

|                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title            | 悪性黒色腫の免疫療法耐性細胞分画のマーカー探索、及び耐性機序の解明と克服法の開発                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Sub Title        | Identification of the sub-population in human malignant melanoma showing strong resistance to tumor specific cytotoxic T cells                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Author           | 谷口, 智憲(Yaguchi, Tomonori)<br>河上, 裕(Kawakami, Yutaka)<br>猪爪, 隆史(Inozume, Takashi)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Publisher        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Publication year | 2018                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Jtitle           | 科学研究費補助金研究成果報告書 (2017. )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| JaLC DOI         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Abstract         | <p>悪性黒色腫は, 免疫療法が標準治療法の一つとして認められつつある。しかし, 治療不応例も多数存在し, 効く症例を見分けられるマーカー, 及び治療不応の分子機序の解明と克服法の開発が課題である。本研究では, 悪性黒色腫において, 免疫抑制を誘導して免疫療法耐性となる細胞分画を定義できるマーカーの同定を試みた。その結果, 抗腫瘍T細胞に対して耐性となる細胞集団を定義できる3つの細胞表面マーカーを同定し, さらにそのうちの一つのマーカーに関して, 抗腫瘍T細胞耐性の原因となる遺伝子の一つ, マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析で同定した。これらの分子は, 治療標的や, 治療マーカーとなる可能性が示唆された。</p> <p>Although cancer immunotherapies have become one of the major treatment for malignant melanoma (MM), only 20-30% of patients can show objective clinical responses. Unresponsiveness to immunotherapies may be mediated by numerous immunosuppressive mechanisms that inhibit anti-tumor T-cell responses. Thus, combined therapies that can reverse immunosuppression in non-responders and identification of biomarkers for responders are urgently needed. In this study, we have identified three cell surface markers which could define particular subpopulation showing resistance to tumor antigen specific cytotoxic T cells. Moreover, by cDNA microarray analysis, we also identified the one responsible gene that directly caused this resistance. These results indicate that these cell surface markers and the gene may be potential biomarkers for the prediction of responders for immunotherapies and could be used as attractive therapeutic targets in MM.</p> |
| Notes            | <p>研究種目：基盤研究(C)(一般)</p> <p>研究期間：2015～2017</p> <p>課題番号：15K09783</p> <p>研究分野：腫瘍免疫学</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| Genre            | Research Paper                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| URL              | <a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K09783seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_15K09783seika</a>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様 式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09783

研究課題名 (和文) 悪性黒色腫の免疫療法耐性細胞分画のマーカー探索、及び耐性機序の解明と克服法の開発

研究課題名 (英文) Identification of the sub-population in human malignant melanoma showing strong resistance to tumor specific cytotoxic T cells

研究代表者

谷口 智憲 (Yaguchi, Tomonori)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町) ・講師

研究者番号：40424163

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,800,000 円

研究成果の概要 (和文) : 悪性黒色腫は、免疫療法が標準治療の一つとして認められつつある。しかし、治療不応例も多数存在し、効く症例を見分けられるマーカー、及び治療不応の分子機序の解明と克服法の開発が課題である。本研究では、悪性黒色腫において、免疫抑制を誘導して免疫療法耐性となる細胞分画を定義できるマーカーの同定を試みた。その結果、抗腫瘍T細胞に対して耐性となる細胞集団を定義できる3つの細胞表面マーカーを同定し、さらにそのうちの一つのマーカーに関して、抗腫瘍T細胞耐性の原因となる遺伝子をつ、マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析で同定した。これらの分子は、治療標的や、治療マーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : Although cancer immunotherapies have become one of the major treatment for malignant melanoma (MM), only 20-30% of patients can show objective clinical responses. Unresponsiveness to immunotherapies may be mediated by numerous immunosuppressive mechanisms that inhibit anti-tumor T-cell responses. Thus, combined therapies that can reverse immunosuppression in non-responders and identification of biomarkers for responders are urgently needed. In this study, we have identified three cell surface markers which could define particular subpopulation showing resistance to tumor antigen specific cytotoxic T cells. Moreover, by cDNA microarray analysis, we also identified the one responsible gene that directly caused this resistance. These results indicate that these cell surface markers and the gene may be potential biomarkers for the prediction of responders for immunotherapies and could be used as attractive therapeutic targets in MM.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：悪性黒色腫 免疫療法

