

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

W02020/071354

発行日 令和3年9月2日(2021.9.2)

(43) 国際公開日 令和2年4月9日(2020.4.9)

(51) Int.Cl. F 1 テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 Y

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁)

出願番号	特願2020-550446 (P2020-550446)	(71) 出願人	504205521
(21) 国際出願番号	PCT/JP2019/038721		国立大学法人 長崎大学
(22) 国際出願日	令和1年10月1日(2019.10.1)		長崎県長崎市文教町1-14
(31) 優先権主張番号	特願2018-187856 (P2018-187856)	(71) 出願人	300061835
(32) 優先日	平成30年10月3日(2018.10.3)		公益財団法人神戸医療産業都市推進機構
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		兵庫県神戸市中央区港島南町六丁目3番地の7
		(74) 代理人	230104019
			弁護士 大野 聖二
		(74) 代理人	100119183
			弁理士 松任谷 優子
		(74) 代理人	100149076
			弁理士 梅田 慎介
		(74) 代理人	100173185
			弁理士 森田 裕

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫チェックポイント阻害剤の効果予測方法

(57) 【要約】

免疫チェックポイント阻害剤による重症間質性肺炎の発症リスクを予測するための方法を提供し、安全で効果の高いがん免疫療法を実現すること。

(a) 被験者から単離された末梢血単核球におけるV δ 2⁺γ δ T細胞の細胞数又は割合、(b) 被験者から単離された末梢血単核球におけるV δ 2⁺γ δ T細胞の抗原刺激後の細胞数又は割合、(c) 被験者から単離された末梢血T細胞におけるV δ 2⁺γ δ T細胞の細胞数又は割合、及び(d) 被験者から単離された末梢血T細胞におけるV δ 2⁺γ δ T細胞の抗原刺激後の細胞数又は割合、から選ばれるいずれか1又は2以上を測定し、前記細胞数又は割合を指標として重症間質性肺炎の発症リスクを予測する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫チェックポイント阻害剤による重症間質性肺炎の発症リスクを予測する方法であって、

(a) 被験者から単離された末梢血単核球における $V\delta 2^{+}\gamma\delta T$ 細胞の細胞数又は割合、

(b) 被験者から単離された末梢血単核球における $V\delta 2^{+}\gamma\delta T$ 細胞の抗原刺激後の細胞数又は割合、

(c) 被験者から単離された末梢血 T 細胞における $V\delta 2^{+}\gamma\delta T$ 細胞の細胞数又は割合、及び

(d) 被験者から単離された末梢血 T 細胞における $V\delta 2^{+}\gamma\delta T$ 細胞の抗原刺激後の細胞数又は割合、から選ばれるいずれか 1 又は 2 以上を測定すること、及び

前記細胞数又は割合に基づいて重症間質性肺炎の発症リスクを判断すること、を含む方法。

10

【請求項 2】

前記細胞数又は割合がカットオフ値以上である場合に、当該被験者は重症間質性肺炎の発症リスクが高いと予測することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

抗原刺激後の細胞が凝集を生じる場合に、当該被験者は重症間質性肺炎の発症リスクが高いと予測することを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 4】

免疫チェックポイント阻害剤による治療の適否を判定する方法であって、請求項 1～3 に記載の方法にしたがい重症間質性肺炎の発症リスクを予測し、前記予測に基づき免疫チェックポイント阻害剤による治療の適否を判定する方法。

【請求項 5】

前記 $\gamma\delta T$ 細胞の抗原刺激が、IL-2、リン酸モノエステル化合物、ピロリン酸モノエステル化合物、トリリン酸モノエステル化合物、テトラリン酸モノエステル化合物、トリリン酸ジエステル化合物、テトラリン酸ジエステル化合物、窒素含有型ビスホスホン酸化合物、アルキルアミン、アルキルアルコール、アルケニルアルコール、イソプレニルアルコール、及びヒト由来腫瘍細胞から選ばれるいずれか 1 又は 2 以上の抗原を用いて行われる、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 6】

前記抗原刺激に加えて、IL-18、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-21、IL-23、インターフェロン γ 、及び末梢血コンディション培地から選ばれるいずれか 1 又は 2 以上を用いて $\gamma\delta T$ 細胞を刺激する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

細胞数又は割合が、フローサイトメトリー又はイメージサイトメトリーを用いて測定される、請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

(i) 抗 CD3 抗体、及び (ii) 抗 $V\delta 2$ 抗体を含む、免疫チェックポイント阻害剤による治療の適否を判定するためのキット。

40

【請求項 9】

さらに、

(iii) ピロリン酸モノエステル誘導体、又は窒素含有ビスホスホン酸誘導体、及び

(iv) IL-18、

から選ばれる 1 又は 2 以上を含む、請求項 8 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【 0 0 0 1 】

関連出願：

本明細書は、本願の優先権の基礎である特願 2 0 1 8 - 1 8 7 8 5 6 号 (2 0 1 8 年 1 0 月 3 日出願) の明細書に記載された内容を包含する。

技術分野：

本発明は、免疫チェックポイント阻害剤によるがん免疫療法の適否を判定する方法、及び前記方法のためのキットに関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

次世代のがん標準治療法として、免疫チェックポイント阻害剤を利用した “ がん免疫療法 ” が期待されている。免疫チェックポイントとは、がん細胞を認識し排除する自然の免疫防御機構を制御する分子である。PD - 1 は、免疫エフェクター細胞上に発現し、抗原提示細胞に発現する PD - L 1 や PD - L 2 と結合して、免疫防御機構を負に制御する、免疫チェックポイントとして機能する。

10

【 0 0 0 3 】

多くのがん細胞は、T細胞のシグナルを制御することで免疫防御機構を回避するシステムを有し、PD - 1 リガンドである PD - L 1 の発現と予後不良の間には相関があることが知られている (非特許文献 1) 。抗 PD - 1 抗体等を利用した PD - 1 免疫チェックポイント阻害による抗がん剤の開発も進められているが、その作用機序には不明な点が多く、また単独での奏効率は 5 ~ 3 0 % 程度にすぎない。一方で、間質性肺炎など有害事象を

20

【 0 0 0 4 】

免疫チェックポイント阻害剤の効果を予測するバイオマーカーの探索も行われており、免疫グロブリン、CD 5 L およびゲルソリンの血中濃度が抗 PD - 1 抗体の効果判定マーカーとして使用できること (特許文献 1) や、特定の miRNA が PD - 1 阻害剤の感受性予測に利用できること (特許文献 2) が報告されている。しかし、免疫チェックポイント阻害剤による治療の適否を判定する方法は未だ確立していない。

【 0 0 0 5 】

免疫チェックポイント阻害剤による治療の適否を予測・評価することは、その奏効率を高め、適切な患者に適切な医療を届ける精密医療を実現させるという点で、患者の安全は

30

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 6 】

【 特許文献 1 】 WO 2 0 1 0 / 0 0 1 6 1 7

【 特許文献 2 】 特開 2 0 1 6 - 6 4 9 8 9 号

【 非特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 非特許文献 1 】 Hamanishi J. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 27; 104(9):3360-5. Epub 2007 Feb 21.

40

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 8 】

本発明の課題は、免疫チェックポイント阻害剤による重症性間質性肺炎を発症するリスクを予測し、免疫チェックポイント阻害剤による治療の適否を診断することで、その奏効率を高め、より安全で効果の高いがん免疫療法を実現することにある。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

免疫チェックポイントは、免疫システムの中で 2 段階で作用している。一つは、Th 0 細胞が抗原提示細胞の抗原を最初に認識し、Th 1 細胞、Th 2 細胞、Th 1 7 細胞など

50

に分化する際にそれを負に制御するプライミングフェーズでの作用である。このプライミングフェーズでの、免疫チェックポイントとしてはC T L A - 4 / C D 8 0 / C D 8 6 が知られており、T細胞がある抗原を認識するかしないかを決定する。もう一つは、腫瘍細胞や感染細胞を免疫エフェクター細胞が障害するエフェクターフェーズでの作用である。このフェーズでの免疫チェックポイントとしては、P D - 1 / P D - L 1 / P D - L 2 が知られており、T細胞が腫瘍細胞や感染細胞を傷害するかしないかを決定する。細胞障害活性を有する免疫エフェクター細胞としては、C D 8 陽性T細胞（キラー細胞）、 $\gamma \delta$ T細胞、NK細胞、などが知られている。NK細胞は $\gamma \delta$ T細胞とC D 8 陽性T細胞を増殖させ、 $\gamma \delta$ T細胞とNK細胞は、標的細胞を傷害後、抗原提示分子（M H C クラス I 及び I I）と抗原ペプチド複合体を細胞表面に提示し、それに反応して $\alpha \beta$ T細胞が感作され、抗原特異性を獲得し、腫瘍細胞や感染細胞を傷害する。

10

【 0 0 1 0 】

発明者らは、P D - 1 免疫チェックポイント阻害剤の効果は、患者のエフェクター細胞の数とその機能に関連すると考え、抗 P D - 1 抗体（ニボルマブ）の治療を受けたがん患者の末梢血中のエフェクター細胞の数、増殖能、及び腫瘍細胞障害活性と有害事象及び奏効率との関係を調べた。そして、エフェクター細胞である $\gamma \delta$ T細胞（ $V \delta 2^+ \gamma \delta$ T細胞）の末梢血単核球中の細胞数又は割合を測定することで、P D - 1 免疫チェックポイント阻害剤による重症性間質性肺炎などの有害事象の発症リスクを予測できることを見出した。エフェクター細胞である $\gamma \delta$ T細胞は、刺激を受けた後、H L A - D R、H L A - D Q、C D 8 0、C D 8 6 などの抗原提示細胞関連分子を発現し、 $\alpha \beta$ T細胞に対して抗原提示を行うことが知られており、2 次的なプライミングフェーズで作用することが示唆されている。このことから、本発明知見は、P D - 1 免疫チェックポイント阻害剤だけでなく、2 次的なプライミングフェーズで作用するC T L A - 4 阻害剤による重症間質性肺炎などにも適用可能であることを見出し、本発明を完成させた。

20

【 0 0 1 1 】

すなわち、本発明は以下の [1] ~ [1 3] を提供する。

[1] 免疫チェックポイント阻害剤による重症間質性肺炎の発症リスクを予測する方法であって、

(a) 被験者から単離された末梢血単核球における $V \delta 2^+ \gamma \delta$ T細胞の細胞数又は割合、

30

(b) 被験者から単離された末梢血単核球における $V \delta 2^+ \gamma \delta$ T細胞の抗原刺激後の細胞数又は割合、

(c) 被験者から単離された末梢血T細胞における $V \delta 2^+ \gamma \delta$ T細胞の細胞数又は割合、及び

(d) 被験者から単離された末梢血T細胞における $V \delta 2^+ \gamma \delta$ T細胞の抗原刺激後の細胞数又は割合、から選ばれるいずれか 1 又は 2 以上を測定すること、及び

前記細胞数又は割合に基づいて重症間質性肺炎の発症リスクを判断すること、を含む方法。

前記方法では、比較的急性でびまん性肺胞傷害（diffuse alveolar damage : D A D）を伴う間質性肺炎（重症間質性肺炎）をそれ以外の（例えば器質化肺炎（organizing pneumonia : O P）を伴う）間質性肺炎と鑑別して、その発症を予測することができる。

40

[2] 前記細胞数又は割合がカットオフ値以上である場合に、当該被験者は重症間質性肺炎の発症リスクが高いと予測することの特徴とする、[1] に記載の方法。

[3] 抗原刺激後の細胞数又は割合が高く、抗原刺激後の細胞が凝集を生じる場合に、当該被験者は重症間質性肺炎の発症リスクが高いと予測することの特徴とする、[1] に記載の方法。

[4] 免疫チェックポイント阻害剤による治療の適否を判定する方法であって、請求項 1 ~ 3 に記載の方法にしたがい重症間質性肺炎の発症リスクを予測し、前記予測に基づき免疫チェックポイント阻害剤による治療の適否を判定する方法。

[5] 前記 $\gamma \delta$ T細胞の抗原刺激が、I L - 2、リン酸モノエステル化合物、ピロリン酸

50

モノエステル化合物、トリリン酸モノエステル化合物、テトラリン酸モノエステル化合物、トリリン酸ジエステル化合物、テトラリン酸ジエステル化合物、窒素含有型ビスホスホン酸化合物、アルキルアミン、アルキルアルコール、アルケニルアルコール、イソプレニルアルコール、及びヒト由来腫瘍細胞から選ばれるいずれか 1 又は 2 以上の抗原を用いて行われる、[1] ~ [4] のいずれかに記載の方法。

[6] 前記抗原刺激に加えて、IL - 18、IL - 2、IL - 7、IL - 12、IL - 15、IL - 21、IL - 23、インターフェロン γ 、及び末梢血コンディショニング培地から選ばれるいずれか 1 又は 2 以上を用いて $\gamma\delta$ T 細胞を刺激する、[5] に記載の方法。

[7] 細胞数又は割合が、フローサイトメトリー又はイメージサイトメトリーを用いて測定される、[1] ~ [6] のいずれかに記載の方法。

[8] (i) 抗 CD 3 抗体、及び (ii) 抗 V δ 2 抗体を含む、免疫チェックポイント阻害剤による治療の適否を判定するためのキット。

[9] さらに、

(iii) ピロリン酸モノエステル誘導体、又は窒素含有ビスホスホン酸誘導体、及び

(iv) IL - 18、

から選ばれる 1 又は 2 以上を含む、[8] に記載のキット。

[10] 免疫チェックポイント阻害剤による重症間質性肺炎の発症リスクの診断を補助するための方法であって、

(a) 被験者から単離された末梢血単核球における V δ 2 $^{+}$ $\gamma\delta$ T 細胞の細胞数又は割合、

(b) 被験者から単離された末梢血単核球における V δ 2 $^{+}$ $\gamma\delta$ T 細胞の抗原刺激後の細胞数又は割合、

(c) 被験者から単離された末梢血 T 細胞における V δ 2 $^{+}$ $\gamma\delta$ T 細胞の細胞数又は割合、及び

(d) 被験者から単離された末梢血 T 細胞における V δ 2 $^{+}$ $\gamma\delta$ T 細胞の抗原刺激後の細胞数又は割合、から選ばれるいずれか 1 又は 2 以上を測定することを含み、

ここで、重症間質性肺炎の発症リスクは前記細胞数又は割合に基づいて決定される、方法。

[11] 免疫チェックポイント阻害剤による重症間質性肺炎の発症リスクを予測し、免疫チェックポイント阻害剤により治療するための方法であって、

(a) 被験者から単離された末梢血単核球における V δ 2 $^{+}$ $\gamma\delta$ T 細胞の細胞数又は割合、

(b) 被験者から単離された末梢血単核球における V δ 2 $^{+}$ $\gamma\delta$ T 細胞の抗原刺激後の細胞数又は割合、

(c) 被験者から単離された末梢血 T 細胞における V δ 2 $^{+}$ $\gamma\delta$ T 細胞の細胞数又は割合、及び

(d) 被験者から単離された末梢血 T 細胞における V δ 2 $^{+}$ $\gamma\delta$ T 細胞の抗原刺激後の細胞数又は割合、から選ばれるいずれか 1 又は 2 以上を測定すること、

前記細胞数又は割合に基づいて重症間質性肺炎の発症リスクを予測すること、及び

前記予測にしたがい免疫チェックポイント阻害剤による治療を行う（例えば、発症リスクが高い被験者を除外して免疫チェックポイント阻害剤の投与を行う、あるいは発症リスクが高い患者には所定の措置を講じて免疫チェックポイント阻害剤の投与を行う）ことを含む、方法。

[12] 被験者が、肺がん患者である、[1] ~ [7]、[10]、及び [11] のいずれかに記載の方法。

[13] 免疫チェックポイント阻害剤を含有する医薬組成物であって、重症間質性肺炎の発症を抑制し、腫瘍を治療または予防するために使用され、[1] ~ [7] のいずれかに記載の方法により重症間質性肺炎の発症リスクが少ないと判断される被験者に用いることを特徴とする医薬組成物。

上記 [1] ~ [13] において、免疫チェックポイント阻害剤は、好ましくは PD - 1

10

20

30

40

50

免疫チェックポイント阻害剤である。

【発明の効果】

【0012】

本発明によれば、免疫チェックポイント阻害剤による重症間質性肺炎の発症リスクを投与前に予測し、治療の適否を判定することで、適切な患者に適切な医薬を提供する精密医療が実現される。本発明の方法は、患者から採取したわずかな末梢血を用いて実施できるため患者の負担が少なく、しかもフローサイトメトリー等を用いることで迅速かつ簡便に診断することができる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、健常人末梢血単核球における $\gamma\delta$ T細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した結果を示す。

【図2】図2は、PTA及びIL-2で増殖誘導したときの健常人末梢血単核球における $\gamma\delta$ T細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した結果を示す（左：Day 0、右 Day 11）。（A） $V\delta 2$ 型 $\gamma\delta$ T細胞のDay 0における割合が5.57%であった健常人、（B） $V\delta 2$ 型 $\gamma\delta$ T細胞のDay 0における割合が10.35%であった健常人。

【図3】図3は、肺がん患者における $\gamma\delta$ T細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した結果を示す。

【図4】図4は、PTA及びIL-2で増殖誘導したときの肺がん患者の末梢血単核球における $\gamma\delta$ T細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した結果を示す（左：Day 0、右 Day 11）。（A） $V\delta 2$ 型 $\gamma\delta$ T細胞のDay 0における割合が4.14%であった肺がん患者、（B） $V\delta 2$ 型 $\gamma\delta$ T細胞のDay 0における割合が2.91%であった肺がん患者、（C） $V\delta 2$ 型 $\gamma\delta$ T細胞のDay 0における割合が0.89%であった肺がん患者、（D） $V\delta 2$ 型 $\gamma\delta$ T細胞のDay 0における割合が0.78%であった肺がん患者。

【図5】図5は、健常人末梢血単核球をZol/IL-2あるいはZol/IL-2/IL-18で刺激したときの $\gamma\delta$ T細胞の増殖を示す（図中、左：コントロール（培地）、中央：Zol/IL-2、右：Zol/IL-2/IL-18）。

