

免疫チェックポイント阻害薬に伴う 膠原病発症と自己抗体産生に関する研究

名古屋大学 大学院医学系研究科 皮膚結合組織病態学
大学院生 桃原 真理子

(共同研究者)

名古屋大学 大学院医学系研究科 皮膚結合組織病態学 准教授 室 義直

1-1. 研究開始当初の背景および研究目的

本研究は、免疫チェックポイント阻害剤(抗PD-1阻害薬、抗CTLA-4阻害薬)の悪性黒色腫治療において、以下の2つの目的で研究をおこなった。

①抗CTLA-4阻害薬は、CTLA-4を阻害することによって末梢での制御性T細胞の働きを抑制することが知られている。抗CTLA-4抗体により治療を受けた膠原病患者において27%に症状の増悪を認めたという報告があり、また、抗CTLA-4抗体治療依存性に発症し、治療中断で軽快を認め、再投与で悪化を認めた皮膚筋炎やループス腎炎の症例も散見され、抗CTLA-4抗体による治療では自己免疫疾患が誘発される傾向にあることが予想された。自己免疫疾患(全身性エリテマトーデス、全身性強皮症、皮膚筋炎/多発筋炎等)に関連する自己抗体の産生動態及び疾患の発症について検討することを目的とした。

②抗CTLA-4抗体治療後発症の下垂体炎患者の全例で、抗下垂体抗体を認めたという報告や、またPD-1をノックアウトしたSLEモデルマウスにおいて、全例で心筋のミオシンに対する特異抗体が産生されているという報告がある。上記研究から抗CTLA-4抗体や抗PD-1抗体加療下では臓器特異的自己抗体が産生され易くなると考えられる。免疫チェックポイント阻害薬で加療した悪性黒色腫の症例では、白斑の発症と治療効果の優位な関連性が指摘されており、色素細胞に対して産生された特異的自己抗体が、抗腫瘍効果を発揮しているのではないかという仮説が立てられた。腫瘍周囲で強い炎症反応が認められることも、抗腫瘍特異抗体が産生されているのではないかということをサポートすると思われる。免疫チェックポイント阻害薬を投与し抗腫瘍効果が得られた検体において、腫瘍特異抗体産生の有無及び抗体の発現時期を解析することによって治療効果を予測する一助となるかを検討する。

1-2. 研究期間中に追加で行った実験の背景と目的

近年、次世代シーケンサーにより遺伝子解析が比較的容易に検索可能となったため、個々の患者単位でガンに発現している遺伝子変異により産生される新生抗原(ミュータノーム)が注目されるようになってきた。この抗原は非常に多彩で、この抗原に対しT細胞は胸腺にて免疫寛容を習得しないため、抗原性が高いことが知られている。新生抗原が産生されやすい

1つの原因として、腫瘍内のDNA 修復酵素欠損があり、悪性黒色腫などの免疫チェックポイント阻害薬に反応性のある癌種では他の癌種と比較し高頻度に欠損が認められることが近年注目されている。当科では、以前から自己免疫疾患群において抗DNA修復酵素(MMRE)抗体に注目し、本抗体(抗MSH2、MSH3、MSH6、MLH1、MLH3、PMS1、PMS2)を測定するELISA法を確立している。担癌患者の血清内には免疫複合体が多数認められていることが分かっており、腫瘍により抗体産生が亢進していると考えられる。今回私達は、DNA修復酵素の腫瘍内遺伝子異常により、抗原性の高いDNA修復酵素様タンパクが腫瘍内に産生され、抗MMRE抗体が悪性黒色腫の患者群において高率に陽性になるのではないかと仮定し、検索を行うことにした。

