

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B1)

(11) 特許番号

特許第6664684号
(P6664684)

(45) 発行日 令和2年3月13日(2020.3.13)

(24) 登録日 令和2年2月21日(2020.2.21)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
	A 6 1 K 39/395 T

請求項の数 20 (全 94 頁)

(21) 出願番号	特願2019-526634 (P2019-526634)	(73) 特許権者	504013775
(86) (22) 出願日	平成30年2月6日(2018.2.6)		学校法人 埼玉医科大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2018/004090		埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38
(87) 国際公開番号	W02018/147291	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成30年8月16日(2018.8.16)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	令和1年5月17日(2019.5.17)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	特願2017-20685 (P2017-20685)		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成29年2月7日(2017.2.7)	(74) 代理人	100143638
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		弁理士 長谷部 真久
(31) 優先権主張番号	特願2017-110069 (P2017-110069)	(74) 代理人	100181674
(32) 優先日	平成29年6月2日(2017.6.2)		弁理士 飯田 貴敏
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)	(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74) 代理人	230113332
			弁護士 山本 健策
早期審査対象出願			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 がん免疫療法の臨床効果を予測する免疫学的バイオマーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

被験体の $CD62L^{low}CD4^+T$ 細胞の量 (X) の、 $Foxp3^+CD25^+CD4^+T$ 細胞の量 (Y) に対する相対値を、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標として用いる方法であって、

該 X を測定する工程と、

該 Y を測定する工程と

を含み、該がん免疫療法は免疫チェックポイント阻害剤の投与を含み、該免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1阻害剤およびPD-L1阻害剤からなる群から選択される阻害剤を含み、XのYに対する相対値と無効群閾値との比較を、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群であるか否かを予測するための指標として用いる、方法。

【請求項2】

前記相対値が、 X/Y である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記相対値が、 X^2/Y である、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記無効群ではないことが予測された被験体における、

$CD4^+T$ 細胞における $Foxp3^+CD25^+CD4^+T$ 細胞亜集団の割合、

$CD62L^{low}CD4^+T$ 細胞における $ICOS^+CD62L^{low}CD4^+T$ 細胞亜集団の割合、

CD62L^{low}CD4⁺T細胞におけるLAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、または

CD62L^{low}CD4⁺T細胞におけるPD-1⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合

を、該被験体のがん免疫療法に対する応答の指標としてさらに用いる請求項1~3のいずれか1項に記載の方法であって、

該CD4⁺T細胞における該Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
該CD62L^{low}CD4⁺T細胞における該ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、

該CD62L^{low}CD4⁺T細胞における該LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、または

該CD62L^{low}CD4⁺T細胞における該PD-1⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合

が奏効群閾値よりも高いことは、該被験体が奏効群であることを示す、方法。

【請求項5】

前記無効群閾値が、無効群の検出についての感度および特異度を考慮して決定される、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記無効群閾値が、無効群の検出について感度が約90%超となるように決定される、請求項1~5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記無効群閾値が、無効群の検出について特異度が約90%超となるように決定される、請求項1~5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記細胞の量を、末梢血サンプルを用いて測定することを特徴とする、請求項1~7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記PD-1阻害剤は、PD-1とPD-L1との相互作用を阻害する抗PD-1抗体である、請求項1~8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記PD-L1阻害剤は、PD-1とPD-L1との相互作用を阻害する抗PD-L1抗体である、請求項1~8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項11】

前記PD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤は、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、デュルバルマブ、アテゾリズマブまたはアベルマブを含む、請求項1~8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

前記相対値が前記無効群閾値以上であることが、前記被験体が前記がん免疫療法に対して無効群ではないことを示す、請求項1~11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

前記XがCD4⁺T細胞集団におけるCD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合であり、前記YがCD4⁺T細胞集団におけるFoxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合である、請求項1~12のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

CD4に対する検出剤、CD25に対する検出剤、CD62Lに対する検出剤およびFoxp3に対する検出剤を含む、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するためのキットであって、該予測は、CD62L^{low}CD4⁺T細胞の量(X)の、Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞の量(Y)に対する相対値と、無効群閾値との比較を、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群であるか否かの指標として用いることによって行われ、該がん免疫療法は、免疫チェックポイント阻害剤の投与を含み、該免疫チェックポイン

