

悪性腫瘍治療研究部

教授：本間 定 腫瘍免疫学
 准教授：小井戸薫雄 消化器病学，特に膀胱癌の診断と治療
(内科学講座(消化器・肝臓内科)より出向中)
 講師：伊藤 正紀 分子生物学
 講師：赤崎 安晴 悪性脳腫瘍の診断と治療
(脳神経外科学講座より出向中)

教育・研究概要

I. 免疫チェックポイント分子の機能的細胞アッセイ
 免疫チェックポイント阻害剤(抗 programmed cell death (PD)-1 抗体)による腫瘍免疫療法が多くのがんで有効性を示している。しかしながら、腫瘍における PD-L (programmed cell death ligand) 1 の発現と PD-1 抗体の治療効果に必ずしも相関が見られていない。PD-1 は免疫関連チロシンモチーフ (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif と immunoreceptor tyrosine-based activation motif) を持っている。PD-L1 と PD-1 の結合により PD-1 の細胞質領域に Src-homology 2 domain-containing phosphatase (SHP)-2 フォスファターゼの誘引が起こる。我々は T 細胞受容体非依存性条件下で PD-L1 と PD-1 の結合により引き起こされる PD-1 への SHP2 の誘引を機能的に評価する細胞アッセイ系の開発を行った。PD-1 と SHP-2 の結合を検出するために、分割型の生物発光レポーターシステムを使用した。PD-L1 および PD-L2 を発現する樹状細胞は強い PD-1 活性化を示したが、腫瘍細胞の PD-L1 発現量と PD-1 活性化能は相関しなかった。このシステムは PD-1 シグナルに影響する分子の探索に有効である。

II. 樹状細胞療法のバイオマーカー探索のための多形性膠芽腫 (GBM) の網羅的遺伝子発現解析

GBM に対する樹状細胞療法の効果を予測するバイオマーカーを決定する目的で、次世代シーケンサー (NGS) を用いて凍結保存された腫瘍細胞の遺伝子発現を網羅的に解析した。NGS は Torrent-Suite (ThermoFisher) を使用し、whole transcriptome 解析により発現している転写産物のリストを作製した。有効群 4 例、無効群 4 例の腫瘍細胞で比較を行うと、無効群は有効群に比較して好中球活性化に関与するサイトカイン、ケモカイン遺伝子の高発現が認められた。好中球は抗腫瘍免疫における中

心的な効果細胞である細胞障害性 T 細胞の活性を抑制する事が知られている。無効群の腫瘍細胞に好中球関連の遺伝子が高発現することは、樹状細胞ワクチンにより誘導された T 細胞を介した抗腫瘍免疫が好中球の腫瘍微小環境へのリクルートにより阻害されていることを強く示唆する。腫瘍細胞に発現する好中球関連遺伝子は樹状細胞療法の効果予測バイオマーカーである可能性が示唆された。

III. 新たな膀胱癌治療の標的分子としての Claudin (CLDN) 7

腫瘍組織は極めてヘテロな特性を示す腫瘍細胞の集合体であり、腫瘍の進展とともに活発な増殖能を示す悪性度の高い細胞群が優位となると考えられる。これらの悪性度の高い細胞に特異的に発現する遺伝子は新たな治療標的分子となる可能性が高い。ヒト膀胱癌細胞株 MIA PaCa2 から single cell cloning により上皮性形態の A 細胞、非上皮性形態の R 細胞を単離した。A 細胞は R 細胞に比較して in vitro、及び SCID mouse 移植下の in vivo において明らかに増殖能が高く、さらに代表的な膀胱癌に対する抗がん剤 gemcitabine に対する抵抗性も高かった。A 細胞と R 細胞の遺伝子発現を DNA マイクロアレイ法を用いて網羅的に解析すると、A 細胞において細胞接着関連分子の CLDN family の一つである CLDN7 の発現が R 細胞に比較して有意に高いことが明らかとなった。A 細胞から siRNA 法を用いて CLDN7 の遺伝子発現をノックダウンすると、A 細胞の活発な増殖は著明に抑制された。CLDN7 は膀胱癌において増殖能が強く悪性度の高い腫瘍細胞群に発現して膀胱癌の進展に重要な役割を果たす遺伝子と考えられ、膀胱癌の新たな治療標的分子としての可能性を有している。

IV. ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染肺がんにおける PD-L1 発現の意義

近年の抗ウイルス療法の発展により HIV 感染患者の予後は飛躍的に改善したが、経過中悪性腫瘍の発生を見る例が少なくなく、肺癌はその中心的な存在である。都立駒込病院呼吸内科との共同研究で HIV 感染肺がん患者の腫瘍組織に発現する PD-L1 の臨床的意義を検討した。腫瘍組織における PD-L1 の発現はヒト PD-L1 抗体 (Cell Signaling Technology) を用いた免疫組織化学的解析で行った。解析の結果、従来の報告と同様に HIV 感染肺がん患者の予後は HIV 非感染肺がん患者に比較して不良であったが、HIV 感染肺がんの中で腫瘍組織に PD-