【図6】図6は、健常人末梢血単核球のCD3陰性画分をIL-2あるいはIL-2/IL-18で刺激したときのNK細胞の増殖を示す（図中、上：IL-2、下：IL-2/IL-18）。

【図7】図7は、IL-2/IL-18によるNK細胞増殖誘導能と $\gamma\delta$ T細胞の増殖誘導との関係を混合培養により確認した結果を示す（図中、左： $\gamma\delta$ T細胞単独培養、中央：NK細胞単独培養、右：NK細胞と $\gamma\delta$ T細胞の混合培養。NK細胞（赤色）、 $\gamma\delta$ T細胞（緑色）。

【図8】図8は、抗原刺激後の $\gamma\delta$ T細胞の増殖誘導メカニズムを示す。

【図9】図9は、PD1免疫チェックポイント阻害剤によるがん免疫療法と効果予測の概念を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

1. 定義

「免疫チェックポイント阻害剤」

免疫チェックポイント阻害剤とは、CTLA-4/CD80/CD86シグナル伝達系や、PD-1/PD-L1/PD-L2シグナル伝達系などの免疫チェックポイントを阻害し、これにより抗腫瘍効果やウイルスなどの免疫逃避を抑制して抗感染症効果を示す物質を言う。

【0015】

「PD-1 (Programmed Death-1)」は、エフェクターT細胞表面に発現し、腫瘍細胞表面に発現するPD-L1と相互作用することで免疫防御機構を負に制御する、いわゆる免疫チェックポイントである。PD-1は、細胞内領域に2つのITIM (Immunorecept

10

20

30

40

50

or tyrosine-based inhibition motif) 構造を有し、そのC末端側にSHIP-2が結合することにより免疫抑制シグナルが伝達されると考えられている。

「PD-1免疫チェックポイント阻害剤」とは、PD-1が介在する免疫チェックポイント系を阻害する物質を意味する。これにより、「PD-1免疫チェックポイント阻害剤」は、腫瘍細胞による免疫逃避機構を抑制することで抗腫瘍効果を示し、またウイルスや病原微生物の免疫逃避を抑制することで抗感染症効果を示す。

【0016】

一般に、T細胞は、抗原提示細胞上に提示された抗原ペプチド/MHCクラスIあるいはMHCクラスII複合体をT細胞受容体(TCR)依存的に認識する。しかし、このTCR/抗原ペプチド/MHC複合体からのシグナルだけでは、完全な免疫応答は惹起されず、T細胞のプライミングには、TCR/抗原ペプチド/MHC複合体のシグナルに加えて、CD28/CD80/CD86シグナル系が必要である(正の副刺激シグナル)。これに対し、CTLA-4/CD80/CD86シグナル系が作動すると、T細胞の活性化が負に制御される(負の副刺激シグナル)。すなわち、CD28やCTLA-4の副刺激シグナルは、T細胞がある抗原に対して反応するかどうかの最初の段階を規定する。一方、エフェクターフェーズでは、ICOS/ICOSLシグナル系が正の副刺激シグナルとなり、PD-1/PD-L1/PD-L2シグナル系が負の副刺激シグナルとなる。すなわち、PD-1/PD-L1システムは、T細胞が標的細胞を殺すか殺さないかを決定するフェーズにおいて負のシグナル系として機能する。

【0017】

PD-1免疫チェックポイント阻害剤としては、3つの候補、すなわち、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体が考えられる。まず、抗PD-1抗体はPD-1とPD-L1との相互作用、そして、PD-1とPD-L2との相互作用の両者を遮断する。一方、抗PD-L1抗体はPD-1とPD-L1との相互作用のみを、抗PD-L2抗体はPD-1とPD-L2との相互作用のみを遮断する。

【0018】

PD-1は活性化した免疫エフェクターT細胞に発現することが知られている。PD-L1とPD-L2は、予後の悪い腫瘍細胞に発現することが知られているが、PD-L2は樹状細胞にも発現している。そのため、抗PD-L1抗体は、活性化T細胞上に発現するPD-1と腫瘍細胞上に発現するPD-L1との相互作用を阻害して、T細胞の免疫抑制を遮断することで、T細胞の抗腫瘍効果を特異的に亢進させることが期待できる。一方、抗PD-L2抗体は、活性化T細胞上に発現するPD-1と腫瘍細胞上に発現するPD-L2との相互作用を阻害するため、T細胞の免疫抑制を遮断するほかに、T細胞上に発現するPD-1と樹状細胞上に発現するPD-L2との相互作用を阻害し、T細胞のプライミングにも影響を与える可能性がある。すなわち、抗PD-L2抗体や抗PD-1抗体はがん特異的な作用に加えて、別の異なる作用を示す可能性がある。このように、理論的には、PD-1免疫チェックポイント阻害剤としては、抗PD-L1抗体が最もがん特異的であり、副作用も小さいと予想されるが、現実の作用については、臨床を踏まえたより詳細な解析が必要である。

【0019】

現在販売あるいは開発中の免疫チェックポイント阻害剤のうち、エフェクターフェーズで作用するPD-1免疫チェックポイント阻害剤としては、抗PD-1抗体であるニボルマブ(オプジーボ)、ペムブロリズマブ(キイトルーダ)、ビディリズマブ(CT-011);抗PD-L1抗体であるアテゾリズマブ(MPDL3280A/RG-7446)、Durvalumab(MEDI4736)、アベルマブ(MSB0010718C)、MED10680/AMP-514が挙げられる。他のフェーズで作用する、現在販売あるいは開発中の免疫チェックポイント阻害剤としては、抗CTLA-4抗体であるイピリムマブ(MDX-010)、トレメリムマブ(CP675、206);抗キラー細胞免疫グロブリン様受容体(KRI)抗体であるリリルマブ(IPH2102/BMS-986015)、抗CD137抗体であるウレルマブ(BMS-663513)、PF-05

10

20

30

40

50

0 8 2 5 6 6、抗 L A G 3 抗体である B M S - 9 8 6 0 1 6 ; 抗 O X 4 0 抗体である M E D I 6 4 6 9 等が挙げられる。

【 0 0 2 0 】

「 間質性肺炎 」

間質性肺炎とは肺の間質を炎症や線維化病変の場とする疾患の総称であり、進行して肺が線維化を起こしたものは肺線維症と呼ばれる。間質性肺炎の原因は多岐にわたり、職業・環境性や薬剤などによるもの、膠原病・サルコイドーシスなどの全身性疾患に付随して発症するもの、原因が特定できないものがある。一般的傾向として、急性発症はびまん性肺胞傷害 (diffuse alveolar damage : D A D) などの臨床像を取るのに対し、慢性発症では器質化肺炎 (organizing pneumonia : O P) の臨床像を示す。O P などは一般に良好で薬剤中止あるいは副腎皮質ステロイド (ステロイド) の使用で改善することが多いが、D A D は治療反応性に乏しく予後不良で、回復しても線維化を残す。

10

【 0 0 2 1 】

「 重症間質性肺炎 」

本明細書において、重症間質性肺炎とは、比較的急性の D A D を伴う間質性肺炎を意味し、急性増悪を起こし、死に至る危険がある間質性肺炎の症状を意味する。本発明の方法によれば、D A D を伴う間質性肺炎と、それ以外の (例えば O P を伴う) 間質性肺炎を鑑別して、その発症を予測することができる。

【 0 0 2 2 】

「 末梢血単核球 (P B M C) 」

20

単核球 (Mononuclear Cells) とは全身の結合組織、血中、リンパ組織に広く分布する単核の間葉系細胞群の総称で、組織中のマクロファージ、その前駆細胞である単球、リンパ球が含まれる。本発明にかかる「末梢血単核球 (Peripheral Blood Mononuclear Cells : P B M C)」とは、末梢血に存在する単核球であり、主として単球とリンパ球からなる。末梢血単核球は公知の方法により、あるいは市販のキット等を用いて、単離することができる。

【 0 0 2 3 】

「 腫瘍細胞障害活性 」

「腫瘍細胞障害活性」とは、腫瘍細胞に対して、死、機能障害、増殖阻害を与える機能を意味する。N K 細胞は、腫瘍細胞表面のリガンドと $\gamma \delta$ T 細胞は、細胞内 I P P 濃度の高い腫瘍細胞に対して、高い細胞障害性を示し、I F N - γ や T N F - α などのサイトカインを産生し、抗腫瘍細胞活性を示す。腫瘍細胞傷害性を有する「エフェクター T 細胞」としては、 $\alpha \beta$ T 細胞、 $\gamma \delta$ T 細胞、N K 細胞が知られている。

30

【 0 0 2 4 】

「 $\alpha \beta$ T 細胞 」

「 $\alpha \beta$ T 細胞」は、 α 鎖と β 鎖の 2 つの糖タンパク質から構成される T 細胞受容体を有する T 細胞で、末梢血リンパ球の大部分を占める。 $\alpha \beta$ T 細胞は T C R / C D 3 複合体により、抗原性ペプチド / M H C 複合体を認識する。したがって、 $\alpha \beta$ T 細胞を解析するためには抗原性ペプチドに関する情報が必要になる。現在までに T 細胞の認識する抗原性ペプチドが同定されているが、一つの腫瘍でもその種類は複数であることが推測され、その全体を把握し、解析するのは困難である。

40

【 0 0 2 5 】

「 $\gamma \delta$ T 細胞 」

「 $\gamma \delta$ T 細胞」は、細胞表面に γ 鎖と δ 鎖の 2 つの糖タンパク質から構成される T 細胞受容体を有する T 細胞である。 $\gamma \delta$ T 細胞は、通常 $\alpha \beta$ T 細胞と比べると、はるかに少ない。末梢血単核球の C D 3 陽性 T 細胞中には約 4 % の $\gamma \delta$ T 細胞が存在し、その 5 0 ~ 7 5 % が、T C R 可変領域において、「V γ 2」 (V γ 9 と称されることもある) 及び「V δ 2」を発現する V γ 2 V δ 2 T 細胞 (V δ 2 $^{+}$ $\gamma \delta$ T 細胞) である。

【 0 0 2 6 】

$\gamma \delta$ T 細胞を活性化する抗原分子はほとんど知られていないが、発明者らはモノエチル

50

リン酸などの合成アルキルリン酸が $\gamma\delta$ T細胞の抗原になること(Tanaka Y et al., PNAS USA 91 :8175-8179, 1994)、イソプレノイド生合成経路の起点となるイソメンテニルニリン酸(I P P)などのピロリン酸モノエステル系代謝物を抗原として認識し、I P Pで活性化された $\gamma\delta$ T細胞は強い抗腫瘍活性を有することを報告している(Tanaka et al., Nature, 375: 155-158, 1995)。また、窒素含有型ビスホスホン酸で抗原提示細胞(Miyagawa F et al., J. Immunol 166: 5508-5514, 2001)や腫瘍細胞(Kato Y. et al., J. Immunol 167: 5092-5098, 2001)を処理すると $\gamma\delta$ T細胞が活性化されることも報告している。 $\gamma\delta$ T細胞は、その抗原認識機構の詳細に関しては、未解明の部分が多いが、解析は可能である。

【0027】

10

「ナチュラルキラー(NK)細胞」

本発明にかかる「NK細胞」は、T細胞にも、B細胞にも属さないリンパ球で、腫瘍細胞、ある種のウイルス感染細胞、移植骨髄細胞などに対して、主要組織適合性(MHC)抗原に拘束されずに障害活性を示す。NK細胞の表面には、標的細胞表面のリガンドと結合して細胞障害活性を誘導する活性化受容体と、自己MHCクラスI分子を認識して活性化受容体からのシグナルを抑制する抑制受容体が存在する。このように、NK細胞は、通常はMHCによる負のシグナルを受け、腫瘍細胞上のMHCが欠落した際、腫瘍細胞障害性を発揮する。しかし、ヒトのNK細胞でPD-1の発現を検討すると、その発現の確認が困難であり、解析することは難しい。

【0028】

20

発明者らは、IL-2とIL-18を組み合わせることでNK細胞を効率的に増殖できることを見出している(WO2016/021720)。NK細胞はCD56の発現により同定できる。IL-2及びIL-18刺激後のNK細胞は、抗原提示細胞に関連したHLA-DR、HLA-DQ、CD80を発現しており、がん細胞の破壊に加えて、T細胞にがん抗原を提示することで、免疫防御を活性化させることが示唆される。

【0029】

「キラーT細胞(CTL)」

「キラーT細胞(CTL)」は、細胞障害性T細胞(CTL: Cytotoxic T Lymphocyte)と称され、宿主にとって異物である、アロ抗原やウイルス抗原を有する細胞を認識して障害する。CTLは、細胞表面にCD8抗原と α 鎖、 β 鎖からなるT細胞受容体を有する。「CD8陽性T細胞」は、抗原提示細胞からMHC-クラスI抗原と抗原ペプチドの提示を受け、活性化されることで、細胞障害活性を有ようになる。活性化されたCTLは、パーフォリン、グランザイム、TNFを放出したり、標的細胞のFas抗原を刺激してアポトーシスを誘導することで、細胞を障害する。

【0030】

2. 免疫チェックポイント阻害剤による重症間質性肺炎の発症リスク

免疫チェックポイント阻害剤は、腫瘍細胞によるエフェクターT細胞の機能抑制を解除することにより、その本来の機能を回復させる。しかし、エフェクターT細胞の数が極端に少ないがん患者に関しては、エフェクター細胞の機能を回復させても、その絶対数が足りないために効率的な抗腫瘍効果は期待できない。本発明は、エフェクター細胞である $\gamma\delta$ T細胞の数(割合)と機能を測定することで、免疫チェックポイント阻害剤による重症間質性肺炎の発症リスクを予測することを特徴とする。

【0031】

2.1 検体(試料)

本発明で使用される検体(試料)は、被験者、すなわち免疫チェックポイント阻害剤の使用を検討している、あるいは既に使用している被験者から単離された末梢血単核球である。1回の測定に必要な末梢血は、少なくとも10ml、好ましくは10ml~20mlである。

【0032】

末梢血単核球は、被験者から採取した末梢血を、必要であれば適当量の抗凝固剤を加え

50

、常法にしたがい、P B Sなどの生理学的緩衝液で希釈後、密度勾配遠心、比重遠心等にかけることにより単離することができる。単離した単核球は、Y s s e l 培地、I s c o v 培地、R P M I 1 6 4 0 培地等のヒトT細胞用の培地で希釈して、一定の濃度、例えば 1×10^4 c e l l s / m l ~ 1×10^7 c e l l s / m l、好ましくは 5×10^5 c e l l s / m l ~ 3×10^6 c e l l s / m l に調整する。

【0033】

2.2 測定対象

(a) 末梢血単核球における $V \delta 2^+ \gamma \delta T$ 細胞の細胞数又は割合

「末梢血単核球における $V \delta 2^+ \gamma \delta T$ 細胞の細胞数又は割合」は、特異的な表面マーカーを利用することで、測定することができる。

10

【0034】

例えば、T細胞はその表面にC D 3 抗原を有し、 $\gamma \delta T$ 細胞は、さらに γ 鎖及び δ 鎖の2つの糖タンパク質からなる受容体を表面に有している。よって、被験者から単離された末梢血単核球に対して、C D 3 に特異的に結合する抗体と、 γ 鎖及び δ 鎖の一方又は両方に特異的に結合する抗体（例えば、抗 $V \gamma 2$ 抗体、抗 $V \delta 1$ 抗体、抗 $V \delta 2$ 抗体）を使用することにより、末梢血単核球における $\gamma \delta T$ 細胞の量を測定することができる。前述のとおり、 $\gamma \delta T$ 細胞の大部分は $V \gamma 2 V \delta 2 T$ 細胞（ $V \delta 2^+ \gamma \delta T$ 細胞）であるため、 $V \delta 2$ を指標とすることで、実質的に $V \gamma 2 V \delta 2$ を検出することができる。すなわち、抗 $V \delta 2$ 抗体とT細胞抗原であるC D 3 抗原を用いて検出したC D 3 + $V \delta 2^+$ 細胞（ $V \delta 2^+ \gamma \delta T$ 細胞）を、 $\gamma \delta T$ 細胞の数や割合を示すものとして判定に用いることができる。測定は、後述するフローサイトメトリーあるいはイメージアナライザーを使用することで、簡便かつ迅速に、「末梢血単核球における $V \delta 2^+ \gamma \delta T$ 細胞の細胞数又は割合」を求めることができる。

20

【0035】

具体的には、末梢血採取後（D a y 0 における）、一定数の末梢血単核球（以下のカットオフ値では、末梢血単核球 1×10^7 個）に関して、細胞数又は割合を測定する。被験者の免疫状態は変化しうるため、末梢血採取は治療直前に実施することが好ましい。

【0036】

(b) 末梢血単核球における $V \delta 2^+ \gamma \delta T$ 細胞の抗原刺激後の細胞数又は割合

「末梢血単核球における $V \delta 2^+ \gamma \delta T$ 細胞の抗原刺激後の細胞数又は割合」は、 $V \delta 2^+ \gamma \delta T$ 細胞の増殖能を示す。

30

【0037】

使用される抗原は、 $\gamma \delta T$ 細胞によって認識され、これを活性化できるものであれば特に限定されない。例えば、I L - 2、I L - 7、I L - 12、I L - 15、I L - 18、I L - 21、I L - 23、インターフェロン γ などのペプチド性抗原；マイコバクテリアやマラリア原虫などが産生する（E）- 4 - ヒドロキシ - 3 - メチル - 2 - ブテニルニリン酸（H M B - P P）、2 - メチル - 3 - ブテニルニリン酸（2 M 3 B P P）、モノエチルリン酸などの合成アルキルリン酸を含むリン酸モノエステル化合物、トリリン酸モノエステル化合物、テトラリン酸モノエステル化合物、トリリン酸ジエステル化合物、テトラリン酸ジエステル化合物；例えば、イソペンテニルニリン酸（I P P）、モノエチルピロリン酸二ナトリウム、モノメチルピロリン酸二ナトリウム、モノプロピルピロリン酸二ナトリウムなどのC 1 - 5 のアルキル基を有するピロリン酸モノエステル化合物又はその塩に代表されるピロリン酸誘導体（例えば、特開 2 0 0 3 - 1 2 8 5 5 5 号に記載の化合物など）；窒素含有ビスホスフォネートのジェミナル炭素原子にアルキルアミンまたはアルケニルアミンを導入したビスホスホン酸化合物もしくはそのエステル又はそれらの塩に代表される窒素含有ビスホスホン酸化合物（例えば、W O 2 0 1 6 / 0 9 8 9 0 4、W O 2 0 1 6 / 1 2 5 7 5 7 に記載された化合物（後掲 P T A など）、アルキルアミン、アルキルアルコール、アルケニルアルコール、イソプレニルアルコールなどの非ペプチド性抗原、ならびにヒト由来腫瘍細胞や末梢血コンディショニング培地等を使用することができる。前記抗原は、機能し得る限り、そのフラグメント（断片）であってもよい。

