

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08396

研究課題名（和文）免疫チェックポイント阻害薬心筋炎の免疫機構解明のための免疫統合オミックス解析

研究課題名（英文）Immune Integrated Omics Analysis for Elucidating the Mechanisms of Immune Checkpoint Inhibitor-Induced Myocarditis

研究代表者

田尻 和子 (Tajiri, Kazuko)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：60633914

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：免疫チェックポイント阻害薬（ICI）投与により心筋炎を生じた症例の自己抗体をプロテオームアレイを用いて検出した。いくつかの既知の心筋構成蛋白に対する自己抗体が心筋炎を生じる前から高値であった。また、新規の自己抗体も複数検出した。さらに、サイトカインプロファイルの変化を検討したところ、心筋炎発症した患者ではICI投与前から有意に血中炎症性サイトカイン量が高く、またICI投与後早期の type-I interferon の下流のサイトカインの増加も顕著であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害薬投与前から心筋症関連自己抗体が検出されたことから、免疫チェックポイント阻害薬による心筋炎発症の予測因子として用いることができる可能性が考えられた。しかし、免疫チェックポイント阻害薬投与後の心筋炎発症時に有意な上昇を示さなかったことから、病態への関与は少ないことが示唆された。腫瘍循環器の見地から免疫チェックポイント阻害薬の作用機序や心筋障害を臨床的・基礎的に詳細に解析することで、これまでにない心筋炎の機序あるいは治療に向けた研究のシーズが見つかり、新たなトランスレーショナルリサーチへと展開できる可能性を多く含んでいると考える。

研究成果の概要（英文）：We detected autoantibodies in a case of myocarditis induced by immune checkpoint inhibitor (ICI) administration using proteome array. Autoantibodies against several known myocardial structural proteins were elevated even before the onset of myocarditis. Additionally, we identified several novel autoantibodies. Furthermore, upon examining the changes in cytokine profiles, it was found that patients who developed myocarditis had significantly higher levels of inflammatory cytokines in the bloodstream prior to ICI administration, and there was a notable increase in downstream cytokines of type-I interferon in the early stages following ICI administration.

研究分野：腫瘍循環器学

キーワード：腫瘍循環器学 心筋炎

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント分子 (CTLA-4 や PD-1 など) は抑制性共シグナルを伝達することによって免疫細胞の活性化を抑制し、自己に対する免疫寛容状態の維持や免疫反応の収束を行い、免疫応答の恒常性を維持している分子群である。免疫チェックポイント阻害薬により抗腫瘍免疫が活性化され、抗腫瘍効果をもたらされる一方、自己免疫の賦活化によると考えられる副作用 (免疫関連有害事象、irAE) の発生が問題となっている。本薬剤の安全な使用のために、irAE の発生や重症度を予測するバイオマーカーの開発が求められている。

全身の様々な臓器で irAE の発生が報告されているが、心臓への副作用は重症筋無力症や筋炎を合併した心筋炎として生じることが多く (Tajiri, et al. Jpn J Clin Oncol. 2018) (図 1) 約半数がグレード 4 または 5 に陥るため (Mahmood et al. J Am Coll Cardiol. 2018) 病態の解明が急務である。

免疫チェックポイント阻害薬使用後に心筋炎と筋炎を発症した症例の T 細胞受容体レパトア解析結果によると、がん組織と心臓、骨格筋に同じ T 細胞受容体を持つ T 細胞クローンが浸潤していることが明らかとなった (Johnson, et al. N Eng J Med 2016) 。

さらに、がん組織のトランスクリプトーム解析によって、がん組織にも骨格筋や心筋特異的な遺伝子発現を認めたことから、がん組織が体細胞遺伝子変異によりネオアンチゲンを合成し、その蛋白には骨格筋や心筋と共通の T 細胞ネオエピトープが存在している可能性が示唆されるが、未だ明らかになっていない。

さらに最近の研究結果では、irAE の発生には細胞性免疫だけでなく B 細胞を主体とした液性免疫も大きな役割を果たしていることが示唆されている (Das, et al. J Clin Invest 2018) 。