2-1. 研究成果

目的① 抗核抗体(抗細胞質抗体を含む)は、投与前の2検体を含めてすべての検体が血清80倍希釈で陽性であり、染色パターンに規則性は認めなかった(表1)。

No	age	Sex	治療内容	治療効果	ANA 核	ANA 細胞質	陽性 抗体
M1	51	M	Nivo 7→Ipi 2	PD	membranous	Fine dense staining	抗サイロ
M2	60	M	Ipi 4→Nivo 13	PD	Fine speckled	Fine speckled & condensed around the nucleus	抗甲状腺 抗サイロ
M3	60	M	Nivo 6 PD→Ipi 2 PR	PR	Fine speckled	Fine speckled	-
M4	24	F	Ipi 1→Nivo 32	SD→PD	membranous	Fine dense staining	抗サイロ
M5	50	M	Nivo8→Ipi1→Pen 9	PR	Fine speckled	Fine speckled	-
M6	57	F	Pem→Nivo 6→Pem 2	PD	Fine speckled	Fine fibres	-
M7	63	F	Nivo 12→Ipi 4	PR	Fine speckled	Fine speckled	-
M8	78	M	Nivo 37	CR	Fine speckled	Fine speckled & condensed around the nucleus	-
M9	54	M	Pem 1	評価前	speckled	Fine speckled with large dot	-
M10	72	F	Pem 4	判定前	-	Fine speckled & condensed around the nucleus	抗サイロ、 抗甲状腺
M11	59	M	Ipi 4→Nivo 8	PR	Fine speckled	Fine speckled	-
M12	76	M	Pem + 治験 2→Pem5	PD	Fine speckled	Fine speckled	-

表1 症例の治療内容と効果、抗核抗体判定結果

ANA: 抗核抗体, CR: complete response, F: female, Ipi:Ipilimumab, Nivo: Nivolumab, M: male, PD: progressive disease, Pem: pembrolizumab, PR: partial response, SD: stable disease, 抗サイロ: 抗サイログロブリン抗体, 抗甲状腺: 甲状腺ペルオキシダーゼ抗体 治験: 内容非公開

今回1年の研究機関で得られた12症例では、特異抗体を産生する膠原病(全身性エリテマトーデス、全身性強皮症、皮膚筋炎/多発筋炎等)をもともと合併していたり、投与期間中に発症した症例がなかったため、この目的に対する検討はできていないが、約30%の4症例に抗甲状腺抗体を認めた。

目的② 免疫チェックポイント阻害薬治療を受けた12例の患者より血清を採取した(表1)。

治療前に採血し得た検体はM3、M9で、M10以外の9症例は免疫チェックポイント阻害薬の一般的な効果判定基準である投与開始後3カ月以上経過した症例であった。

うち、部分奏効例(PR)が4例(M4、M5、M7、M11)、完全奏効例は1例(M8)のみであった。

症例M8は明らかなリンパ節転移を伴う踵5cm大の黒色結節で、手術を施行せず抗PD-1抗体投与となった。投与2か月で病変の明らかな縮小を認め、その後腫瘍は完全に転移部も含め消失した。投与開始後3か月より露光部に発赤出現し、その後白斑に変化。次第に全身に拡大した。白斑部ではメラノサイトの減少と色素の消失を認めた。

メラノーマ細胞、HaCaT細胞(ヒト不死化角化細胞)の培養細胞から抽出した細胞成分を用いて、患者検体12症例において(表1)ウエスタンブロットを行った(図2)。検体M4、M8、M7、においてHaCaT細胞、メラノーマ細胞の両方の細胞抽出物に対し強い反応を認めた。図には提示していないが、M10検体は陽性シグナルを呈さなかった。

