

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 創薬基盤推進研究事業
(英語) Research on Development of New Drugs

研究開発課題名： (日本語) 血中PD-1リガンド検出エライザー法によるPD-1抗体がん治療の有効性診断薬開発
(英語) A predictive biomarker of anti-PD-1 mAb cancer immunotherapy by the evaluation of immune checkpoint-related proteins in the blood

研究開発担当者 (日本語) 京都大学 大学院医学研究科 免疫ゲノム医学 特定教授 本庶佑
所属 役職 氏名： (英語) Department of Immunology and Genomic Medicine, Kyoto University Graduate School of Medicine, Professor Tasuku Honjo

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

和文

PD-1抗体が2014年に、悪性黒色腫の治療薬として初めて承認されて以来、肺がん、腎癌、頭頸部腫瘍等、様々ながんが治療薬として認可されている。将来的には、PD-1抗体がさらに多くのがんに対する治療薬として承認されることが予想される。近年、PD-1抗体の高額な治療費が日本の医療費問題として取り上げられており、PD-1抗体治療の治療効果を見分けるバイオマーカーを同定することが緊急課題となっている。本研究では、血中PD-1, PD-1リガンド(PD-L), CTLA-4を高感度で検出するエライザー法を開発し、PD-1抗体治療前後の患者由来血液検体を用いて、PD-1抗体治療の治療効果バーカーになり得るか確認することが目的である。

1年目) はじめに高感度ヒトPD-L1エライザーを確立した。様々なPD-L1抗体の組み合わせとSysmex社の化学発光酵素免疫測定法をベースとしたHISCLの技術を組み合わせ、市販より20倍以上感度が高いPD-L1エライザーを開発することに成功した。このエライザーの精度を検証するため、京都大学大学院産婦人科、泌尿科、呼吸器科、病理診断科の協力の下、がん患者の手術前後の血液を集め血中における可溶性PD-L1

を測定し腫瘍組織における PD-L1 発現量と比較した(卵巣癌患者 13 人、腎臓癌患者 17 人、肺がん 18 人)。その結果、ある程度の腫瘍の PD-L1 発現と相関する可能性が示されたがそうでない患者もいた。この結果は、腫瘍側のマーカーだけに注目するのは不十分であるという可能性を示しており、T 細胞側の活性化も検討する必要があると考えた。

2年目)そこで血中 PD-1, CTLA-4 タンパクの高感度エライザにも着手した。すでに PD-L1 エライザーの開発でノウハウを有しているため、2年目でこれらの高感度エライザを完成させることができた。高感度エライザの開発と同時並行し、まずは高感度エライザの比較群として市販エライザを用い、市販のがん患者と健常人(50 症例)の血漿における可溶性 PD-1, PD-L1, CTLA-4 の値を検討した。また自己免疫疾患(甲状腺異常患者 30 症例)の血中における可溶性 PD-1, PD-L1, CTLA-4 も測定したところ、特徴的なパターンを捉えることができた。

3年目)2年目で用いた市販がん患者の血漿サンプルを用いて高感度エライザで検討したところ、PD-L1 と PD-1 はがん腫によって健常人より高くなる傾向が得られた。市販のエライザでは検出限界以下の多くを検出することができた。このことはやはり高感度エライザを用いることの必要性を示している。またこの結果は、生体内にがんが存在するかどうか検定できる可能性を示しており、特許出願した(PCT/JP2016/088978)。さらに血中における可溶性 PD-1, PD-L1, CTLA-4 の動態を詳細に検討するため、1年目の健常人、術前・術後のがん患者由来血液サンプルを検証した。その結果、癌腫、術後の時期によって可溶性 PD-1, PD-L1, CTLA-4 の値が変化することが明らかになった。次に京都大学大学院皮膚科、泌尿器科の協力の下、悪性黒色腫(4患者)、腎癌(4患者)のがん患者のニボルマブ投与前後の血中における3つの値を検討したところ、治療前後において特徴的なパターンが示された(未発表)。3年目には国立がんセンターとの協力体制も確立することができた。28年度にて本プロジェクトは終了するが、引き続き検体数を増やし可溶性 PD-1, PD-L1, CTLA-4 の値とニボルマブの有効性を検討する。

英文

Anti-PD-1 antibody has been approved as a cancer treatment agent in various cancers such as melanoma lung cancer, kidney cancer, head and neck tumor. PD-1 antibody is expected to be approved as a therapeutic agent for many more cancers in the near future. In recent years, expensive treatment cost of PD-1 antibody has been a medical cost problem in Japan and it is an urgent task to identify biomarkers that distinguish the therapeutic effect of PD-1 antibody therapy. In this project, we developed highly sensitive ELISA to detect soluble PD-1, PD-1 ligand (PD-L1), and CTLA-4 in the blood. The purpose is measure patient-derived blood specimens before and after PD-1 antibody treatment, and test whether it can be a therapeutic biomarker of PD-1 antibody therapy.