10

20

30

40

50

ト阻害剤は、PD - 1 阻害剤およびPD - L 1 阻害剤からなる群から選択される阻害剤を含む、キット。

【請求項 15】

前記検出剤が抗体である、請求項 14 に記載のキット。

【請求項 16】

被験体においてがんを治療するための、免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物であって、該被験体は、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法によって無効群でないと予測された被験体であることを特徴とし、該免疫チェックポイント阻害剤が、PD - 1 阻害剤およびPD - L 1 阻害剤からなる群から選択される阻害剤を含む、組成物。

【請求項 17】

前記被験体由来のサンプル中の

CD4⁺T細胞におけるFoxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
CD62L^{low}CD4⁺T細胞におけるICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞
亜集団の割合、

CD62L^{low}CD4⁺T細胞におけるLAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞
亜集団の割合、または

CD62L^{low}CD4⁺T細胞におけるPD-1⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞
亜集団の割合

が奏効群閾値以上であることを特徴とする、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 18】

前記PD - 1 阻害剤は、PD - 1 とPD - L 1 との相互作用を阻害する抗PD - 1 抗体である、請求項 16 または 17 に記載の組成物。

【請求項 19】

前記PD - L 1 阻害剤は、PD - 1 とPD - L 1 との相互作用を阻害する抗PD - L 1 抗体である、請求項 16 または 17 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記PD - 1 阻害剤またはPD - L 1 阻害剤が、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、デュルバルマブ、アテゾリズマブまたはアベルマブである、請求項 16 または 17 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、がん免疫療法の分野に関する。より詳細には、被験体のT細胞組成に基づく被験体のがん免疫療法に対する応答性の予測、およびその予測に基づくがん免疫療法を用いた治療の方法に関する。別の局面では、本発明は、被験体のがん免疫療法に対する応答性を改善または維持するための方法を提供する。

【背景技術】

【0002】

がん免疫療法は、がん細胞の代謝等を標的とする従来の抗がん治療（アルキル化剤、白金製剤、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害剤、微小管重合阻害剤、微小管脱重合阻害剤等）と比較し、副作用が少なく大きな効果を示すとして近年注目を集めている。がん免疫療法の中でも、抗PD - 1 免疫チェックポイント阻害は特に大きな関心を寄せられている治療である。

【0003】

抗PD - 1 抗体であるNivolumabは非小細胞肺癌の2次治療として従来の標準治療であったドセタキセルに対して全生存期間で大きな差をつけて勝利し、肺癌学会ガイドラインでも推奨度Aの標準治療となった（Brahmer J, et al. N Engl J Med 2015; 373: 123 - 135）。同じ抗PD - 1 抗体であるPembrolizumabは初回治療において従来の標準治療であった細胞傷害性抗がん剤に対して全生存期間で勝利している（ただし、腫瘍細胞上PD - L1 50%

10

20

30

40

50

以上発現の患者において)。今後、非小細胞肺癌標準治療となることが決定されている。

【0004】

抗PD-1抗体の効果は肺癌に留まらず腎がん、頭頸部癌、消化器癌、婦人科癌、悪性リンパ腫、乳癌でも証明されつつある。日本でも腎がんに対する保険適応となり、来年には頭頸部癌、消化器癌、悪性リンパ腫で適応となることが予想されている。

【0005】

臨床的に極めて大きな成功を収めているように見える抗PD-1抗体であるが、実は大きな問題点をはらんでいる。無増悪生存期間(PFS)のデータからは、ほぼ全ての抗PD-1抗体臨床試験において3ヶ月以内に病勢増悪する「無効群」が認められる。一方、1年以上有効であった群は、それ以降ほとんど病勢増悪が認められず、治癒に近い状態を得ていることがわかる。これは、臨床効果において「無効群」「著効群」「中間群」というような3つの異なったサブグループが存在することを示唆しているが、これを予測するバイオマーカーは知られていない。ほぼ全ての癌腫における標準治療となる事が予想される抗PD-1抗体を約40%を占める無効群に投与することは、医学的のみならず医療経済の点からも問題となる。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Brahmer J, et al. N Engl J Med 2015; 373: 123-135

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、被験体のCD4⁺T細胞の組成を、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標として用いる方法を提供する。本発明はまた、被験体の樹状細胞および/またはCD8⁺T細胞の組成を、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標として用いる方法を提供する。本発明は、がん免疫療法に対する応答性が被験体におけるT細胞および/または樹状細胞の組成と関連しており、バイオマーカーとして使用可能であるという本発明者らの発見に基づいてなされたものである。本発明のバイオマーカーは感度、特異度とも極めて高く、従来検討されてきたバイオマーカーを大きく凌駕している。