がん細胞の体細胞遺伝子変異によって出現したネオアンチゲンには、心筋・骨格筋に反応する免疫グロブリンと共通の B 細胞ネオエピトープ配列が含まれている可能性が考えられるが、そのような検討は未だなされていない。

2. 研究の目的

免疫チェックポイント阻害薬による心筋炎発症の背景を細胞性免疫と液性免疫の両面から様々なオミックス解析を統合することで明らかにすることで、免疫チェックポイント阻害薬が安全に使用できる患者選別のためのバイオマーカーを確立し、がん治療の個別化を前進させる。

3. 研究の方法

対象は免疫チェックポイント阻害薬により心筋炎を発症した 2 症例である (表 1) 。

表1. 患者背景

	免疫チェックポイント阻害剤	年齢	原疾患
症例①	Nivolumab	70代	腎細胞癌
症例②	Nivolumab	50代	非小細胞性肺癌

症例 1 は 70 代男性。肺転移を伴う進行腎細胞がん患者で、免疫チェックポイント阻害薬投与後に心筋炎、筋炎、重症筋無力症を発症した (初回投与 30 日後に発症した) 。

心筋生検では CD3 陽性 T リンパ球と CD68 陽性マクロファージの浸潤を多数認め、T リンパ球は CD8 陽性リンパ球が主体であった。また、少数の CD20 陽性 B リンパ球の浸潤も認めた。心筋炎診断後にステロイドパルス治療を行い心筋炎は改善したが、その後がんが増悪し、8 ヶ月後に死亡した(1)。

症例 2 は 50 代女性。遠隔転移を伴う非小細胞性肺がんの診断で免疫チェックポイント阻害薬が開始となった。しかし、初回投与後 23 日目に心不全のために入院となった。心筋生検では明らかな炎症細胞浸潤は指摘できなかったが、心エコー図検査では心尖部や前壁の新規の壁運動低下を認め、冠動脈病変は認めなかったために免疫チェックポイント阻害薬による心筋炎と診断し、ステロイドパルス治療を行った。しかし、病態の改善なく免疫チェックポイント阻害薬投与開始後 2 ヶ月後に心不全のために死亡した。

上記 2 名の患者の血清を、免疫チェックポイント阻害薬投与前後に採取し、プロテオーム解析を行うまで -80 に保存した。自己抗体の網羅的解析に使用したプロテインアレイは、20,000 以

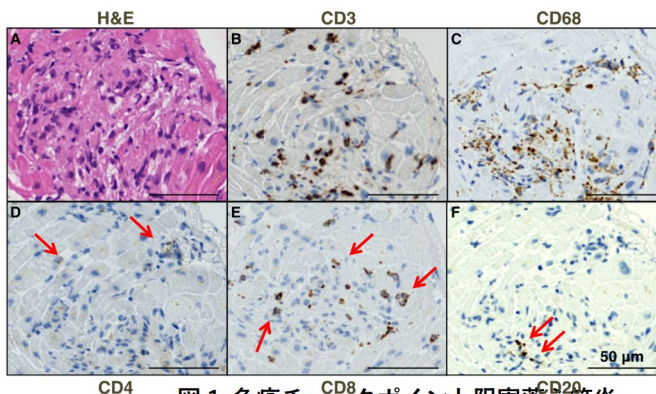


図 1 免疫チェックポイント阻害薬心筋炎

上のタンパク質コレクションを搭載し、ヒトプロテオームの 81% を網羅した CDI Laboratories 社の HuProt™ Human Proteome Microarray v3.1 を用いた。また、心筋炎患者の血清中のサイトカイン量を Abcam 社の Cytokine Array - Human Cytokine Antibody Array (Membrane, 80 Targets) を用いて検討した。

