

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) 革新的がん医療実用化研究事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control
- 研究開発課題名： (日本語) T細胞応答の多様性回復によるがん免疫併用療法の開発  
(英語) Development of a novel cancer immunotherapy with recovering Diversity of T-cell responses.
- 研究開発担当者 (日本語) 国立がん研究センター先端医療開発センター 免疫TR分野  
分野長 西川 博嘉
- 所属 役職 氏名： (英語) Hiroyoshi NISHIKAWA, M. D., Ph. D.  
Chief, Division of Cancer Immunology,  
Exploratory Oncology Research and Clinical Trial Center (EPOC),  
National Cancer Center
- 実施期間： 平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月 31日
- 分担研究 (日本語) 新規がん免疫併用療法の臨床応用の検討  
(患者検体の提供と新規併用療法の展開の可能性の検討)
- 開発課題名： (英語) Evaluation of clinical application of a novel cancer immunotherapy
- 研究開発分担者 (日本語) 国立がん研究センター 東病院 副院長 土井 俊彦
- 所属 役職 氏名： (英語) Toshihiko Doi, MD., PhD.  
Deputy director  
National Cancer Center Hospital East
- 分担研究 (日本語) 新規がん免疫併用療法の投与スケジュールの最適化の検討  
(動物モデルを用いた臨床プロトコルの最適化の検討)
- 開発課題名： (英語) Optimization of administration schedule in cancer combination immunotherapy- Examination of clinical protocol using animal models

研究開発分担者 (日本語) 国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野 分野長 青木一教  
所属 役職 氏名: (英語) Kazunori Aoki, MD., PhD.  
Chief, Division of Molecular and Cellular Medicine  
National Cancer Center Research Institute

分担研究 (日本語) 加齢マウスでの免疫応答低下とその克服  
開発課題名: (英語) Overcoming of the reduced TCR repertoire and immune response  
in aged mice

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学大学院医学系研究科  
総合医学専攻 分子細胞免疫学 講師 伊藤佐知子  
所属 役職 氏名: (英語) Sachiko ITO, Ph.D.  
Senior Lecturer, Department of Immunology,  
Nagoya University Graduate School of Medicine

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

免疫チェックポイント阻害剤 (抗 PD-1 抗体など) が悪性黒色腫をはじめとする種々のがん腫で劇的な臨床効果を示し、がん免疫療法が注目を集めている。しかしながら、免疫チェックポイント阻害剤による治療ではそれらの併用療法においても半数を超える患者で臨床効果が認められず、治療効果を予測するバイオマーカーの同定もしくは新規の併用療法の開発が重要課題である。

免疫抑制性の制御性 T 細胞は、がん (自己) 抗原特異的 CD8+T 細胞の活性化を抑制し、免疫チェックポイント分子 (CTLA-4) 発現を含む特徴的なフェノタイプをもつ不可逆的な不応答 CD8+T 細胞に陥らせる (Maeda Y and Nishikawa H et al. **Science** 2014)。これらの不応答性 T 細胞は易アポトーシス性のため、がん局所でアポトーシスに陥りやすく、がん免疫療法の治療効果と負の相関をもつがん局所の CD8+T 細胞浸潤の低下及び T 細胞レセプター (TCR) の多様性 (レパトアサイズ) の縮小に参与している (manuscript under preparation)。

一方、TCR のレパトアサイズは加齢でも縮小する。がん患者の多くが高齢であることを鑑みると、がん局所での CD8+T 細胞応答の多様性を確保し抗腫瘍活性を増強するには、制御性 T 細胞のコントロールによる不応答性エフェクター T 細胞誘導の阻害に加えて、胸腺での TCR レパトアサイズの回復が必要であることが示唆される。以上より本研究では、T 細胞シグナルの下流のチロシンキナーゼ阻害による制御性 T 細胞およびエフェクター T 細胞への影響、それに伴う抗腫瘍活性をマウスモデルで検討した。チロシンキナーゼ阻害剤によりがん局所の制御性 T 細胞が特異的に低下し、それにともない腫瘍増殖の抑制がみられることが示され、エフェクター T 細胞の活性化も認められた。一方で、チロシンキナーゼ阻害剤に抵抗性の腫瘍株も明らかになった。さらにチロシンキナーゼ阻害剤投与の最適化を検討した結果、抗 PD-1 抗体等に比較して、チロシンキナーゼ阻害剤は長期的に投与することが必要であることが明らかになるとともに、腫瘍微小環境の解析がバイオマーカーに繋がる可能性が示唆された。