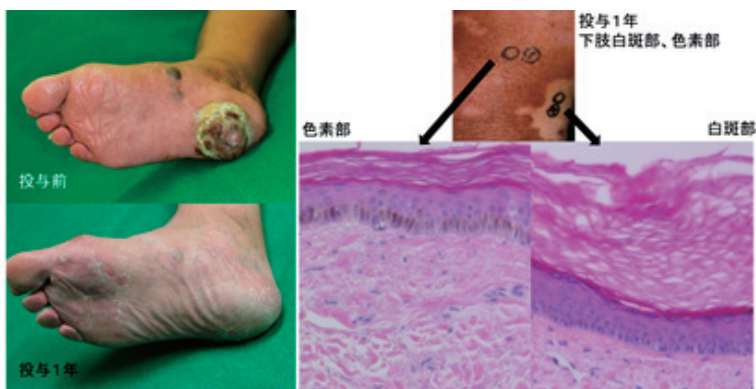


図1 症例M8の臨床像

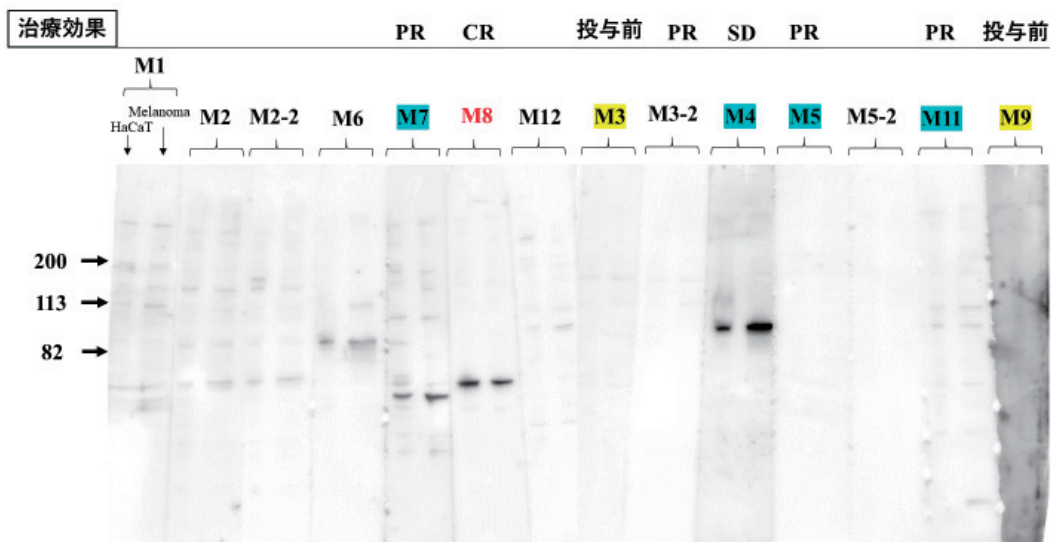


図2

2-2. 追加実験結果

リコンビナントタンパクを用いたELISA法で悪性黒色腫治療患者12例の血清内のDNA修復酵素(MSH2、MSH3、MSH6、MLH1、MLH3、PMS1、PMS2)に対する自己抗体の有無を検索した。12検体すべての血清において7種類のDNA修復酵素に対する抗体は陰性であった。(図3)

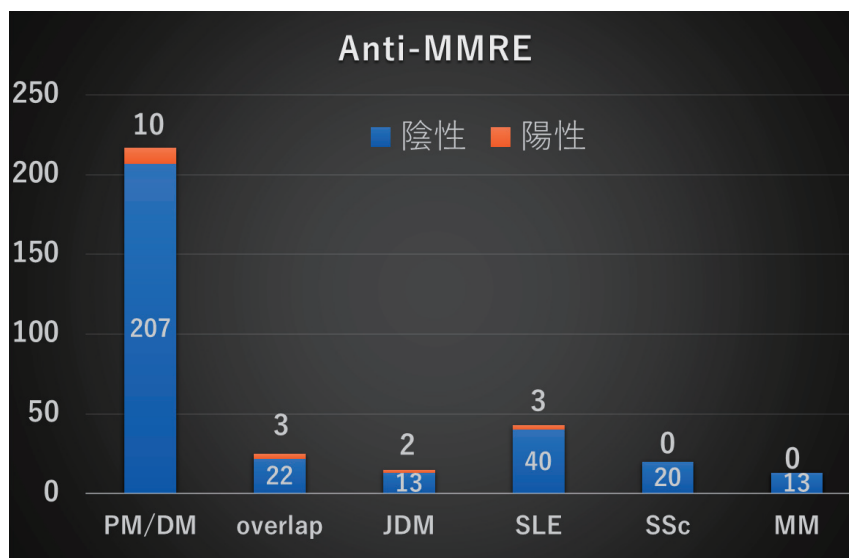


図 3 当院での膠原病疾患群と悪性黒色腫の比較

Overlap: myositis overlaps with SSc or SLE, RA, PM/DM: polymyositis/dermatomyositis
MMRE : DNA mismatch repair enzyme, JDM: juvenile DM

