

Immune-Liquid biopsy による 革新的乳癌免疫療法の創出

京都大学医学部附属病院乳癌外科 助教 河口 浩介

要 約

近年の薬物療法の開発並びに臨床応用により、乳癌の治療成績は飛躍的に向上している。特筆すべきは、免疫チェックポイント阻害薬を代表とするがん免疫療法の登場による治療パラダイムシフトである。しかしながら、いまだ転移乳癌の予後は芳しくなく、乳癌の制御という観点においてがん免疫療法の効果・毒性予測は急務である。本研究では、治療ナビゲーションシステムの鍵となる循環免疫プロファイルによる効果・毒性予測アルゴリズムを構築することを目的とする。患者サンプルは第Ib/II相臨床試験(NCT03430479)においてサンプル収集に同意が得られた患者から取得した。同試験はHER2陰性転移性乳がん患者を対象に、ニボルマブと放射線療法(RT)を併用する多施設共同研究である。サンプル解析は1)網羅的遺伝子発現解析、2)網羅的サイトカイン発現レベル解析、3)マスサイトメトリーによるシングルセル免疫細胞のプロファイル解析を行った。1)並びに2)を統合してトポロジカルデータ解析を行った。チェックポイント阻害薬の効果があるクラスターと効果が無いクラスターは循環免疫細胞のプロファイルによって明確に区別された。また、各クラスターをマスサイトメトリーにて解析したところ、特徴的な免疫細胞群の集団が含まれることが明らかになった。今回我々はチェックポイント阻害薬の効果と循環免疫細胞のプロファイルの変動が相関する事を明らかにした。免疫療法のモニタリングが可能になれば、それぞれの治療の効果を最大限に引き上げ、副作用を最小限まで引き下げることが出来るようになる。より個別化された免疫療法の治療戦略にとって重要な知見となった。

緒 言

近年の薬物療法の開発並びに臨床応用により、乳癌の治療成績は飛躍的に向上している。特筆すべきは、免疫チェックポイント阻害薬を代表とするがん免疫療法の登場による治療パラダイムシフトである。しかしながら、いまだ転移乳癌の予後は芳しくなく、乳癌の制御という観点においてがん免疫療法の効果・毒性予測は急務である。世界中で治療・毒性メカニズム解明並びに予測モデル構築への研究開発が進んでいるが、ロバストな突破メカニズムは未だ解明されていない。がんを専門として診療に携わる我々が目指すところは、患者にとって最大の効果を予測し、毒性のリスクを最小限にすることである。特に不可逆的かつ致命的な毒性はなんとしてでも予防すべきであると考えられる。この状況を突破するためには宿主の免疫防御機構、内分泌学的な観点からの解析、即ち統合的解析が必須であると考えられる。特に、がん免疫療法の効果や毒性出現については進展プロセスに環境要因、内分泌学的要因が密接に関与

しており、治療中においてもドラスティックに宿主免疫機構が変化していると考えられる。

本研究では、治療ナビゲーションシステムの鍵となる循環免疫プロファイルによる効果・毒性予測アルゴリズムを構築することを目的とする。我々は、これまでの研究において循環免疫細胞の遺伝子発現パターンは乳癌の生物学的特徴のみでなく腫瘍免疫微小環境とも深く関わるということが定量的に明らかにした。循環免疫プロファイルが免疫チェックポイント阻害薬の効果と相関すると仮説を立て、PhaseIb/II試験において前向きに効果予測解析を行ったところ、免疫プロファイルは免疫チェックポイント阻害薬投与後非常に短い期間で反応性に変化し、その変化を解析することにより治療効果のナビゲーションマップが作成可能性であることが示唆された。これらの結果から、循環免疫プロファイルは治療修飾早期から変化するため効果・毒性のモニタリングに非常に適していると考えられる。