1st year) We succeeded in developing a highly sensitive ELISA for PD-L1 that has around 20 fold higher sensitive than commercially available ones based on HISCL technology with Sysmex company. In order to verify the accuracy of this ELISA, we tested the blood of cancer patients before and after operation, in cooperation with the Department of Gynecology, Urology, Respiratory, Pathology Diagnosis in Kyoto University Hospital. The soluble PD-L1 levels in the blood from the patients (13

patients with ovarian cancer, 17 patients with renal cancer, 18 patients with lung cancer), were correlated with the PD-L1 expression on tumor tissues to some extent, but not perfectly. These results suggested the paying attention only to the markers on the tumor side is not sufficient, but we considered the activation of the T cell immunity side.

2nd year), Therefore, we developed additionally highly sensitive ELISA for PD-1 and CTLA-4 proteins. We validated the ELISA by measuring the 3 factors in the blood of autoimmune disease patients (thyroid abnormal patients), and got a characteristic pattern. During the development of the ELISA, using commercially available ELISA, we analyzed the 3 factors in the plasma of cancer patients and healthy volunteers commercially available as a control of our sensitive ELISA.

3rd year) The highly sensitive ELISA developed in the 2nd year enabled us to detect the values under the detection limit of commercially available ELISA. This indicated the necessity of our highly sensitive ELISA for the evaluation. The result of the 3 factors indicated that using the sensitive ELISA enable to find the possibility of cancer existence in the body (Patent: PCT / JP2016 / 088978). In order to examine the dynamics of soluble PD-1, PD-L1, CTLA-4 in the blood in more detail, the same blood samples from preoperative and postoperative cancer patients as the 1st year were examined. The values of the 3 factors showed typical features. Next, we examined three values in the blood before and after Nivolumab administration in the patients with melanoma (4 patients) and renal cancer (4 patients), in cooperation with the department of Dermatology and Urology in Kyoto University Hospital, Characteristic patterns were obtained before and after treatment (unpublished). In the third year we also were able to establish a collaborative system with the National Cancer Center. Although this project is completed, we will continue to increase the number of specimens and examine the soluble PD-1, PD-L1, CTLA-4.

Ⅲ. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 3 件)

1. Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K (three are equally contributed), Honjo T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. J Biomed Sci. (2017) 24:26. doi: 10.1186/s12929-017-0329-9. Review
2. Chamoto K, Chowdhury PS, Kumar A, Sonomura K, Matsuda F, Fagarasan S, Honjo T. Mitochondrial activation chemicals synergize with surface receptor PD-1 blockade for T cell-dependent antitumor activity. Proc Natl Acad Sci U S A. (2017) 114:E761-E770.
3. Minato, N. and Honjo, T. Cancer Immunotherapy by Checkpoint Blockade. Chapter 29 Second Edition of the Vaccine Book. Academic Press. (2016)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. **Tasuku Honjo**, Cancer immunotherapy by blockade of the lymphocyte surface receptor PD-1
Lecture at SALK Institute 2017/3/13 国外 (San Diego, USA)
2. **Tasuku Honjo**, Serendipities of acquired immunity Kyoto Prize Symposium in San Diego
2017/3/15 国外 (San Diego, USA)
3. **Tasuku Honjo**, Cancer Immunotherapy by combination of small molecules with PD-1 blockade
「免疫多様性とがん治療」国際シンポジウム 2016/1/26 国内 (神戸)
4. **本庶 佑**, 免疫力でがんを治す 慶應医学賞 受賞記念講演 2016/12/1 国内 (東京)
5. **Tasuku Honjo**, Cancer Immunotherapy by PD-1 blockade. SFI2016 "50" Plenary Lecture
2016/11/28 国外 (Paris, France)
6. **本庶 佑**, 免疫力の再興 京都賞記念ワークショップ 2016/11/12 国内 (京都)
7. **本庶 佑**, 獲得免疫の驚くべき幸運 京都賞受賞記念講演 2016/11/11 国内 (京都)
8. **Tasuku Honjo**, Cancer Immunotherapy by PD-1 blockade 大阪大学免疫学フロンティア研究
センター国際シンポジウム 2016/11/1 国内 (大阪)
9. **Tasuku Honjo**, Cancer immunotherapy by PD-1 blockade TMC/TACT 2016 Plenary Lecture
2016/10/28 国外 (Taipei, Taiwan)
10. **Tasuku Honjo**, Cancer Immunotherapy by PD-1 blockade 5th International Symposium on
Regulators of Adaptive Immunity 2016/9/11 国外 (Erlangen, Germany)
11. **本庶 佑**, PD-1 抗体によるがん治療 第3回 KUIP シンポジウム 2016/7/9 国内 (京都)
12. **茶本健司** T細胞のエネルギー代謝と PD-1 抗体の抗腫瘍効果 (2016) 第5回日本免疫・細胞治
療学会学術総会、シンポジウム、12月3日 秋葉原 UDX
13. **Chamoto K.** Mitochondrial modulation improves PD-1 blockade cancer immunotherapy. (2016)
京都賞ワークショップ、京都国際会館 11月12日
14. **茶本健司** PD-1を標的とした免疫チェックポイント阻害療法 (2016) 第78回日本血液学会学術
集会、教育講演、パシフィコ横浜 10月13日
15. **Chamoto K**, Chowdhury PS, Honjo T. Mitochondrial activation of comprehensive
tumor-specific CTLs during PD-1 blockade therapy. (2014) The 75th Annual Meeting of the
Japanese Cancer Association, International Session. Oct 8. Yokohama
16. **茶本健司** 抗 PD-1 抗体の開発とがん免疫治療の進展 第52回姫路市医師会夏季大学講演会
(2016)、姫路、兵庫、7月24日
17. **Chamoto K**, Chowdhury PS, Honjo T. Priming CD8⁺ T cells in DLN accelerates the accumulation
of CTLs in tumor sites via MIG/CXCR3 axis in PD-1 blockade therapy. (2016) 第20回日
本がん免疫学会 (口頭), 大阪国際交流センター 7月28日
18. **茶本健司** T細胞のエネルギー代謝による PD-1 阻害がん免疫治療の増強効果 (2017年3月27日) 奈良
先端科学技術大学院大学、招待講演 (石田靖雅先生)
19. **茶本健司** 抗 PD-1 抗体治療の開発とがん免疫治療の進展 (2017年2月23日) 大阪大学大学院医学系
研究科附属最先端医療イノベーションセンター1F マルチメディアホール (高島成二先生、HMT)
20. **茶本健司** 抗 PD-1 抗体治療の開発とがん免疫治療の進展 (2017年2月15日) 九州大学大学院医学研
究科脳神経外科、招待講演 (飯原弘二先生)

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 本庶 佑 免疫力でがんを治す「免疫多様性とがん治療」国際シンポジウム 市民公開講座 2017/1/28 国内（神戸）
2. 本庶 佑 免疫力でがんを治す 千里ライフサイエンス振興財団地域イノベーション成果報告会 2017/1/18 国内（大阪）
3. 本庶 佑 免疫力でがんを治す 京都賞高校フォーラム 2016/11/14 国内（京都）
4. 本庶 佑 PD-1 阻害によるがん治療 免疫学会免疫サマースクール 2016/7/12 国内（函館）
5. 本研究の取り組みと論文内容の紹介、本庶 佑 2016/9/28 朝日新聞 朝刊 13面 オピニオン&フォーラム 世紀の新薬未来へ
6. 本研究の取り組みと論文内容の紹介、本庶 佑 2016/9/25 朝日新聞 朝刊 31面 科学の扉 日本発 がん新薬
7. 本研究の取り組みと学会発表の内容の紹介、茶本健司、2016年10月18日日経産業新聞 8面：がん研究最前線
8. 本研究の取り組みと論文内容の紹介、茶本健司、2016年12月22日 日経産業新聞 8面：次世代の先導者
9. 論文内容の紹介、茶本健司、本庶佑、2017年1月17日 朝日新聞（1月17日 3面）
10. 論文内容の紹介、茶本健司、本庶佑、2017年1月17日 京都新聞（1月17日 26面）
11. 論文内容の紹介、茶本健司、本庶佑、2017年1月17日 日刊工業新聞（1月17日 23面）
12. 論文内容の紹介、茶本健司、本庶佑、2017年1月17日 産経新聞（1月17日 26面）
13. 論文内容の紹介、茶本健司、本庶佑、2017年1月17日 日本経済新聞（1月17日 34面）
14. 論文内容の紹介、茶本健司、本庶佑、2017年1月17日 毎日新聞（1月17日 4面）
15. 論文内容の紹介、茶本健司、本庶佑、2017年1月17日 読売新聞（1月17日 33面）

(4) 特許出願

公開する特許番号は無し