30

【0008】

本発明者らは、がん免疫療法(例えば、抗PD-1治療または抗PD-L1治療)に対する治療効果が進行(PD)、安定(SD)、奏効(完全奏効(CR)+部分奏効(PR))となる三群が、それぞれ異なる免疫状態を呈することを見出した。これにより、本発明の一部の実施形態では、被験体のがん免疫療法を行った場合、そのがん免疫療法に対する応答が、進行(PD)、安定(SD)または奏効(完全奏効(CR)+部分奏効(PR))のいずれかであることを予想する方法が提供される。なお、本発明においては、被験体の集団が部分奏効群(PR)に加えて完全奏効群(CR)を含む場合であっても、あるいは部分奏効群(PR)を含まずに完全奏効群(CR)を含む場合であっても、部分奏効群(PR)と同様であるとして検出され得る。

40

【0009】

本発明の1つの実施形態は、抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の相対量を、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標として用いる方法である。抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団としては、例えば、二次リンパ臓器へのホーミング分子の発現が低下したCD4⁺T細胞亜集団、エフェクター型T細胞にプライミングされたCD4⁺T細胞亜集団、および、抗原認識によるプライミングを受けたCD4⁺T細胞亜集団、制御性T細胞亜集団が挙げられるがこれらに限定されない。限定されることはないが、例えば、CD4⁺T細胞亜集団の相対量は、以下：

50

$CD4^+$ T細胞中の $CD62L^{low}$ $CD4^+$ T細胞亜集団の割合、
 $CD4^+$ T細胞中の $CCR7^-$ $CD4^+$ T細胞亜集団の割合、
 $CD4^+$ T細胞中の $CD45RA^-$ $CD4^+$ T細胞亜集団の割合、
 $CD4^+$ T細胞中の $CD45RO^+$ $CD4^+$ T細胞亜集団の割合、
 $CD62L^{low}$ $CD4^+$ T細胞中の $LAG-3^+$ $CD62L^{low}$ $CD4^+$ T細胞亜
 集団の割合、
 $CD62L^{low}$ $CD4^+$ T細胞中の $ICOS^+$ $CD62L^{low}$ $CD4^+$ T細胞亜集
 団の割合、
 $CD4^+$ T細胞中の $CD62L^{high}$ $CD25^+$ $CD4^+$ T細胞亜集団の割合、
 $CD4^+$ T細胞中の $CCR4^+$ $CD25^+$ $CD4^+$ T細胞亜集団の割合、
 $CD4^+$ T細胞中の $CD127^+$ $CD25^+$ $CD4^+$ T細胞亜集団の割合、および、
 $CD4^+$ T細胞中の $Foxp3^+$ $CD25^+$ $CD4^+$ T細胞亜集団の割合、
 からなる群から選択されるがこれらに限定されない。本発明は、例えば、被験体の $CD4^+$
 $+$ T細胞における $CD62L^{low}$ T細胞の割合を、該被験体のがん免疫療法に対する応
 答を予測するための指標として用いる方法を提供する。1つの実施形態において、方法は
 、被験体由来のサンプル中の、 $CD4^+$ T細胞における $CD62L^{low}$ T細胞の割合を
 決定する工程を含む。該割合が閾値（無効群閾値）よりも高いことは、該被験体が該がん
 免疫療法に対して無効群でないことを示し得る。

10

【0010】

本発明の別の実施形態は、抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜
 集団の相対量を、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標として用い
 る方法である。抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団としては
 、例えば、 $CD4^+$ T細胞集団におけるホーミング分子の発現が低下した細胞亜集団の増
 加に起因して増加する樹状細胞亜集団、 $CD4^+$ T細胞集団におけるエフェクター型T細
 胞にプライミングされた $CD4^+$ T細胞亜集団の増加に起因して増加する樹状細胞亜集団
 、および、 $CD4^+$ T細胞集団における抗原認識によるプライミングを受けた $CD4^+$ T
 細胞亜集団の増加に起因して増加する樹状細胞亜集団が挙げられるがこれらに限定されな
 い。また、樹状細胞亜集団としては、例えば、 $HLA-DR^+$ 樹状細胞亜集団、 $CD80^+$
 $+$ 樹状細胞亜集団、 $CD86^+$ 樹状細胞亜集団、および $PD-L1^+$ 樹状細胞亜集団が挙げ
 られるがこれらに限定されない。樹状細胞としては、例えば、骨髄樹状細胞（mDC、
 $CD141^+$ $CD11c^+$ 樹状細胞）および形質細胞様樹状細胞（pDC、 $CD123^+$
 $CD11c^+$ 樹状細胞）が挙げられるがこれらに限定されない。