## 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫では、最近、抗 CTLA-4 抗体、抗 PD-1 抗体などの免疫チェックポイント阻害薬や、培養 T 細胞を用いた養子免疫療法などが相次いで開発され、進行がんに対して劇的な抗腫瘍効果を示した。抗 PD-1 抗体は、世界で始めて本邦で承認され、悪性黒色腫では、がん免疫療法が標準治療の一つとなりつつある。ただし、どの治療にも、少なからず不応例があり、改良の余地がある。不応例が見られる一つの理由は、適切な患者集団を選べて無いからである。例えば、抗 PD-1 抗体療法では、治療前に CD8+T 細胞の浸潤が多く、がん組織での PD-L1 の発現が多い症例で奏効し、逆に CD8+T 細胞の浸潤が無い症例は、殆ど奏効しない。すなわち、免疫療法のこれからの課題は、患者の抗腫瘍免疫応答を正しく評価出来るマーカーを開発し、適切に免疫状態を評価し、様々な免疫療法、化学療法から、患者の病態にあった治療を選択する個別化治療を実施することである。

この患者の抗腫瘍免疫応答は、がんの抗原性と免疫抵抗性のバランスで決定され、患者個々人で様々である。これらは、がん細胞と、患者の免疫機能の両方の性質（遺伝的背景や環境因子）で規定されるであろうが、詳細は分かっていない。治療を考える上では、がんの抗原性をいかに上げるか、免疫抵抗性をいかに下げるかが重要である。昨今、劇的な治療効果を示している免疫チェックポイント阻害薬も、この免疫抵抗性を解除することが作用機序の一つである。この治療が良好な治療成績を示したという事は、免疫抵抗性を解除する事の重要性を示しており、免疫抵抗性のメカニズムを解析し、さらなる新しい免疫抵抗性改善法を開発する事は意義ある事である。

研究代表者は、このがんの免疫抵抗性のメカニズムとその克服法について研究をしてきた。具体的には、がん組織中で、がんシグナルの活性化が見られるがん細胞分画は、その下流で様々な免疫抑制分子を異所性に発現し、免疫抵抗性を獲得していることを提唱してきた(Yaguchi et al. J Immunol 2012)。すなわち、不均一(heterogeneity)ながん組織では、分画ごとに免疫学的に異なる性質を持ち、中には免疫抵抗性をもつ分画が存在し、免疫療法の不応答に関与している可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、悪性黒色腫において、がん組織の中でも、不均一(heterogeneity)に発現する分子マーカーの中から、免疫抑制を誘導して免疫療法耐性となる細胞分画を定義できるマーカーの同定を試みた。そして、同定

されたマーカーを用いて、免疫療法に耐性を持つ分画の性質や耐性の機序を解析することで、その克服法を開発し、現在の免疫療法との併用で臨床効果の改善することを目的とした。

## 3. 研究の方法

（１）悪性黒色腫における細胞膜表面分子の発現の評価と、そのマーカー発現に基づく細胞分離

これまでにヒト悪性黒色腫で発現が報告されている細胞膜表面分子 18 種類について、それぞれに対する PE 標識モノクローナル抗体(Biolegend 社、BD Biosciences 社)を用いて、ヒト悪性黒色腫細胞株 9 種類を染色した。そして、その発現を、FACS(Gallios (Beckman coulter 社))を用いて解析した。また、これらの膜表面分子の発現の陽性、陰性分画をそれぞれ、FACS Aria II(BD Biosciences 社)を用いて分離した。

（２）細胞株、腫瘍浸潤 T 細胞(TIL)の培養

ヒト悪性黒色腫細胞株は、RPMI1640 に 10% FCS を加えた培養液で培養した。TIL は、ヒト悪性黒色腫組織片より、分取した T 細胞を RPMI1640 に 10% ヒト血清、ヒト IL2 (6000 IU/ml, Novartis 社)を加えた培養液で、培養した(Yaguchi T et al. Cell Mol Immunol. In press)。

（３）悪性黒色腫の MART-1 特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)に対する感受性の評価

MART-1 特異的 CTL(MART-1-T 細胞)は、過去に報告されているとおり(Johnson LA et al. Blood: 114, 535-46, 2009)、ヒト末梢血由来活性化 T 細胞に、腫瘍抗原 MART-1 特異的 T 細胞レセプター遺伝子をレトロウイルスを用いて導入し、作製した。

作製した MART-1-T 細胞( $0.1-1 \times 10^5$ )と各種悪性黒色腫細胞株( $0.1-1 \times 10^5$ )を 96 ウェルプレート中で共培養を 24 時間し、培養上清中に産生される IFN- $\gamma$  の産生量を、ELISA 法を用いて測定した(IFN- $\gamma$  放出試験)。また、MART-1-T 細胞と、 $^{51}\text{Cr}$  を取り込ませた各種悪性黒色腫細胞株( $5 \times 10^3$ )を 50:1 から 1.56:1 の比率で 96 ウェルプレート中で共培養を 4 時間し、培養上清中に放出された  $^{51}\text{Cr}$  を測定し、MART-1-T 細胞に殺傷された悪性黒色腫細胞の割合を算出した( $^{51}\text{Cr}$  遊離アッセイ)。

