

190. 次世代がん免疫療法の開発

岩井 佳子

*産業医科大学 医学部 分子生物学講座

Key words : がん免疫療法, 免疫チェックポイント, PD-1, 可溶性 PD-L1, 非小細胞肺癌

緒言

免疫チェックポイント阻害剤の登場により世界的ながん治療のパラダイムシフトが起こりつつある。抗 PD-1 抗体 Nivolumab は、免疫チェックポイント分子 PD-1 を阻害することにより、免疫系のブレーキを解除してがんに対する免疫応答を高め抗腫瘍効果を発揮する [1~3]。本邦では 2014 年に新薬として承認されたが、奏効率は概ね 20~30% で、感受性の高い患者群と低い患者群に分かれるが、その原因やメカニズムは知られていない。低感受性群に対する新たな治療戦略を開発する上で、低感受性群および高感受性群の診断は極めて重要であるが、両者を区別できるバイオマーカーは今のところ見つかっていない。現状では腫瘍組織における PD-L1 発現によって治療適応の評価が行われているが、免疫組織学的検査は生検部位による影響や検査機関でのばらつきがあり、定量化が難しいという問題がある。そこで本研究では血中に存在する可溶性 PD-L1 (soluble PD-L1: sPD-L1) に着目して、PD-1 受容体に対する結合能をもった可溶性 PD-L1 (PD-1 binding sPD-L1: bsPD-L1) を検出する新規 ELISA システムを開発した [4]。

方法および結果

1. PD-1 結合能を指標とした血中 PD-L1 測定法の開発

従来型の ELISA システムでは、“抗原-抗体反応” を介して、固相化された捕捉抗体 (抗 PD-L1 抗体) により sPD-L1 を捕捉する。新型 ELISA システムでは、“リガンド-受容体反応” により bsPD-L1 を捕捉するために、固相化抗 PD-L1 抗体を固相化 PD-1-Ig 融合蛋白質に置換した (図 1)。同一の検出抗体 (ビオチン標識抗 PD-L1 抗体) を用いて、既知の濃度の組換え PD-L1 蛋白質を段階希釈したサンプルを新型 ELISA および従来型 ELISA により測定したところ、いずれも濃度依存性に吸光度の増加がみられた (図 2A)。この 2 つの検量線から総 PD-L1 蛋白質中の正味の bsPD-L1 量を計算した結果、bsPD-L1 の検量線は図 2B となり、測定範囲は 156-10,000 pg/ml であった。

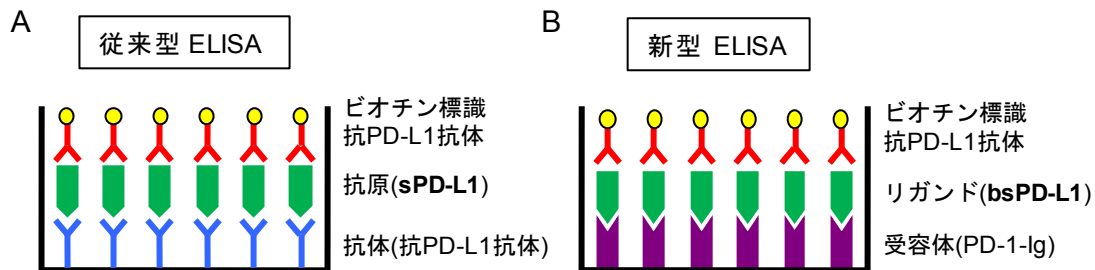


図 1. PD-1 結合能を指標とした血中 PD-L1 測定法の開発

従来型の ELISA システムでは、“抗原-抗体反応” を介して、固相化された捕捉抗体 (抗 PD-L1 抗体) により sPD-L1 を捕捉する。一方、新型 ELISA システムでは、“リガンド-受容体反応” を介して、固相化された PD-1-Ig 融合蛋白質により、PD-1 に対する結合能を有する sPD-L1 (bsPD-L1) を捕捉する。

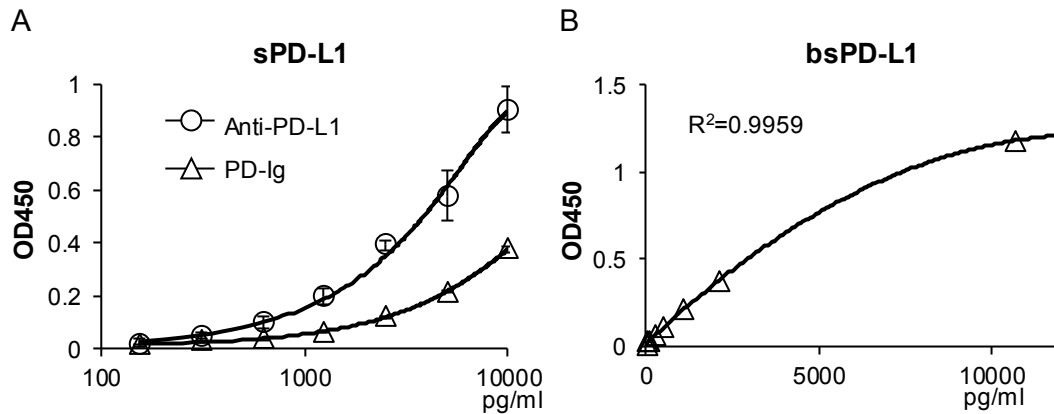


図2. sPD-L1 および bsPD-L1 の検量線

(A) sPD-L1 の検量線 既知の濃度の組換え PD-L1 蛋白質を段階希釈して新型 ELISA (Δ) および従来型 ELISA (\circ) を用いて波長 450 nm での吸光度を測定した。(B) bsPD-L1 の“真”の検量線。

