

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17050

研究課題名（和文）免疫チェックポイント阻害剤の有効性予測バイオマーカー開発—血中自己抗体の可能性—

研究課題名（英文）Development of biomarkers for predicting the effectiveness of immune checkpoint inhibitors - potential of autoantibodies in the bloodstream

研究代表者

松本 和幸（Matsumoto, Kazuyuki）

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40795027

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：免疫抑制分子であるPD-1に対する抗体陽性反応陽性者が膵癌患者でも一定数存在することを発見し、化学療法の有効性予測バイオマーカーとなり得るか検討した。膵癌化学療法患者の血清を使用し、間接ELISA法で血清中抗PD-1抗体価を測定した。血中抗PD-1抗体価が高値群は低値群と比較して有意に生存期間が延長しており、抗腫瘍効果では、DCRが高値群で有意に高いことが判明した。切除検体を用いて腫瘍部のPD-L1染色と抗PD-1抗体価の関連性を検討したが、有意な関連はなく、抗体産生は個体差によるものと推測している。抗PD-1抗体陽性患者はPD-1-PD-L1結合を阻害し、細胞免疫活性に寄与すると推測する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、多くの癌種での有用性が報告されているチェックポイント阻害剤であるが、膵癌に対しては効果が乏しいとされている。今回の検討で血清中にPD-1に対する自己抗体があることが判明し、抗体価が高い群では、生命予後が良好で、抗腫瘍効果が良好な結果であった。抗PD-1抗体価が高い状態では、PD-1-PD-L1の結合を阻害することで細胞免疫が活性化していると考えられる。逆に抗体価が低い症例では、既存のPD-1抗体の使用により抗腫瘍効果を示すことも期待される。細胞性免疫の活性化には、膵癌特有の線維化なども関与しており、一元的には論述できないが、腫瘍側因子も整理していく事で、次世代の治療に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We discovered that there is a certain number of pancreatic cancer patients who test positive for antibodies of PD-1 molecule, and investigated whether this could serve as a biomarker for predicting the effectiveness of chemotherapy. We measured the anti-PD-1 antibody levels in the serum of pancreatic cancer patients undergoing chemotherapy using an indirect ELISA method. The patients with high anti-PD-1 antibody group had a significantly longer survival compared to the patients with low-antibody group, and we found that the disease control rate (DCR) was significantly higher in the high antibody group. We investigated the correlation between PD-L1 staining in the tumor site and anti-PD-1 antibody using resected samples, however any significant correlation were found. We guess that antibody production may depend on the individual. We hypothesize that PD-1 antibody-positive patients inhibit PD-1-PD-L1 binding and contribute to cellular immune activity.

研究分野：消化器病

キーワード：膵癌 抗PD-1抗体 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

膵癌は増加してきており、未だ大多数が進行した状態で発見され、根治的外科切除が困難である。一方で、新規抗癌剤プロトコール (FOLFIRINOX、GEM+nabPTX) が登場し、切除不能例に対して施行されてきているが、治療効果は十分とは言えない。

近年、癌治療の方向性の一つとして、免疫医療、特に抗体医療が注目されている。悪性黒色腫からはじまり種々の癌腫に対する抗体医薬として、免疫抑制分子 Programmed cell death (PD)-1 に対する抗体 (抗 PD-1 抗体) は、その有用性が認められ、消化器系固形癌では進行胃癌が保険適応となり、他癌種に対しても多くの治験が行われている。抗 PD-1 抗体は抑制された癌免疫を回復させることで広範な癌腫に対する有効性を引き出しているが、膵癌は効果が低いことが示されている。その原因として、膵癌細胞そのものが免疫治療反応性低い可能性と、膵癌の組織学的特徴である癌周囲の線維増生 (間質線維化反応) の影響が想定されている。しかし線維成分の除去や線維化関連細胞の抑制は腫瘍自体の増生を促すことが示され、腫瘍周囲の線維増生は癌増殖の制御の役割も担っていることが想定されており、適度な制御が困難な病態と理解されている。免疫治療をより有効に作用させるためには、このような腫瘍環境の状態評価と治療法の組み合わせを考えていかねばならないであろう。