免疫チェックポイント阻害剤の多くの第 3 相試験では、75 歳以上では抗 PD-1 抗体の化学療法に対する優位性が減弱する。これは加齢に伴う T 細胞レパトアサイズの低下が免疫チェックポイント阻害剤に

よる抗腫瘍免疫応答の増強効果を阻害する要因の一つと考え、加齢マウスを用いて検討した。2つのマウスモデルで、TCR レパトアサイズの増大および抗腫瘍効果への影響を検討した。若年マウスでは抗 PD-1 抗体投与により抗腫瘍活性（腫瘍縮小）が認められるものの、加齢マウスでは抗 PD-1 抗体の治療効果が減弱した。しかし、胸腺での Notch シグナルを増強させると、TCR レパトアサイズの多様性が回復するとともに、抗 PD-1 抗体の抗腫瘍活性（腫瘍縮小）も回復することが明らかとなり、高齢者での免疫チェックポイント阻害剤治療との併用療法の可能性が示唆された。

Immune checkpoint inhibitors such as anti-PD-1 mAb show enormous clinical benefits in various types of cancers including malignant melanoma and lung cancers, emerging as an attractive cancer treatment. However, as the clinical efficacy is limited in 20-30% of treated patients even with combinations, cancer researches to identify biomarkers that can predict responders for cancer immunotherapy and to develop novel effective cancer immunotherapy are urgently required.

Regulatory T cells (Tregs) with immune suppressive function inhibit CD8+ T-cell activation with self-antigen specific and rendered self-cancer antigen (Melan-A)-specific CD8+ T cells anergic (i.e., hypo-proliferative and cytokine hypo-producing upon antigen re-stimulation). As these Treg-suppressed CD8+ T cells easily fall into apoptosis, tumor infiltrating CD8+ T cells are suppressed by Tregs and fall into apoptosis, resulting in decrease of CD8+ T cells and their TCR repertoire which are critical for anti-tumor immunity.

Additionally, TCR repertoire size is reduced with aging. Considering that most cancer patients are elderly people, it is necessary to recover the diversity of T-cell responses in addition to Treg control in tumor tissues. In this study, we first examined the influences of tyrosine kinase inhibitors (TKI) that control the downstream of TCR signaling in Tregs and effector T cells using murine tumor models. TKI reduced Tregs in tumors and activated effector T cells resulting in inhibition of tumor growth. In another tumor model, TKI did not show the significant reduction of Tregs, indicating the importance of tumor microenvironment of the TKI action. Additionally, longer administration of TKI compared with anti-PD-1 mAb is required for optimal anti-tumor effect, suggesting an important clue for clinical application of TKI.

Clinical trials in immune checkpoint inhibitors have revealed that clinical benefit by immune checkpoint inhibitors compared with control chemotherapy is reduced in older ( $\geq 75$  years old) patients. We hypothesized that this impairment of clinical efficacy depended on the reduction of TCR repertoire with aging. In two mouse models, we examined the association of TCR repertoire and anti-tumor effect by immune checkpoint inhibitors such as anti-PD-1 mAb. While anti-PD-1 mAb induced tumor regression in young mice bearing tumors, the anti-tumor effect was abrogated in aged mice. However, when Notch signaling was enhanced in the thymus, TCR repertoire size was recovered, resulting in the synergistic anti-tumor effect by anti-PD-1 mAb. Therefore, combination of immune checkpoint inhibitors and reagent recovering TCR repertoire is promising cancer immunotherapy in elder patients.

