなかった免疫関連有害事象 (**immune-related adverse events: irAE**) と呼ばれる特有の副反応を認める。irAE は全身の臓器で認められ、これまでの殺細胞性抗がん薬の副作用とは全く異なる管理が必要である。特に抗 **CTLA-4** 抗体の使用にあたっては、有害事象共通用語規準で、**Grade 3** (重症/重大で入院または入院期間の延長を要する) 以上の有害事象を **30~40%** 発症し、極めて大きな治療の妨げになっている。現在、irAE のメカニズムは明らかになっておらず、発症リスクや発症時期の特定は困難で、治療方法も確立されていない。

2. 研究の目的

一般に irAE は、ICI にて活性化された T 細胞による臓器障害により引き起こされると考えられる。しかし我々はこれまでの研究で、重症の irAE 肝炎症例において、肝生検組織に抗体産生細胞が多数浸潤していることを確認しており、irAE の発症には T 細胞のみならず、**B 細胞の関与(自己抗体による抗原抗体反応)** が関与していると仮説を立てた。これを証明するために、まず、**B 細胞が irAE と関連していることを明らかにする**。ICI 投与の前後で B 細胞の変化をフローサイトメトリーや **B 細胞受容体(BCR)レパートリーアッセイ** で経時的に解析することで“**ICI 治療による B 細胞の変化が irAE に与える影響**”を確認する。

我々は B 細胞が関与した irAE 発症の詳細なメカニズムとして「“正常組織由来の抗原に対する自己反応性抗体”を産生する B 細胞クローンが増加し、抗原抗体反応を介して臓器に障害を与える自己免疫疾患である」と考えている。これを明らかにするために、**Grade 3** 以上の irAE が発症した症例において、発症時と ICI 投与前の末梢血 B 細胞の **BCR** レパートリーを比較することで、irAE に関連してクローン増殖しているユニーク配列を同定する。さらに、同定した配列から無細胞タンパク質合成系にてモノクローナル抗体を合成し、網羅型タンパク質アレイでその抗体の抗原を同定する。これにより、抗原が irAE の発症臓器に由来するタンパク質であり、その発症が抗原抗体反応に起因することを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ICI 投与の前後で B 細胞の変化をフローサイトメトリーや BCR レパートリーアッセイを用いて経時的に解析する

臨床研究プロトコル「悪性腫瘍患者を対象とした免疫関連細胞の前向き観察研究」を作成し、ICI 投与前後の免疫細胞の動態について研究を行う。irAE の発症頻度の多い抗 **CTLA-4** 抗体を含む ICI 併用療法(抗 **CTLA-4** 抗体 + 抗 **PD-1** 抗体)を受ける様々ながん患者において、治療前、1 サイクル目の 1 週間後、2 サイクル前に末梢血を採取する。フローサイトメトリーを用いて、**CD21^{low} B 細胞 (CD21^{low})**、クラススイッチ B 細胞 (**CD27⁺ IgD⁺**)、形質芽細胞 (**CD27⁺ IgD⁺ CD38⁺**)、形質細胞 (**CD27⁺ IgD⁺ CD38⁺ CD138⁺**) などの活性化 B 細胞を解析する。加えて、B 細胞活性化のマーカーとして **BCR** の多様性解析を行う。

(2) irAE 発症時クローン拡大している B 細胞から抗体を合成し、タンパク質アレイでその抗原を同定する

(1)にて登録した症例のなかで、**Grade 3**の **irAE** を発症した症例を利用し、以下 **1~3** を実行する。**1. irAE** 発症時に、活性化(増加)している **B 細胞クローン**のユニークな **BCR** 遺伝子配列を同定する(**BCR** 遺伝子のレパトア解析)。**2. 1.**のユニーク配列を持つ **B 細胞 1 細胞**から遺伝子情報(重鎖/軽鎖)を取り出し、無細胞タンパク質合成系にてモノクローナル抗体を合成する。**3. 網羅型タンパク質アレイ**でその抗体の抗原を同定する。これにより、抗原が **irAE** の発症臓器に由来するタンパク質であり、その発症が抗原抗体反応に起因することを明らかにする。

4 . 研究成果

(1) 免疫チェックポイント阻害薬初回投与後 1 週間目の末梢血 B 細胞の活性化が irAE の重症化を予測する

全症例を通じて、すべての活性化 **B 細胞**サブセットは、**ICI** の投与前と比較して **1 週間**後に増加傾向にあった(図 1)。

ICI 併用療法後、**12 人**中 **5 人**に **Grade 3**以上(重症)の **irAE** が発生している。そこで、“**irAE** の発生の有無”と、“各活性化 **B 細胞**サブセットのベースラインから **1 週間**目の変化(fold change)”との関係を調査した(図 1, 2)。**irAE** を発症していない患者