20

30

【0011】

本発明の別の実施形態は、抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関する $CD8^+$ T
 細胞亜集団の相対量を、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標とし
 て用いる方法である。抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関する $CD8^+$ T細胞亜
 集団としては、例えば、 $CD4^+$ T細胞集団におけるホーミング分子の発現が低下した細
 胞亜集団の増加に起因して増加する $CD8^+$ T細胞亜集団、 $CD4^+$ T細胞集団における
 エフェクター型T細胞にプライミングされた $CD4^+$ T細胞亜集団の増加に起因して増加
 する $CD8^+$ T細胞亜集団、 $CD4^+$ T細胞集団における抗原認識によるプライミングを
 受けた $CD4^+$ T細胞亜集団の増加に起因して増加する $CD8^+$ T細胞亜集団、樹状細胞
 集団における $HLA-DR^+$ 樹状細胞亜集団の増加に起因して増加する $CD8^+$ T細胞亜
 集団、樹状細胞集団における $CD80^+$ 樹状細胞亜集団の増加に起因して増加する $CD8^+$
 $+$ T細胞亜集団、樹状細胞集団における $PD-L1^+$ 樹状細胞亜集団の増加に起因して増
 加する $CD8^+$ T細胞亜集団が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、抗腫瘍免疫
 応答における樹状細胞刺激と相関する $CD8^+$ T細胞亜集団としては、例えば、 $CD62L^{low}$
 $CD8^+$ T細胞亜集団、 $CD137^+$ $CD8^+$ T細胞亜集団、および $CD28^+$ $CD62L^{low}$
 $CD8^+$ T細胞亜集団が挙げられるがこれに限定されない。

40

【0012】

本発明の1つの実施形態は、被験体における以下：

50

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、
抗腫瘍免疫応答でのCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の
量、

抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の量、
制御性T細胞亜集団の量または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、
および

ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
から選択される量を、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数（指標）
として用いる方法である。1つの実施形態において、本発明の変数（X、Y）は、それぞ
れ、以下：

CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
CCR7⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
CD45RA⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
CD45RO⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
CCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
CD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
CD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
CD45RA⁺Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
HLA-DR⁺樹状細胞亜集団の量、
CD80⁺樹状細胞亜集団の量、
CD86⁺樹状細胞亜集団の量、
PD-L1⁺樹状細胞亜集団の量、
CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量、
CD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の量、および
CD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量

からなる群から選択される。

【0013】

例えば、本発明の方法では、

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、
抗腫瘍免疫応答でのCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の
量、および、

抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の量、
からなる群から選択される値を（X）とすることができる。本発明の方法ではまた、

CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
CCR7⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
CD45RA⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
CD45RO⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
HLA-DR⁺樹状細胞亜集団の量、
CD80⁺樹状細胞亜集団の量、
CD86⁺樹状細胞亜集団の量、
PD-L1⁺樹状細胞亜集団の量、
CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量、
CD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の量、および
CD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量

からなる群から選択される値を（X）として、変数（X、Y）を計算することができる。

10

20

30

40

50

【0014】

例えば、本発明の方法では、制御性T細胞亜集団の量または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量を(Y)として、変数(X、Y)を計算することができる。本発明の方法ではまた、

CCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
 CD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
 CD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
 CD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、および
 CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団の量、

からなる群から選択される値を(Y)として、変数(X、Y)を計算することができる。

10

【0015】

本発明の方法では、例えば、CD4⁺CD62L^{low}T細胞の量(X)を測定する工程と、CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺T細胞の量(Y)を測定する工程とを含む、XのYに対する相対値と閾値(無効群閾値)との比較を、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを予測するための指標として用いることができる。(Y)としては、制御性T細胞亜集団の量、または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量ないし割合を使用することができる。特に、CD62L^{low}CD4⁺T細胞/制御性T細胞比をバイオマーカーとして検討した報告は今までになされていないが、本発明者らによって、がん免疫療法に対する応答性の予測のためのバイオマーカーとして非常に有用であることが見出された。

20

本発明ではまた、CD80⁺樹状細胞亜集団の量(X)を測定する工程と、CD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量(Y)を測定する工程とを含む、XのYに対する相対値と閾値(無効群閾値)との比較を、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを予測するための指標として用いることができる。

