

研究課題：高深度血漿プロテオーム解析による免疫チェックポイント阻害剤の効果予測法の開発

愛知県がんセンター
分子診断トランスレーショナルリサーチ分野 分野長
田口 歩
愛知県がんセンター
分子診断トランスレーショナルリサーチ分野 主任研究員
阿部 雄一

研究の背景・目的

免疫チェックポイント阻害剤 (immune checkpoint inhibitor; ICI) の登場により、生体の免疫が癌を拒絶し得ることが明らかとなり、癌免疫療法は、癌の4大治療法のひとつとしてその地位を確立した。しかし、ICI 単独療法での奏効率は10-40%と限定的である。また、ICI の特徴として、使用後に腫瘍が急速に増大する症例 (Hyperprogressive disease ; HPD) や、自己免疫性の免疫関連有害事象 (immune-related adverse event; irAE) として内分泌障害、間質性肺炎、大腸炎、肝炎、腎炎、皮膚障害などを起こす症例があることが知られている(文献1)。

腫瘍組織における ICI の効果予測因子として、腫瘍の体細胞突然変異数 (Tumor mutational burden; TMB)、腫瘍内免疫細胞浸潤量、腫瘍細胞における PD-L1 発現などが、抗腫瘍効果と関連することが示唆されてきた(文献2)。血液バイオマーカーについても、ctDNA と末梢血 CD8 陽性 T 細胞、末梢血 CD8 陽性 T 細胞のクローンサイズ、自己抗体の存在、血中 IL-8、エクソソームにおける PD-L1 発現、腸内細菌由来短鎖脂肪酸などと ICI の治療効果との関連が最近報告され、精力的に研究が進められている。その一方で、irAE の発症メカニズムについては、T 細胞が自己抗原を標的とする細胞性免疫のオフターゲット効果や、抗 CTLA-4 抗体が下垂体など CTLA-4 発現臓器を直接標的とする ICI のオフターゲット効果、免疫活性化に伴う IL-17 などのサイトカイン産生亢進、既存の自己抗体活性化などがあげられているが、irAE の発症や標的臓器を予測できるようなバイオマーカーの同定は行われていない(文献3)。HPD や irAE などの副作用には用量依存性がなく、治療レジメンから予測することは困難である上に、重篤な場合は致死的でもあることから、ICI

の効果だけでなく、HPD や irAE の発症を、その使用前に予測できるバイオマーカーの開発は、喫緊の課題である。

血液、特に血漿中のタンパク質は、簡便かつ低侵襲、低コストで高スループットな診断法となりえることから、癌の早期診断、スクリーニング、治療個別化など、様々な臨床応用が可能なバイオマーカープラットフォームとして非常に有望である。本研究では、ICI が用いられた非小細胞肺癌患者において、血漿タンパク質と血漿抗原-自己抗体複合体の網羅的プロファイルによる液性免疫応答ダイナミクスを解析した。これにより、ICI に対する治療反応性予測、副作用、特に irAE 予測に有用なバイオマーカーの探索同定と、それを用いた診断法の開発を目指す。

研究の対象ならびに方法

本研究は、名古屋大学医学部糖尿病・内分泌内科学（有馬寛教授、岩間信太郎講師）との共同研究である。非小細胞肺癌 9 症例において、ICI 投与前と投与 6 週間後あるいは irAE 発症時に採取された血漿検体を解析に用いた。各血漿検体から Protein A/G を用いて免疫グロブリンを回収し、抗原-自己抗体複合体の質量分析を行った。血漿タンパク質解析については、バイオマーカーの候補となる低濃度血漿タンパク質を十分同定するために、サンプルを 30 個に分画して質量分析を行った。

結果

申請者らが以前開発した抗原-自己抗体複合体の解析プロトコル(文献 4)では、画分中に濃縮された免疫グロブリン量が著しく多いために、微量な免疫グロブリン結合タンパク質の同定感度が落ちてしまう点が問題であった。そこで、今回免疫グロブリン抗体固相カラムの溶出 pH 条件の最適化と SDS-PAGE による免疫グロブリン除去により、従来法に比べて約 3 倍となる、500 個を超える免疫グロブリン結合タンパク質が同定可能な高感度測定系を構築した(図 1 左)。