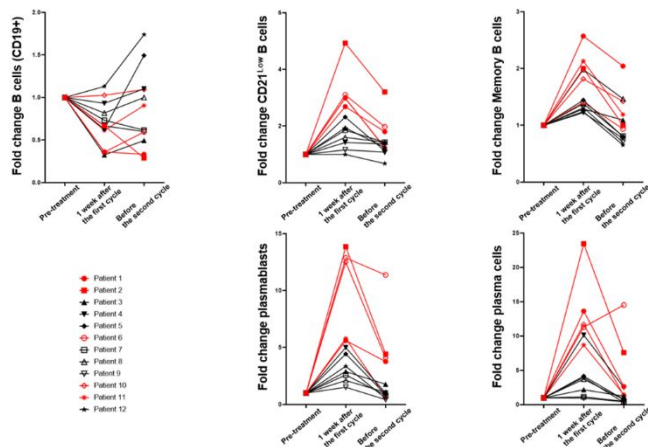


図1. ICI投与によるB細胞の変動(赤線: ≧G3 irAE症例)

に比較して、発症した患者は変動が大きく(図 1, 2)、**CD21^{low} B 細胞**(中央値 **1.6**[範囲 **1.0 - 2.3**] vs **3.0** [**2.7 - 4.9**])、**形質芽球**(**2.9** [**1.5 - 5.0**] vs **12.5** [**5.6 - 13.9**])、**形質細胞**(**3.7** [**1.0 - 10.1**] vs **11.7** [**8.7 - 23.5**])で有意な差を認めた(図 2)。これにより我々は、**ICI 初回投与後 1 週間目の末梢血 B 細胞の活性化が irAE の重症化を予測している**と考えている。加えて、重度の **irAE** を有する患者の **BCR** の多様性は、投与前と比較して、**1 週間**後に有意に増加した(図 3)。これらの結果は、**irAE** 発症における **B 細胞**の関与を強く示唆してる。

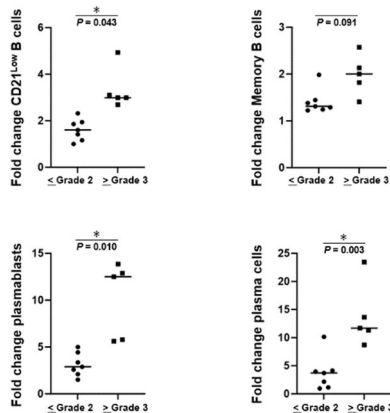


図2. “irAEの重症度”と“ICI投与後の活性化B細胞の変動”の関係

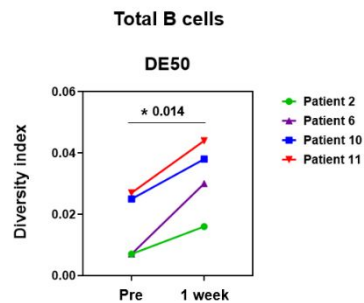


図3. ≧G3 irAE症例におけるBCRレパトア解析

(2) Grade3 の irAE 肝炎症例において BCR レパト

ア解析を行い、肝炎に関連したユニーク配列を選定する。

前述の症例のなかで、**Grade 3** の **irAE** 肝炎を発症した症例について解析を進めた(図 4)。ICI 投与前、ICI 投与後 1 週間、**irAE** 診断時 (**Day21**) に保存していた **CD21^{Low}** 分画 **B** 細胞(セルソータにて分離)より抽出した **mRNA** に対し、それぞれ **BCR** レパートリー解析を行った。各検体に対して約 **20** 万リードの **BCR** を解析しコピー数順でランキングし、「ICI 投与前にリード数が少なく(**0** かそれに近い値)、**irAE** の発症日に向けて増加するクローン配列」かつ「**irAE** 発症時に **500** リード以上(全体の **0.2%**)となるクローン配列」を **irAE** 肝炎の発症に関係する抗体候補の **BCR** 配列と考え **20** 配列を選定した(表 1)。もっとも有力な候補配列(**CDR3** のアミノ酸配列：**CARGYNGLLYW**)は、ICI 投与前のリード数は **0** であったが、ICI 投与 1 週間後に **5** に上昇、**irAE** 発症時には **4162** と全体の **1.5%**までに上昇し、巨大なクローン集団を形成しており **irAE** 肝炎の発症と関連があるものと考えた。