【0016】

本発明者らによって、複数の指標が独立に応答性との相関を示していることが見出されているため、複数の指標を組み合わせて、応答性の指標として用いることが可能である。2つ以上の指標を組み合わせて、応答性の指標とする場合には、任意の数の変数を用いた式によって表される指標を用いることができる。複数の指標(X₁、X₂、X₃・・・X_n)を用いる場合、応答性の指標としては、例えば、以下が挙げられるがそれに限定されるものではない：

$$F = a_1 X_1^{b_1} + a_2 X_2^{b_2} + a_3 X_3^{b_3} \dots + a_n X_n^{b_n}$$

$$F = X_1^{c_1} * X_2^{c_2} * X_3^{c_3} \dots * X_n^{c_n}$$

(式中、各a、b、cは任意の実数である)。このような式によって計算される値(指標)と閾値とを比較した大小から、応答性の予測が可能である。本発明者らによって見出された、新規な指標について、判別分析による多変量解析(例えば、ロジスティクス回帰による推定)を行うことによって各係数を決定し、被験体のがん免疫療法への応答性の指標として用いることができる。

30

【0017】

代表的には、本明細書に記載される2つの指標(X、Y)を変数とした式F(X、Y)によって、応答性を予測することが可能であり、特定の実施形態において、式は、XのYに対する相対値である。

40

【0018】

XのYに対する相対値としては、XとYについての任意の関数(F(X、Y))を用いることができる。特に、Xが応答性と正に相関し、Yが応答性と負に相関していると考えられる場合、限定されるものではないが、Xに対して単調増加であり、Yに対して単調減少である、任意のXとYの関数(F(X、Y))を用いることができる。応答性を示す式は、応答性を表す2以上の変数が与えられた場合、それぞれの変数の応答性への寄与を計算することによって、回帰的に求めることが可能である。

【0019】

50

応答性を示す式 $F(X, Y)$ としては、例えば、以下が挙げられるがそれに限定されるものではない：

$$F = aX^r + bY^s$$

$$F = X^r * Y^s$$

(式中、 a 、 b 、 r 、 s は任意の実数である)。

【0020】

r 、 s としては、式の簡便性のため、整数を用いることができる。一部の実施形態では、 X の Y に対する相対値の例としては、 X^n / Y^m (n および m は任意の実数、例えば任意の整数) が挙げられ、例えば、 X / Y 、 X^2 / Y が挙げられるが、これに限定されるものではない。 X 、 Y の因子がそれぞれ異なる機序から治療に対する応答性を示している場合、このように指標を組み合わせることは、応答性の予測をより正確なものとする事ができる。本発明者らによる検証によって、 r および s が $-5 \sim 5$ の範囲の式を用いて、被験体のがん免疫療法への応答性を正確に予測することができたことが示された。

10

【0021】

本発明の別の局面では、被験体の $CD4^+$ T細胞の組成を、がん免疫療法に対する応答の指標として用いることで、無効群ではないことが示された被験体の中からさらに奏効群(完全奏効(CR) + 部分奏効(PR))である被験体を予測する方法が提供される。

【0022】

本発明の1つの実施形態は、無効群ではないことが示された被験体の $CD4^+$ T細胞における $Foxp3^+ CD25^+$ T細胞の割合、 $CD62L^{low} CD4^+$ T細胞における $ICOS^+ CD62L^{low} CD4^+$ T細胞亜集団の割合、 $CD62L^{low} CD4^+$ T細胞における $LAG-3^+ CD62L^{low} CD4^+$ T細胞亜集団の割合、または $CD62L^{low} CD4^+$ T細胞における $PD-1^+ CD62L^{low} CD4^+$ T細胞亜集団の割合を、該被験体のがん免疫療法に対する応答の指標として用いる方法である。 $CD4^+$ T細胞における $Foxp3^+ CD25^+$ T細胞の割合、 $CD62L^{low} CD4^+$ T細胞における $ICOS^+ CD62L^{low} CD4^+$ T細胞亜集団の割合、 $CD62L^{low} CD4^+$ T細胞における $LAG-3^+ CD62L^{low} CD4^+$ T細胞亜集団の割合、または $CD62L^{low} CD4^+$ T細胞における $PD-1^+ CD62L^{low} CD4^+$ T細胞亜集団の割合が閾値(奏効群閾値)よりも高いことは、該被験体が奏効群であることを示し得る。被験体が奏効群であるか否かを決定するためには、被験体が無効群ではないことを決定する必要があるが、そのような無効群か否かの決定は、本明細書において記載される方法によって示すことができる。