### 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 14 件、国際誌 16 件）

西川博嘉

国際誌

1. Nagase H, Takeoka T, Urakawa S, Morimoto-Okazawa A, Kawashima A, Iwahori K, Takiguchi S, Nishikawa H, Sato E, Sakaguchi S, Mori M, Doki Y and Wada H.: ICOS<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>TILs in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory T cells associated with Helicobacter pylori. **Int J Cancer**. 2017 Feb 1;140(3):686-695.
2. Takeoka T, Nagase H, Kurose K, Ohue Y, Yamasaki M, Takiguchi S, Sato E, Isobe M, Kanazawa T, Matsumoto M, Iwahori K, Kawashima A, Morimoto-Okazawa A, Nishikawa H, Oka M, Pan L, Venhaus R, Nakayama E, Mori M, Doki Y and Wada H.: NY-ESO-1 Protein Cancer Vaccine With Poly-ICLC and OK-432: Rapid and Strong Induction of NY-ESO-1-specific Immune Responses by Poly-ICLC. **J Immunother**. 2017 Mar 23.
3. Hamano Y, Kida H, Ihara S, Murakami A, Yanagawa M, Ueda K, Honda O, Tripathi LP, Arai T, Hirose M, Hamasaki T, Yano Y, Kimura T, Kato Y, Takamatsu H, Otsuka T, Minami T, Hirata H, Inoue K, Nagatomo I, Takeda Y, Mori M, Nishikawa H, Mizuguchi K, Kijima T, Kitaichi M, Tomiyama N, Inoue Y and Kumanogoh A.: Classification of idiopathic interstitial pneumonias using anti-myxovirus resistance-protein 1 autoantibody. **Sci Rep**. 2017 Feb 23;7:43201. doi: 10.1038/srep43201.
4. Saito T, Nishikawa H, Wada H, Nagano Y, Sugiyama D, Atarashi K, Maeda Y, Hamaguchi M, Ohkura N, Sato E, Nagase H, Nishimura J, Yamamoto H, Takiguchi S, Tanoue T, Suda W, Morita H, Hattori M, Honda K, Mori M, Doki Y and Sakaguchi S.: Two FOXP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-cell subpopulations distinctly control the prognosis of colorectal cancers. **Nat Med**. 22(6):679-684 2016 (Corresponding Author).
5. Okubo K, Wada H, Tanaka A, Eguchi H, Hamaguchi M, Tomokuni A, Tomimaru Y, Asaoka T, Hama N, Kawamoto K, Kobayashi S, Marubashi S, Nagano H, Sakaguchi N, Nishikawa H, Doki Y, Mori M, Sakaguchi S.: Identification of Novel and Noninvasive Biomarkers of Acute Cellular Rejection After Liver Transplantation by Protein Microarray. **Transplant Direct**. 2(12):e118. eCollection 2016 Nov 18. 2016
6. Kakahana K, Fujioka Y, Suda W, Najima Y, Kuwata G, Sasajima S, Mimura I, Morita H, Sugiyama D, Nishikawa H, Hattori M, Hino Y, Ikegawa S, Yamamoto K, Toya T, Doki N, Koizumi K, Honda K, Ohashi K.: Fecal microbiota transplantation for patients with steroid-resistant/dependent acute graft-versus-host disease of the gut. **Blood**. 2016 Jul 26.
7. Haseda F, Imagawa A, Nishikawa H, Mitsui S, Tsutsumi C, Fujisawa R, Sano H, Murase-Mishiba Y, Terasaki J, Sakaguchi S, Hanafusa T.: Antibody to CMRF35-Like Molecule 2, CD300e A Novel Biomarker Detected in Patients with Fulminant Type 1 Diabetes. **PLoS One**. Aug 11;11(8):e0160576 2016.

8. Ureshino H, Shindo T, Nishikawa H, Watanabe N, Watanabe E, Satoh N, Kitaura K, Kitamura H, Doi K, Nagase K, Kimura H, Samukawa M, Kusunoki S, Miyahara M, Shin-I T, Suzuki R, Sakaguchi S, Kimura S.: Effector Regulatory T Cells Reflect the Equilibrium between Antitumor Immunity and Autoimmunity in Adult T-cell Leukemia. **Cancer Immunol Res.** 4(8):644-649 2016.
9. Takeuchi Y, Nishikawa H.: Roles of regulatory T cells in cancer immunity. **Int Immunol.** 2016 28(8):401-409 2016 (Corresponding Author).
10. Shimazu Y, Shimazu Y, Hishizawa M, Hamaguchi M, Nagai Y, Sugino N, Fujii S, Kawahara M, Kadowaki N, Nishikawa H, Sakaguchi S, Takaori-Kondo A.: Hypomethylation of the Treg-specific demethylated region in FOXP3 is a hallmark of the regulatory T-cell subtype in adult T-cell leukemia. **Cancer Immunol Res.** 4(2):136-145 2016.
11. Hayakawa Y, Kawada M, Nishikawa H, Ochiya T, Saya H, Seimiya H, Yao R, Hayashi M, Kai C, Matsuda A, Naoe T, Ohtsu A, Okazaki T, Saji H, Sata M, Sugimura H, Sugiyama Y, Toi M, Irimura T.: Report on the use of non-clinical studies in the regulatory evaluation of oncology drugs. **Cancer Sci.** 107(2):189-202 2016.