我々は、現在までに血液中に存在する自己抗体の病態への関与を検討してきた。その中で抗 PD-1 抗体の ELISA による測定アッセイの確立は特許を取得しており、臨床病態との関連性評価は、自己免疫性肝炎の病態との相関により示している (J Gastroenterol Hepatol. 2014)。自己免疫性肝炎の病態進展に PD-1 の発現低下が関係し、PD-1 ノックアウトマウスで胸腺摘出を行うと自己免疫性肝炎様の病態を呈することから自己免疫性肝炎で検討を行っていたが、抗 PD-1 抗体が癌免疫療法として有用であることから、癌病態との関連についての検討を開始した。

2. 研究の目的

本研究は膵癌患者において血液中に自然に誘導される抗 PD-1 抗体の臨床経過との関連を明らかにし、抗 PD-1 治療抗体の有用性を高める生体環境調節法を開発することを目的としている。

近年、多くの癌種での有用性が報告されているチェックポイント阻害剤であるが、膵癌に対しては効果が乏しいとされている。しかしながら、抗 PD-1 治療抗体は単独では膵癌に対して有効性は低いとされているが、現在様々な組み合わせが試行中で、Phase I 臨床試験の中には制御性 T 細胞を抑制する治療との組み合わせで Partial response 7%、Stable disease 33% (Clin Cancer Res. 2019) といった期待できる結果も散見されるようになってきている。すなわち、抗 PD-1 治療抗体が効かないというより不十分であることが予測され、1~2%ということではなく、ある程度の割合で、効果が期待できる症例は存在するはずであり、有効症例の同定は、強く望まれている。肺癌などでは組織中の PD-L1 発現 (≧1%) が治療適応推奨としてガイドラインに掲載されており、PD-1/PD-L1 の生体側の発現状況は、抗体医薬の効果予測として妥当なものである。癌患者での癌側の PD-L1 発現や血液中の T 細胞など免疫細胞での PD-1 発現などの有効性マーカーとしての評価は既報があるが、本研究のように自然発生している生体内の自己抗体についての検討は無い。癌組織での PD-L1 発現解析は、手術で全体像がつかめないと、散在性に発現が分布している膵癌組織では過小評価になってしまう (J Gastroenterol 2019) し、血液中の T 細胞などはフローサイトメトリーなど高額かつリアルタイムでの解析が必要になり、広く実用に供することが難しい。我々の検討している血液中抗 PD-1 抗体測定は、全患者で採取可能な血液により評価可能で、安価で安定性の高い ELISA 法であり、現在行われている方法に比較し優位性を有している。

3. 研究の方法

①本研究で予定された方法は、主に以下の3点である。

①-1. 血清中抗 PD-1 抗体価は切除組織の PD-L1 発現に関連しているか？

・血清中抗 PD-1 抗体価の測定は間接 ELISA 法を用いて健常人 (コントロール) との相対比を用いて比較した。Recombinant PD-1 (Abnova) を使用し、マイクロプレートリーダー (model 680) を用いて吸光度 630nm で測定した。

・切除組織の PD-L1 染色は過去に我々が報告した染色法と同様に 10%ホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いて、Anti-PD-L1 antibody (Cell Signaling) で染色を行い、病理医により陽性、陰性の評価を行った (J Gastroenterol 2019)。

①-2. 血清中抗 PD-1 抗体価は、切除・抗ガン剤治療などの効果や生命予後と相関しているか？

①-3. 抗 PD-1 抗体価と以下の検討を統合し、自己抗体出現メカニズムを明らかにする。

①-3-1 末梢血リンパ球の活性化状況を CD28 陽性 CD8T 細胞・Th1/Th2-CD4T 細胞バランスなど

により評価する

①-3-2 膵摘出標本とリンパ節転移摘出標本を用いて、PD-L1 発現・腫瘍周囲線維化の評価を行う。CD80 (PD-L1 機能阻害作用を有する) など免疫活性化マーカー・αSMA など線維化関連マーカーの評価も行い、免疫・線維化状態の評価を行う。

①-3-3. 自己抗体出現メカニズムの一つとして、膵臓へも浸潤して免疫活性化に影響していると考えられている腸内細菌叢について抽出・網羅的解析を検討する。

以上の検討項目のうち、①-1、①-2、①-3-2 については期間内に検討可能であったが、①-3-1、①-3-3 については期間中に検討ができておらず、今後の検討課題とした。