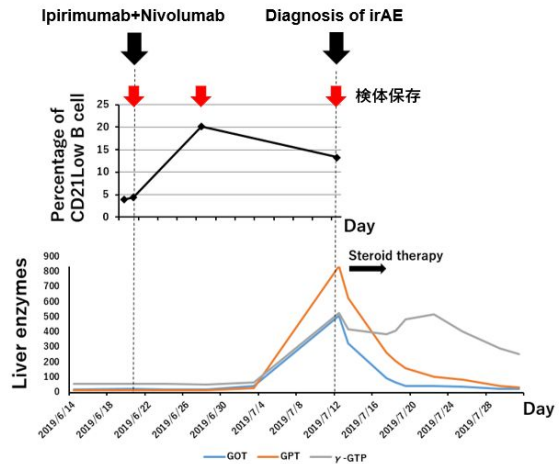


図4. Grade 3 irAE肝炎の経過

Group1			Group2		
Group1_Heavy mix_1st PCR			Group2_Heavy mix_1st PCR		
1	hHsp-1F_200630	ATGGACTGGACCTGGAGCATC	24	hHsp-24F_200630	TCCACGCTCCTGCTACTGAC
2	hHsp-2F_200630	ATGGACTGGACCTGGAGGATC	25	hHsp-25F_200630	TCCACGCTCCTGCTGCTGAC
3	hHsp-3F_200630	ATGGGGTCAACCCATCCTC	26	hHsp-26F_200630	TCCACGCTCCTGCTGCTGAG
4	hHsp-4F_200630	ATGGAGTTGGGCTGAGCTGG	27	hHsp-27F_200630	TTCTTCCTCCTCCTGGTGGC
5	hHsp-5F_200630	ATGGAACGGGGCTCCGCTGG	28	hHsp-28F_200630	TTCTTCCTCCTGCTGGTGGC
6	hHsp-6F_200630	ATGGAGTTGGGCTGAGCTGG	7	hHCG_1stR_160407	AGTAGTCCTTGACCAGGCAG
7	hHCG_1stR_160407	AGTAGTCCTTGACCAGGCAG			
Group1_Heavy mix_2nd PCR			Group2_Heavy mix_2nd PCR		
8	hHsp-8F_200630	GCTCAGTGAAGTCTCCTGC	29	hHsp-29F_200630	TGGATCCGTCAGCCCCCAGG
9	hHsp-9F_200630	CCTCAGTGAATACTCCTGC	30	hHsp-30F_200630	TGGATCCGTCAGCCCCCGGG
10	hHsp-10F_200630	CCTCAGTCAACCTCCTCCTGC	31	hHsp-31F_200630	TGGATCCGTCAGCCCCCGG
11	hHsp-11F_200630	CCTCAGTGAAGCTTTCCCTGC	32	hHsp-32F_200630	TGGATCCGTCAGCCCCCAGG
12	hHsp-12F_200630	AGTCTACGGATCGCCTGC	33	hHsp-33R_200630	AAAAGTCCACCCATGGGGG
13	hHsp-13F_200630	GGTCCCTGAGACTCCTCCTGT	34	hHsp-34R_200630	AAAAGTCCACCCCTGGAAC
14	hHsp-14R_200630	GACCGCGTTTAGCGAAGTA	35	hHsp-35R_200630	CTACGATTATGCCCTTTG
15	hHsp-15R_200630	GTACTGGTAATATGGTAATAAACCAC	36	hHsp-36R_200630	GTAGTACGCGGTAATTACCAGC
16	hHsp-16R_200630	GCTCCTAACCGCGCTCGATC	37	hHsp-37R_200630	GTCAGACATGAGCTTGCCCTC
17	hHsp-17R_200630	GTAGCCACTTTGAGCCCTC	38	hHsp-38R_200630	GGTTAGAAATGAGCCATCTTGG
18	hHsp-18R_200630	GGTCGAGCCACCCCTCGCC	39	hHsp-39R_200630	GGCCAGTCAAAATATCGTAATCG
19	hHsp-19R_200630	AGAGAAGCCCGTTATAACCC	40	hHsp-40R_200630	GGGAGAATAACCAAGTCCAAATATTG
20	hHsp-20R_200630	AGAATTTCCCGACCGCTATC	41	hHsp-41R_200630	GTGGTTTCCCTTTGTGGTGC
21	hHsp-21R_200630	GACATCATAATAGCCACTATATGG			
22	hHsp-22R_200630	AGGTGAACCAACCCCTCTCGT			
23	hHsp-23R_200630	GTAGTCAAGGATTCGACTCTA			