#### 国内誌

1. 西川博嘉 : 免疫チェックポイント阻害剤の臨床導入に伴うがん免疫療法の今後の展望 **BIO Clinica** 31. 8 : 16-17, 2016
2. 坂井千香、西川博嘉 : 腫瘍免疫応答と制御性 T 細胞 **実験医学増刊** 34:1884-1889, 2016
3. 竹内美子、西川博嘉 : 免疫調節受容体を標的としたがん免疫療法—免疫刺激分子および免疫抑制分子に対する抗体療法— **医学のあゆみ** 258:11 : 97-105, 2016
4. 藤岡優樹、西川博嘉 : 免疫チェックポイントの基礎 **多発性骨髄腫 Updating** 9: 111-119, 2016
5. 杉山大介、西川博嘉 : がん微小環境における免疫抑制機構 **医学のあゆみ** 258 : 5 : 445-450, 2016
6. Danbee Ha、竹内美子、西川博嘉 : 癌免疫療法の作用機序—免疫チェックポイント阻害療法など 4 療法への取り組み **日本医事新報** 26-35, 2016
7. 杉山栄里、西川博嘉 : 免疫チェックポイント阻害薬の基礎. **Pharma Medica** 23-27, 2016
8. 坂井千香、西川博嘉 : 腫瘍における制御性 T 細胞の抑制 **臨床免疫・アレルギー科** 66: 199-204, 2016
9. 藤岡優樹、西川博嘉 : がん免疫療法の基礎 **臨床血液** 57(11)2346-2354, 2016
10. 杉山 大介、西川博嘉 : がん免疫における制御性 T 細胞 **腫瘍内科** 17 :94-97, 2016
11. 藤岡 優樹、西川博嘉 : 免疫チェックポイント阻害剤と他の免疫療法との併用の可能性 **Pharma stage** 15:39-48, 2016
12. 竹内 美子、西川博嘉 : がん免疫療法における制御性 T 細胞の意義 **腫瘍内科** 4:360-366, 2016

#### 土井俊彦

#### 国際誌

なし

#### 国内誌

なし

#### 青木一教

## 国際誌

1. Shoji H, Heike Y, Tada K, Kitano S, Nishimura T, Shimada Y, Nagashima K, Aoki K, Hiraoka N, Honma Y, Iwasa S, Takashima A, Kato K, Boku N, Honda K, Yamada T, Hamaguchi T: The peripheral immune status of granulocytic myeloid-derived suppressor cells correlates the survival in advanced gastric cancer patients receiving cisplatin-based chemotherapy. **Oncotarget** (in press)
2. Tada T, Kitano S, Shoji H, Nishimura T, Shimada Y, Nagashima K, Aoki K, Hiraoka N, Honma Y, Iwasa S, Okita N, Takashima A, Kato K, Yamada Y, Katayama N, Boku N, Heike Y, Hamaguchi T: Relationship between pre-treatment immune status and progression-free survival of metastatic colorectal cancer patients treated with first-line chemotherapy. **Cancer Immunol Res** 4:592-599, 2016.

## 国内誌

1. 青木一教 がん根治に向けた免疫療法の開発 先端治療技術の実用化と開発戦略 日本術情報協会, 311-318, 2017.
2. 青木一教 がん免疫微小環境のシングルセル解析で何がわかってきたか. 実験医学. 35: 552-556, 2017.

## 伊藤佐知子

### 国際誌

1. Ito S, Tanaka Y, Oshino R, Okado S, Hori M, Isobe KI. GADD34 suppresses lipopolysaccharide-induced sepsis and tissue injury through the regulation of macrophage activation. **Cell Death Dis.** 2016, 7, e2219.
2. Liu L, Ito S, Nishio N, Sun Y, Tanaka Y, Isobe K. GADD34 Promotes Tumor Growth by Inducing Myeloid-derived Suppressor Cells. **Anticancer Res.** 2016, 36,9, 4623-8
3. Du Q, Tsuboi N, Shi Y, Ito S, Sugiyama Y, Furuhashi K, Endo N, Kim H, Katsuno T, Akiyama S, Matsuo S, Isobe KI, Maruyama S. Transfusion of CD206+ M2 Macrophages Ameliorates Antibody-Mediated Glomerulonephritis in Mice. **Am J Pathol.** 2016, 186, 12, 3176-3188.

### 国内誌

なし

## (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

### 西川博嘉

1. Targeting immuno-suppressive cancer microenvironment is critical for successful cancer immunotherapy, 口頭, Hiro Yoshi Nishikawa, The 5th International Symposium of Training Plan for Oncology Professionals, 2017/3/11, 国内
2. Targeting FoxP3+ T cells in Cancers; Friends or Foes?\_ Nishikawa H, New York Academy of Science; Frontiers in Cancer Immunotherapy 2017/2/27-28, 国外
3. Role of FoxP3+ T cells in cancer immunology, 口頭, Hiro Yoshi Nishikawa, International Symposium on Immune Diversity and Cancer Therapy Kobe 2017, 2017/1/26, 国内.

4. EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌で細胞障害性 T リンパ球浸潤が減少する分子学的機序, ポスター, 竹内美子・富樫庸介・杉山栄里・木島貴志・熊ノ郷淳・新谷康・奥村明之進・青景圭樹・菱田智之・石井源一郎・坪井正博・西川博嘉, 第 57 回日本肺癌学会, 2016/12/20, 国内.
5. Control of regulatory T cells for effective cancer immunotherapy, 口頭, Hiroyoshi Nishikawa, 第 45 回日本免疫学会総会, 2016/12/7, 国内.
6. The next steps of immune checkpoint inhibitors, 口頭, Hiroyoshi Nishikawa, 第 29 回日本放射線腫瘍学会, 2016/11/27, 国内.
7. がん免疫療法における precision medicine, 口頭, 西川博嘉, 第 75 回日本癌学会, 2016/10/8, 国内.
8. Regulatory T-cell induced anergic CD8+ T cells with suppressive function are novel targets of anti-CTLA-4 mAb, 口頭, Danbee Ha, Hiroyoshi Nishikawa, Daisuke Sugiyama, Yuka Maeda, Dennis Adeegbe, Eichi Sato, Atsushi Tanemura, Ichiro Katayama, Shimon Sakaguchi, 第 75 回日本癌学会, 2016/10/8, 国内.
9. Perspective of T cell responses as predictive markers in cancer immunotherapy, 口頭, Yuka Maeda, Hiroyoshi Nishikawa, Hiroyuki Mano, 第 75 回日本癌学会, 2016/10/6, 国内.
10. がん患者における免疫病態の最新知見とがん治療への応用, 口頭, 西川博嘉, 第 44 回日本臨床免疫学会, 2016/9/8, 国内.
11. Regulatory T cells as a target of cancer immunotherapy, 口頭, 西川博嘉, 第 14 回日本臨床腫瘍学会, 2016/7/30, 国内.
12. がん免疫療法でのバイオマーカーとしての免疫抑制細胞, 口頭, 西川博嘉, 第 20 回日本がん免疫学会, 2016/7/29, 国内.
13. Cell-depleting anti-CCR4 mAb therapy, 口頭, 西川博嘉, The 7th JSH International Symposium, 2016/5/13, 国内.
14. Critical Role of Regulatory T cells in Cancer Immunotherapy for Hematologic Malignancies, 口頭, 西川博嘉, The 5th JCA-AACR Special Joint Conference, 2016/7/15, 国内.
15. がん免疫療法で誘導される免疫応答と免疫抑制の関連, 口頭, 西川博嘉, 第 20 回日本がん分子標的治療学会, 2016/5/31, 国内.
16. Cancer Immunotherapy, 口頭, 西川博嘉, 5th Japan Taiwan Oncology Phase I Trail Conference, 2016/4/30, 国外.

土井俊彦

なし

青木一教

1. Shibasaki C, Hashimoto H, Ueda R, Narumi K, Aoki K. Intratumoral IFN- $\alpha$  gene transfer reduces trafficking of Tregs into tumor by inhibition of CCL17 expression in tumors. 第 22 回日本遺伝子治療学会学術集会. July 28-30, 2016.
2. Aoki K, Shibasaki C, Hashimoto H, Narumi K, Ueda R. Intratumoral IFN- $\alpha$  expression reduces trafficking of Tregs into tumor by inhibition of CCL17 expression in tumors. 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜、10 月 6-8 日、2016 年.

3. Henmi M, Ogiwara Y, Toyoura M, Aoki K, Kudo C. Targeting FSTL1 is a new approach to treatment of pediatric cancers. 第75回日本癌学会学術総会、横浜、10月6-8日、2016年.
4. Shibasaki C, Hashimoto H, Ueda R, Narumi K,
5. Aoki K: Intratumoral IFN- $\alpha$  gene transfer reduces trafficking of Tregs into tumor by inhibition of CCL17 expression in tumors. AACR Tumor Immunology and Immunotherapy, Boston, October, 2016
6. Aoki K, Shibasaki C, Hashimoto H. Intratumoral IFN- $\alpha$  expression reduces trafficking of Tregs into tumor by inhibition of CCL17 expression. 第45回日本免疫学会、宜野湾、12月5-7日、2016年.

伊藤佐知子

なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

西川博嘉

1. がん細胞および免疫応答解析に基づくがん免疫療法効果予測診断法の確立 ジャパン・キャンサーリサーチ・プロジェクト 企業向け成果発表会 2017/3/3 国内
2. がん免疫療法の効果向上に向けた新たな治療法開発 ジャパン・キャンサーリサーチ・プロジェクト 市民向け成果発表会 2017/3/4 国内

(4) 特許出願