4. 研究成果

免疫チェックポイント阻害剤投与により心筋炎を生じた 2 症例の免疫チェックポイント阻害剤投与前と心筋炎発症時の血清中の自己抗体をプロテオームアレイを用いて検出した。まず、これまでに心筋炎を含む種々の心疾患に関与することが報告されている自己抗体について検討を行った。その中で、tropomyosin1-4、Na-KATPase、熱ショック蛋白 60 に対する自己抗体を検出した (表 2)。しかし、それらの自己抗体は免疫チェックポイント投与前と比較して最大で 1.23 倍の上昇にとどまり、有意な上昇とは言えなかった。その他のこれまでに心疾患との関与が報告されている 2-、3-、1-アドレナリン受容体、ムスカリン受容体、心筋トロポニン T/I、ラミニン、熱ショック蛋白 70 に対する自己抗体は検出されなかった。

表2. 心筋炎関連自己抗体の関与

自己抗原	症例①	症例②
Tropomyosin 1	0.76	0.84
Tropomyosin 2	1.02	検出されず
Tropomyosin 3	1.23	0.88
Tropomyosin 4	0.75	検出されず
Na-K ATPase, alpha 3 polypeptide	1.13	0.94
Heat shock protein 60	0.93	検出されず

数値は免疫チェックポイント阻害剤投与後の信号強度を投与前の信号強度で除した値

次に、心筋炎関連自己抗体として過去に報告のない、未知の自己抗体に関して網羅的に検討した (図 2)。図 1 の volcano plot の赤枠内に示した自己蛋白に対する自己抗体 (IgM) が免疫チェックポイント阻害剤投与後に有意に増加していた。

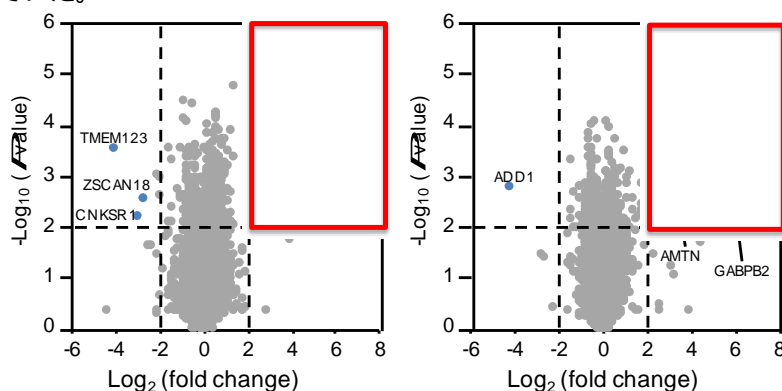


図 2 プロテオーム解析による自己抗体の検出 (左: 心筋炎、右: 心筋炎。赤枠内は心筋炎発症時に免疫チェックポイント阻害剤投与前に比べて 4 倍以上に有意に [p < 0.01] 増加していた自己抗体を示した)

さらに、免疫チェックポイント阻害剤の投与やステロイド治療により生じたサイトカインプロファイルの変化をサイトカインアレイを用いて検討した (図 3)。心筋炎発症時には免疫チェックポイント阻害剤投与前と比べ、fibroblast growth factor-4 (FGF-4)、neurotrophin-4 (NT-4) が上昇し、interleukin (IL)-7、macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22)、insulin-like growth factor 1 (IGF-1)、TIMP metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP-1) が減少していた。ステロイドパルス治療により心筋炎発症時より IL-4、interferon- (IFN-)、thymus and activation regulated chemokine (TARC/CCL17)、B lymphocyte chemoattractant (BLC/CXCL13)、FGF-4、FGF-6、fractalkine (CX3CL1)、insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP-3)、leukemia inhibitory factor (LIF)、TNF superfamily member 14 (LIGHT)、monocyte chemoattractant protein-4 (MCP-4/CCL13)、NT-4、pulmonary and activation-regulated chemokine (PARC/CCL18)、placental growth factor (PIGF)、transforming growth factor, beta 3 (TGF-β3) が有意に減少し、IGF-1 が有意に増加していた。

