



TITLE:

Peripheral blood Th9 cells are a possible pharmacodynamic biomarker of nivolumab treatment efficacy in metastatic melanoma patients.(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Nonomura, Yumi

CITATION:

Nonomura, Yumi. Peripheral blood Th9 cells are a possible pharmacodynamic biomarker of nivolumab treatment efficacy in metastatic melanoma patients.. 京都大学, 2017, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2017-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20254>

RIGHT:

許諾条件により本文は2018-01-01に公開

京都大学	博士 (医学)	氏 名	野々村 優美
論文題目	Peripheral blood Th9 cells are a possible pharmacodynamic biomarker of nivolumab treatment efficacy in metastatic melanoma patients. (末梢血 Th9 細胞は進行期メラノーマ患者に対するニボルマブ治療効果の薬力学的バイオマーカーとなる可能性がある)		
<p>①背景 2014 年、悪性黒色腫に対して承認されたニボルマブは、programmed cell death 1 (PD-1)に対するモノクローナル抗体であり、進行期悪性黒色腫の生命予後を改善した。しかし奏功率は 20-40%の患者にとどまり、治療効果を反映するバイオマーカーの同定が喫緊の課題であった。本研究では、患者末梢血中のバイオマーカーの探索と、治療反応性のメカニズムの解明を目指した。</p> <p>②実験手法と結果 (1) ニボルマブ奏功群の末梢血中では Th9 細胞%が増加している ニボルマブで治療した進行期悪性黒色腫患者 46 名の治療前と 3 回目の投与終了後の 2 点で末梢血を解析した。白血球数、分画、血液生化学検査結果を、治療反応群と不応群で比較した結果、優位な差はみられなかった。フローサイトメトリーを用いて、末梢血中の CD8⁺T 細胞、CD4⁺T 細胞、制御性 T 細胞の数と比率を検討した結果、優位な差はみられなかった。さらに CD8⁺T 細胞と CD4⁺T 細胞の分画を詳しく調べた結果、反応群では治療後 IL-9⁺CD4⁺T 細胞(Th9 細胞)%が上昇していることを見出した。</p> <p>(2) Th9 細胞誘導は抗 PD-1 抗体存在下で促進される Th9 は naïve T 細胞から IL-4 と TGFβ で誘導される。われわれは健常人末梢血を用い、<i>in vitro</i> にて抗 PD-1 抗体の Th9 誘導における作用を検討した。抗 PD-1 抗体存在下では、IL-4 と TGFβ による Th9 誘導が促進された。</p> <p>(3) CD8⁺T 細胞の細胞傷害性と IL-9 との関連 CD8⁺T 細胞の細胞傷害性への IL-9 の影響を調べるため、健常人末梢血のリンパ球を IL-9 中和抗体存在下で培養し、CD8⁺T 細胞中の granzyme B と perforin の発現をフローサイトメトリーで調べた。その結果、IL-9 中和抗体存在下では CD8⁺T 細胞中の granzyme B と perforin の発現が低下することを見出した。</p> <p>(4) 悪性黒色種マウスモデルにおける IL-9 阻害の作用の検討 B16 メラノーマ細胞移植モデル、タモキシフェン誘導型悪性黒色腫モデル(Braf/Pten モデル)を用い、<i>in vivo</i> での IL-9 の影響を検討した。IL-9 中和抗体を投与した群では、コントロール群に比べ、腫瘍の増大が促進された。腫瘍組織に浸潤する NK 細胞および CD8⁺T 細胞の数に両群で差はみられなかった。一方、CD8⁺T 細胞内の granzyme B と perforin の発現が IL-9 中和抗体投与群では低下していた。</p> <p>(5) 腫瘍特異的 CD8⁺T 細胞への IL-9 の作用の検討 IL-9 の腫瘍特異的 CD8⁺T 細胞への影響を調べるため、オボアルブミンを恒常的に発現する悪性黒色腫の細胞株 MO4 と、MO4 で免疫した OT-I マウス由来のリンパ球を用いて細胞傷害性試験を行った。その結果、OT-I 由来リンパ球は MO4 細胞を IL-9 存在下でより効率よく傷害した。さらにフローサイトメトリーで解析した所、IL-9 存在下では CD8⁺T 細胞内 granzyme B と perforin の発現が上昇し</p>			

ていた。

(6) ヒト悪性黒色腫組織では IL-9 が発現している

ヒト悪性黒色腫組織における IL-9 発現を、免疫染色にて検討した。調べた患者 10 名全ての組織で腫瘍内または近傍に IL-9 陽性細胞と CD8⁺T 細胞の存在が認められた。

③考察・まとめ

ニボルマブで抗腫瘍効果を示した患者では Th9 細胞が薬理作用に関与する可能性が示唆された。作用機序として、IL-9 が CD8⁺T 細胞内の granzyme B と perforin の発現を亢進し腫瘍細胞の傷害にかかわる可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

本研究は、メラノーマ患者に対する抗 PD-1 抗体の効果予測するバイオマーカーの探索、および、検出したバイオマーカーが関与する腫瘍免疫のメカニズムの解明を行ったものである。まずフローサイトメトリーを用いた患者末梢血サンプルの解析で、奏効群では治療開始後早期に IL-9 産生 CD4 陽性 T 細胞(Th9)分画が増加することを見出し、Th9 が治療開始後早期のバイオマーカーとなる可能性を示唆した。また、*in vitro* で抗 PD-1 抗体が Th9 の誘導を促進する事を示した。さらに、Th9 および IL-9 が寄与するメラノーマに対する腫瘍免疫機構を明らかにするため、マウスメラノーマモデルを用いた検討を行った。*In vivo* での IL-9 阻害により腫瘍の増大が促進され、腫瘍浸潤 CD8 陽性 T 細胞のグランザイム B、パーフォリンの発現が抑制された。また、*in vitro* の細胞傷害性試験において IL-9 を阻害したところ、CD8 陽性 T 細胞のグランザイム B、パーフォリンの発現が抑制され、細胞傷害性が抑制された。

以上の研究はメラノーマに対する抗 PD-1 抗体治療の効果発現機序の解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 2 月 6 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。