②PD-L1 に関連した追加検討として、胆道癌の生検検体 (内視鏡検体および肝生検) を用いたバイオマーカー検索の可能性を検討するため、胆道癌に対して免疫チェックポイント阻害剤の有効性が示されている PD-L1 に注目し、胆道癌患者の生検検体と切除検体での PD-L1 染色を行い、一致率を検討した。

4. 研究成果

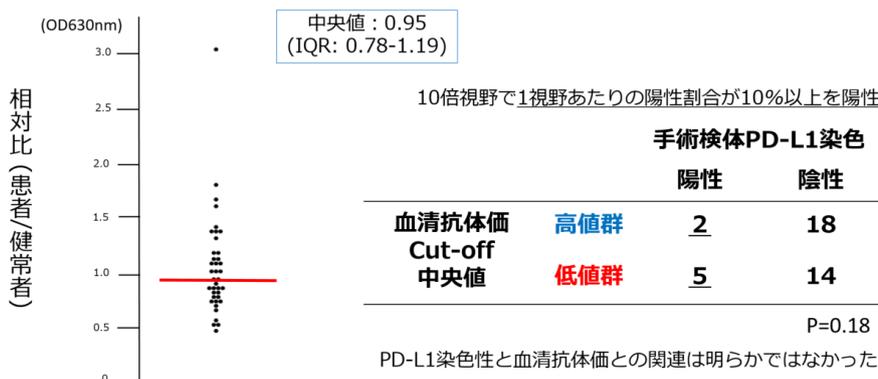
①-1 血清中抗 PD-1 抗体価は切除組織の PD-L1 発現に関連しているか?

膵臓癌手術 39 症例の手術・抗がん剤治療前の保存血清から ELISA 測定を行い、抗 PD-1 抗体測定をおこなった。抗 PD-1 抗体値の中央値は 0.95 OD630nm であり、中央値をカットオフとし、抗体値高値群と低値群に群別化した。

PD-L1 染色は 10 倍視野での PD-L1 陽性細胞数を目視でカウントし、1 視野あたりの陽性割合が 10%以上を陽性と定義した。陽性例は 18%(7/39)、陰性例は 82%(32/39)であった。下記に結果のプロット図、および 2×2 表を示す。今回の検討結果では切除検体の PD-L1 染色性と血清抗体価との関連は明らかではなかった。考察としては、切除例での検討となるため、ステージが非転移症例に限定せざるを得ず、転移をきたしている状態と全身の免疫バランスの違いはある可能性があると考ええる。または、抗 PD-1 抗体は、腫瘍側因子により左右されるものではなく、体内で多く産生できる個体と、できない個体がある可能性を考えた。

血清抗 PD-1 抗体と切除標本での PD-L1 染色との関係

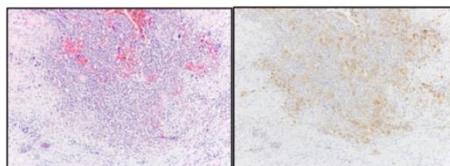
膵臓手術症例39例でのELISA測定結果とPD-L1染色結果



切除検体を用いた PD-L1 染色

PD-L1陽性の定義

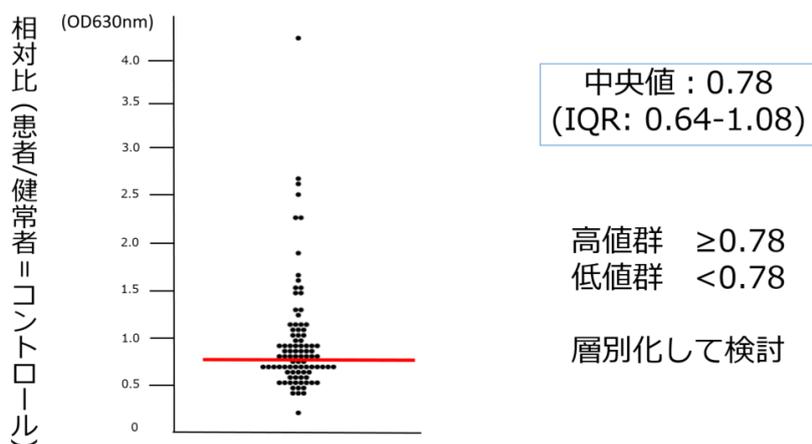
10倍視野でPD-L1陽性細胞数を目視でカウントし、1視野あたりの陽性割合が10%以上を陽性とした。