40

50

【 0 0 3 8 】

抗原刺激後の細胞数や割合は、単離した末梢血単核球を含む培養液に上記した抗原を添加し、一定期間経過後に前項 (a) と同様の方法で測定する。添加する抗原の量は、使用する抗原の $\gamma \delta$ T 細胞活性化能に応じて適宜決定する。抗原添加後の測定までの時間も使用する抗原に応じて適宜決定されるが、通常は 0 . 5 時間以上、好ましくは 1 2 時間 ~ 1 4 日程度である。

【 0 0 3 9 】

例えば、IL - 2 の場合、例えば 1 0 ~ 1 0 0 0 IU / ml、好ましくは 2 0 ~ 2 0 0 IU / ml となるように添加し、3 7 °C、5 % CO₂ 雰囲気下でインキュベートし、3 日 ~ 1 4 日後、好ましくは 7 日 ~ 1 1 日後に $\gamma \delta$ T 細胞の細胞数又は割合を測定する。

10

【 0 0 4 0 】

ピロリン酸モノエステル誘導体の場合であれば、例えば 1 0 pM ~ 5 0 0 μ M、好ましくは 1 0 0 pM ~ 1 0 0 μ M となるように添加し、3 7 °C、5 % CO₂ 雰囲気下でインキュベートし、3 日 ~ 1 4 日後、好ましくは 7 日 ~ 1 1 日後に $\gamma \delta$ T 細胞の細胞数又は割合を測定する。

【 0 0 4 1 】

PTA のような窒素含有型ビスホスホン酸誘導体であれば、例えば 1 nM ~ 5 0 0 μ M、好ましくは 1 0 nM ~ 5 μ M (例えば、1 μ M の PTA) となるように添加し、3 7 °C、5 % CO₂ 雰囲気下でインキュベートし、3 日 ~ 1 4 日後、好ましくは 7 日 ~ 1 1 日後に $\gamma \delta$ T 細胞の細胞数又は割合を測定する。

20

【 0 0 4 2 】

(c) 末梢血 T 細胞における $V \delta 2^+ \gamma \delta$ T 細胞の細胞数又は割合

「末梢血 T 細胞における $V \delta 2^+ \gamma \delta$ T 細胞の細胞数又は割合」は、T 細胞に特異的な抗 CD 3 抗体と抗 $V \delta 2$ 抗体を用いることにより求めることができる。測定は、後述するフローサイトメトリーあるいはイメージアナライザーを使用することで求めることができる。

【 0 0 4 3 】

(d) 抗原刺激後の末梢血 T 細胞における $V \delta 2^+ \gamma \delta$ T 細胞の細胞数又は割合

「末梢血 T 細胞における抗原刺激後の $V \delta 2^+ \gamma \delta$ T 細胞の細胞数又は割合」は、 $V \delta 2^+ \gamma \delta$ T 細胞の増殖能を示す。抗原刺激及び抗原刺激後の $V \delta 2^+ \gamma \delta$ T 細胞の細胞数又は割合の測定方法は、(b) に記載した方法に準じて実施することができる。

30

本発明においては、上記 (a) ~ (d) のいずれを指標とすることも可能であるが、後述するように、CD 3⁺ $V \delta 2^+$ 細胞が多い被験者においては末梢血 T 細胞を試料とするほうが好ましい。

また、通常健康人では $\gamma \delta$ T 細胞の大部分は $V \delta 2^+$ 細胞であるが、がん患者では、 $V \delta 1$ が多い場合がある。そのような患者由来の試料でも、抗原刺激をすると $V \delta 2^+$ 細胞が増殖し、 $V \delta 1$ は検出感度以下になるため、 $V \delta 2^+ \gamma \delta$ T 細胞を、 $\gamma \delta$ T 細胞の数や割合を示すものとして評価することができる。したがって、 $V \delta 1^+ \gamma \delta$ T 細胞が多い被験者においては抗原刺激後の試料中の $V \delta 2^+ \gamma \delta$ T 細胞の細胞数や割合を指標とすることが好ましい。

40

【 0 0 4 4 】

2 . 3 細胞数又は割合の測定

・ フローサイトメトリー

末梢血単核球あるいは末梢血 T 細胞中における $V \delta 2^+ \gamma \delta$ T 細胞の細胞数又は割合の測定方法は、各細胞の表面抗原に特異的な抗体を使用して、フローサイトメトリーにより測定することができる。フローサイトメトリーは、流体に懸濁させた細胞を 1 個ずつセンシングゾーンに導き、その単一の流れにおいて、蛍光や散乱光を測定することで、多量の細胞を短時間に 1 個ずつ定量解析できる細胞測定法である。

【 0 0 4 5 】

$V \delta 2^+ \gamma \delta$ T 細胞の細胞数又は割合は、T 細胞マーカーである CD 3 と、 $\gamma \delta$ T 細胞

50

マーカーであるV δ 2等を用いた2色蛍光ヒストグラムにより簡便に測定することができる。具体的に言えば、末梢血単核球をCD3抗体と抗体V δ 2抗体を用いた2色蛍光ヒストグラムで解析すると、CD3⁺V δ 2⁻が $\alpha\gamma$ T細胞(G1)に該当し、CD3⁺V δ 2⁺が $\gamma\delta$ T細胞(G2)に該当し、それ以外に、CD3⁻V δ 2⁻の細胞(G3)が検出できる。G2/G1+G2+G3が末梢血単核球におけるV δ 2⁺ $\gamma\delta$ T細胞の割合に該当し、G2/G1+G2が末梢血T細胞におけるV δ 2⁺ $\gamma\delta$ T細胞の細胞数と割合に該当する。

【0046】

・イメージサイトメトリー(イメージアナライザー)

末梢血単核球におけるV δ 2⁺ $\gamma\delta$ T細胞の細胞数又は割合の測定方法は、各細胞の表面抗原に特異的な抗体を使用して、イメージサイトメトリーにより測定することもできる。イメージサイトメトリーは、マルチウェルプレートやスライドグラス上の細胞を、レーザー走査して、その蛍光イメージや散乱光・透過光イメージを取得し、画像処理することにより、多量の細胞を短時間に1個ずつ定量解析できる細胞測定法である。

10

【0047】

フローサイトメトリーと同様に、末梢血単核球あるいは末梢血T細胞におけるV δ 2⁺ $\gamma\delta$ T細胞の細胞数と割合は、T細胞マーカーであるCD3と、V δ 2を用いた散乱光像や2色蛍光像により簡便に測定することができる。

【0048】

2.4 予測・判定方法

20

(1) 末梢血単核球におけるV δ 2⁺ $\gamma\delta$ T細胞の数・割合に基づく予測

(a) 末梢血単核球におけるV δ 2⁺ $\gamma\delta$ T細胞の細胞数又は割合、及び/又は(b)末梢血単核球におけるV δ 2⁺ $\gamma\delta$ T細胞の抗原刺激後の細胞数又は割合が、所定のカットオフ値以上の場合、免疫チェックポイント阻害剤による重症間質性肺炎の発症リスクは高いと予測できる。そして、その発症リスクに基づき免疫チェックポイント阻害剤による治療の適否を判定することができる。

【0049】

カットオフ値は、使用する免疫チェックポイント阻害剤、ならびに末梢血単核球数及び細胞の培養期間に応じて、適宜決定される。

【0050】

30

(a) 細胞数のカットオフ値は、末梢血単核球が 1×10^7 個とした場合、通常 $0.5 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^5$ の範囲、好ましくは $0.5 \times 10^5 \sim 1.4 \times 10^5$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 1.3 \times 10^5$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^5$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^5$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 9 \times 10^4$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 8 \times 10^4$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 7 \times 10^4$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 6 \times 10^4$ 、 $0.5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^4$ の範囲、より好ましくは $1 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 1.4 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 1.3 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 9 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5 \sim 8 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5 \sim 7 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5 \sim 6 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5 \sim 4 \times 10^4$ の範囲、とくに好ましくは $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ の範囲である。

40

細胞割合のカットオフ値は、通常0.5~15%の範囲、好ましくは0.5~14%、0.5~13%、0.5~12%、0.5~11%、0.5~10%、0.5~9%、0.5~8%、0.5~7%、0.5~6%、0.5~5%、0.6~5%、0.7~5%、0.8~5%、0.9~5%、1.0~5%、0.6~4%、0.7~4%、0.8~4%、0.9~4%、1.0~4%の範囲、より好ましくは0.6~3%、0.7~3%、0.8~3%の範囲、0.9~3%、とくに好ましくは1~3%の範囲である。

(b) 抗原刺激を与える場合の細胞数のカットオフ値は、与える抗原刺激によって異なるが、上記した値の数十倍超、好ましくは100倍~2000倍になる。例えば、PTAとIL-2を用いた抗原刺激では、細胞数は200倍~3000倍に増加し、細胞割合は98%超となる。重症間質性肺炎の発症リスクが高い被験者では、V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T細胞の

50

反応性が高く、ピロリン酸誘導体やビスホスホン酸化合物による抗原刺激を与えると細胞が凝集を生じるため、目視判定することも可能である。例えば、末梢血単核球に $1 \mu\text{M}$ の PTA を作用させて、1 日目の細胞凝集を目視判定する。

【0051】

(2) 末梢血 T 細胞における $V\delta 2^+ T$ 細胞の数・割合に基づく予測

(c) 末梢血 T 細胞における $V\delta 2^+ \gamma\delta T$ 細胞の細胞数又は割合、及び / 又は (d) 末梢血 T 細胞における $V\delta 2^+ \gamma\delta T$ 細胞の抗原刺激後の細胞数又は割合が、所定のカットオフ値以上の場合、免疫チェックポイント阻害剤による重症間質性肺炎の発症リスクは高いと予測できる。そして、その発症リスクに基づき免疫チェックポイント阻害剤による治療の適否を判定することができる。

10

一般的には、前述した末梢血単核球における $V\delta 2^+ \gamma\delta T$ 細胞の細胞数又は割合によって被験者の応答を予測できるが、 $CD3^+ V\delta 2^-$ の細胞 (G3) が多い被験者の場合には、これを除いた末梢血 T 細胞における $V\delta 2^+ \gamma\delta T$ 細胞の細胞数や割合を対象に診断するほうが好ましい。

【0052】

カットオフ値は、使用する免疫チェックポイント阻害剤、ならびに末梢血 T 細胞数及び培養期間に応じて、適宜決定される。

【0053】

(c) 細胞数のカットオフ値は、T 細胞が 1×10^7 個とした場合、通常 $1 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^5$ の範囲、好ましくは $1 \times 10^5 \sim 1.9 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 1.8 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 1.7 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 1.6 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 1.5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 1.4 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 1.3 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^5 \sim 9 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5 \sim 8 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5 \sim 7 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5 \sim 6 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^4$ の範囲、より好ましくは $2 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ の範囲、とくに好ましくは $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ の範囲である。

20

細胞割合のカットオフ値は、通常 1 ~ 20 % の範囲、好ましくは 1 ~ 19 %、1 ~ 18 %、1 ~ 17 %、1 ~ 16 %、1 ~ 15 %、1 ~ 14 %、1 ~ 13 %、1 ~ 12 %、1 ~ 11 %、1 ~ 10 %、1 ~ 9 %、1 ~ 8 %、1 ~ 7 %、1 ~ 6 %、1 ~ 5 %、1 ~ 4 %、1 ~ 3 % の範囲、より好ましくは 2 ~ 5 %、2 ~ 4 % の範囲、とくに好ましくは 2 ~ 3 % の範囲である。

30

(b) 抗原刺激を与える場合の細胞数のカットオフ値は、与える抗原刺激によって異なるが、上記した値の数十倍超、好ましくは 100 倍 ~ 2000 倍になる。例えば、PTA と IL-2 を用いた抗原刺激では、細胞数は 200 倍 ~ 3000 倍に増加し、細胞割合は 98 % 超となる。

重症間質性肺炎の発症リスクが高い被験者では、 $V\delta 2^+ \gamma\delta T$ 細胞の反応性が高く、ピロリン酸誘導体やビスホスホン酸化合物による抗原刺激を与えると細胞が凝集を生じるため、目視判定することも可能である。例えば、末梢血単核球に $1 \mu\text{M}$ の PTA を作用させて、1 日目の細胞凝集を目視判定する。

【0054】

40

2.5 その他の方法

上記した方法に加えて、使用する免疫チェックポイント阻害剤や治療目的に応じて、下記 (e) ~ (i) の指標を適宜組み合わせ、治療の適否を判定してもよい。

(e) 抗原刺激後の $\gamma\delta T$ 細胞の PD-1 発現量、

(f) 抗原刺激後の $\gamma\delta T$ 細胞の腫瘍細胞障害活性、

(g) 被験者から単離された末梢血単核球における NK 細胞の細胞数又は割合、

(h) 被験者から単離された末梢血単核球における NK 細胞の増殖刺激後の細胞数又は割合、

(i) 前記増殖刺激後の NK 細胞の腫瘍細胞障害活性。

なお、前述のとおり、 $\gamma\delta T$ 細胞は $V\delta 2^+ \gamma\delta T$ 細胞として上記指標を求めても良い

50

。

【 0 0 5 5 】

(e) 抗原刺激後の $\gamma \delta$ T 細胞の P D - 1 発現量

「抗原刺激後の $\gamma \delta$ T 細胞の P D - 1 発現量」は、免疫チェックポイント阻害剤に対する応答性の指標である。したがって、重症間質性肺炎の発症リスクと併せて、免疫チェックポイント阻害剤に対する応答性を評価することで、より精密な治療が可能になる。

【 0 0 5 6 】

使用する抗原は、 $\gamma \delta$ T 細胞によって認識され、これを活性化できるものであれば特に限定されず、前記 (b) に記載した抗原と同様のものを使用することができる。また、抗原の添加量や抗原添加後測定までの時間も前記 (b) に記載したとおりである。P D - 1 の発現量は、上述したフローサイトメトリーやイメージサイトメトリーを使用することで、簡便に定量解析することができる。

10

【 0 0 5 7 】

(f) 抗原刺激後の $\gamma \delta$ T 細胞の腫瘍細胞障害活性

「抗原刺激後の $\gamma \delta$ T 細胞の腫瘍細胞障害活性」は、免疫チェックポイント阻害剤に应答して、現実に $\gamma \delta$ T 細胞が腫瘍細胞障害活性を発揮するかどうかの指標である。したがって、重症間質性肺炎の発症リスクと併せて、免疫チェックポイント阻害剤に应答した $\gamma \delta$ T 細胞の腫瘍細胞障害活性を評価することで、より精密な治療が可能になる。

【 0 0 5 8 】

使用する抗原は、 $\gamma \delta$ T 細胞によって認識され、これを活性化できるものであれば特に限定されず、前記 (b) に記載した抗原と同様のものを使用することができる。また、抗原の添加量や抗原添加後測定までの時間も前記 (b) に記載したとおりである。

20

【 0 0 5 9 】

通常、腫瘍細胞の場合、細胞傷害活性を測定するためには、 $\gamma \delta$ T 細胞の腫瘍細胞障害性をあげるために窒素含有ピスホスホン酸 (N - B P) 等による刺激を行うことが好ましい。例えば、まず、腫瘍細胞を N - B P 処理し、処理終了 1 5 分前にテルビリジン誘導体をパルスする。がん細胞を洗浄後、 $\gamma \delta$ T 細胞を作用させ、細胞障害性を惹起する。4 0 分後に、後述する方法により腫瘍細胞傷害活性を測定する。

【 0 0 6 0 】

$\gamma \delta$ T 細胞の細胞障害性を受けやすい腫瘍細胞を用いる方法もある。例えば、D a u d i パーキットリンパ腫細胞は N - B P による刺激を与えなくても $\gamma \delta$ T 細胞の細胞障害性を受ける。D a u d i 細胞に P D - L 1 を強制発現させると、抗 P D - L 1 抗体の効果をより簡便に測定することができる。すなわち、D a u d i / P D - L 1 細胞に $\gamma \delta$ T 細胞を作用させると、P D - 1 / P D - L 1 相互作用により免疫抑制を受ける。しかし、ここに抗 P D - L 1 抗体を添加すると、P D - 1 / P D - L 1 相互作用が遮断されるため、細胞障害性が上昇する。この系を用いることにより、免疫チェックポイント阻害剤の腫瘍細胞障害性活性を *in vitro* で容易に評価できる。

30

【 0 0 6 1 】

腫瘍細胞障害活性は、 β 放射線放射活性測定法、 γ 放射線放射活性測定法、乳酸脱水素酵素 (L D H) 活性測定法、及び時間分解蛍光法、非 R I 系細胞障害測定法 (W O 2 0 1 5 / 1 5 2 1 1 1) など、培養がん細胞株を利用して公知の方法により実施することができる。

40

【 0 0 6 2 】

・ β 放射線放射活性測定法

標的細胞 (腫瘍細胞) を ^3H - P r o l i n e で標識し、エフェクター細胞 ($\gamma \delta$ T 細胞又は N K 細胞) と混合培養し、エフェクター細胞による細胞障害によって標的細胞から放出される ^3H - P r o l i n e 量 (β 放射線) を測定する。標的細胞とエフェクター細胞の混合比 (E / T 比) や培養時間は使用する細胞に応じて適宜設定され、例えば E / T 比 = 0 . 5 ~ 2 程度で調整する。