（４）マウスモデル

マウス MHC class I および II をダブルノックアウトした NOG(NOG-dKO)マウス (Yaguchi T et al. Cell Mol Immunol. In press) に、ヒト悪性黒色腫細胞株 Mel2 を皮下移植した後、Mel2 と同一患者由来の TIL である TIL2 を投与した。35 日後に、腫瘍組織を取り出し、コラゲナーゼで細胞を処理した後、CD271 の発現を FACS(Gallios)で解析した。

#### (5) 網羅的遺伝子発現解析

ヒト悪性黒色腫細胞株を細胞膜表面分子の発現に基づき、陽性分画と陰性分画に分離し、それぞれの RNA を RNeasy(QuiaGen 社)を用いて抽出し、マイクロアレイ (Clariom S, Affymetrix 社)を用いて、発現遺伝子を網羅的に解析した。

#### (6) siRNA

目的の遺伝子を、悪性黒色腫において、siRNA (Silencer® Select siRNA, Ambion 社)を導入することで、ノックアウトした。ノックアウト効率は、qPCR で確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) ヒト悪性黒色腫細胞株における各種細胞膜表面分子の発現解析

これまでヒト悪性黒色腫組織で発現が報告されている表面抗原 18 種類に関して、9 種類のヒト悪性黒色腫細胞株で、発現様式を FACS で解析した。その結果、5 つ以上細胞株で、図 1 に示すような、その発現様式に不均一性 (heterogeneity) を示した表面抗原を 5 つ同定した。

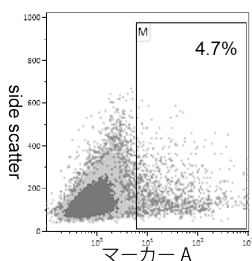


図 1 培養ヒト悪性黒色腫細胞株で、ある細胞膜表面分子の発現は heterogeneity を示した。

(2) ヒト悪性黒色腫細胞株において、ある膜表面分子の発現の陽性分画と陰性分画では、腫瘍抗原特異的 T 細胞の感受性に差がある。

その発現に不均一性が認められた細胞膜表面分子 5 つに関して、陽性分画と陰性分画に分離し、MART-1 特異的 CTL (MART-1-T 細胞) に対する感受性を、評価した。その結果、CD271 に関しては、その陽性分画は、陰性分画に比べて、MART-1-T 細胞に対して耐性であること (図 2)、さらに二つの細胞膜表面分子に関しては、その陰性分画は、陽性分画に比べて、MART-1-T 細胞に対して耐性であることがわかった。

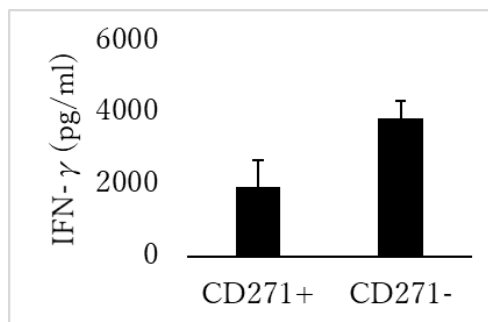


図 2 培養ヒト悪性黒色腫細胞株で、CD271 陽性、陰性分画を分離し、MART-1 特異的 T 細胞と 24 時間共培養し、IFN- $\gamma$  の濃度を測定した。

#### (3) CD271 陽性悪性黒色腫細胞分画は、TIL 療法後に増加する

NOG-dKO マウスにヒト悪性黒色腫細胞株 Mel2 を移植し、同一患者由来の培養した TIL2 を投与し、治療後 35 日後に、腫瘍の CD271 分画を FACS で評価すると、治療群では、CD271 陰性分画が減り CD271 陽性分画の方が優位になっていた (図 3)。この結果より、*in vivo* においても CD271 陽性分画は、CTL に耐性であり、治療後に残存する可能性、T 細胞浸潤により CD271 が発現し、耐性能を獲得する可能性などが考えられた。

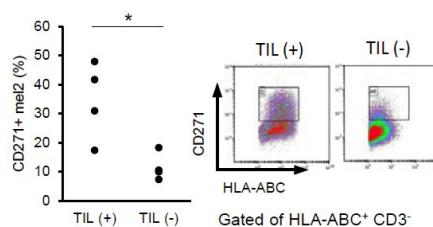


図 3 NOG-dKO マウスに Mel2 を移植し、同一患者由来の TIL2 で治療 35 日後に腫瘍細胞の CD271 の発現を FACS で解析した。

#### (4) 悪性黒色腫細胞株の MART-1-T 細胞に耐性となる原因の検索

ヒト悪性黒色腫細胞株で、その陰性分画が MART-1-T 細胞に耐性となっている細胞膜表面分子に関して、陽性分画と陰性分画の遺伝子発現を網羅的にマイクロアレイを用いて比較解析した結果、細胞の運動に関与する遺伝子が陰性分画に二倍以上多く発現しており、さらに、この遺伝子を siRNA を用いてノックアウトすると、MART-1-T 細胞に対する感受性が増強された。このことより、この遺伝子は、T 細胞をエフェクター細胞とする免疫療法の効果を改善させるための治療標的や効果予測のためのバイオマーカーになる可能性が示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文] (計 10 件)