20

30

【0023】

本発明の別の実施例では、上記の(X 、 Y)を用いて無効群でない判定された被験体集団において、奏効群(PR)と安定群(SD)とを識別する方法を提供する。奏効群(PR)と安定群(SD)とを識別する方法においては、

$ICOS^+ CD62L^{low} CD4^+$ T細胞亜集団の量を(Z)として

$CD4^+ CD25^+$ T細胞亜集団の量

$CD4^+ Foxp3^+$ T細胞亜集団の量

$CD4^+ Foxp3^+ CD25^+$ T細胞亜集団の量

$CD62L^{high} CD25^+ CD4^+$ T細胞亜集団の量、

$CD45RA^+ Foxp3^+ CD4^+$ T細胞亜集団の量、

$CCR4^+ CD25^+ CD4^+$ T細胞亜集団の量、

$CD127^+ CD25^+ CD4^+$ T細胞亜集団の量、

からなる群から選択される値を(W)として、変数(Z 、 W)を計算し、被験体が奏効群(PR)であるか、または、安定群(SD)であるかを予測することができる。代表的には、奏効群(PR)と安定群(SD)とを識別する方法においては、 $ICOS^+ CD62L^{low} CD4^+$ T細胞亜集団の量を(Z)とし、 $CD4^+ Foxp3^+ CD25^+$ T細胞亜集団の量を(W)とし、 $W^5 * Z$ の数値を指標として、奏効群(PR)と安定群(S

40

50

D)とを判定することが可能である。

【0024】

閾値は、感度および特異度を考慮して決定することができる。感度および特異度は、無効群の検出、奏効群の検出、または安定群の検出についての感度および特異度であり得る。1つの実施形態において、本発明のバイオマーカーは、感度、特異度とも100%となる閾値を設定することができる。そのため、極めて正確に無効症例を選択することが可能であり、大きな技術的優位性を有している。本発明のバイオマーカーとして記載される指標の2つ以上を用いる場合、それらの指標についてそれぞれ閾値を定めることができ、必要な場合には、第1の閾値、第2の閾値、第3の閾値、第4の閾値のようにして区別して用いることができる。

10

【0025】

閾値は、無効群の検出、奏効群の検出、または安定群の検出について感度が約90%超となるように決定され得る。別の実施形態では、閾値が、無効群の検出、奏効群の検出、または安定群の検出について感度が約100%となるように決定され得る。さらに別の実施形態では、閾値は、無効群の検出、奏効群の検出、または安定群の検出について特異度が約90%超となるように決定され得る。さらに別の実施形態では、閾値は、無効群の検出、奏効群の検出、または安定群の検出について特異度が約100%となるように決定され得る。

【0026】

1つの実施形態では、被験体のT細胞の組成は、被験体から得られたサンプル中のT細胞の組成であり、好ましくは、サンプルは、末梢血サンプルである。本発明において提供されるバイオマーカーは、末梢血サンプルを使用して測定することができるものであるため、非侵襲的、安価で経時的に施行可能という、臨床応用における大きな優位性を有している。

20

【0027】

1つの実施形態では、がん免疫療法は、免疫チェックポイント阻害剤の投与を含む。本発明のバイオマーカーは、特に、このようながん免疫療法に対する被験体の応答を非常に正確に予測することができる。

【0028】

1つの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤を含む。PD-1阻害剤としては、PD-1とPD-L1の相互作用（例えば、結合）を阻害する抗PD-1抗体、例えば、ニボルマブ、ペムプロリズマブなどの抗PD-1抗体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。PD-L1阻害剤としては、PD-1とPD-L1の相互作用（例えば、結合）を阻害する抗PD-L1抗体、例えば、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマブなどの抗PD-L1抗体が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

30

【0029】

本発明のさらなる局面は、被験体のT細胞の組成を用いて被験体のがん免疫療法に対する応答を予測し、がんを有する被験体を治療する方法を提供する。あるいは、特定のT細胞の組成を有する被験体において、がんを治療する方法、またはそのための組成物を提供する。がん免疫療法、特に免疫チェックポイント阻害療法は、被験体ごとの応答性の差が大きいことが知られており、本発明のバイオマーカーによって被験体を選択してがん免疫療法を施すことは、腫瘍縮小などの治療効果が奏される確率を顕著に高めることができる。

40

【0030】

本発明の1つの実施形態において、がんを有する被験体を治療する方法であって、

(1) 該被験体由来のサンプル中のCD4⁺T細胞における、以下：

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の相対量

抗腫瘍免疫応答におけるCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の相対量、および

50

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の相対量からなる群から選択される相対量を決定する工程と、