次式で示される細胞障害活性 (%) を計算し、細胞障害活性を評価する。

50

細胞障害活性(%) = (E / T比) - 標的細胞のみの放出量 / 標的細胞を全て障害したときの放出量 - 標的細胞のみの放出量

【0063】

・γ放射線放射活性測定法

標的細胞(腫瘍細胞)を⁵¹Crで標識し、エフェクター細胞(γδT細胞又はNK細胞)と混合培養し、エフェクター細胞による細胞障害によって標的細胞から放出される³H-Proline量(β放射線)を測定する。β放射線放射活性測定法と同様に、標的細胞とエフェクター細胞の混合比(E / T比)や培養時間は使用する細胞に応じて適宜設定され、細胞障害活性(%)を計算することで細胞障害活性を評価する。

【0064】

・時間分解蛍光法

標的細胞(腫瘍細胞)をユーロピウム(Eu)で標識し、エフェクター細胞(γδT細胞又はNK細胞)と混合培養し、エフェクター細胞による細胞障害によって標的細胞から放出される³Eu量(蛍光)を測定する。β放射線放射活性測定法やγ放射線放射活性測定法と同様に、標的細胞とエフェクター細胞の混合比(E / T比)や培養時間は使用する細胞に応じて適宜設定され、細胞障害活性(%)を計算することで細胞障害活性を評価する。

【0065】

・乳酸脱水素酵素(LDH)活性測定法

乳酸脱水素酵素(LDH)は細胞質に存在する酵素で、細胞が障害を受けると培地中に放出される。この放出されたLDHを、LDHによって触媒される乳酸脱水素反応で生じるNADHをITN(テトラゾリウム塩)と反応させて生じるホルマゼン色素(490nmの吸光度量)を通して定量する。RIを使用しないため、安全性が高い。他の方法と同様に、標的細胞とエフェクター細胞の混合比(E / T比)や培養時間は使用する細胞に応じて適宜設定され、細胞障害活性(%)を計算することで細胞障害活性を評価する。

【0066】

・キレート前駆体を利用した非RI測定法

発明者らが開発した非RI系による細胞障害能迅速測定法では、キレート剤前駆体で腫瘍細胞を処理する。具体的には、まず、ブタノイルオキシメチル基で保護したテルビリジン誘導体で腫瘍細胞を処理する。すると、その脂溶性のために細胞に取り込まれ、エステラーゼで加水分解を受け、細胞内にネガティブチャージを有するキレート剤が蓄積する。ここで、免疫エフェクター細胞を作用させると、腫瘍細胞が障害され、膜構造が少し破壊される。すると、キレート剤は速やかに培養上清に漏出する。ここで、培養上清を少し回収し、ランタノイド系金属であるユーロピウムを添加するとキレートが形成され、励起光を当てると時間分解蛍光が発せられる。この時間分解蛍光を測定すれば、細胞障害性が非RIで定量できる。

【0067】

時間分解蛍光の利点は、励起光を当てた後、通常の蛍光性化合物は2μ秒ほどの蛍光しか発しないのと比較し、100μ秒程度の長い時間蛍光を発するため、バックグラウンドとの差が大きくなり、測定の信頼性が上がる。本アッセイ法で用いるテルビリジンジカルボン酸のアルコキシメチル誘導体のうち下記化合物は、ほとんどの腫瘍細胞株で、高い最大標識量と20%以下の自然漏出量を得ることができる。

【0068】

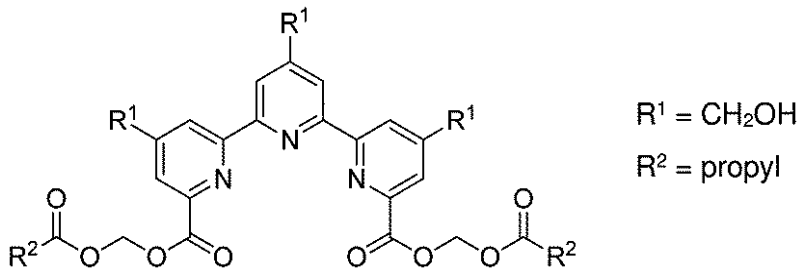
10

20

30

40

【化 1】



【 0 0 6 9 】

腫瘍細胞障害活性の測定で使用する腫瘍細胞株は特に限定されない。腫瘍細胞としては、例えば、ヒト骨髓性腫瘍あるいは白血病細胞株である K 5 6 2、H L 6 0、E B 1、C R F - C E M、H E L - 9 2 . 1 . 7、H S B、J u r k a t、H u T - 7 8、K G - 1 A、H N T - 3 4、M O L T - 4、M V 4 - 1 1、N B - 4、R E H、R P M I - 1 7 8 8、T F - 1、T H P - 1、T K 6、U 9 3 7；ヒト肺がん細胞株である A - 4 2 7、A - 5 4 9、C a l u - 1、C a l u - 6、C L S - 5 4、D M S - 7 9、G C T、H E L - 2 9 9、H - M e s s o - 1、H - M e s s o - 1 A、L C L C - 9 7 T M 1、L X - 1、L X - 2 8 9、M R C - 5、M S T O - 2 1 1 H、N C I - H 1 4 6、N C I - H 2 0 9、N C I - H 6 9、N C I - H 8 2、N C I - H 1 2 8、S C L C - 2 1 H、S C L C - 2 2 H、S K - L U - 1、S K - M E S - 1、S V - 8 0；ヒト肝がん細胞株である C h a n g - L i v e r、H e p - G 2、H u H - 7、P L C - P R F - 5、S K - H E P - 1；ヒト乳がん細胞株である B T - 2 0、B T - 4 7 4、B T - 5 4 9、C O L O - 8 2 4、H B L - 1 0 0、M A - C L S - 2、M C F - 7、M D A - M B - 2 3 1、M X - 1、S K - B R - 3、T - 4 7 D、Z R - 7 5 - 1；ヒト卵巣がん細胞株である H E Y；ヒト胃がん細胞株である A G S、C L S - 1 4 5、H G C - 2 7、M K N 1、M K N 2 8、K A T O - I I I；ヒト膵臓がん細胞株である A s P C - 1、C a p a n - 1、C a p a n - 2、D A N - G、F A M P A C、F A M P A C - A、P A - C L S 5 2、P a n c - 1；ヒト腎臓がん細胞株である 2 9 3 (H E K - 2 9 3)、7 6 9 - P、7 8 6 - 0、A - 4 9 8、A - 7 0 4、A C H N、C a K i - 2、R C - 1 2 4、R C - 1 3 1、R C - 1 3 4、R C - 1 3 8、R C - 1 4 2、R C C - A B (K T C T L - 2 1)、R C C - E R (K T C T L - 1 3)、R C C - E K (K T C T L - 1 3 5)、R C C - E W (K T C T L - 2)、R C C - A L 4、R C C - F G 1 (K T C T L - 2 6)、R C C - F G 2 (K T C T L - 2 6 A)、R C C - G H、R C C - G S (K T C T L - 1 8 5)、R C C - H B (K T C T L - 4 8)、R C C - J W (K T C T L - 1 9 5)、R C C - K L、R C C - K P (K T C T L - 5 3)、R C C - L R (K T C T L - 1 2 0)、R C C - M F (K T C T L - 1 M)、R C C - M H (K T C T L - 1 2 9)、R C C - O F 1 (K T C T L - 5 4)、R C C - G W、R C C - P R、R C C - W K (K T C T L - 8 7)、S K - N E P - 1、W T - C L S 1；ヒト骨肉腫細胞株である C A D O - E S 1、H O S (T E - 8 5)、K H O S - 2 4 0 S、K H O S - 3 1 2 H、K H O S - N P、M G - 6 3、M H H - E S 1、M N N G - H O S、R D - E S、S a O S - 2、S K - E S - 1、S W - 1 3 5 3、T M - 7 9 1、U - 2 O S；ヒト大腸がん細胞株である C W 2、D L D - 1、C o l o 3 2 0；ヒト悪性黒色腫細胞株である C 3 2 T G、G 3 6 1；ヒト前立腺細胞株である P C - 3、D U - 1 4 5、L N C a P を挙げるができるが、これらに限定されない。とくに、N K 細胞の場合は、その腫瘍細胞障害活性試験の標準的細胞株として使用される K 5 6 2 細胞、γ δ T 細胞の場合は U 9 3 7 組織球由来白血病細胞が好ましい。

【 0 0 7 0 】

免疫チェックポイント阻害剤の奏効率を高めるために、他の免疫療法との併用療法の開発も進められている。例えば、ニボルマブ（ヒト型抗 P D - 1 モノクローナル抗体）とイピリムマブ（ヒト型抗 C T L A - 4 モノクローナル抗体）の併用による奏効率は 6 割であ

ると報告されている。また、発明者らはIL - 18を、抗PD - 1抗体、抗PD - L1抗体、抗PD - 1抗体、抗PD - L1抗体、抗CDLA - 4抗体と併用することにより、抗腫瘍効果の相乗的向上が認められることを報告している(WO2010/001617)。そのような併用療法における免疫チェックポイント阻害剤の奏効率を予測する場合には、併用される抗体やサイトカインの存在下で腫瘍細胞傷害活性をみてもよい。

【0071】

(g) 末梢血単核球におけるNK細胞の細胞数又は割合

「末梢血単核球におけるNK細胞の細胞数又は割合」は、末梢血単核球とNK細胞にそれぞれ特異的な表面マーカーを利用することで、測定することができる。前述のとおり、NK細胞は、腫瘍細胞障害活性を有する。したがって、重症間質性肺炎の発症リスクと併せて、NK細胞の数や割合を評価することで、より精密な治療が可能になる。

10

【0072】

NK細胞はその表面にCD56抗原を有している。よって、抗CD3抗体と抗CD56抗体を使用することにより、末梢血単核球中のNK細胞の量を測定することができる。測定は、後述するフローサイトメトリーあるいはイメージアナライザーを使用することで、簡便かつ迅速に、「末梢血単核球におけるNK細胞の細胞数又は割合」を求めることができる。

【0073】

(h) 末梢血単核球におけるNK細胞の増殖刺激後の細胞数又は割合

「末梢血単核球におけるNK細胞の増殖刺激後の細胞数又は割合」は、NK細胞の増殖能を示す。したがって、重症間質性肺炎の発症リスクと併せて、腫瘍細胞障害活性を有するNK細胞の増殖能を評価することで、より精密な治療が可能になる。

20

【0074】

使用される増殖刺激因子は、NK細胞の増殖を刺激できるものであれば特に限定されない。例えば、IL - 2、IL - 7、IL - 12、IL - 15、IL - 18、IL - 21、IL - 23、インターフェロン γ 、及び末梢血コンディショニング培地などを挙げることができる。前記増殖刺激因子は、機能し得る限り、そのフラグメント(断片)であってもよい。

【0075】

増殖刺激後の細胞数や割合は、単離した末梢血単核球を含む培養液に上記した増殖刺激因子を添加し、一定期間経過後に前項(b)と同様の方法で測定する。添加する増殖刺激因子の量は、使用する増殖刺激因子のNK細胞増殖刺激能に応じて適宜決定される。増殖刺激因子添加後の測定までの時間も使用する増殖刺激因子に応じて適宜決定されるが、通常は0.5時間以上、好ましくは12時間~14日程度である。

30

【0076】

IL - 2の場合であれば、例えば10~1000IU/ml、好ましくは20~200IU/mlとなるように添加し、37℃、5%CO₂雰囲気下でインキュベートし、3日~14日後、好ましくは7日~11日後にNK細胞の細胞数又は割合を測定する。

【0077】

インターフェロン γ の場合であれば、例えば1~10000IU/ml、好ましくは10~1000IU/mlとなるように添加し、37℃、5%CO₂雰囲気下でインキュベートし、1日~14日後、好ましくは3日~10日後にNK細胞の細胞数又は割合を測定する。

40

【0078】

IL - 18の場合であれば、例えば1~1000IU/ml、好ましくは20~300IU/mlとなるように添加し、37℃、5%CO₂雰囲気下でインキュベートし、1日~14日後、好ましくは3日~10日後にNK細胞の細胞数又は割合を測定する。

【0079】

(i) 増殖刺激後のNK細胞の腫瘍細胞障害活性

「増殖刺激後のNK細胞の腫瘍細胞障害活性」は、免疫チェックポイント阻害剤に応答

50

して、現実にはNK細胞が腫瘍細胞障害活性を発揮するかどうかの指標である。したがって、重症間質性肺炎の発症リスクと併せて、NK細胞の腫瘍細胞障害活性を評価することで、より精密な治療が可能になる。

【0080】

使用する抗原は、NK細胞の増殖を刺激できるものであれば特に限定されず、前記(h)に記載した増殖刺激因子と同様のものを使用することができる。また、増殖刺激因子の添加量や増殖刺激因子添加後測定までの時間も前記(h)に記載したとおりである。

【0081】

腫瘍細胞障害活性は、β放射線放射活性測定法、γ放射線放射活性測定法、乳酸脱水素酵素(LDH)活性測定法、及び時間分解蛍光法、非RI系細胞障害測定法(WO2015/152111)など、培養がん細胞株を利用して公知の方法により実施することができる。腫瘍細胞障害活性の測定方法については、次項で詳述する。

【0082】

3. 診断用試薬・キット

本発明は、上記した免疫チェックポイント阻害剤の効果予測用試薬及びキットも提供する。

【0083】

本発明のキットは、(i)抗CD3抗体、及び(ii)抗Vδ2抗体を必須の構成要素とし、判定(診断)のための指示書を含んでいてもよい。

【0084】

本発明のキットは、さらに(iii)ピロリン酸モノエステル誘導体、又は窒素含有ビスホスホン酸誘導体、及び/又は(iv)IL-18、を含んでいてもよい。

【0085】

本発明のキットにおいて、抗体は適宜標識あるいは固定化されていてもよい。また、目的とする抗原分子の検出に使用できる限り、抗体フラグメント(断片)であってもよい。抗体フラグメントとしては、たとえばF(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、scFv、rIgG、Fcを挙げることができる。

【0086】

上記した構成要素のほか、本発明のキットは、前述したフローサイトメトリー又はイメージサイトメトリー、腫瘍細胞障害活性測定に必要な各種試薬(例えば抗CD4抗体、抗CD8抗体)、二次抗体、基質溶液、腫瘍細胞株(例えば、K562細胞株など)、培地(例えば、Yessel培地など)を含む。また上記(i)~(iv)や、その他の構成要素は、それぞれ個別に判定(診断)用試薬として提供されていてもよい。

【0087】

4. コンパニオン診断と治療戦略

本発明の免疫チェックポイント阻害剤による重症間質性肺炎の発症のリスクを予測する方法、前記方法にしたがい免疫チェックポイント阻害剤による治療の適否を判定する方法(診断方法)、試薬(診断薬)、及びキット(診断用キット)は、免疫チェックポイント阻害剤の効果や副作用を投薬前に予測する臨床検査、いわゆるコンパニオン診断に利用することができる。

【0088】

対象となる免疫チェックポイント阻害剤は、例えば、前述したような、抗PD-1抗体であるニボルマブ(オプジーボ)、ペムブロリズマブ(MK-3475);抗PD-L1抗体であるジピリズマブ(CT-011)、MPDL3280A/RG-7446、MED14736、MSB0010718C、MED10680/AMP-514;抗PD-L2抗体;抗CTLA-4抗体であるイピリムマブ(MDX-010)、トレメリムマブ(CP675、206);抗キラー細胞免疫グロブリン様受容体(KRI)抗体であるリリルマブ(IPH2102/BMS-986015);抗CD137抗体であるウレルマブ(BMS-663513)、PF-05082566;抗LAG3抗体であるBMS-986016;抗OX40抗体であるMED16469等が挙げられるが、これらに限定

10

20

30

40

50

されない。

【 0 0 8 9 】

本発明の予測方法（診断方法）、試薬（診断薬）、及びキット（診断用キット）を用いて免疫チェックポイント阻害剤による重症性間質性肺炎の発症リスクを予測することで、被験者（患者）に対する投薬の適否を決定する。そして、その結果に基づき、免疫チェックポイント阻害剤を投与するという、免疫チェックポイント阻害剤による一連の治療戦略が提供される。そのような、免疫チェックポイント阻害剤の治療方法も、本発明の対象である。

【 0 0 9 0 】

上記治療方法の対象となる疾患としては、免疫チェックポイント阻害剤の対象となりうる疾患（癌、感染症等）である。癌としては、例えば、骨癌、膵癌、皮膚癌、頭頸部癌、メラノーマ、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門部癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、卵管カルシノーマ、子宮内膜カルシノーマ、子宮頸部カルシノーマ、膣カルシノーマ、外陰部カルシノーマ、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、食道癌、小腸癌、内分泌系癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、柔組織肉腫、尿道癌、陰茎癌、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、慢性白血病、急性白血病、小児固形癌、リンパ球性リンパ腫、膀胱癌、腎臓癌、尿管癌、腎盂カルシノーマ、中枢神経系（CNS）腫瘍、原発性CNSリンパ腫、腫瘍新脈管形成、脊椎腫瘍、脳幹グリオーム、下垂体アデノーマ、カポシ肉腫、扁平上皮癌、扁平細胞癌、T細胞リンパ腫、環境誘発腫瘍等が挙げられる。とくに、PD-L1を発現する転移性癌や肺癌に好適に適用することができる。

【 0 0 9 1 】

感染症としては、例えば、HIV感染（AIDS）、肝炎、ヘルペス、マラリア、デング熱、リウシュマニア症、インフルエンザ、赤痢、肺炎、結核、敗血症、リステリア症等を挙げることができる。とくに、重篤な免疫不全を生じるHIV感染に好適に適用することができる。

【 0 0 9 2 】

上記のほか、アルツハイマー型認知症（Kuti Baruch1, et al. Nature Medicine. 2016 ; 22(2): 135-7）、脳アミロイド血管症、ダウン症候群、加齢黄斑変性、レビー小体型認知症、パーキンソン病、多系統萎縮症、タウオパチー、前頭側頭葉変性症、嗜銀顆粒性認知症、筋萎縮性側索硬化症、糖尿病、筋萎縮性側索硬化症（ALS）等における投薬の適否の診断にも利用することが可能である。