Matsumoto K. J Gastroenterol. 2019

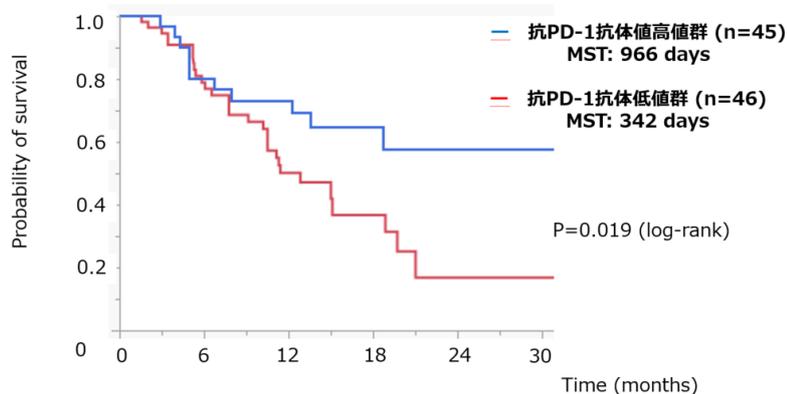
①-2. 血清中抗 PD-1 抗体価は、切除・抗がん剤治療などの効果や生命予後と関連しているか? 当院で膵臓癌に対して化学療法施行症例かつ抗体測定可能であった 91 例について検討を行った。患者背景は年齢中央値 69 歳、男性 47 例、腫瘍径中央値 33mm、腫瘍マーカー CEA 4.0 ng/mL、CA19-9 275 U/mL、c Stage、IIA/IIB/III/IV が 7/3/21/60 例で、7 割弱が Stage IV であった。初回化学療法のレジメンは GnP/mFFX/GS/GEM or S1 単剤が 64/20/3/4 例で、7 割が GnP を使用していた。ELISA による抗 PD-1 抗体価のプロット図を示す。中央値 0.78 OD630nm であり、中央値をカットオフとして高値群と低値群で比較検討をした。なお、高値群と低値群での患者背景の比較では差異がある項目はなかった。

化学療法症例 91 例の血清抗 PD-1 抗体価測定の結果



全症例での生存期間は中央値 453 日であった。これを抗 PD-1 抗体高値群と低値群に分けて検討すると、高値群では生存期間中央値 966 日、低値群で 342 日であり、高値群で有意に生命予後の延長を認めていた。

生存期間の比較 抗 PD-1 抗体高値群と低値群との比較

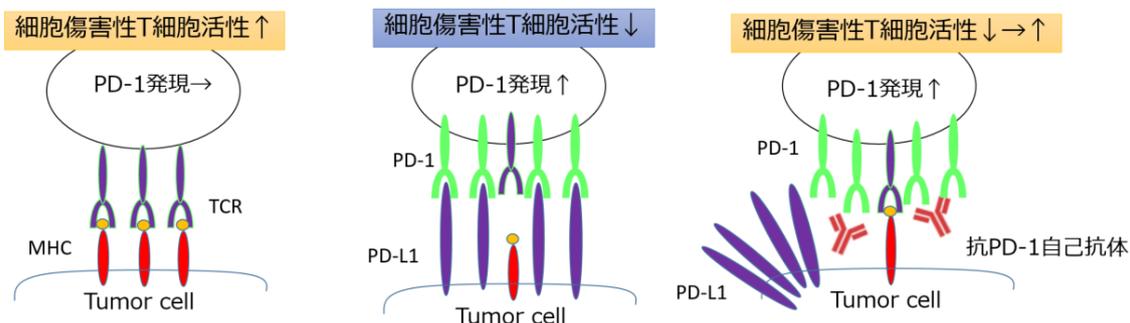


さらに、抗腫瘍効果について検討したところ、抗 PD-1 抗体高値群では ORR:16%、DCR:73%、低値群では ORR:11%、DCR:57%であり、高値群で DCR 率が有意に高い結果であった (P=0.02)。Cox 比例ハザードモデルを用いた生存に寄与する因子の検討では、腫瘍径 HR:3.70、Stage HR:6.17、抗 PD-1 抗体高値 HR:0.47 であり、生存に寄与する有意な因子であった。以上のことから、抗 PD-1 抗体は化学療法の奏功に関与し、生命予後の延長に寄与している可能性が考えられた。