表1. irAE肝炎の発症に関する抗体候補のBCR配列

CD21^{Low} 分画 **B** 細胞集団の **mRNA** を用いたバルクでの **BCR** レパートア解析では、**IgG** 重鎖を解析したが、対応する軽鎖の情報は同時に得られない。そこで、重鎖/軽鎖のペア情報を得るために、**CD21^{Low}** 分画 **B** 細胞のシングルセル解析を行った。**irAE** 肝炎の発症直後 (**Day22**)に細胞保存液(セルバンカー)にて保存した **PBMC** を解凍し、セルソータを用いて **CD21^{Low}** 分画 **B** 細胞をシングルセルとして単離した。**10 × 10⁶**個の **PBMC** を処理し **408** 個

の **CD21^{Low}** 分画 **B** 細胞を単離し(図 5)、それぞれ **BCR** 解析を行った。しかし、単離された **408** 個の **CD21^{Low}** 分画 **B** 細胞に、前述の **20** 配列をもつ細胞は同定出来なかった。これにより、選定したユニーク配列を持つ **B** 細胞(**1** 細胞)を同定し、重鎖/軽鎖のペア情報から抗体を作成する過程に進むことが困難であった。

irAE 発症時に拡大しているユニーク配列のリード数は **BCR** 全体のリード数の最大 **1.5%**にまで拡大しており、シングルセル解析(図 5)にて目的の配列をもつ **B** 細胞が得られることが期待されたが単離することが出来なかった。この原因として、**BCR/mRNA** のリード数の割合と細胞数の割合が異なることが考えられる。リード数割合と細胞数割合が同程度であれば **408** 個の解析より **6** 個程度(**1.5%**)の候補細胞が得られると予測されたが得られていない。活性化 **B** 細胞 **1** 細胞が非活性化細胞より大量の **BCR/mRNA** を産生するなら、

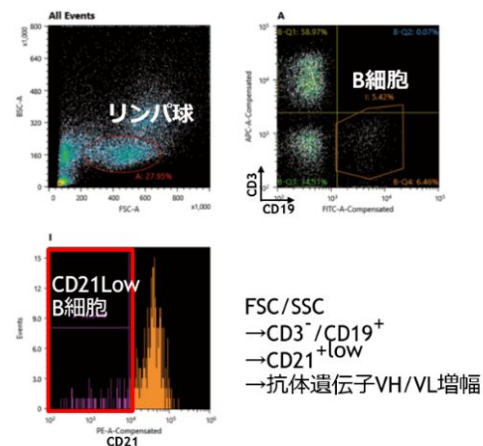


図5. 活性化B細胞のシングルセル解析

候補細胞を得るためにより多くの細胞を解析する必要がある。しかし、**PBMC** 中の活性化 **B** 細胞(抗体産生細胞)は少なく、保存されていた検体量では不十分であると考えられた。**irAE** 肝炎以外に、**irAE 1** 型糖尿病の検体でもレパトア解析を試みたが、発症時に拡大しているユニーク配列のリード数は、**BCR** 全体のリード数の最大 **1.4%**程度であり同様に困難であること考えた。

3) **irAE** 重症筋無力症症例を利用して、**irAE** の発症メカニズムを明らかにする。

上記の如く、**irAE** 発症に伴い拡大した **B** 細胞クローンをシングルセルで採取することが困難であった。そこで、その他方法で研究課題である「**irAE** の発症に対する **B** 細胞の関与」を、レパトア解析を通じて明らかにする方法を検討した。これまで、本研究に参加した症例で、**irAE** 重症筋無力症を発症した症例があり、アセチルコリンレセプター(**Ach-R**)抗体が陽性であることが確認されている。この症例も **ICI** 投与前から定期的に **PBCM** を保存しているが、各検体の **BCR** レパトア解析を行い、これに含まれる「**Ach-R** 蛋白に結合する **B** 細胞の **BCR** 配列」を追跡することで、**irAE** の発症に関連する **B** 細胞の挙動を正確に評価出来ると考えた。現在、**Ach-R** の抗体結合部位を含む サブユニットをカイコ発現系にて作成中であり(図 5)、今後、保存された患者血球から本蛋白に結合可能な **B** 細胞をソートすることで「**Ach-R** 蛋白に結合する **B** 細胞の **BCR** 配列」を取得する計画である。**Ach-R** 蛋白は膜蛋白であり、構造を維持した蛋白を作成することに難渋しているが、ナノディスクに入れ込むことで立体構造を維持した蛋白合成に取り組んでいる。