L1の発現が認められる症例は認められない症例に比較して有意に生存期間が短く、極めて予後不良であった。一方、HIV非感染肺がん症例では腫瘍組織におけるPD-L1発現の有無は予後に影響しなかった。HIVに対する抗ウイルス療法はウイルスの増殖は抑制するもののウイルスは残存するため、生体の免疫系は慢性的なウイルスの抗原刺激に暴露されT細胞は疲弊状態にあるといわれている。肺がん組織に発現するPD-L1はPD-1陽性の疲弊T細胞を不活化・アポトーシスに陥れるため、HIV感染肺がんにおいては肺がん組織のPD-L1発現はT細胞による抗腫瘍免疫をより強く抑制すると考えられる。

V. 進行膵癌患者における血中可用性PD-L1の産生機序の解析

これまでの研究により進行膵癌患者の末梢血中には健康人に比較して高い可溶性PD-L1 (sPD-L1)が存在することを示し、sPD-L1が膵癌の病態に関与する可能性を報告してきた。しかし、膵癌患者においてsPD-L1が腫瘍組織から産生されるのか、または免疫細胞などの非腫瘍細胞から産生されるのか明確ではなかった。今回、膵癌症例の臨床経過における各種マーカーと血中sPD-L1値の相関を検討すると、腫瘍組織のPD-L1発現、腫瘍マーカー値の変動や画像上の腫瘍の増殖と血中sPD-L1値は全く相関しないことが明らかとなった。一方、同一患者由来の末梢血単核球 (PBMC)、樹状細胞、培養がん細胞の3者の培養上清中のsPD-L1をELISA法で測定すると、樹状細胞の培養上清中には高いsPD-L1が認められたが、PBMCやがん細胞の培養上清中sPD-L1量は極めて低かった。以上より、がん患者血中sPD-L1は患者体内における樹状細胞の機能と深く関連している可能性が示唆された。

VI. 抗CD38抗体daratumumabを用いた肺がん治療の基礎的研究

抗CD38抗体製剤であるdaratumumabはantibody dependent cell-mediated cytotoxicityやcomplement dependent cytotoxicityを介したCD38発現腫瘍に対する抗腫瘍効果を示し、多発性骨髄腫に対する良好な治療成績が報告されている。一方、CD38は肺がん症例の一部にも発現が認められ、daratumumabを用いた肺がん治療が期待されている。われわれはヒト肺がん細胞株A549細胞にCD38が発現し、さらに、A549細胞をinterferon-gamma (IFN- γ)処理するとCD38の強い発現増強

が誘導されることを見出した。この研究成果をもとに、肺癌に対するdaratumumabとIFN- γ 併用療法の可能性をin vitro, in vivoの実験系を用いて検討している。

「点検・評価」

腫瘍免疫学は免疫チェックポイント阻害療法やCART療法が発表された2013年を区切りに大きく変貌を遂げた。かつて治療上重要視された腫瘍抗原に対する免疫反応の活性化の促進は過去のものとなり、抗腫瘍免疫のブレーキとなる免疫チェックポイント機構の遮断が予想をはるかに超えた高い治療効果を示す実例が数多く示され、腫瘍免疫学には大きなパラダイムシフトが訪れた。この大きなパラダイムシフトの中で、本研究室も昨年度から全く新しい方向へスタートを切り、本年度はその継続2年目であったといえる。未だ世界中で確立されていない全く新しい概念に基づく事象を対象としての研究は、目的に達するまでの多大な迂回、誤解、蹉跎を伴った。その分、多くの労力、時間、費用が特別な成果を上げることなく消費された時期であったといえる。しかし、スタート時点においてはこのような経過は不可避であり、このnegative dataをどのように明日に研究の発展に生かすかが問われている。翻って、この分野の基礎研究（臨床研究は既に全世界的に製薬会社のコントロール下にある）は、少なくとも国内においては多くの施設においても緒に就いたばかりの状態であり、優劣なく同時スタートを切ったともいえる。そのような意味からは、現時点は平等に独自性の高い研究を展開できる機会に富んだ状況下にあるともいえるため、よりユニークなアイデアと高い確実性に基づいた研究の遂行の努力が求められる。本年度が生みの苦しみの時期であったことを期待する。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Hayashi K, Nagasaki E, Kan S, Ito M, Kamata Y, Homma S, Aiba K. Gemcitabine enhances rituximab-mediated complement-dependent cytotoxicity to B cell lymphoma by CD20 upregulation. *Cancer Sci* 2016; 107(5): 682-9.
- 2) Akasaki Y, Kikuchi T, Homma S, Koido S, Ohkusa T, Tasaki T, Hayashi K, Komita H, Watanabe N, Suzuki Y, Yamamoto Y, Mori R, Arai T, Tanaka T, Joki T, Yanagisawa T, Murayama Y. Phase I/II trial of combination of temozolomide chemotherapy and im-

munotherapy with fusions of dendritic and glioma cells in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother* 2016; 65(12): 1499-1509.