下記にこれまでの結果から現段階の考察を示す。

個体の中で、抗 PD-1 抗体を高力価で産生できる個体が存在し、抗 PD-1 抗体は抑制された免疫反応を再賦活化すると考えている。T 細胞が TCR からの刺激で活性化したのち、PD-1 分子の発現後、腫瘍側の PD-L1 と結合し活性化が低下したのち、抗 PD-1 自己抗体は PD-1—PD-L1 結合を離すことで T 細胞の再活性化が起き、抗腫瘍効果を示すものと予測している。これらの仮説の証明には T 細胞の機能解析が必要であり、今後の課題としている。

仮説 抗 PD-1 抗体の働き方



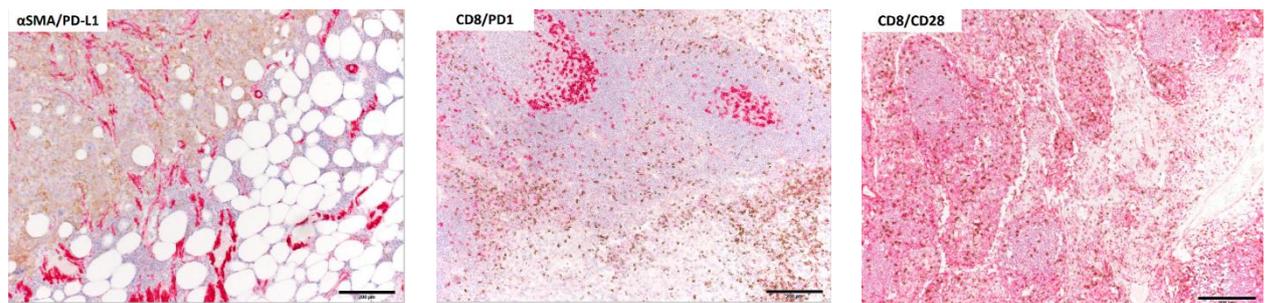
①-3. 抗 PD-1 抗体価と以下の検討を統合し、自己抗体出現メカニズムを明らかにする。

①-3-2 膵摘出標本とリンパ節転移摘出標本を用いて、PD-L1 発現・腫瘍周囲線維化の評価を行う。CD80 (PD-L1 機能阻害作用を有する) など免疫活性化マーカー・ α SMA など線維化関連マーカーの評価も行い、免疫・線維化状態の評価を行う。

標本の選定は、StageIII 以上は手術適応とならない為、リンパ節転移を有する StageIIB 症例とリンパ節転移を有さない StageI-IIA 症例とし、膵癌主病巣とリンパ節において、線維化の程度およびリンパ球の免疫応答関連マーカー発現を検討した。線維化の評価は α SMA 染色を用い、リンパ球の活性化状態の評価は、PD-1、CD45RO 染色を用いた。主病巣の膵癌主病巣では癌は強い線維化を伴っていることが、免疫細胞浸潤を拒絶している可能性があり、癌周囲の線維化関連マーカー発現の程度と免疫細胞の活性化状態について標本評価を行っている。リンパ節では通常線維化を伴っておらず、癌がむき出しの状態であるため、免疫応答が生じやすい状態と考えられる。リンパ節転移の有無により、免疫応答に違いがあるかをリンパ球活性化関連マーカーで検討し、血中の抗 PD-1 抗体価との関連を明らかにしていく。