【 0 0 9 3 】

5．重症間質性肺炎の発症リスクが少ない被験者を対象とした免疫チェックポイント阻害剤を含有する医薬組成物

本発明によれば、免疫チェックポイント阻害剤による重症間質性肺炎の発症リスクを予測し、当該リスクが少ないと判断される被験者を対象とした、免疫チェックポイント阻害剤の新たな用途を提供する。本発明は、そのような免疫チェックポイント阻害剤を含有する医薬組成物であって、重症間質性肺炎の発症を抑制し、腫瘍を治療または予防するために使用され、前述した方法により重症間質性肺炎の発症リスクが少ないと判断される被験者に用いることを特徴とする医薬組成物も提供する。

【 0 0 9 4 】

6．その他

本発明の方法及び試薬・キットは、免疫チェックポイント阻害剤の使用前段階での投薬の適否の診断に加えて、治療開始後のリスク予測、さらには、HIV感染症などのウイルス感染症や、原虫感染症、細菌感染症などにおける免疫チェックポイント阻害剤治療における投薬の適否の診断にも利用することができる。

【 実施例 】

【 0 0 9 5 】

本発明を実施例により、具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 6 】

実施例 1：健常人及び肺がん患者における末梢血中の $\gamma\delta$ T 細胞及び NK 細胞の比較

免疫チェックポイント阻害剤を用いたがん免疫療法において、重要なことはエフェクター細胞である T 細胞の数と PD - 1 発現を含む免疫状態である。極論を言えば、がん患者で免疫系が疲弊し、腫瘍細胞障害性 T 細胞のほとんどない、あるいは、極端に少ない症例に対して免疫チェックポイント阻害剤を投与しても、腫瘍細胞障害性は期待できない。

【 0 0 9 7 】

「腫瘍細胞が腫瘍特異的な免疫エフェクター細胞に免疫寛容を誘導する際、PD - 1 免疫チェックポイントを介在させているとすると、 $\alpha\beta$ T 細胞でも $\gamma\delta$ T 細胞でも、その作用機構は同じである」と仮定すると、 $\alpha\beta$ T 細胞に対する免疫寛容誘導と、 $\gamma\delta$ T 細胞に対する免疫寛容誘導が同時に起こっていると考えられる。すなわち、 $\gamma\delta$ T 細胞の免疫寛容状態を判断できれば、 $\alpha\beta$ T 細胞の免疫寛容状態も推測することができる。そこで、本実施例では、上記仮説の検証として、健常人とがん患者における、V γ 2 V δ 2 の $\gamma\delta$ T 細胞の数と抗原反応性を検討した（なお、健常成人では、 $\gamma\delta$ T 細胞の半数以上が V γ 2 V δ 2 であり、V δ 2 を指標とすれば、実質的には V γ 2 V δ 2 を検出することになる）。

10

【 0 0 9 8 】

1. 材料及び方法

(1) V γ 2 V δ 2 T 細胞及び NK 細胞の数又は割合

末梢血単核球 (P M B C : Peripheral Blood Mononuclear Cell) 中の $\gamma\delta$ T 細胞の数又は割合は、以下の手順にしたがい、2 色フローサイトメトリーで解析する。

20

肺がん患者より、末梢血 (1 0 m l) を採取し、常法にしたがい P M B C 画分を調製し、5 0 μ l の P B S / 2 % F C S に懸濁させる。各 3 μ l の抗体をウェルに加え、氷上で 3 0 分放置後、2 % F C S / P B S で 3 回洗浄し、フローサイトメトリー (F A C S C a l i b u r ^{T M}、B D バイオサイエンス) で解析する。

P M B C 中の $\gamma\delta$ T 細胞 (V δ 2 陽性細胞) の数及び割合は、抗 C D 3 抗体と抗 V δ 2 抗体を用いた 2 色フローサイトメトリーにより求めることができる。

P M B C 中の NK 細胞 (C D 5 6 陽性細胞) の数及び割合は、抗 C D 3 抗体と抗 C D 5 6 抗体を用いた 2 色フローサイトメトリーにより求めることができる。

C D 3 は T 細胞の表面マーカーであり、C D 5 6 は NK 細胞の表面マーカーである。V δ 2 は、ここでは $\gamma\delta$ T 細胞を検出するために使用される。健常人の $\gamma\delta$ T 細胞の大部分は V δ 2 陽性細胞であり、V δ 1 陽性細胞が多い試料でも、後述する抗原刺激後には V δ 2 陽性細胞が増殖し、V δ 1 陽性細胞は検出感度以下になるため、V δ 2 陽性細胞を $\gamma\delta$ T 細胞として評価することができるからである。

30

【 0 0 9 9 】

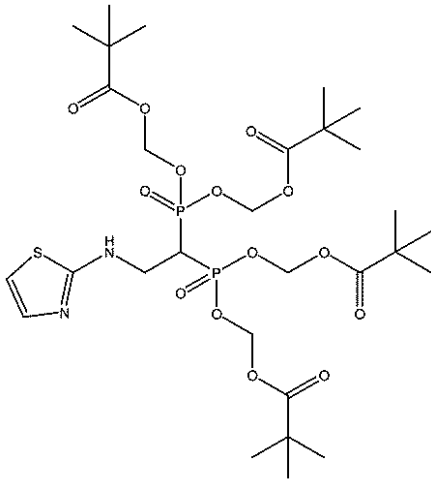
(2) V γ 2 V δ 2 T 細胞の抗原刺激 (増殖誘導)

1 m M の P T A ストック溶液 (D M S O 中) 3 μ l を P M B C (3 m l) に加え、終濃度 1 μ M にする。V δ 2 陽性細胞懸濁液を 2 4 ウェルプレートの 2 ウェル (1 . 5 m l / ウェル, 2 ウェル) に移す。I L - 2、I L - 1 8 を 2 ウェルに加え、それぞれ終濃度 1 0 0 U / m l、1 0 0 n g / m l になるように添加し、3 7 °C、5 % C O ₂ でインキュベートする。D a y 1 から P M B C に、毎日 I L - 2 又は I L - 2 / I L - 1 8 を培地に加える。

40

* P T A は、下記構造を有する窒素含有型ビスホスホン酸 (W O 2 0 1 6 / 1 2 5 7 5 7、及び Medicinal Chemistry, 2007, 85-99) で、F P P S 合成を阻害することで $\gamma\delta$ T 細胞を活性化する。

【化 2】



PTA

Z o l (ゾメタ) / I L - 2 / I L - 1 8 による刺激は、P T A (1 μ M) を Z o l (1 μ M) に代えて同様に行う。

【 0 1 0 0 】

(3) 抗原刺激後の V γ 2 V δ 2 T 細胞の数又は割合

D a y 1 1 に細胞を回収し、(1) にしたがひ、2 色フローサイトメトリーで γ δ T 細胞の数又は割合を解析する。

【 0 1 0 1 】

(4) N K 細胞の I L - 2 / I L - 1 8 による刺激

P M B C から、常法にしたがひ、M A C S (r) B e a d s 標識抗 C D 3 抗体を用いて、N K 細胞を精製する。具体的には、P M B C (3 m l) を 1 5 m l のコニカルチューブに移し、1 7 0 0 r p m 、4 で 5 分遠心する。次いで、上清を吸引除去し、細胞ペレットを分散させ、8 0 μ l の P B S / 0 . 5 % B S A / 2 m M E D T A に再懸濁させる。2 0 μ l の M A C S (r) B e a d s 標識抗 C D 3 抗体 (M y l t e n y B i o t e c) を細胞懸濁液に加え、4 で 1 5 分間インキュベートする。1 5 分後、2 m l の P B S / 0 . 5 % B S A / 2 m M E D T A を加えて細胞を再懸濁させる。次いで、3 0 0 × g 、4 で 1 0 分遠心して上清を吸引除去する。細胞ペレットを分散させ、1 m l の P B S / 0 . 5 % B S A / 2 m M E D T A に再懸濁させる。細胞懸濁液を、P B S / 0 . 5 % B S A / 2 m M E D T A で平衡化した L D カラム (磁性球体で構成される) にかける。C D 3 陰性細胞を 1 m l の P B S / 0 . 5 % B S A / 2 m M E D T A で 2 回溶出する。1 7 0 0 r p m 、4 、5 分間遠心し、上清を捨て、アスピレーターで吸引除去する。次いで、細胞ペレットを分散させ、C D 3 陰性細胞を 1 . 5 m l の Y M - A B 培地に再懸濁させる。

N K 細胞懸濁液を 2 4 ウェルプレート (1 . 5 m l / ウェル , 1 ウェル) に移し、I L - 2 及び I L - 1 8 をウェルに加え、それぞれ終濃度 1 0 0 I U / m l 及び 1 0 0 n g / m l にし、3 7 、5 % C O ₂ でインキュベートする。D a y 0 から 1 0 日間、毎日 I L - 2 / I L - 1 8 を培地に加える。

【 0 1 0 2 】

(5) 増殖刺激後の N K 細胞の数又は割合

D a y 1 1 に細胞を回収し、(1) にしたがひ、2 色フローサイトメトリーで N K 細胞の数又は割合を解析する。

【 0 1 0 3 】

2 . 結果

(1) 健常人の γ δ T 細胞の割合

1 2 人の健常人の γ δ T 細胞の割合をフローサイトメトリーで解析すると、これまで報告されてきたとおり、平均すると末梢血単核球中の 3 % から 4 % 程度であり、1 0 % を超えているドナーも存在した。一方、2 % を切るようなドナーは 2 例と少なく、1 % を切る

10

20

30

40

50

ようなドナーはいなかった（図１）。

【０１０４】

（２）健常人の $\gamma\delta$ Ｔ細胞の反応性

次に、健常人の $\gamma\delta$ Ｔ細胞の反応性に関して検討を行った。 $V\delta 2$ $\gamma\delta$ Ｔ細胞の割合が５．５７％だった健常人の末梢血単核球にＰＴＡを作用させ、ＩＬ－２とともに１１日間培養すると、 $\gamma\delta$ Ｔ細胞の割合は９８．３９％まで上昇した。また、この際、細胞数は１０００倍以上になった（図２（Ａ））。

【０１０５】

同じく、 $V\delta 2$ $\gamma\delta$ Ｔ細胞の割合が１０．３５％だった健常人の末梢血単核球にＰＴＡを作用させ、ＩＬ－２とともに１１日間培養すると、 $\gamma\delta$ Ｔ細胞の割合は９８．９９％まで上昇し、細胞数は１０００倍以上になった。このように、健常人の $\gamma\delta$ Ｔ細胞はＰＴＡ／ＩＬ－２刺激により培養１１日目に９９％近くの純度と１０００倍以上の増殖性を示す（図２（Ｂ））。

【０１０６】

（３）肺がん患者の $\gamma\delta$ Ｔ細胞の割合

肺がん患者の $\gamma\delta$ 型Ｔ細胞の割合を表１に示す。 $\gamma\delta$ Ｔ細胞の少ない症例（ＬＣ０２，ＬＣ０５，ＬＣ０９，ＬＣ１０）と多い症例（ＬＣ０３，ＬＣ０４，ＬＣ０７，ＬＣ０８）にはっきりと分かれているのが分かる。

【０１０７】

【表１】

肺がん患者の $\gamma\delta$ 型Ｔ細胞

Patient	V δ 2/CD3 (%)	V δ 2/Lymphocytes (%)	V δ 2/Lymphocytes/ 1×10^7 PBMC
LC01	1.89	1.43	1.43×10^5
LC02	1.46	0.79	0.79×10^5
LC03	14.63	10.40	10.40×10^5
LC04	3.76	2.91	2.91×10^5
LC05	1.00	0.73	0.73×10^5
LC06	1.55	1.01	1.01×10^5
LC07	10.43	4.14	4.14×10^5
LC08	2.98	1.95	1.95×10^5
LC09	0.99	0.78	0.78×10^5
LC10	1.23	0.89	0.89×10^5
LC11	0.06	0.03	0.03×10^5
LC12	0.82	0.53	0.53×10^5

【０１０８】

肺がん患者の末梢血単核球中の $\gamma\delta$ Ｔ細胞の割合を検討すると、１２症例中９症例で $\gamma\delta$ Ｔ細胞の割合が２％以下と著しく減少していた。また、減少した症例の内訳をみると、６症例で１％未満であった。これは、肺がんにより、 $\gamma\delta$ Ｔ細胞が抑制され、免疫寛容になっている可能性を示している。また、この $\gamma\delta$ Ｔ細胞と同様に、肺がん特異的 $\alpha\beta$ Ｔ細胞も免疫抑制がかかっているとすると、免疫エフェクター細胞自体の数が極端に少ないことになり、免疫チェックポイントで免疫抑制シグナルを遮断したとしても、十分な免疫エフェクター作用が回復しないのではないかと推測される（図３）。

【０１０９】

（４）肺がん患者の $\gamma\delta$ Ｔ細胞の反応性

次に、肺がん患者のうち、 $\gamma\delta$ T細胞の割合が、健常人と同程度の症例を選択し、 $\gamma\delta$ T細胞の増殖誘導能を検討した。 $V\delta 2\gamma\delta$ T細胞の割合が4.14%だった肺がん患者の末梢血単核球にPTAを作用させ、IL-2とともに11日間培養すると、 $\gamma\delta$ T細胞の割合は98.59%まで上昇した。また、この際、細胞数は1000倍以上になった。すなわち、健常人に近い数値の肺がん患者は、健常人と同程度の $\gamma\delta$ T細胞増殖誘導能があることが明らかとなった(図4(A))。

【0110】

同様に、 $\gamma\delta$ T細胞の割合が、2%以上の肺がん患者の末梢血 $\gamma\delta$ T細胞の増殖誘導能を検討した。その結果、 $V\delta 2\gamma\delta$ T細胞の割合が2.91%だった肺がん患者の末梢血単核球にPTAを作用させ、IL-2とともに11日間培養すると、 $\gamma\delta$ T細胞の割合は99.74%まで上昇し、細胞数は1000倍以上になった。この症例でも、健常人と同程度の $\gamma\delta$ T細胞増殖誘導能があることが明らかとなった(図4(B))。

10

【0111】

次に、 $\gamma\delta$ T細胞の割合が、1%を下回る肺がん患者の末梢血 $\gamma\delta$ T細胞の増殖誘導能を検討した。 $V\delta 2\gamma\delta$ T細胞の割合が0.89%だった肺がん患者の末梢血単核球にPTAを作用させ、IL-2とともに11日間培養すると、 $\gamma\delta$ T細胞の割合は84.21%までしか上昇しなかった。すなわち、健常人と比較して明らかに $\gamma\delta$ T細胞の割合が低い肺がん患者は、健常人と比較して、 $\gamma\delta$ T細胞増殖誘導能が低いことが明らかになった(図4(C))。

20

【0112】

同様に、 $\gamma\delta$ T細胞の割合が、1%を下回る別の肺がん患者の末梢血 $\gamma\delta$ T細胞の増殖誘導能を検討した。その結果、 $V\delta 2\gamma\delta$ T細胞の割合が0.78%だった肺がん患者の末梢血単核球にPTAを作用させ、IL-2とともに11日間培養すると、 $\gamma\delta$ T細胞の割合は90.57%までしか上昇しなかった(図4(D))。

【0113】

このように、 $\gamma\delta$ T細胞の割合が末梢血において低い(1%を下回る)患者は、 $\gamma\delta$ T細胞の免疫寛容が起こっている可能性が高い。これが、腫瘍細胞によるなんらかの免疫エフェクターT細胞免疫寛容誘導システムによるものであれば、腫瘍抗原ペプチド特異的な $\alpha\beta$ T細胞の免疫寛容も同時に起こっている可能性が高い。すなわち、 $\gamma\delta$ T細胞の末梢血中の割合を測定すれば、腫瘍抗原ペプチド特異的 $\alpha\beta$ T細胞の免疫寛容状態を判断できる可能性がある。したがって、免疫チェックポイント阻害剤の感受性を判断する基準の一つとして、末梢血単核球中での $\gamma\delta$ T細胞の割合を検討することが考えられ、 $\gamma\delta$ T細胞の割合が、免疫チェックポイント阻害剤のサロゲートマーカーになる可能性がある。

30

【0114】

(5) $\gamma\delta$ T細胞とNK細胞との関係

$\gamma\delta$ T細胞とNK細胞との関係について検討を行った。まず、健常人の末梢血単核球を精製し、既報(Sigie T. et al., Cancer Immunol Immunother. 2013 Apr; 62(4):677-87. Epub 2012 Nov 15.)にしたがい、窒素含有ビスホスホン酸(N-BP)の1種であるZol(Zoledronic acid:ゾメタ)/IL-2あるいはZol/IL-2/IL-18で刺激し、 $\gamma\delta$ T細胞の増殖誘導を検討した。

40

【0115】

その結果、 $\gamma\delta$ T細胞の刺激因子であるZolと増殖因子であるIL-2との混合刺激よりも、細胞保護作用のあるIL-18を添加した刺激において明らかな増殖優位性が認められた(図5)。これがどのようにして起こるのか検討した結果、この実験系からNK細胞を除去すると $\gamma\delta$ T細胞の増殖誘導が抑制されることが明らかとなった。つまり、ヒト $\gamma\delta$ T細胞の増殖誘導の際、NK細胞が重要な役割をしていることが明らかとなった(図には示していない)。

【0116】

Zol/IL-2/IL-18での増殖誘導後の結果を表2に示す。増殖誘導前と同様に、 $\gamma\delta$ T細胞の少ない症例(LC02, LC05, LC09, LC10)と多い症例(LC03, LC04, LC07

50

, LC08) にはっきりと分かれているのが分かる。

【 0 1 1 7 】

【 表 2 】

肺がん患者の増殖誘導後 $\gamma \delta$ 型 T 細胞 (Z α 1/IL-2/IL-18 刺激)

Patient	V δ 2/CD3 (%)	V δ 2/Lymphocytes (%)	V δ 2/Lymphocytes/ 1×10^7 PBMC
LC01	97.30	93.99	3.00×10^8
LC02	99.26	93.88	1.30×10^8
LC03	99.39	97.43	4.00×10^8
LC04	99.15	97.14	14.52×10^8
LC05	97.82	93.71	1.05×10^8
LC06	90.09	59.18	1.90×10^8
LC07	99.02	95.53	4.88×10^8
LC08	98.45	93.18	6.50×10^8
LC09	90.57	88.14	1.92×10^8
LC10	95.39	60.00	1.84×10^8