2. 非小細胞肺癌患者血漿中の PD-L1 および bsPD-L1

次に新型 ELISA および従来型 ELISA を用いて、非小細胞肺癌患者血漿 75 検体について解析を行った。新型 ELISA は従来型 ELISA に比べて、検出頻度およびシグナル強度が増強した (図 3)。新型 ELISA では 29 検体 (38.6%) が bsPD-L1 陽性に対して、従来型 ELISA では 8 検体 (10.6%) が sPD-L1 陽性であった。吸光度の平均値は従来型 ELISA に比べて新型 ELISA で高値となった (新型 ELISA, 0.292 ± 0.461 ; 従来型 ELISA, 0.051 ± 0.027)。

3. PD-1/PD-L1 結合能における糖鎖修飾の効果

新型 ELISA と従来型 ELISA とでは、検出感度や検出パターンが異なることから、これらが質的に異なる sPD-L1 を検出している可能性が考えられた。その可能性の一つとして、sPD-L1 の糖鎖修飾の影響について検討を行った。

可溶性 PD-L1 の PD-1 に対する結合能における糖鎖修飾の効果について調べるために、非小細胞肺癌患者血漿をグリコシダーゼ処理により脱グリコシル化して、Western blot および ELISA による解析を行った。患者検体中の sPD-L1 は糖鎖修飾があると約 50 kD 付近にバンドが検出されるが、脱グリコシル化すると、約 25 kD のバンドが検出されるようになった。脱グリコシル化処理前後の検体を新型 ELISA および従来型 ELISA にて測定したところ、従来型 ELISA では吸光度の変化はほとんど見られなかったが、新型 ELISA では脱グリコシル化により吸光度が大きく減少した。以上の結果から、sPD-L1 の糖鎖修飾が PD-1 への結合に重要な役割を果たしていることが示唆された。

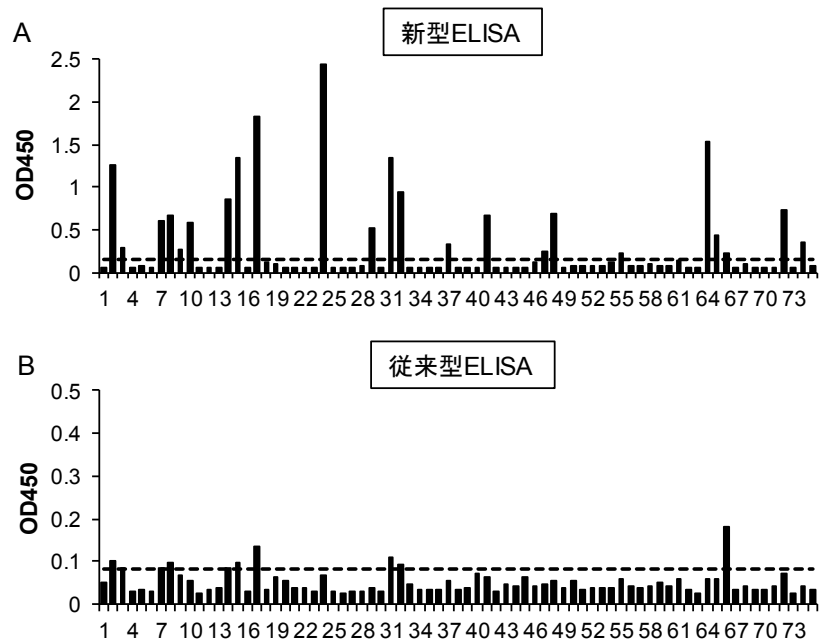


図 3. 非小細胞肺癌患者血漿中の sPD-L1 および bsPD-L1
非小細胞肺癌患者血漿中の bsPD-L1 (A) および sPD-L1 (B) を新型 ELISA
および従来型 ELISA を用いて測定した。

考 察

開発した新規 ELISA システム (特許出願中) は、PD-1 結合能を指標としている点で従来型の ELISA と異なる。この ELISA を用いた解析により、非小細胞肺癌患者の約 38% で PD-1 結合能を有する bsPD-L1 が血液中に存在することがわかった。さらに本研究により、非小細胞肺癌患者血漿中の sPD-L1 は糖鎖修飾を受けており、この糖鎖修飾が PD-1 との結合に重要な役割を果たすことが示唆された。糖鎖修飾は個人差が大きく、多様性を有することが知られている。現在、bsPD-L1 と肺癌予後および免疫チェックポイント阻害剤感受性との関連について解析中である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は竹内雅大、大林邦衣、土井知光 (産業医科大学医学部分子生物学講座)、米田和恵、田中文啓 (同第 2 外科学講座、敬称略) である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, Honjo T. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J Biomed Sci.* 2017 Apr 4;24(1):26. PMID:28376884 DOI: 10.1186/s12929-017-0329-9.
- 2) Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol.* 2013 Dec;14(12):1212-8. PMID:24240160 DOI: 10.1038/ni.2762

- 3) Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Sep 17;99(19):12293-7. Epub 2002 Sep 6. PMID:12218188 DOI: 10.1073/pnas.192461099
- 4) Takeuchi M, Doi T, Obayashi K, Hirai A, Yoneda K, Tanaka F, Iwai Y. Soluble PD-L1 with PD-1-binding capacity exists in the plasma of patients with non-small cell lung cancer. *Immunol Lett*. 2018 Apr 196:155-160. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29366663 DOI: 10.1016/j.imlet.2018.01.007.