- 3) Chiba M, Imazu H, Kato M, Ikeda K, Arakawa H, Kato T, Sumiyama K, Homma S. Novel quantitative analysis of the S100P protein combined with endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration cytology in the diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Oncol Rep* 2017; 37(4): 1943-52. Epub 2017 Feb 21.
- 4) Okuma Y, Hosomi Y¹⁾, Nakahara Y¹⁾, Watanabe K¹⁾ (¹Tokyo Metropolitan Hosp), Sagawa Y, Homma S. High plasma levels of soluble programmed cell death ligand 1 are prognostic for reduced survival in advanced lung cancer. *Lung Cancer* 2017; 104: 1-6.

II. 総説

- 1) Okamoto M (Kitasato Inst Hosp), Kobayashi M (Seren Clin Nagoya), Yonemitsu Y (Kyushu Univ), Koido S, Homma S. Dendritic cell-based vaccine for pancreatic cancer in Japan. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2016; 7(1): 133-8.
- 2) 林 和美, 本間 定. Gemcitabine 併用による CD20 発現増強を介した DLBCL に対する rituximab の増強効果. *血液内科* 2017; 74(1): 94-8.

III. 学会発表

- 1) 小井戸薫雄, 西田純幸, 石川 剛, 江川新一, 石井淳, 菅野良秀, 柳本泰明, 古倉 聡, 森本創世子, 大庭真梨, 江口英利, 島田英昭, 本間 定, 森田智視, 杉山治夫. (ミニシンポジウム 14 臓腑 7: 進行膵癌に対する治療戦略) 進行膵癌に対するゲムシタピン併用 WT1 ペプチドワクチン療法ランダム化第Ⅱ相臨床試験. 第 54 回日本癌治療学会学術集会. 横浜, 10 月.
- 2) 大熊裕介, 細見幸生, 弥勒寺紀栄, 渡邊景明, 中原善朗, 高橋 聡, 佐川由紀子, 本間 定. (ポスター) 進行肺がん患者における可溶性 PD-L1 高値は予後不良となる. 第 75 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月.
- 3) 鎌田裕子, 久原映子, 赤崎安晴, 本間 定. (口頭) 樹状細胞・腫瘍細胞融合ワクチンが有効であった膠芽腫の全エクソン解析による遺伝子変異の探索. 第 75 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月.
- 4) 佐川由紀子, 関 寿之, 鎌田裕子, 伊藤正紀, 岡本愛光, 本間 定. (ポスター) シスプラチン誘導性 PD-L1 発現増強はシスプラチン抵抗性卵巣癌では抑制されている. 第 75 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月.
- 5) 林 和美, 永崎栄次郎, 鎌田裕子, 伊藤正紀, 小井戸薫雄, 本間 定. (ポスター) ボルテゾミブは B 細胞リンパ腫の CD20 の発現を上昇させリツキシマブの抗腫瘍効果を高める. 第 75 回日本癌学会学術総会.

横浜, 10 月.

- 6) 本間 定, 佐川由紀子, 林 和美, 鎌田裕子, 伊藤正紀. (口頭) がん細胞のインターフェロン- γ 誘導性 PD-L1 発現阻止による免疫チェックポイント阻害療法. 第 75 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月.
- 7) 伊藤正紀, 林 和美, 南澤宝美后, 小井戸薫雄, 本間 定, 芝 清隆. (ポスター) Toll 様受容体 4 アゴニストモチーフ付加により抗原提示細胞のサイトカイン産生能を刺激する人工抗原ワクチンを作製する. 第 75 回日本癌学会学術総会. 横浜, 10 月.

IV. 著書

- 1) 本間 定, 鎌田裕子, 赤崎安晴. 第Ⅱ部: がん免疫療法の開発と臨床試験 第 4 章: 各種がん免疫療法の臨床試験と実際 6. 樹状細胞ワクチンと多形性膠芽腫. 河上 裕 (慶應義塾大) 編. *がん免疫療法: 腫瘍免疫学の最新治験から治療法のアップデートまで (実験医学 2016 年増刊 34 巻 12 号)*. 東京, 羊土社, 2016. p.179-83.