10

20

【 0 1 1 8 】

(6) NK 細胞と I L - 1 8 との関係

次に、NK 細胞と I L - 1 8 との関係について検討を行った。NK 細胞は I L - 2 刺激により増殖誘導を受けるが、ここに I L - 1 8 を添加するとどうなるのか検討した。まず、ヒト末梢血単核球から C D 3 陽性細胞を除去し、C D 3⁻細胞画分を I L - 2 あるいは I L - 2 / I L - 1 8 で刺激した。

【 0 1 1 9 】

その結果、I L - 2 / I L - 1 8 刺激群で明らかな NK 細胞の増殖誘導優位性がみとめられた (図 6)。つまり、I L - 2 / I L - 1 8 刺激により、NK 細胞が強力な増殖誘導を受けることが明らかとなった。I L - 2 / I L - 1 8 刺激前の結果を表 3 に、刺激後の結果を表 4 に示す。

30

【 0 1 2 0 】

【 表 3 】

健常人の増殖誘導前の NK 細胞

Healthy adult	NK/Lymphocyte	NK/Lymphocyte/ 1×10^7 PBMC
HD03	10.46	10.46×10^5
HD04	18.18	18.18×10^5
HD05	18.12	18.12×10^5
HD06	13.18	13.18×10^5
HD07	28.42	28.42×10^5
HD08	14.06	14.06×10^5
HD09	4.42	4.42×10^5
HD10	23.58	23.58×10^5
HD11	18.61	18.61×10^5

40

【 0 1 2 1 】

50

【表 4】

健康人の増殖誘導前のNK細胞（IL-2/IL-18刺激）

Healthy adult	NK/Lymphocyte	NK/Lymphocyte/1x10 ⁷ PBMC
HD06	96.57	1.56 x 10 ⁸
HD07	99.07	5.77 x 10 ⁸
HD08	98.43	5.44 x 10 ⁸
HD09	96.22	2.00 x 10 ⁸
HD10	95.37	0.83 x 10 ⁸
HD11	85.02	0.63 x 10 ⁸

10

【0122】

次にこのIL-2/IL-18によるNK細胞増殖誘導能がどのようにγδT細胞の増殖誘導と結びついているのか検討を行った。まず、既報（Li et al., PLoS One. 2013 Dec 20;8(12), Fig.2参照）にしたがい、γδT細胞を緑色色素で標識し、IL-2/IL-18刺激で増殖誘導されたNK細胞を赤色色素で標識して、混合培養した。その結果、γδT細胞とNK細胞は相互作用し、細胞塊を形成していることが明らかとなった（図7）。

20

【0123】

3. 考察

上記の結果から、ゾメタやPTAのようなN-BPによるγδT細胞の増殖誘導メカニズムは、γδT細胞とNK細胞の相互作用に基づくものと予想された（図8）。すなわち、N-BPがCD14陽性であるマクロファージに取り込まれると、ブチロフィリン3A1（BTN3A1）の細胞外領域に変化が起こり、それをγδT細胞がγδT細胞受容体依存的に認識する。すると、γδT細胞受容体からγδT細胞内にシグナルが誘導され、IL-2のプロモーター領域に転写因子が動員されることにより、若干量のIL-2の産生がみられる。一方、N-BPストレスを受けたマクロファージではインフラマソーム依存的にカスパーゼ1が活性化され、IL-18前駆体を加水分解し、成熟型IL-18を産生し、細胞外へ放出する。ここで、IL-2/IL-18によりNK細胞が増殖誘導を受ける。他方、γδT細胞にもIL-18が作用するとLFA-1やICAM-1が発現誘導される。これらの接着分子を介してNK細胞とγδT細胞との強い相互作用が起こり、γδT細胞の爆発的な増殖誘導がおこる。以上のことから、一次的にはγδT細胞の数（割合）と増殖誘導性を、二次的にはNK細胞の数（割合）と増殖誘導性を検討すれば、免疫チェックポイント阻害剤の感受性予測が可能であることが予想される。

30

【0124】

図9に示すとおり、がん細胞がPD-L1分子を発現すると、活性化されたγδT細胞はPD-1分子を発現しているため、PD-1とPD-L1の相互作用によりγδT細胞に負の副刺激シグナルが誘導され、腫瘍細胞傷害性が抑制される。ここで、抗PD-L1抗体を作用させるとPD-1とPD-L1との相互作用が遮断され、負の副刺激シグナルが解除されるため、γδT細胞はがん細胞を効率よく障害できるようになる。ところが、γδT細胞が疲弊現象（exhaustion）を起こしている場合には、γδT細胞の機能そのものが不可逆的に抑制されてしまっているため、PD-1免疫チェックポイント阻害剤によりPD-1とPD-L1との相互作用を遮断しても、γδT細胞の腫瘍細胞傷害性は回復しない。本実施例の結果は、γδT細胞の末梢血中の数（割合）と機能を評価することにより、免疫寛容状態を判断し、免疫チェックポイント阻害剤の効果を予測し示す。

40

【0125】

実施例2：ニボルマブ（抗PD-1抗体）の奏功性

50

実施例 1 の結果、PD - 1 免疫チェックポイント阻害剤の抗腫瘍効果を予測する際、免疫エフェクター T 細胞の機能と増殖性、そして、NK 細胞の増殖性が鍵となる可能性が高いことが確認された。つまり、免疫エフェクター T 細胞として、 $\alpha\beta$ T 細胞と $\gamma\delta$ T 細胞があるが、これらの免疫寛容誘導システムが同一であるとする、 $\gamma\delta$ T 細胞の状態を明らかにすれば、 $\alpha\beta$ T 細胞の免疫寛容状態も予想できることになる。

【0126】

そこで、本実施例では、ニボルマブ（抗 PD - 1 抗体製剤）治療後の患者について、末梢血単核球中の $\gamma\delta$ T 細胞の割合、 $\gamma\delta$ T 細胞の抗原刺激による増殖誘導性、増殖誘導後の PD - 1 を発現量と奏功性及び有害事象との相関関係について検討を行った。

【0127】

1. 試験デザイン

[施設数] 多施設共同試験（長崎大学病院、長崎原爆病院）

[対象] 肺がん患者

[選択基準]

コンピュータ断層撮影で組織学的に肺がんと確認された患者（any T, any N, and M1, stage IV）、

パフォーマンスステータス（PS）0、年齢 20 ~ 75 歳、主要組織は機能を維持しており、当機関の試験基準に合致し、試験の性質について説明を受けた後、本試験への参加に対する同意書面を自発的に提出したものを採用する。

【0128】

[排除基準]

以下のうち一つでも該当する患者は、対象として除外する。

1) 本剤の成分に対し過敏症の既往歴のある患者

2) 妊婦および妊娠している可能性のある患者、または授乳中の患者

3) その他、研究責任者が研究対象者として不適当と判断した患者

【0129】

[プライマリーエンドポイント]

第 1 のプライマリーエンドポイントは、ニボルマブを投与された肺がん患者における、奏効率（ORR）と末梢血リンパ球ゲート中及び CD 3 陽性細胞中の $V\delta 2$ T 細胞の割合との相関関係である。

第 2 のプライマリーエンドポイントは、肺がん患者における奏効率（ORR）と抗原刺激後の PD - 1 発現 $V\delta 2$ T 細胞の割合との相関関係である。

【0130】

[セカンダリーエンドポイント]

第 1 のセカンダリーエンドポイントは、ニボルマブを投与された肺がん患者における、奏効率（ORR）と末梢血単核球中の NK 細胞の割合との相関関係である。

第 2 のプライマリーエンドポイントは、肺がん患者における奏効率（ORR）と IL - 2 / IL - 18 刺激後の NK 細胞の増殖との割合の相関関係である。

【0131】

[検体収集]

同意の得られた抗 PD - 1 抗体ニボルマブを投与予定の症例より、投与前および投与 3 ヶ月後に、末梢血 10 ml のヘパリン採血を行う。この際、入院中の通常採血に付随して採血を行い、この採血のための新たな穿刺は行わない。

【0132】

[研究評価項目]

(A) 腫瘍容積の測定及び奏効率（RECIST）

腫瘍容積は MRI を用いて測定する。測定はガイドラインにしたがって実施し、奏効率（ORR : Objective Response Rate）は超音波検査と臨床評価を使用して RECIST ガイドラインにしたがい個別に評価する。

【0133】

10

20

30

40

50

(B) 抗PD-1抗体ニボルマブ投与前および投与後末梢血単核球中のV γ 2V δ 2T細胞およびCD56陽性NK細胞の数と割合の検討

フィコール濃度勾配遠心法により、末梢血単核球(PBMC)を精製し(実施例1参照)、7 mlのYM-AB培地に懸濁する。YM-AB培地に懸濁したPBMCのうち1 mlに関してフローサイトメトリー解析を行う。具体的には、細胞懸濁液0.1 mlずつを96ウェル丸底プレート9ウェルに播種し、1700 rpm、4、2分間遠心する。上清を除去し、細胞ペレットをボルテックス攪拌する。そこに46 μ lの2% FCS/PBSと、それぞれ以下を添加する。

(i) 2% FCS/PBS (4 μ l)

(ii) PE標識抗CD3抗体(2 μ l) + 2% FCS/PBS (2 μ l)

10

(iii) 2% FCS/PBS (2 μ l) + FITC標識抗V δ 2抗体(2 μ l)

(iv) PE標識抗CD3抗体(2 μ l) + FITC標識抗CD4抗体(2 μ l)

(v) PE標識抗CD3抗体(2 μ l) + FITC標識抗CD8抗体(2 μ l)

(vi) PE標識抗CD3抗体(2 μ l) + FITC標識抗V δ 1抗体(2 μ l)

(vii) PE標識抗CD3抗体(2 μ l) + FITC標識抗V δ 2抗体(2 μ l)

(viii) PE標識抗CD25抗体(2 μ l) + FITC標識抗CD4抗体(2 μ l)

(ix) PE標識抗CD56抗体(2 μ l) + FITC標識抗CD3抗体(2 μ l)

抗体添加後、プレートを氷上で15分インキュベートし、100 μ lの2% FCS/PBSを添加する。その後、プレートを1700 rpm、4、2分間遠心し、上清を除去する。この操作を計3回行い、最後に、200 μ lの2% FCS/PBSを添加し、70 μ mのフィルター膜に通し、フローサイトメトリーで解析を行う。この解析結果を基に、V γ 2V δ 2T細胞の割合と数、および、細胞表面マーカーの検討を行う。

20

【0134】

(C) PTA刺激による抗PD-1抗体ニボルマブ投与前および投与後末梢血V δ 2T細胞の増殖誘導性の検討

YM-AB培地に懸濁したPBMCのうち3 mlに関して $\gamma\delta$ T細胞の増殖試験を行う。3 mlのPBMC懸濁液に1 mMのPTAを加え、24ウェルプレートの2ウェル(1.5 ml/ウェル, 2ウェル)に播種し、37、5%CO₂でインキュベートする(Day 0)。

一方のウェルにIL-2(100 U/ml)、他方のウェルにIL-2(100 U/ml) + IL-18(100 ng/ml)の最終濃度で添加する(Day 1)。IL-2あるいはIL-2 + IL-18をさらに添加する(Day 2 - Day 9)。Day 10において細胞数を測定し、V γ 2V δ 2T細胞の増殖誘導性を検討する。

30

【0135】

(D) 抗PD-1抗体ニボルマブ投与前および投与後末梢血IL-2/IL-18誘導性NK細胞の増殖誘導性の検討

YM-AB培地に懸濁したPBMCのうち残り3 mlに関してNK細胞の増殖試験を行う。細胞懸濁の入った15 mlのコニカルチューブを1700 rpm、4で5分遠心する。次いで、上清を吸引除去し、細胞ペレットを分散させ、80 μ lのPBS/0.5%BSA/2 mM EDTAに再懸濁させる。そこに20 μ lのMACS(登録商標)Beads(Mylteny Biotech)標識抗CD3抗体を20 μ l加え、4で15分間インキュベートする。ここに2 mlのPBS/0.5%BSA/2 mM EDTAを加えて細胞を軽く懸濁させる。次いで、この細胞懸濁液を300 $\times$ g、4で10分遠心して上清を除去する。細胞ペレットを分散させ、1 mlのPBS/0.5%BSA/2 mM EDTAを添加し、細胞をよく懸濁させる。細胞懸濁液を、PBS/0.5%BSA/2 mM EDTAで平衡化したLDカラム(磁性球体で構成される)にかける。CD3陰性細胞を1 mlのPBS/0.5%BSA/2 mM EDTAで2回溶出する。1700 rpm、4、5分間遠心し、上清を捨て、アスピレーターで吸引除去する。次いで、細胞ペレットを分散させ、CD3⁺細胞を1.5 mlのYM-AB培地に懸濁させる。これを24ウェルプレートに播種し、IL-2及びIL-18をそれぞれ終濃度100 U

40

50

/ml 及び 100 ng/ml となるように添加し、37℃、5%CO₂ でインキュベートする (Day 0)。IL-2 及び IL-18 を毎日培地に加える (Day 2 - Day 9)。Day 10 において細胞数を測定し、NK 細胞の増殖誘導性を検討する。

【0136】

(E) 増殖誘導後の V δ 2 T 細胞の PD-1 を含む表面マーカー解析 (方法: 前記 (F) 参照)

PTA により増殖誘導した V γ 2 V δ 2 T 細胞を Day 10 において回収し、細胞表面マーカーのフローサイトメトリーによる検討を行う。具体的には、細胞懸濁液 0.1 ml ずつを 96 ウェル丸底プレート 7 ウェルに播種し、1700 rpm、4℃、2 分間遠心する。上清を除去し、細胞ペレットをボルテックス攪拌する。そこに 46 μ l の 2% FCS / PBS と、それぞれ以下を添加する。

- (i) 2% FCS / PBS (4 μ l)
- (ii) PE 標識抗 CD3 抗体 (2 μ l) + 2% FCS / PBS (2 μ l)
- (iii) 2% FCS / PBS (2 μ l) + FITC 標識抗 V δ 2 抗体 (2 μ l)
- (iv) PE 標識抗 CD3 抗体 (2 μ l) + FITC 標識抗 V δ 2 抗体 (2 μ l)
- (v) PE 標識抗 CD3 抗体 (2 μ l) + FITC 標識抗 CD4 抗体 (2 μ l)
- (vi) PE 標識抗 CD3 抗体 (2 μ l) + FITC 標識抗 CD8 抗体 (2 μ l)
- (vii) PE 標識抗 CD56 抗体 (2 μ l) + FITC 標識抗 V δ 2 抗体 (2 μ l)
- (viii) 2% PE 標識抗 NK G2D 抗体 (2 μ l) + FITC 標識抗 V δ 2 抗体 (2 μ l)
- (ix) PE 標識抗 DNAM-1 抗体 (2 μ l) + FITC 標識抗 V δ 2 抗体 (2 μ l)
- (x) PE 標識抗 FasL (2 μ l) + FITC 標識抗 V δ 2 抗体 (2 μ l)
- (xi) PE 標識抗 TRAIL 抗体 (2 μ l) + FITC 標識抗 V δ 2 抗体 (2 μ l)
- (xii) PE 標識抗 CD16 抗体 (2 μ l) + FITC 標識抗 V δ 2 抗体 (2 μ l)
- (xiii) 無標識抗 PD-1 抗体 (2 μ l) + RPE 標識抗マウス IgG 抗体 (2 μ l) + FITC 標識抗 V δ 2 抗体 (2 μ l)

抗体添加後、プレートを氷上で 15 分インキュベートし、100 μ l の 2% FCS / PBS を添加する。その後、プレートを 1700 rpm、4℃、2 分間遠心し、上清を除去する。この操作を計 3 回行い、最後に、200 μ l の 2% FCS / PBS を添加し、70 μ m のフィルター膜に通し、フローサイトメトリーで解析を行う。この解析結果を基に、V γ 2 V δ 2 T 細胞の割合と個数、および、細胞表面マーカーの検討を行う。

【0137】

(F) 増殖誘導後の NK 細胞の表面マーカー解析

Day 10 において細胞を回収し、細胞表面マーカーのフローサイトメトリーによる検討を行う。具体的には、細胞懸濁液 0.1 ml ずつを 96 ウェル丸底プレート 7 ウェルに播種し、1700 rpm、4℃、2 分間遠心する。上清を除去し、細胞ペレットをボルテックス攪拌する。そこに 46 μ l の 2% FCS / PBS と、それぞれ以下を添加する。

- (i) 2% FCS / PBS (4 μ l)
- (ii) PE 標識抗 CD56 抗体 (2 μ l) + FITC 標識抗 CD3 抗体 (2 μ l)
- (iii) PE 標識抗 NK G2D 抗体 (2 μ l) + FITC 標識抗 CD56 抗体 (2 μ l)
- (iv) PE 標識抗 DNAM-1 抗体 (2 μ l) + FITC 標識抗 CD56 抗体 (2 μ l)
- (v) PE 標識抗 FasL (2 μ l) + FITC 標識抗 CD56 抗体 (2 μ l)
- (vi) PE 標識抗 TRAIL 抗体 (2 μ l) + FITC 標識抗 CD56 抗体 (2 μ l)
- (vii) PE 標識抗 CD16 抗体 (2 μ l) + FITC 標識抗 CD56 抗体 (2 μ l)

抗体添加後、プレートを氷上で 15 分インキュベートし、100 μ l の 2% FCS / PBS を添加する。その後、プレートを 1700 rpm、4℃、2 分間遠心し、上清を除去する。この操作を計 3 回行い、最後に、200 μ l の 2% FCS / PBS を添加し、70 μ m のフィルター膜に通し、V γ 2 V δ 2 T 細胞の細胞表面マーカーに関するフローサイトメトリーで解析する。この解析結果を基に、NK 細胞の割合と個数、および、細胞表面マーカーの検討を行う。