現在、PD-L1 陽性/陰性、リンパ節転移陽性/陰性の 4 パターンを 2 症例ずつの免疫染色は終了しており、各発現バランスと予後等の調査を行っている。

各免疫マーカーと PD-L1,CD 8 との 2 重染色



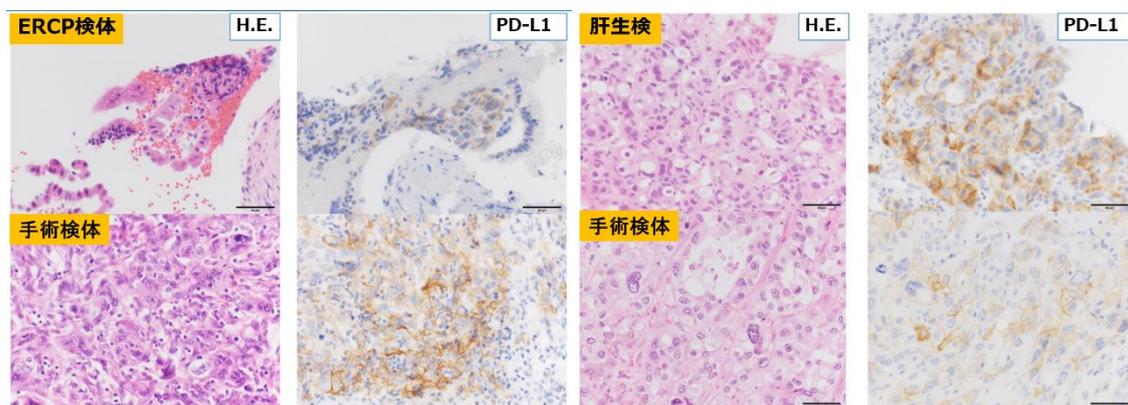
②胆道癌患者の生検検体と切除検体での PD-L1 染色性の一致率の検討

当院で胆道癌に対して術前生検後に切除を行い、十分な組織採取が可能であった 45 例を対象とした。胆道癌の内訳は胆管癌 17、肝内胆管癌 11、胆嚢癌 9 (うち 1 例は胆嚢 NEC)、乳頭部癌 8 であり、生検方法は ERCP 28、EUS-FNA 7、肝生検 10 であった。方法は、生検検体と手術検体の腫瘍部切片の PD-L1 免疫染色を行い、腫瘍細胞の陽性細胞数をカウントし、1 視野当たりの陽性割合を調べた。一致率の検討は手術検体を standard とし、PD-L1 陽性の cut-off 値を 10% に設定した。

切除検体の PD-L1 陽性率は 20% (9/45) であり、生検検体を使用した PD-L1 染色の陽性一致率は 56% (5/9)、陰性一致率は 100% (36/36)、正診率は 91% (41/45) であった。生検法別の正診率は ERCP 89% (25/28)、FNA 86% (6/7)、肝生検 100% (10/10) であり、生検部位別の正診率は胆管 86% (19/22)、乳頭 100% (7/7)、肝臓 92% (11/12)、リンパ節 100% (4/4) であった。また、PD-L1 陽性例は陰性例と比較し、診断時の腫瘍径が有意に大きく (36 mm vs 21 mm, $p=0.035$)、進行例 (pStage III or IV) が多く (67% vs 25%, $P=0.018$)、生命予後が不良であった (中央値 537 日 vs 1418 日, $p=0.041$)。生検検体を用いた PD-L1 染色は可能であり、抗体治療薬投与のコンパニオン診断として有用である可能性を見出した (J Gastrointest Surg. 2022)

同一症例での生検検体と手術検体での PD-L1 染色

(左：胆管癌 ERCP 検体と手術検体 右：肝内胆管癌 肝生検検体と手術検体)



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Matsumoto Kazuyuki, Ohara Toshiaki, Fujisawa Masayoshi, Takaki Akinobu, Takahara Masahiro, Kato Hironari, Yoshida Ryuichi, Umeda Yuzo, Yagi Takahito, Matsukawa Akihiro, Okada Hiroyuki	4. 巻 26
2. 論文標題 Diagnostic Utility of the PD-L1 Immunostaining in Biopsy Specimens of Patients with Biliary Tract Neoplasms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastrointestinal Surgery	6. 最初と最後の頁 1213 ~ 1223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11605-021-05197-6	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本和幸、高木章乃夫、高原政宏、小幡泰介、藤井佑樹、山崎辰洋、内田大輔、堀口繁、堤康一郎、加藤博也
2. 発表標題 膵癌化学療法における血中自己抗体を用いた治療効果予測の可能性
3. 学会等名 第109回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本 和幸、高木 章乃夫、大原 利章、藤澤 真義、高原 政宏、加藤 博也、吉田 龍一、榎田 祐三、八木 孝仁、松川 昭博
2. 発表標題 生検検体を用いた胆道癌におけるPD-L1発現の検討
3. 学会等名 JDDW 2022
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
研究協力者	高木 章乃夫 (Takaki Akinobu)		

6. 研究組織（つづき）

	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	大原 利章 (Ohara Toshiaki)		

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