我々が創出する循環免疫プロファイルを用いた、

日本発のImmune-Liquid Biopsy (ILB)によるがん免疫療法の最適化アルゴリズム構築することが出来れば、乳癌患者における免疫療法の効果の最大化、毒性の最小化が実現され、乳癌治療のパラダイムシフトがもたらされると考える。またがん免疫療法に留まらず、他の分子標的治療薬や放射線治療、さらには他癌種への応用が可能となると考える。

方法

試験デザイン

第Ib/II相臨床試験(NCT03430479)は、HER2陰性転移性乳がん患者を対象に、ニボルマブと放射線療法(RT)を併用する多施設共同研究として実施された。プロトコールは京都大学の施設審査委員会によって承認され、すべての患者が書面によるインフォームドコンセントを得ている。HER2陰性の転移病変を有する患者さんを登録対象とした。すべての患者は、緩和的放射線治療の候補となる骨転移を少なくとも1つ有し、RECIST(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors version 1.1)による測定が可能な未照射転移病変を有することが条件とした。主な除外項目は、活動性脳転移、活動性自己免疫疾患、間質性肺疾患歴、活動性糖尿病、試験開始28日以内の全身性ステロイドまたは他の免疫抑制剤の使用、活動性感染症およびICIによる前治療歴とした。

治療と評価

全ての患者は第0日目に骨転移に対して8Gyの放射線治療を1回行った。ニボルマブ3mg/kgを14日間サイクルの各1日目に、病勢進行または許容できない毒性が発現するまで点滴静注した。主要評価項目は、RECIST 1.1に定義された未照射標的的病変の客観的奏効率(ORR)、副次的評価項目は、奏効期間(DOR)、病勢コントロール率(DCR)、無増悪生存期間(PFS)、安全性とした。

PBMC

患者の血液は、BD Vacutainer CPTチューブに採血し、採血後2時間以内にプロトコールに従いPBMCを分離した。PBMC細胞ペレットからtotal RNAを抽出した。

マスサイトメトリー

抗ヒト抗体は、金属同位体にプレコンジュゲー

トされたものを使用した(Fluidigm)。各抗体は、使用前にワーキングパネルと同様に滴定し、得られたシグナルが有益であることを確認した。得られたデータに対してCyTOFソフトウェアの内部FCS-Processingモジュールを用いて正規化およびランダム化を行った。100秒あたり50ビーズ未満の区間は、結果のFCSファイルから除外した。

サイトカイン分析

サンプルは液体窒素で凍結し、サンプル採取から2時間以内に-80℃で保存した。血清試料中のサイトカイン、IL-1 β 、IL-1 γ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、granulocyte-macrophage colony-stimulating factor、granulocyte colony-stimulating factor、interferon gamma(IFN- γ)、monocyte chemoattractant protein-1、マクロファージ炎症性タンパク質-1 α (MIP-1 α)、PDGF-BB、RANTES、VEGF、bFGFおよびTNF- α は、Bio-Plex multiplex assay system(Bio-Rad, Hercules, CA)でプロトコール従い測定した。

統合解析

トポロジカルデータ解析として知られる教師なし学習法を実装し、Kepler Mapperを用いたUniform Manifold Approximation and Projection(UMAP)法によりサイトカインとRNA-seqデータに基づくサンプルのクラスタリングを行った。治療後各タイムポイントまでの値を、ベースライン値に対するRNA-seqとサイトカインの両データのlog₂比をトポロジカルデータ解析のインプット値とした。

結果

循環免疫細胞のプロファイルの変動はチェックポイント阻害薬の効果と相関する

循環免疫細胞のプロファイル(サイトカイン発現レベル並びにPBMCの網羅的遺伝子発現解析)のベースライン値からの変動とチェックポイント阻害薬の効果についてトポロジカルデータ解析を行った(図1)。チェックポイント阻害薬の効果があるクラスターと効果が無いクラスターは循環免疫細胞のプロファイルによって明確に区別された。また、各クラスターをマスサイトメトリーにて解析したところ、特徴的な免疫細胞群の集団が含まれることが明らかになった。