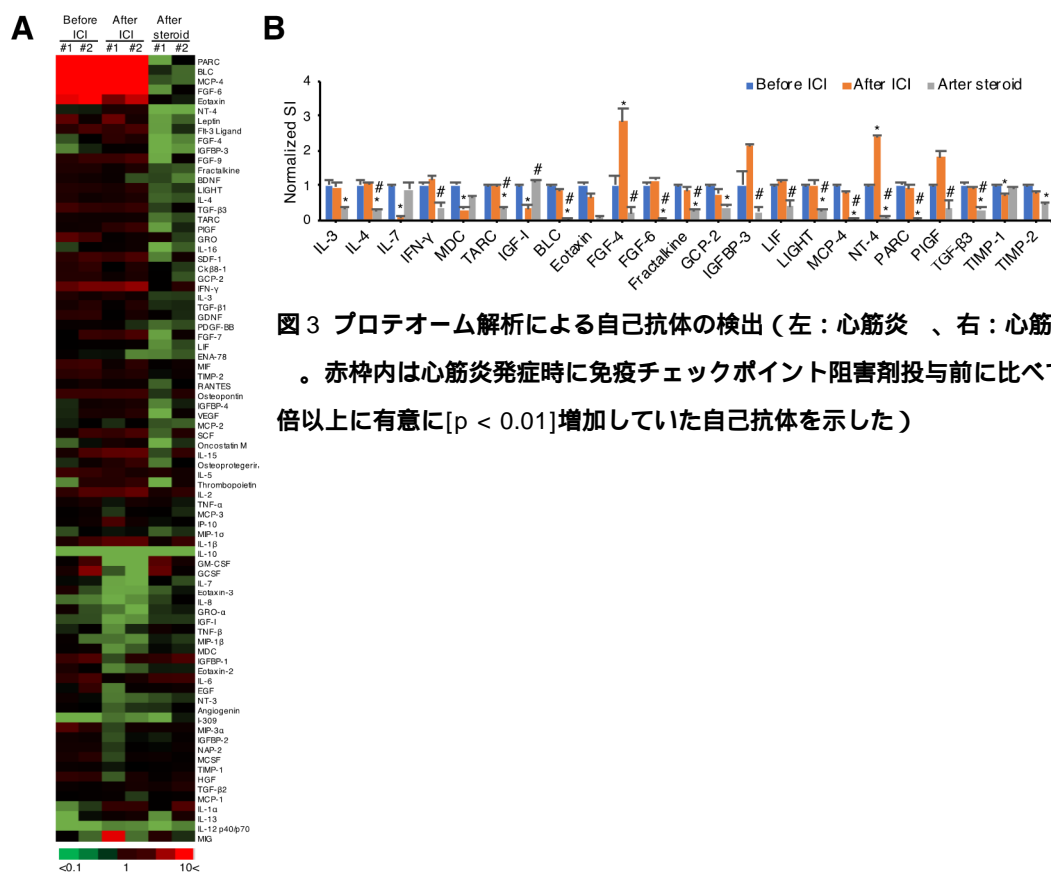


図3 プロテオーム解析による自己抗体の検出（左：心筋炎、右：心筋炎）。赤枠内は心筋炎発症時に免疫チェックポイント阻害剤投与前に比べて4倍以上に有意に[$p < 0.01$]増加していた自己抗体を示した。

本研究で、tropomyosin-4、Na-K ATPase、熱ショック蛋白 60 に対する自己抗体が免疫チェックポイント阻害剤による心筋炎の 2 症例で検出された。Latif ら(2)は、抗 tropomyosin 抗体は拡張型心筋症 (DCM) 患者の 55% に、虚血性心疾患患者の 21% で検出されると報告しているが、その機能は明らかになっていない。Baba ら(3)は DCM 患者 100 症例と年齢を一致させた健常人 100 例の抗 Na-K ATPase 抗体の有無を検討したところ、DCM 患者では 26% に検出されたのに対して、健常人では 2% の陽性率にとどまったと報告している。また本抗体の存在は心室頻拍の独立した予測因子であるとともに、心臓突然死や低心機能の予測因子であることも報告した。心室頻拍のを高頻度に認めることも明らかにした。さらに、抗 Na-K ATPase 抗体陽性患者血清中の IgG は *in vitro* で Na-K ATPase 活性を抑制したことから、本抗体は病態形成に一定の役割を果たしていることが示唆されている。熱ショック蛋白 60 に対する自己抗体は DCM 患者の 85% に、虚血性心疾患患者の 42% で検出されると報告されているが、その病態生理学的な影響は不明である。我々が経験した 2 症例は免疫チェックポイント阻害剤投与前からこのような自己抗体が検出されたことから、免疫チェックポイント阻害剤による心筋炎発症の予測因子として用いることができる可能性が考えられる。しかし、免疫チェックポイント阻害剤投与後の心筋炎発症時に有意な上昇を示さなかったことから、病態への関与は少ないことが示唆される。