改良したプロトコルに基づく抗原-自己抗体複合体解析では、計 2141 個のタンパク質が同定定量でき、極めて高感度な自己抗体プロファイリ

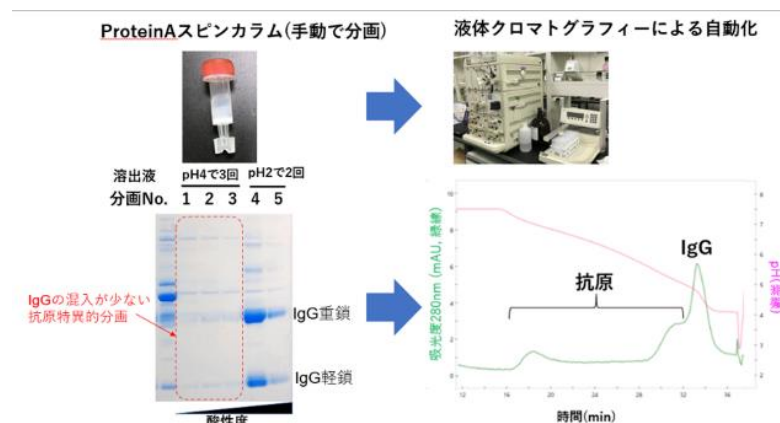


図 1：血中抗原-自己抗体複合体の網羅的プロファイリング

ングが可能となった。ICI 投与前と irAE 発症時の自己抗体プロファイルと比較したところ、興味深いことに、一群の自己抗体が irAE 発症後に大きく変動していることを見出した。例えば、ICI 投与後に間質性肺炎を発症した 1 例については、肺特異的な発現を示すタンパク A に対する自己抗体が、間質性肺炎発症時に ICI 投与前の約 20 倍に増加していた(図 2)。

考察

本研究において、高感度抗原-自己抗体複合体解析法の開発に成功した。現在は更に高感度化、ハイスループット化を目指して、液体クロマトグラフィーを導入した高精度な分離、自己抗原回収システムを開発している(図 1 右)。また、血漿タンパク質解析においても、プロトコルの最適化を行い、現在解析中である。本研究で同定された自己抗体については、愛知県がんセンター病院呼吸器内科部で集積された血漿検体を用いた検証を進めている。

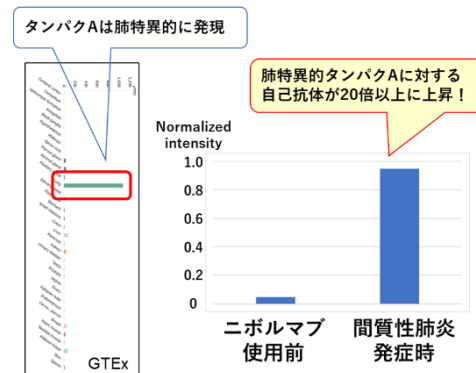


図 2：血中抗原-自己抗体複合体の解析例

文献

1. Martins F, Sofiya L, Sykietis GP, Lamine F, Maillard M, Fraga M, Shabafrouz K, Ribi C, Cairoli A, Guex-Crosier Y, Kuntzer T, Michielin O, Peters S, Coukos G, Spertini F, Thompson JA, Obeid M. Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance. *Nat Rev Clin Oncol.* 16(9):563-580. 2019.
2. Havel JJ, Chowell D, Chan TA. The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 19(3):133-150. 2019.
3. Postow MA, Sidlow R, Hellmann MD. Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med.* 378(2):158-168. 2018.
4. Capello M, Vykoukal JV, Katayama H, Bantis LE, Wang H, Kundnani DL, Aguilar-Bonavides C, Aguilar M, Tripathi SC, Dhillon DS, Momin AA, Peters H, Katz MH, Alvarez H, Bernard V, Ferri-Borgogno S, Brand R, Adler DG, Firpo MA, Mulvihill SJ, Mollrem JJ, Feng Z, **Taguchi A**, Maitra A, Hanash SM. Exosomes harbor B cell targets in pancreatic adenocarcinoma and exert decoy function against complement-mediated cytotoxicity. *Nat Commun.* 16;10(1):254. 2019.