(2) 該相対量が閾値(無効群閾値)よりも高い場合に、該被験体が、がん免疫療法に対する応答について無効群でないと判定する工程と、該被験体が無効群でないと判定された場合に、該被験体に該がん免疫療法を施す工程とを含む、方法が提供される。

本発明の別の実施形態において、がんを有する被験体を治療する方法であって、該被験体由来のサンプル中のCD4⁺T細胞における、以下：

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の相対量

抗腫瘍免疫応答におけるCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の相対量、および

10

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の相対量からなる群から選択される相対量を決定する工程によって、該相対量が閾値(無効群閾値)よりも高く、がん免疫療法に対する応答について無効群でないと判定された被験体に、該がん免疫療法を施す工程を含む、方法が提供される。

ここで、前記相対量は、以下：

CD4⁺T細胞中のCD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCCR7⁻CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCD45RA⁻CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCD45RO⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD62L^{low}CD4⁺T細胞中のLAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、

20

CD62L^{low}CD4⁺T細胞中のICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のFoxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、

樹状細胞におけるHLA-DR⁺樹状細胞亜集団の割合、

樹状細胞におけるCD80⁺樹状細胞亜集団の割合、

樹状細胞におけるCD86⁺樹状細胞亜集団の割合、

樹状細胞におけるPD-L1⁺樹状細胞亜集団の割合

CD8⁺T細胞中のCD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の割合、

CD8⁺T細胞中のCD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の割合、および

CD62L^{low}CD8⁺T細胞中のCD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の割合

30

からなる群から選択される。

【0031】

好ましくは、前記相対量は、以下：

CD4⁺T細胞中のCD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCCR7⁻CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCD45RA⁻CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCD45RO⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD62L^{low}CD4⁺T細胞中のLAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、

40

CD62L^{low}CD4⁺T細胞中のICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、

樹状細胞におけるHLA-DR⁺樹状細胞亜集団の割合、

樹状細胞におけるCD80⁺樹状細胞亜集団の割合、

樹状細胞におけるCD86⁺樹状細胞亜集団の割合、

50

樹状細胞における $PD-L1^+$ 樹状細胞亜集団の割合
 $CD8^+$ T細胞中の $CD62L^{low}$ $CD8^+$ T細胞亜集団の割合、
 $CD8^+$ T細胞中の $CD137^+$ $CD8^+$ T細胞亜集団の割合、および
 $CD62L^{low}$ $CD8^+$ T細胞中の $CD28^+$ $CD62L^{low}$ $CD8^+$ T細胞亜集
 団の割合
 からなる群から選択される。

【0032】

本発明の別の実施形態において、がんを有する被験体を治療する方法であって、該被験体由来のサンプル中の、 $CD4^+$ T細胞における $Foxp3^+$ $CD25^+$ T細胞の割合を決定する工程と、 $CD4^+$ T細胞における $Foxp3^+$ $CD25^+$ T細胞の割合が閾値（無効群閾値）よりも低い場合に、該被験体が、がん免疫療法に対する応答について無効群でないとは判定する工程と、該被験体が無効群でないとは判定された場合に、該被験体に該がん免疫療法を施す工程とを含む、方法が提供される。本発明の別の実施形態において、がんを有する被験体を治療する方法であって、該被験体由来のサンプル中の、 $CD4^+$ T細胞における $Foxp3^+$ $CD25^+$ T細胞の割合を決定する工程、および、 $CD4^+$ T細胞における $Foxp3^+$ $CD25^+$ T細胞の割合が閾値（無効群閾値）よりも低い場合に、該被験体が、がん免疫療法に対する応答について無効群でないとは判定する工程によって、無効群でないとは判定された該被験体に、該がん免疫療法を施す工程を含む、方法が提供される。

【0033】

本発明の別の実施形態において、がんを有する被験体を治療する方法であって、
 (1) 以下：
 抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関する $CD4^+$ T細胞亜集団の相対量
 抗腫瘍免疫応答における $CD4^+$ T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の相対量、および
 抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関する $CD8^+$ T細胞亜集団の相対量
 制御性T細胞または制御性T細胞と相関する $CD4^+$ T細胞亜集団の量、および
 $ICOS^+$ $CD62L^{low}$ $CD4^+$ T細胞亜集団の量、
 からなる群から選択される量 (X, Y) を決定する工程と、
 (2)
 XのYに対する相対値と閾値（無効群閾値）との比較を用いて該被験体のがん免疫療法に対する応答について無効群であるかどうかを判定する工程と、
 (3)
 該被験体が無効群でないとは判定された場合に、該被験体に該がん免疫療法を施す工程とを含む、方法が提供される。