免疫チェックポイント阻害剤による心筋炎発症時に有意な上昇を認めた自己抗体は、両症例で共通するものは認めなかった。症例 1 では制御性 T 細胞の分化に有用な IL2-inducible T cell kinase (ITK)(4)や、NF- κ B を介した炎症の活性化を負に制御する蛋白である TAX1 binding protein 1 (TAX1BP1)(5)に対する自己抗体の著明な増加を認め、心筋炎の発症と進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、症例 2 においてはがんの進展に関連する蛋白 (serine-threonine kinase receptor-associated protein (STRAP)(6)、transmembrane protein 106A (TMEM106A)(7)、chaperonin containing TCP1 (T-Complex Protein 1) subunit 5 (CCT5)(8)) に対する自己抗体の著明な上昇を認め、免疫チェックポイント阻害剤による抗腫瘍作用に影響を与えている可能性が示唆された。

免疫チェックポイント阻害剤投与前、心筋炎発症時、ステロイド投与後の血清中のサイトカインプロファイル変化を網羅的に検討したところ、サイトカインプロファイルが大きく変化していることが明らかとなった。これらの液性因子も心筋炎の発症と進展、ならびにステロイド治療効果に影響していた可能性が考えられる。

本研究全体を通しての大きなリミテーションは症例が少ないこと、心筋炎を生じなかった免疫チェックポイント阻害剤使用患者との比較ができていないことが挙げられる。病態解明には今後の研究でこれらの課題を克服することが必要である。