【 0 1 3 8 】

(G) 増殖誘導後の V δ 2 T 細胞に対する P D - 1 免疫チェックポイント阻害剤の有用性の検討

増殖誘導した V γ 2 V δ 2 T 細胞の細胞障害性アッセイを行う。標的細胞としてはヒト P D - L 1 を強制発現させたヒト D a u d i バークットリンパ腫由来細胞株 D a u d i / h P D - L 1 を用い、P D - 1 免疫チェックポイント阻害剤としてはマウス抗ヒト P D - L 1 抗体 2 7 A 2 を用いる。

まず D a u d i / h P D - L 1 を 3 0 m l の R P M I 1 6 4 0 培地に懸濁し、7 5 c m² フラスコで 3 7 、5 % C O₂ で培養する。細胞数を測定し、 1×10^6 個の細胞を 4 本の 1 5 m l コニカルチューブに移す。細胞懸濁液を 1 7 0 0 r p m、4 で 5 分遠心し、上清を吸引除去し、細胞ペレットを分散させる。チューブ 1 及び 2 には、細胞を 1 m l の R P M I 1 6 4 0 培地に懸濁し、 1×10^6 個の / m l の細胞懸濁液を調製する。チューブ 3 及び 4 には、1 0 0 n M の P T A 溶液を 1 m l 添加し、よく懸濁する。3 7 、5 % C O₂ 雰囲気下で 1 時間 4 5 分インキュベートする。チューブ 4 に、1 m g / m l のマウス抗ヒト P D - L 1 モノクローナル抗体 2 7 A 2 を 2 μ l 添加し、最終濃度が 0 . 5 μ g / m l になるようにする。さらに、これらのチューブを 3 7 、5 % C O₂ 雰囲気下で 1 5 分間インキュベートする。次に、チューブ 1 に、2 . 5 μ l の D M S O、チューブ 2 ~ 4 にテルピリジン誘導体 C h 4 6 (ビス (ブチリロキシメチル) 4 ' - (ヒドロキシメチル) - 2 , 2 ' : 6 ' , 2 ' ' - テルピリジン - 6 , 6 ' - ジカルボキシレート : W O 2 0 1 5 / 1 5 2 1 1 1 実施例 8 参照) を 2 . 5 μ l 添加し、3 7 、5 % C O₂ 雰囲気下で 1 5 分インキュベートする。次にこれらのチューブを 1 7 0 0 r p m、4 、5 分間遠心し、上清を除去する。細胞ペレットをタッピングし、2 m l の R P M I 1 6 4 0 培地を添加し、細胞をよく懸濁後、この操作を 3 回繰り返す、細胞を洗浄する。5 m l の R P M I 1 6 4 0 培地で細胞を懸濁し、この細胞懸濁液 2 m l を新しい 1 5 m l コニカルチューブに移し、6 m l の R P M I 1 6 4 0 培地を添加し、細胞の最終濃度を 5×10^4 個 / m l = 5×10^3 個 / 1 0 0 μ l とする。R P M I 1 6 4 0 培地中 1×10^7 の V γ 2 V δ 2 T 細胞を 1 5 m l のコニカルチューブに移す。1 7 0 0 r p m、4 で 5 分遠心し、上清を吸引除去し、5 m l の R P M I 1 6 4 0 培地に添加し、細胞をよく懸濁後、以下のように系列希釈を行い、細胞懸濁液を調製する。

5 m l (V γ 2 V δ 2 T 細胞)	: 2 $\times 10^6$ / m l :	40 : 1 (E / T ratio)
2 m l (2 $\times 10^6$ / m l) + 2 m l (R P M I)	: 1 $\times 10^6$ / m l :	20 : 1 (E / T ratio)
2 m l (1 $\times 10^6$ / m l) + 2 m l (R P M I)	: 5 $\times 10^5$ / m l :	10 : 1 (E / T ratio)
2 m l (5 $\times 10^5$ / m l) + 2 m l (R P M I)	: 2.5 $\times 10^5$ / m l :	5 : 1 (E / T ratio)
2 m l (2.5 $\times 10^5$ / m l) + 2 m l (R P M I)	: 1.25 $\times 10^5$ / m l :	2.5 : 1 (E / T ratio)
2 m l (1.25 $\times 10^5$ / m l) + 2 m l (R P M I)	: 6.25 $\times 10^4$ / m l :	1.25 : 1 (E / T ratio)
2 m l (6.25 $\times 10^5$ / m l) + 2 m l (R P M I)	: 3.125 $\times 10^4$ / m l :	0.625 : 1 (E / T ratio)
2 m l (R P M I)	: 0 / m l :	0 : 1 (E / T ratio)

【 0 1 3 9 】

次に丸底 9 6 ウェルプレートに、3 ウェルずつに、1 0 0 μ l の V γ 2 V δ 2 T 細胞懸濁液 (試験用)、1 0 0 μ l の R P M I 1 6 4 0 培地 (自然漏出測定用)、あるいは 9 0 μ l の R P M I 1 6 4 0 培地 (最大漏出測定用) を添加する。ここに、1 0 0 μ l の D a u d i / h P D - L 1 細胞を添加し、5 0 0 r p m で、室温 2 分間遠心し、3 7 、5 % C O₂ 雰囲気下で 1 5 分インキュベート後、最大漏出測定用ウェルに 1 0 μ l の 0 . 1 2 5 % ジギトニン (1 9 % D M S O 中 (M i l l i Q 溶液)) を添加し、よくピペッティングする。プレートをさらに、3 7 、5 % C O₂ 雰囲気下で 2 0 分以上インキュベートし、1 7 0 0 r p m、4 で 2 分間遠心する。次に、2 5 μ l の上清を新しい丸底 9 6 ウェルプレートに移し、2 5 0 μ l の E u 溶液とよく混和する。これを 2 0 0 μ l 新しい蛍光測定用プレートに移し、時間分解蛍光を測定する。これらの結果を基に、増殖培養した V γ 2 V δ 2 T 細胞の示す P D - L 1 発現性腫瘍細胞株への抗腫瘍効果における P D - 1 免疫チェックポイント阻害剤の影響を検討する。

【 0 1 4 0 】

(H) 増殖誘導後の N K 細胞と P D - 1 免疫チェックポイント阻害剤の有用性の検討

増殖誘導した N K 細胞の細胞障害性アッセイを行う。標的細胞としてヒト骨髓腫由来細胞株 K 5 6 2 細胞株を、V γ 2 V δ 2 T 細胞の代わりに N K 細胞を用いる以外は、上記 (G) と同じ手順で時間分解蛍光を測定し、その結果を基に増殖培養した N K 細胞の示す K 5 6 2 細胞株への抗腫瘍効果を検討する。

【 0 1 4 1 】

[統計解析]

ニボルマブ投与前および投与後について、上記評価項目記載のバイオマーカーについて要約統計量 (例数、平均、標準偏差、最小値、四分位範囲、中央値、最大値等) を求める。ニボルマブ奏功の有無で 2 群に分け、各バイオマーカーの要約統計量を求める。これらの結果から、末梢血単核球中の γ δ T 細胞の割合、 γ δ T 細胞の抗原刺激による増殖誘導性、増殖誘導後の P D - 1 を発現量と奏功性との相関関係について検討を行う。さらに、 γ N K 細胞の割合及び増殖誘導能と奏功性との相関関係について検討を行う。次にニボルマブ奏功に対するカットオフ値を推定するために、各バイオマーカーによる R O C 曲線を作成する。また、ニボルマブ奏功に対して多因子による関与が考えられた場合には、各バイオマーカーによる L o g i s t i c モデルより多因子 R O C 曲線を求め、多因子でのカットオフ値を推定する。

10

【 0 1 4 2 】

[結果]

20

下表に結果を示す。

【 0 1 4 3 】

【表 5】

治療前染色 day0

Patient	Day0 (PBMC)															Day0 (CD3+ cells)				
	CD3+ CD4+ /All	CD3+ CD4- /All	CD3+ CD8+ /All	CD3+ CD8- /All	CD3+ CD8- D3	CD3+ Vd1- /All	Vd1/C D3	CD3+ Vd2- /All	CD3+ Vd2- /All	Vd2/C D3	CD25 +CD4 /All	CD25- CD4+ /All	CD25- +CD3- /All	CD56 +CD3- /All	CD56 +CD1 6+ /All	CD56 +CD1 6- /All	CD16/ CD56			
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)			
TR01	43.9	36.5	54.60	20.0	57.4	25.84	0.31	79.9	0.39	6.08	10.4	33.7	23.58	9.39	46.9	44.5	2.24	95.21		
TR02	37.2	24.2	60.59	19.5	46.2	29.68	0.11	71.8	0.15	3.74	6.54	37.3	14.92	6.80	37.3	32.7	5.19	86.30		
TR03	13.6	8.4	61.87	8.16	14.0	36.82	0.23	21.2	1.07	0.56	4.19	9.5	30.56	7.56	9.48	8.94	0.27	97.07		
TR04	48.2	9.4	83.65	8.59	51.6	14.27	0.66	58.9	1.11	0.74	60.9	1.20	27.1	23.5	53.56	5.30	16.1	9.86	2.80	77.88
TR05	29.8	28.6	51.03	10.1	40.4	20.00	1.14	58.9	1.90	0.44	59.2	0.74	4.43	12.6	31.8	30.2	1.58	95.03		
TR06	16.6	10.1	62.17	2.33	9.24	2.33	2.33	27.3	7.86	0.023	29.8	0.08	1.45	16.2	61.5	60.2	0.42	99.31		
TR07	30.7	20.9	59.50	9.10	39.4	18.76	1.17	52.0	2.20	0.51	53.5	0.94	8.10	24.1	32.7	29.0	4.28	87.14		
TR08	36.6	12.7	74.24	10.2	36.9	21.66	0.017	44.9	0.04	1.04	44.1	2.30	4.35	26.8	43.5	34.3	1.07	96.97		
TR09	40.6	12.7	76.17	11.7	42.1	21.75	0.40	52.8	0.75	0.52	53.6	0.96	7.42	27.6	38.1	38.4	1.38	96.53		
TR10	27.4	34.8	44.05	31.4	28.5	52.42	1.06	61.2	1.70	0.60	61.0	0.97	4.99	12.1	33.6	32.9	1.38	95.97		
TR11	41.4	18.5	69.12	17.4	42.6	29.00	0.24	59.9	0.40	1.67	58.8	2.76	13.1	19.80	53.1	49.5	2.73	94.77		
TR12	23.6	18.7	55.79	16.1	27.1	37.27	1.88	41.3	4.35	0.92	41.1	2.19	7.61	38.7	67.2	65.5	0.90	98.64		
TR13	48.5	23.7	67.17	23.0	48.7	32.08	0.81	71.2	1.12	0.34	72.2	0.47	9.20	15.3	55.7	53.6	2.13	96.18		
Average	33.70		63.07	14.43		26.83	0.80		1.77	1.12	1.77	8.88	23.39	18.28	40.54	37.66		93.62		

【0144】

13名の被験者のうち、TR01、TR02、TR03、及びTR07において間質性肺炎の発症が確認された。そのうち、TR01とTR02はDAD（びまん性肺胞傷害）であり、他の2例（OP（器質性肺炎））とは異なり、急性憎悪を来し、投薬を中止するも1例は死亡するに至った。TR01及びTR02は、TR03及びTR07とは異なり末梢血単核球に対する $\gamma\delta$ T細胞の割合（ $CD3^+V\delta2^+/All$ ）及びT細胞に対する $V\delta2^+$ 細胞の割合（ $V\delta2^+/CD3^+$ ）が高く、統計解析の結果、データの完全分離が確認された。

【0145】

10

20

30

40

50

以上より、末梢血単核球に対する $V\delta 2^{+}\gamma\delta T$ 細胞の細胞数又は割合を指標にすることで、DADを伴う間質性肺炎をそれ以外の間質性肺炎と鑑別して、その発症リスクを予測することが可能であると考えられた。これにより、投薬前に重大な有害事象を発生するリスクのある患者を見分け、投薬前に治療対象から除外したり、事前の手当てを行うなど、免疫チェックポイント阻害剤による安全な治療が可能になる。なお、ここでは末梢血単核球をベースとして評価したが、 $CD3^{-}V\delta^{-}$ の細胞が多い試料の場合には、末梢血T細胞に対する $V\delta 2^{+}$ 細胞の細胞数又は割合を指標とすることができる。