1. Yaguchi T<sup>\*</sup>, # (\*equally contributed, #co-correspondence), Kobayashi A\*, Inozume T, Morii K, Nagumo H, Nihio H, Iwata T, Ka Yuyo, Katano I, Ito R, Ito M, Kawakami Y<sup>#</sup>. Human PBMC-transferred murine MHC class I/II-deficient NOG mice enable long-term evaluation of human immune responses. *Cell Mol Immunol*. 2017. doi: 10.1038/cmi.2017.106. [Epub ahead of print] (査読あり)
2. Yaguchi T, Kawakami Y. Cancer-induced heterogeneous immunosuppressive tumor microenvironments and their personalized modulation. *Int Immunol*. 28: 393-9. 2016. doi: 10.1093/intimm/dxw030. (査読あり)
3. Inozume T, Yaguchi T, Furuta F†, Harada K, Kawakami Y, Shimada S. Melanoma cells control anti-melanoma CTL responses via interaction between TIGIT and CD155 in the effector phase. *J Invest Dermatol*. 136: 255-63. 2016. doi: 10.1038/jid.2015.404. (査読あり)

##### [学会発表] (計 22 件)

1. 谷口智憲、藤田知信、河上裕 がん微小環境における免疫回避機構とその克服法 第 26 回日本がん転移学会学術集会 総会 シンポジウム 3 「がん微小環境における(免疫細胞の誘導と)制御」2017 年
2. 猪爪隆史、谷口智憲、河上裕、4-1BB 刺激は免疫チェックポイント阻害と相乗的にメラノーマ特異的 CTL の活性を増強する、第 21 回日本がん免疫学会総会、

2017 年

3. 谷口智憲、里見良輔、西尾浩、早川妙香、坪田欣也、河上裕 がんシグナル伝達分子阻害薬を用いた、がん微小環境の免疫抑制解除による、がん免疫療法の増強 第 44 回日本臨床免疫学会総会 Rising Star Symposium 2016 年
4. 谷口 智憲、中村 謙太、早川 妙香、坪田 欣也、河上 裕 既存薬を用いた、がん微小環境の免疫抑制解除による、免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果の増強 第 20 回日本がん免疫学会総会 シンポジウム 2 2016 年
5. 谷口智憲、岩田 卓、里見 良輔、守井 賢二、西尾 浩、杉山 重里、中村 謙太、香川 昌樹、藤田 知信、河上 裕 がんシグナル伝達分子阻害薬による免疫抑制の解除 第 20 回日本がん免疫学会総会ワークショップ 2 2016 年
6. 谷口智憲、河上裕 ヒト腫瘍免疫学の最近の進歩とがん免疫療法の展望 第 79 回日本皮膚科学会東京・東部支部合同学術集会 スポンサーシップシンポジウム「皮膚悪性腫瘍治療の新機軸」2016 年
7. 猪爪隆史、谷口智憲、河上裕、島田眞路、メラノーマ上の PD-L1、CD155、MHC class II 分子は協調的に特異的 CTL による認識を抑制する、第 20 回日本がん免疫学会総会、2016 年
8. Yaguchi T, Nishio H, Sugiyama J, Iwata T, Kagawa M, Hayakawa T, Tsubota K, Fujita T, Sakurai T, Kawakami. Immune modulation of the cancer microenvironment for enhancing cancer immunotherapy using small molecular drugs in ovarian clear cell carcinoma. 第 74 回日本癌学会学術総会 JCA-AACR joint symposium 2015 年
9. Yaguchi T. Combined cancer immunotherapies using molecular-targeting drugs. The 4th CSI/JSI/KAI Joint Symposium on Immunology(日本・中国・韓国合同シンポジウム) 2015 年
10. Takashi Inozume, Tomonori Yaguchi, Junpei Furuta, Kazutoshi Harada, Yutaka Kawakami, Shinji Shimada., Co-blockade of TIGIT and PD-1 signals in tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes is an effective antimelanoma therapy., 第 40 回日本研究皮膚科学会, 2015 年

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

谷口 智憲 (YAGUCHI, Tomonori)  
慶應義塾大学・医学部(信濃町)・専任講師

研究者番号：40424163

(2)研究分担者

河上 裕 (KAWAKAMI, Yutaka)

慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・教授

研究者番号：50161287

(3) 連携研究者

猪爪 隆史 (INOZUME, Takashi)

山梨大学・医学部・専任講師

研究者番号：80334853