1. Sakai S., Tajiri K., Li S., Ieda M., Hassan M. Fatal cerebral haemorrhagic infarction due to left ventricular thrombus after healing of immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis. *Eur Hear J - Case Reports* 2020. Doi: 10.1093/ehjcr/ytaa126.
2. Latif N., Baker CS., Dunn MJ., Rose ML., Brady P., Yacoub MH. Frequency and specificity of antiheart antibodies in patients with dilated cardiomyopathy detected using SDS-PAGE and western blotting. *J Am Coll Cardiol* 1993;22(5):1378–84.
3. Baba A., Yoshikawa T., Ogawa S. Autoantibodies produced against sarcolemmal Na-K-ATPase: possible upstream targets of arrhythmias and sudden death in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2002;40(6):1153–9.
4. Huang W., Solouki S., Koylass N., Zheng S-G., August A. ITK signalling via the Ras/IRF4 pathway regulates the development and function of Tr1 cells. *Nat Commun* 2017;8(1):15871. Doi: 10.1038/ncomms15871.
5. Shembade N., Pujari R., Harhaj NS., Abbott DW., Harhaj EW. The kinase IKK α inhibits activation of the transcription factor NF- κ B by phosphorylating the regulatory molecule TAX1BP1. *Nat Immunol* 2011;12(9):834–43. Doi: 10.1038/ni.2066.
6. Yuan G., Zhang B., Yang S., et al. Novel role of STRAP in progression and metastasis of colorectal cancer through Wnt/ β -catenin signaling. *Oncotarget* 2016;7(13):16023–37. Doi: 10.18632/oncotarget.7532.
7. Liu J., Zhu H. TMEM106A inhibits cell proliferation, migration, and induces apoptosis of lung cancer cells. *J Cell Biochem* 2019;120(5):7825–33. Doi: 10.1002/jcb.28057.
8. Gao H., Zheng M., Sun S., et al. Chaperonin containing TCP1 subunit 5 is a tumor associated antigen of non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2017;8(38):64170–9. Doi: 10.18632/oncotarget.19369.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tajiri Kazuko, Sekine Ikuo	4. 巻 52
2. 論文標題 Atherosclerotic cardiovascular events associated with immune checkpoint inhibitors in cancer patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 659 ~ 664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyac041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tajiri Kazuko, Yonebayashi Saori, Li Siqi, Ieda Masaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Immunomodulatory Role of Tenascin-C in Myocarditis and Inflammatory Cardiomyopathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.624703	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ogura Yukino, Tajiri Kazuko, Murakoshi Nobuyuki, Xu DongZhu, Yonebayashi Saori, Li Siqi, Okabe Yuta, Feng Duo, Shimoda Yuzuno, Song Zoughu, Mori Haruka, Yuan Zixun, Aonuma Kazutaka, Ieda Masaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Neutrophil Elastase Deficiency Ameliorates Myocardial Injury Post Myocardial Infarction in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 722 ~ 722
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22020722	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Li Siqi, Tajiri Kazuko, Murakoshi Nobuyuki, Xu DongZhu, Yonebayashi Saori, Okabe Yuta, Yuan Zixun, Feng Duo, Inoue Keiko, Aonuma Kazuhiro, Shimoda Yuzuno, Song Zoughu, Mori Haruka, Huang Honglan, Aonuma Kazutaka, Ieda Masaki	4. 巻 22
2. 論文標題 Programmed Death-Ligand 2 Deficiency Exacerbates Experimental Autoimmune Myocarditis in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1426 ~ 1426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22031426	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Maruta Shunsuke, Usami Kyohei, Tajiri Kazuko, Otani Masafumi, Hiraya Daigo, Watabe Hiroaki, Hoshi Tomoya, Sato Akira, Ieda Masaki	4. 巻 7
2. 論文標題 Vasospastic angina in a chronic myeloid leukemia patient treated with nilotinib	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cardio-Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40959-021-00119-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tajiri Kazuko, Sekine Ikuo, Naito Hiroyuki, Murata Momoko, Li Siqi, Inoue Keiko, Sasamura Rumi, Nakajima Hideki, Iida Noriko, Nagashio Kenji, Honda Junya, Murakoshi Nobuyuki, Ishizu Tomoko, Ieda Masaki	4. 巻 50
2. 論文標題 Cardiology consultation in oncology practice: a 5-year survey	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1419 ~ 1425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yonebayashi Saori, Tajiri Kazuko, Murakoshi Nobuyuki, Xu Dongzhu, Li Siqi, Feng Duo, Okabe Yuta, Yuan Zixun, Song Zonghu, Aonuma Kazuhiro, Shibuya Akira, Aonuma Kazutaka, Ieda Masaki	4. 巻 24
2. 論文標題 MAIR II deficiency ameliorates cardiac remodelling post myocardial infarction by suppressing TLR9 mediated macrophage activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 14481 ~ 14490
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.16070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tajiri Kazuko, Imanaka-Yoshida Kyoko, Tsujimura Yusuke, Matsuo Kazuhiro, Hiroe Michiaki, Aonuma Kazutaka, Ieda Masaki, Yasutomi Yasuhiro	4. 巻 22
2. 論文標題 A New Mouse Model of Chronic Myocarditis Induced by Recombinant Bacille Calmette-Guérin Expressing a T-Cell Epitope of Cardiac Myosin Heavy Chain-	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 794 ~ 794
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22020794	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田尻和子.
2. 発表標題 心臓自己免疫の制御メカニズム
3. 学会等名 CVMW2020（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田尻和子, Siqi Li, 村越伸行, 家田真樹
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害剤心臓障害から学ぶ心筋炎・心筋症発症メカニズム
3. 学会等名 第6回日本心筋症研究会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	吉田 恭子 (今中恭子)	三重大学・医学系研究科・教授	
	(Imanaka-Yoshida Kyoko)		
	(00242967)	(14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------