【産業上の利用可能性】

【0146】

本発明は、免疫チェックポイント阻害剤による重症間質性肺炎の発症リスクを投与前に予測し、治療の適否を判定することで、精密医療の実現に有用である。

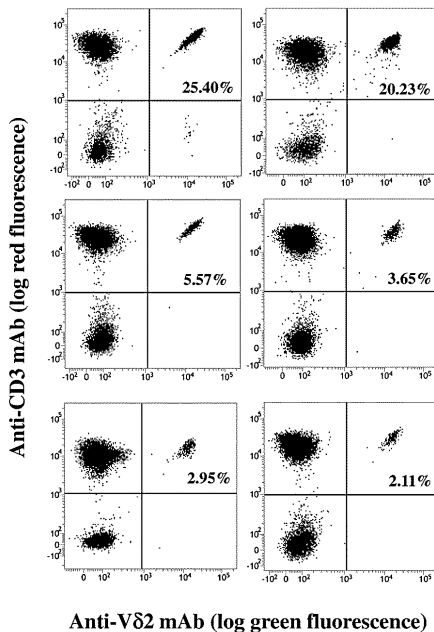
10

【0147】

本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

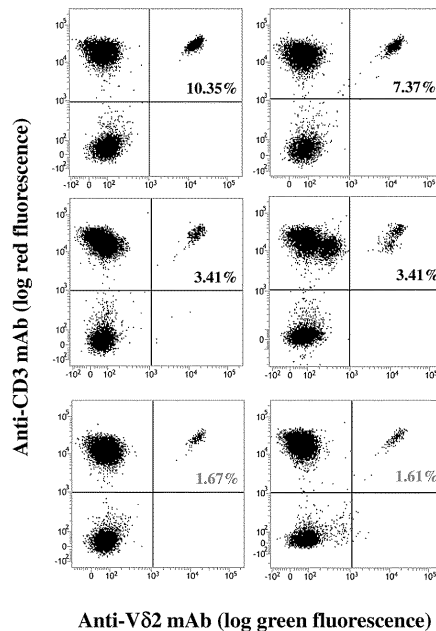
【図1A】

健康人末梢血単核球における $\gamma\delta$ 型T細胞の割合

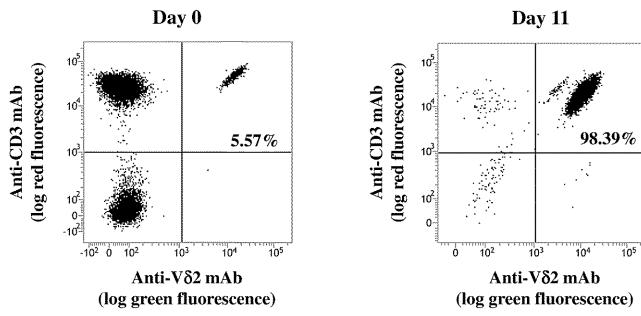


【図1B】

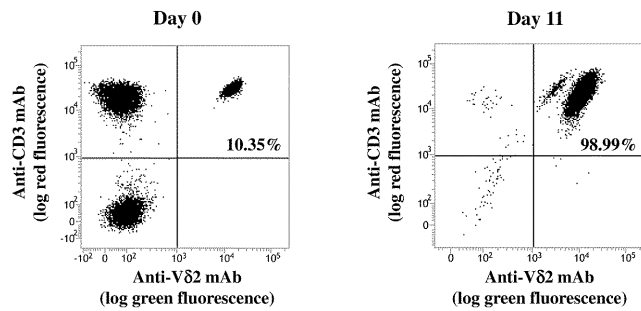
健康人末梢血単核球における $\gamma\delta$ 型T細胞の割合



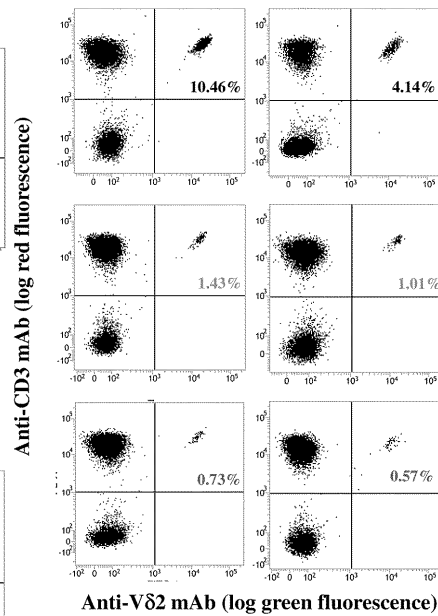
【図 2 A】

健康人末梢血 γ δ 型 T 細胞の増殖誘導

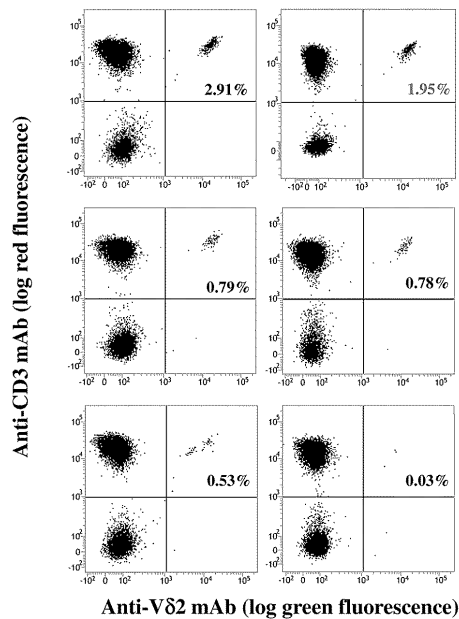
【図 2 B】

健康人末梢血 γ δ 型 T 細胞の増殖誘導

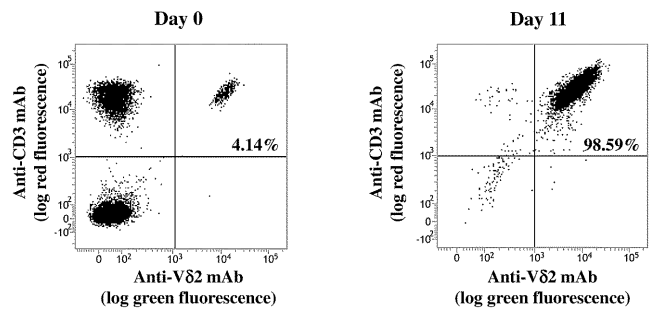
【図 3 A】

肺がん患者では γ δ 型 T 細胞の割合が低い

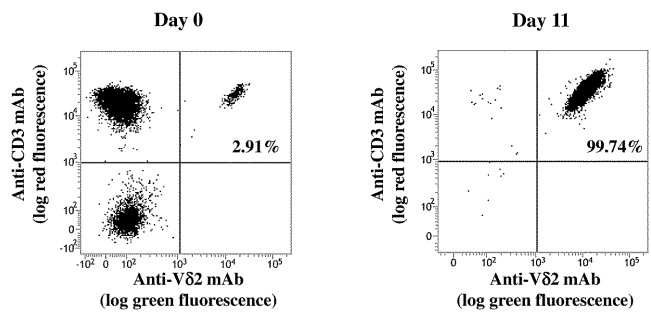
【図 3 B】

肺がん患者では γ δ 型 T 細胞の割合が低い

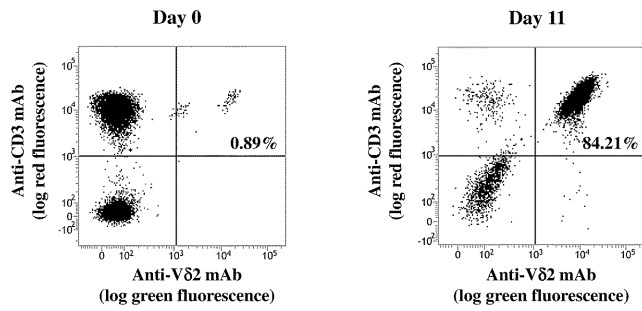
【図 4 A】

肺がん患者末梢血 γ δ 型 T 細胞の増殖誘導

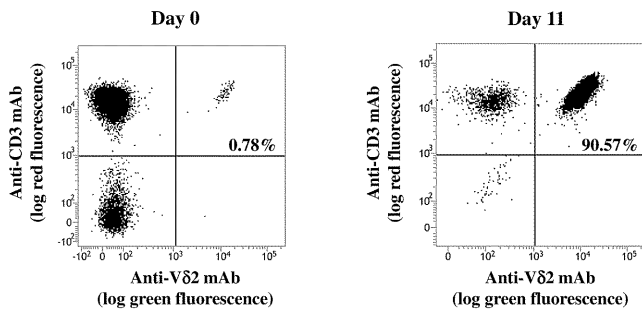
【図 4 B】

肺がん患者末梢血 γ δ 型 T 細胞の増殖誘導

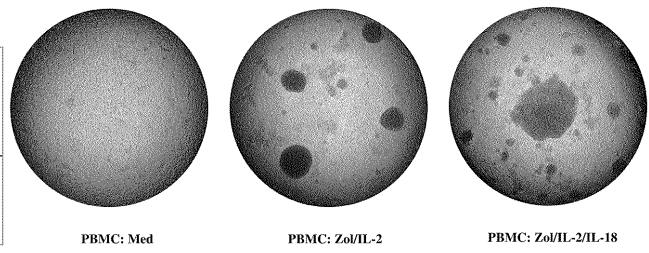
【図 4 C】

肺がん患者末梢血 γ δ 型 T 細胞の増殖誘導

【図 4 D】

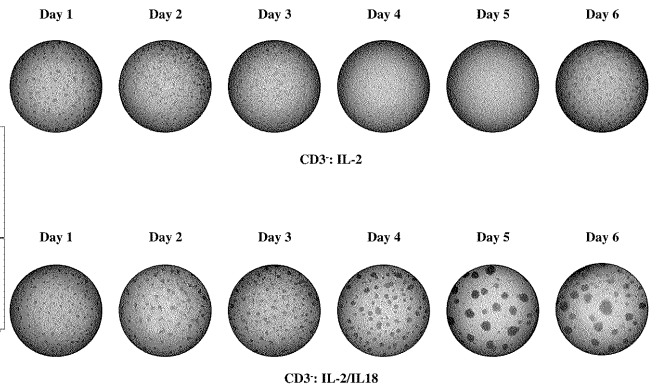
肺がん患者末梢血 γ δ 型 T 細胞の増殖誘導

【図 5】

ヒトにおいて ZOL/IL-2/IL-18 は *in vitro* で γ δ 型 T 細胞を増殖誘導する

【図 6】

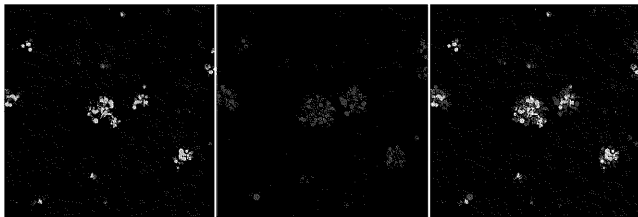
IL-2 依存性 NK 細胞増殖における IL-18 の役割



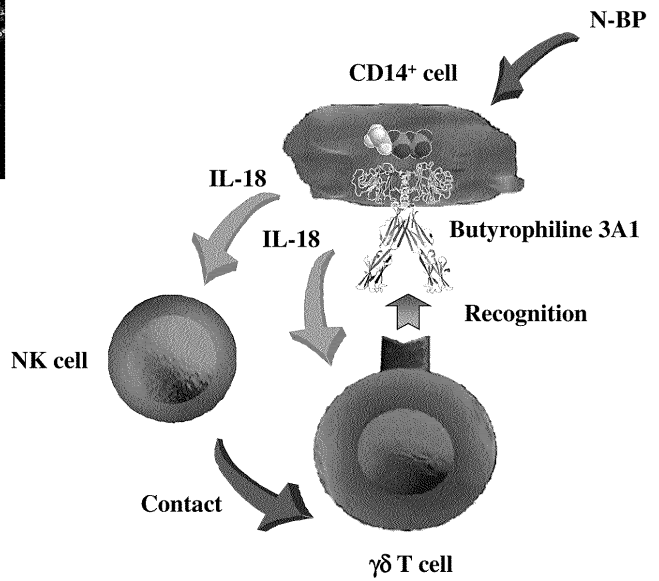
【図 7】

 γ δ T cells

NK cells

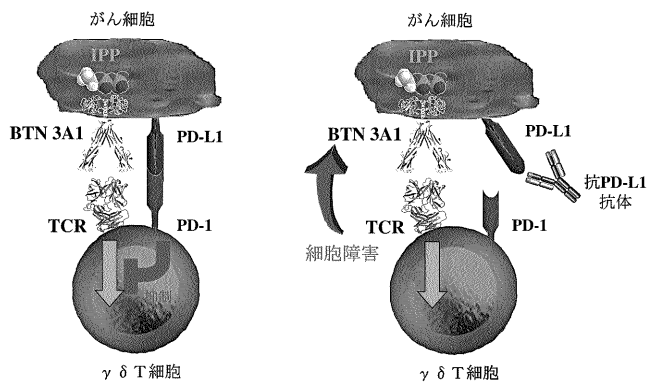
 γ δ T cells + NK cells

【図 8】

IL-18 依存性 γ δ 型 T 細胞増殖機構

【 図 9 】

PD-1免疫チェックポイント阻害剤によるがん免疫療法



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2019/038721
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. G01N33/50(2006.01)i, A61K31/164(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. G01N33/50, A61K31/164, A61P17/00, G01N33/15, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2019 Registered utility model specifications of Japan 1996-2019 Published registered utility model applications of Japan 1994-2019 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN)/JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)/PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WISTUBA-HAMPRECHT, Kilian, "Proportions of blood-borne Vδ1+and Vδ2+T-cells are associated with overall survival of melanoma patients treated with ipilimumab", Eur J Cancer, September 2016, 64, 116-126, abstract, page 9, lines 26-40 <DOI:10.1016/j.ejca.2016.06.001>	8 1-7, 9
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 December 2019 (17.12.2019)		Date of mailing of the international search report 24 December 2019 (24.12.2019)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/038721

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	株式会社テクノ・スズタ, N-SPC (C)ヒト $\gamma\delta$ 型 T 細胞増殖キット[オンライン], [retrieval date 11 December 2019], use examples internet<URL:https://www.technosuzuta.co.jp/publics/index/192/>, (TECHINO SUZUTA CO., LTD., N-SPC® Human $\gamma\delta$ T Cell Expansion Kit [online])	8 1-7, 9
L	株式会社テクノ・スズタ, 「N-SPC(C) $\gamma\delta$ 型 T 細胞増殖キット発売しました。], TOPIX [オンライン], 01 October 2018 [retrieval date 11 December 2019] internet:<URL:https://www.technosuzuta.co.jp/publics/index/1/block721_limit=20t/block721>, non-official translation (TECHINO SUZUTA CO., LTD., "N-SPC® Human $\gamma\delta$ T Cell Expansion Kit was released", TOPIX [online])	1-9
Y A	WISTUBA-HAMPRECHT, Kilian, "OMIP-020: Phenotypic Characterization of Human $\gamma\delta$ I-cells by Multicolor Flow Cytometry", Cytometry Part A, June 2014, 85A, 522-524, Purpose and Appropriate Sample Type, fig. 1 <DOI:10.1002/cyto.a.22470	8 1-7, 9
Y A	TANAKA, Yoshimasa, "Anti-Tumor Activity and Immunotherapeutic Potential of a Bisphosphonate Prodrug", Sci Rep, 20 July 2017, 7:5987, 1-13, $\gamma\delta$ T cell activation assay, fig. 5 <DOI: 10.1038/s41598-017-05553-0>	8 1-7, 9
Y A	TANAKA, Yoshimasa, "Expansion of human $\gamma\delta$ T cells for adoptive immunotherapy using a bisphosphonate prodrug", Cancer Sci., March 2018, 109, 587-599, 2.6 Flow cytometric analysis, fig. 2 <DOI:10.1111/cas.13491>	8 1-7, 9
A	JP 2003-128555 A (OYO IGAKU KENKYUSHO KK) 08 May 2003, paragraphs [0034]-[0035] (Family: none)	5, 9
A	WO 2016/098904 A1 (NAGASAKI UNIVERSITY) 23 June 2016, paragraphs [0015], [0031]-[0034] & US 2017/0360811 A1, paragraphs [0049], [0084] & EP 3235822 A1	5, 9
A	JP 2010-17134 A (HYOGO COLLEGE OF MEDICINE) 28 January 2010, paragraph [0018] & US 2010/0009447 A1, paragraph [0030]	5, 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/038721

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2019/038721

<Continuation of Box No. III>

Document 1: WISTUBA-HAMPRECHT, Kilian, "Proportions of blood-borne Vδ1+and Vδ2+T-cells are associated with overall survival of melanoma patients treated with ipilimumab", Eur J Cancer, September 2016, 64, 116-126

Claims are classified into the following two inventions.

(Invention 1) Claims 1-7

Claims 1-7 have the special technical feature in that "a cell number or ratio of Vδ2+γδ T cells" in "peripheral blood mononuclear cells" or "peripheral blood T cells" "isolated from a subject" is an index, and an "onset risk of severe interstitial pneumonia is predicted by an immune checkpoint inhibitor," and thus are classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 8-9

Claims 8-9 have the technical feature of a "kit for determining a suitability of treatment by an immune checkpoint inhibitor", the kit containing "anti-CD3 antibody" and "anti-Vδ2 antibody." Therefore, claims 8-9 and claim 1 classified as invention 1 share the common technical feature of measuring "Vδ2," and examining effects by an "immune checkpoint inhibitor."

Meanwhile, document 1 (in particular, see Abstract) indicates that, in melanoma patient treated with ipilimumab (corresponding to an "immune checkpoint inhibitor"), if the ratio of Vδ2+ cells is high, survival time of the patients is long, and if the ratio of Vδ2+ cells is reduced, overall survival time of the patients is shorten (corresponding to "effects by an immune checkpoint inhibitor). Therefore, the common technical feature does not make a contribution over the prior art, and thus cannot be considered a special technical feature. In addition, there are no other identical or corresponding special technical features between claims 8-9 and claim 1.

In addition, claims 8-9 are not dependent on claim 1. Further, claims 8-9 are not substantially identical or equivalent to any of the claims classified as invention 1.

In addition, claims 8-9 have the technical feature of a "kit for determining a suitability of treatment by an immune checkpoint inhibitor", the kit containing (i) anti-CD3 antibody and (ii) anti-Vδ2 antibody, and thus are classified as invention 2.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 9 / 0 3 8 7 2 1	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/50(2006.01)i, A61K31/164(2006.01)i, A61P17/00(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/50, A61K31/164, A61P17/00, G01N33/15, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2019年 日本国実用新案登録公報 1996-2019年 日本国登録実用新案公報 1994-2019年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) Caplus (STN)/ JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII) /PubMed			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y A	WISTUBA-HAMPRECHT, Kilian, Proportions of blood-borne Vδ1+ and Vδ2+ T-cells are associated with overall survival of melanoma patients treated with ipilimumab, Eur J Cancer, 2016.09, 64, 116-126, Abstract 及び第9頁第26～40行 <DOI:10.1016/j.ejca.2016.06.001>	8 1-7,9	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 17.12.2019		国際調査報告の発送日 24.12.2019	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 北条 弥作子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 9 / 0 3 8 7 2 1
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	株式会社テクノ・スズタ, N-SPC(C) ヒト $\gamma\delta$ 型 T 細胞増殖キット[オンライン], [検索日 2019.12.11], 使用例 インターネット <URL:https://www.technosuzuta.co.jp/publics/index/192/>	8 1-7, 9
L	株式会社テクノ・スズタ, 「N-SPC(C) $\gamma\delta$ 型 T 細胞増殖キット 発売しました。», TOPIX [オンライン], 2018.10.01 [検索日 2019.12.11] インターネット <URL:https://www.technosuzuta.co.jp/publics/index/1/block721_limit=20#block721>	1-9
Y A	WISTUBA-HAMPRECHT, Kilian, OMIP-020: Phenotypic Characterization of Human $\gamma\delta$ T-cells by Multicolor Flow Cytometry, Cytometry Part A, 2014.06, 85A, 522-524, Purpose and Appropriate Sample Type 及び図 1 <DOI:10.1002/cyto.a.22470>	8 1-7, 9
Y A	TANAKA, Yoshimasa, Anti-Tumor Activity and Immunotherapeutic Potential of a Bisphosphonate Prodrug, Sci Rep, 2017.07.20, 7:5987, 1-13, $\gamma\delta$ T cell activation assay 及び図 5 <DOI: 10.1038/s41598-017-05553-0>	8 1-7, 9
Y A	TANAKA, Yoshimasa, Expansion of human $\gamma\delta$ T cells for adoptive immunotherapy using a bisphosphonate prodrug, Cancer Sci., 2018.03, 109, 587-599, 2.6 Flow cytometric analysis 及び図 2 <DOI: 10.1111/cas.13491>	8 1-7, 9
A	JP 2003-128555 A (株式会社応用医学研究所) 2003.05.08, 段落 [0034] ~ [0035] (ファミリーなし)	5, 9
A	WO 2016/098904 A1 (国立大学法人 長崎大学) 2016.06.23, 段落 [0015] [0031] ~ [0034] & US 2017/0360811 A1, 段落 [0049] [0084] & EP 3235822 A1	5, 9
A	JP 2010-17134 A (学校法人兵庫医科大学) 2010.01.28, 段落 [0018] & US 2010/0009447 A1, 段落 [0030]	5, 9

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2019/038721

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

様式PCT/ISA/210（第1ページの続葉（2））（2015年1月）

<第 III 欄の続き>

文献 1 : WISTUBA-HAMPRECHT, Kilian, Proportions of blood-borne $V\delta 1+$ and $V\delta 2+$ T-cells are associated with overall survival of melanoma patients treated with ipilimumab, Eur J Cancer, 2016.09, 64, 116-126

請求の範囲は、以下の 2 つの発明に区分される。

(発明 1) 請求項 1～7

請求項 1～7 は、「被験者から単離された」「末梢血単核球」又は「末梢血 T 細胞」における「 $V\delta 2+\gamma\delta$ T 細胞の細胞数又は割合」を指標とて、「免疫チェックポイント阻害剤による重症間質性肺炎の発症リスクを予測する」という技術的な特徴を有しているので、発明 1 に区分する。

(発明 2) 請求項 8～9

請求項 8～9 は、「抗 CD 3 抗体」及び「抗 $V\delta 2$ 抗体」含む、「免疫チェックポイント阻害剤による治療の適否を判定するためのキット」という技術的な特徴を有している。したがって、請求項 8～9 は、発明 1 に区分された請求項 1 と、「 $V\delta 2$ 」を測定して、「免疫チェックポイント阻害剤」による効果を検討する点において、共通の技術的特徴を有している。

一方、文献 1 (特に、Abstract 参照。)には、ipilimumab (「免疫チェックポイント阻害剤」に相当。) 治療を受けたメラノーマ患者において、 $V\delta 2+$ 細胞の割合が高いと生存期間が長く、 $V\delta 2+$ 細胞の割合が減少すると全生存期間 (「免疫チェックポイント阻害剤による効果」に相当。) が短くなることが示されている。したがって、上記の共通の技術的特徴は、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、請求項 8～9 と請求項 1 との間に、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項 8～9 は請求項 1 の従属項ではない。また、請求項 8～9 は、発明 1 に区分された何れの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

そして、請求項 8～9 は、(i) 抗 CD 3 抗体、及び (ii) 抗 $V\delta 2$ 抗体を含む、「免疫チェックポイント阻害剤による治療の適否を判定するためのキット」という技術的特徴を有しているので、発明 2 に区分する。

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100162503

弁理士 今野 智介

(74)代理人 100144794

弁理士 大木 信人

(72)発明者 田中 義正

長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学内

(72)発明者 千住 博明

長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学内

(72)発明者 迎 寛

長崎県長崎市文教町 1 - 1 4 国立大学法人長崎大学内

(72)発明者 福島 雅典

兵庫県神戸市中央区港島南町 2 - 2 公益財団法人神戸医療産業都市推進機構内

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。