考 察

目的① 今回の研究では、全12症例と少数ながら、すべての症例で抗核抗体（抗細胞質抗体含む）が陽性となった。これは一般的な担癌患者における抗核抗体陽性率30%と比較し非常に高い。過去の文献において慢性肝炎が肝細胞癌化すると抗核抗体の陽性率が14%から30%へと増加し、抗核抗体の力価も強まり、染色のパターンも変化するという結果がある⁽¹⁾ また、肺癌において、抗核抗体陽性群は、陰性群と比較し生存率が高いとの報告も少数ながら認められる⁽²⁾。これらの報告は、担癌患者が癌特異抗原（癌内のみ発現しているタンパク）のみでなく、体細胞に共通したタンパク（抗核抗体で陽性になる細胞内抗原）に抗体産生を呈する可能性が高く、抗体の多様性が腫瘍免疫に影響を与えている可能性があることを示唆している。今回の研究で抗核抗体陽性率が非常に高い原因として考えられる要因のひとつとして、①悪性黒色腫が腫瘍内の遺伝子変異を多くもち⁽³⁾、抗原性の高いタンパク（ミュータノーム）⁽⁴⁾を産生しやすい癌種であるということ（ただし、現段階では、ミュータノームはT細胞が直接腫瘍細胞から抗原提示を受けるタンパクペプチドとして注目させており、これらのタンパクが既存の癌特異抗原のように抗体産生を誘導しうるのはまだわかっていない）、②今までの研究と比して、本研究は切除不能なほどの進行癌に疾患群が偏っていることが挙げられる。肝炎、間質性肺炎の重症度などの副作用の発現率等も含め、今後のさらなるデータの蓄積が必要とさせる。

目的② 癌特異抗原（腫瘍内のみ発現し、個体間で一定割合の陽性率をもち、抗原性の高いタンパク）の検索や発見タンパクのワクチン化、抗体製剤による治療などが盛んにおこな

われてきた。今回我々は免疫チェックポイント阻害薬で治療を受けた悪性黒色腫の患者群において、白斑出現群が陰性群と比較し、優位に奏効率が高い(overall response rate (ORR) 66.7% vs 14.3%)という本邦の報告(nivolumab)⁽⁵⁾および海外での同様の結果の報告⁽⁶⁾(CRまたはPR達成率が白斑陽性群で71%に対し陰性群28%)から、今まで研究されてきた癌特異的なタンパク抗原ではなく、正常ケラチノサイトにも発現しているタンパク抗原に反応しているため、白斑を生じるのではないかと考えた。通常であれば正常細胞のタンパクには免疫応答を起こさないように制御されているため正常細胞のタンパクは抗原性が低く、本抗体製剤治療患者のように、抑制を強制的に排除した状態でなければ抗原として認識されないのではないかと推察される。文献6によると、白斑の82%が全身型で、59%が白斑を生じる前に紅斑を呈しており、発生時期は投与開始から3、4、5カ月に白斑を生じているとあり、当院での症例に合致する。今回、症例 M8 (表1) の全身性に白斑を生じた症例のみが著名な抗腫瘍効果を呈し、副作用の発現も比較的少なかったため2年以上の長期投与が可能であった。この検体は不死化ケラチノサイトとメラノーマの両方の細胞抽出物に強い反応を示したが、他の抗体を認めなかった。今後反応タンパクを解析同定し、仮説を検証していきたい。

要 約

本研究では高率に抗核抗体が陽性になった。今回白斑を生じ、完全緩解を達成した検体で単一の強い抗体反応をウエスタンブロット法にて確認し得た。

文 献

- 1 Imai H *et al.* Increasing titers and changing specificities of antinuclear antibodies in patients with chronic liver disease who develop hepatocellular carcinoma *CANCER*: 71 : 26-35 1993
- 2 Blaes F *et al.* Antineural and antinuclear autoantibodies are of prognostic relevance in non-small cell lung cancer. *ANNALS OF THORACIC SURGERY*: 69: 254-258: 2000
- 3 Chalmers ZR *et al.* Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med.* :9:34:2017
- 4 Overwijk WW *et al.* Mining the mutanome: developing highly personalized Immunotherapies based on mutational analysis of tumors *J Immunother Cancer.*;1:11. 2013
- 5 Yamazaki N *et al.* Efficacy and safety of nivolumab in Japanese patients with previously untreated advanced melanoma: A phase II study. *Cancer Sci.*;108:1223-1230: 2017.
- 6 Hua C *et al.* Association of Vitiligo With Tumor Response in Patients With Metastatic Melanoma Treated With Pembrolizumab. *JAMA Dermatol.*;152:45-51.2016