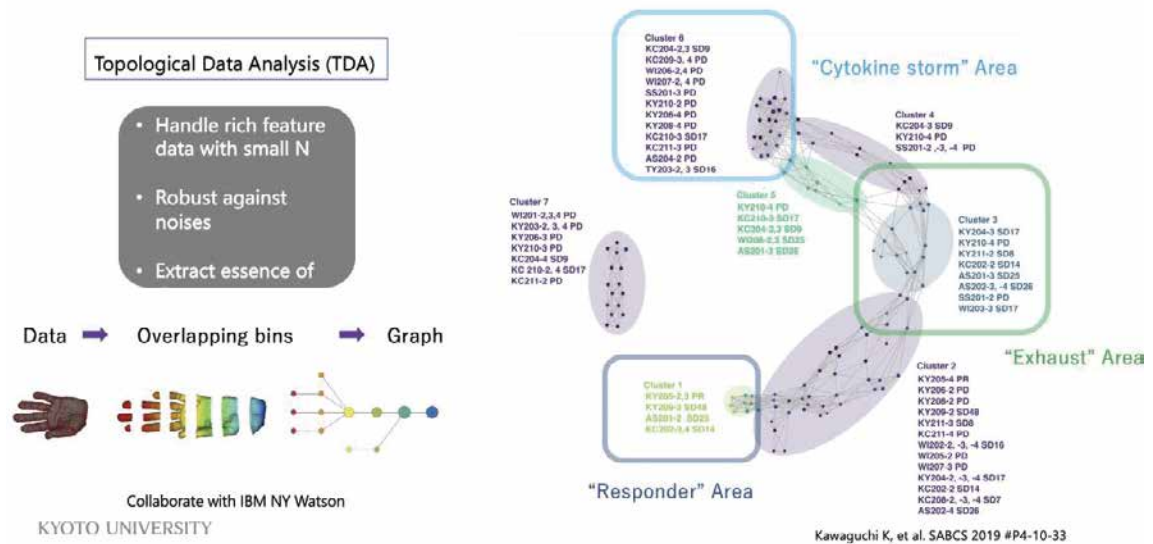


図 1. トポロジカルデータ解析の概要と結果

考 察

今回我々はチェックポイント阻害薬の効果と循環免疫細胞のプロファイルの変動が相関する事を明らかにした。免疫療法のモニタリングが可能になれば、それぞれの治療の効果を最大限に引き上げ、副作用

を最小限まで引き下げることが出来るようになる。より個別化された免疫療法の治療戦略にとって重要な知見となった。今後は様々な薬剤での検証並びに有害事象との関連を探索する必要があると考える。

Abstract

Recent development and clinical application of drug therapies have dramatically improved the treatment outcome of breast cancer. Of particular note is a paradigm shift in treatment with the advent of cancer immunotherapy, represented by immune checkpoint inhibitors. However, the prognosis of metastatic breast cancer is still poor, and it is urgent to predict the efficacy and toxicity of cancer immunotherapy in terms of breast cancer control.

In this study, we aim to develop an algorithm for predicting the efficacy and toxicity of cancer immunotherapy based on circulating immunological profiles, which will be the key to the treatment navigation system.

Patient samples were obtained from patients who consented to sample collection in a phase Ib/II clinical trial (NCT03430479). This is a multicenter study of nivolumab plus radiation therapy (RT) in patients with HER2-negative metastatic breast cancer.

Samples were analyzed by 1) comprehensive gene expression analysis, 2) comprehensive cytokine expression level analysis, and 3) single-cell immune cell profiling by mass cytometry. 1) and 2) were combined for topological data analysis.

Clusters with and without effect of checkpoint inhibitors were clearly distinguished by the profile of circulating immune cells. Mass cytometric analysis of the clusters revealed the presence of characteristic immune cell populations.

In this study, we have shown that the effect of checkpoint inhibitors correlates with changes in the profile of circulating immune cells. The ability to monitor immunotherapy would maximize the efficacy and minimize the side effects of each therapy. This is an important finding for more personalized immunotherapy treatment strategies.