CHRNA1: A1サブユニットのIsoform1

図5. Ach-R α1サブユニット作成のコントラクト

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Tanizaki J., Yonemori K., Akiyoshi K., Minami H., Ueda H., Takiguchi Y., Miura Y., Segawa Y., Takahashi S., Iwamoto Y., Kidera Y., Fukuoka K., Ito A., Chiba Y., Sakai K., Nishio K., Nakagawa K., Hayashi H.	4. 巻 33
2. 論文標題 Open-label phase II study of the efficacy of nivolumab for cancer of unknown primary	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Oncology	6. 最初と最後の頁 216 ~ 226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.annonc.2021.11.009	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 Nose Taku, Funakoshi Yohei, Suto Hiroataka, Nagatani Yoshiaki, Imamura Yoshinori, Toyoda Masanori, Kiyota Naomi, Minami Hironobu	4. 巻 16
2. 論文標題 Transition of the PD-1 occupancy of nivolumab on T cells after discontinuation and response of nivolumab rechallenge	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	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) 10.3892/mco.2022.2537	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 Ozaki Yukinori, Tsurutani Junji, Mukohara Toru, Iwasa Tsutomu, Takahashi Masato, Tanabe Yuko, Kawabata Hidetaka, Masuda Norikazu, Futamura Manabu, Minami Hironobu, Matsumoto Koji, Yoshimura Kenichi, Kitano Shigehisa, Takano Toshimi	4. 巻 171
2. 論文標題 Safety and efficacy of nivolumab plus bevacizumab, paclitaxel for HER2-negative metastatic breast cancer: Primary results and biomarker data from a phase 2 trial (WJOG9917B)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 193 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejca.2022.05.014	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 Aoki Tomokazu, Minami Hironobu, et al.	4. 巻 26
2. 論文標題 Efficacy and safety of nivolumab in Japanese patients with first recurrence of glioblastoma: an open-label, non-comparative study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 2205 ~ 2215
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-021-02028-1	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 Uhara Hisashi, Kiyohara Yoshio, Uehara Jiro, Fujisawa Yasuhiro, Takenouchi Tatsuya, Otsuka Masaki, Uchi Hiroshi, Fukushima Satoshi, Minami Hironobu, Hatsumichi Masahiro, Yamazaki Naoya	4. 巻 48
2. 論文標題 Five year survival with nivolumab in previously untreated Japanese patients with advanced or recurrent malignant melanoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 592 ~ 599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15804	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 TAKAI RYO, FUNAKOSHI YOHEI, SUTO HIROTAKA, NAGATANI YOSHIKI, IMAMURA YOSHINORI, TOYODA MASANORI, YAKUSHIJIN KIMIKAZU, KIYOTA NAOMI, HARADA KEN-ICHI, YAMASHITA KIMIHIRO, KAKEJI YOSHIHIRO, MINAMI HIRONOBU	4. 巻 41
2. 論文標題 Serum Soluble Interleukin-2 Receptor as a Potential Biomarker for Immune-related Adverse Events	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1021 ~ 1026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.14857	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 Minami Hironobu, Doi Toshihiko, Toyoda Masanori, Imamura Yoshinori, Kiyota Naomi, Mitsuma Ayako, Shimokata Tomoya, Naito Yoichi, Matsubara Nobuaki, Tajima Takeshi, Tokushige Kota, Ishihara Kae, Cameron Scott, Ando Yuichi	4. 巻 112
2. 論文標題 Phase I study of the antiprogrammed cell death 1 Ab spartalizumab (PDR001) in Japanese patients with advanced malignancies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 725 ~ 733
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14678	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nagatani Y, Kiyota N, Imamura Y, Koyama T, Funakoshi Y, Komatsu M, Teshima M, Nibu K, Sakai K, Nishio K, Shimomura M, Nakatsura T, Ikarashi D, Nakayama T, Kitano S, Minami H
2. 発表標題 Tumor immune microenvironment in salivary gland cancer
3. 学会等名 Am Assoc Cancer Res (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	船越 洋平 (Funakoshi Yohei) (50566966)	神戸大学・医学部附属病院・助教 (14501)	

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