本発明の別の実施形態において、がんを有する被験体を治療する方法であって、
 (1) 以下：
 抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関する $CD4^+$ T細胞亜集団の相対量
 抗腫瘍免疫応答における $CD4^+$ T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の相対量、および
 抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関する $CD8^+$ T細胞亜集団の相対量
 制御性T細胞または制御性T細胞と相関する $CD4^+$ T細胞亜集団の量、および
 $ICOS^+$ $CD62L^{low}$ $CD4^+$ T細胞亜集団の量、
 からなる群から選択される量 (X, Y) を決定する工程と、
 (2)
 XのYに対する相対値と閾値（無効群閾値）との比較を用いて該被験体のがん免疫療法に対する応答について無効群であるかどうかを判定する工程と、
 によって無効群でないとは判定された該被験体に、該がん免疫療法を施す工程を含む、方法が提供される。

例えば、前記量 (X) および (Y) が、以下：

$CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 $CCR7^{-}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 $LAG-3^{+}CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 $CD45RA^{-}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 $CD45RO^{+}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 $HLA-DR^{+}$ 樹状細胞亜集団の量、
 $CD80^{+}$ 樹状細胞亜集団の量、
 $CD86^{+}$ 樹状細胞亜集団の量、
 $PD-L1^{+}$ 樹状細胞亜集団の量、
 $CD137^{+}CD8^{+}T$ 細胞亜集団の量、 10
 $CD62L^{low}CD8^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 $CD28^{+}CD62L^{low}CD8^{+}T$ 細胞亜集団の量
 $Foxp3^{+}CD25^{+}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 $CD62L^{high}CD25^{+}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 $CD45RA^{-}Foxp3^{+}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 $CCR4^{+}CD25^{+}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、および、
 $CD127^{+}CD25^{+}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 からなる群から選択される。

【0034】

例えば、本発明の方法では、 20
 抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関する $CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 抗腫瘍免疫応答での $CD4^{+}T$ 細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の
 量、および、
 抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する $CD8^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 からなる群から選択される値を(X)とすることができる。本発明の方法ではまた、
 $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 $CCR7^{-}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 $LAG-3^{+}CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 $ICOS^{+}CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 $CD45RA^{-}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、 30
 $CD45RO^{+}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 $HLA-DR^{+}$ 樹状細胞亜集団の量、
 $CD80^{+}$ 樹状細胞亜集団の量、
 $CD86^{+}$ 樹状細胞亜集団の量、
 $PD-L1^{+}$ 樹状細胞亜集団の量、
 $CD62L^{low}CD8^{+}T$ 細胞亜集団の量、および、
 $CD137^{+}CD8^{+}T$ 細胞亜集団の量
 $CD28^{+}CD62L^{low}CD8^{+}T$ 細胞亜集団の量
 からなる群から選択される値を(X)として、変数(X、Y)を計算することができる。

【0035】

40
 例えば、本発明の方法では、制御性T細胞または制御性T細胞と相関する $CD4^{+}T$ 細胞
 亜集団の量を(Y)として、変数(X、Y)を計算することができる。本発明の方法で
 はまた、
 $CCR4^{+}CD25^{+}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 $CD62L^{high}CD25^{+}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 $CD127^{+}CD25^{+}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、
 $CD45RA^{-}Foxp3^{+}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の量、および
 $CD4^{+}Foxp3^{+}CD25^{+}T$ 細胞亜集団の量
 からなる群から選択される値を(Y)として、変数(X、Y)を計算することができる。

【0036】

50

本発明の別の実施形態において、がんを有する被験体を治療する方法であって、
以下：

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、
抗腫瘍免疫応答でのCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の
量、および、

抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の量、
制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、および

ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、

からなる群から選択される量(X, Y)を決定する工程と、XのYに対する相対値と閾値
(無効群閾値)との比較を用いて該被験体のがん免疫療法に対する応答について無効群で
あるかどうかを判定する工程と、該被験体が無効群でないと判定された場合であり、かつ
Foxp3⁺CD25⁺T細胞の割合、ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜
集団、LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、またはPD-1⁺C
D62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合の割合が閾値(奏効群閾値)よりも高い場合
に、該被験体が、がん免疫療法に対する応答について奏効群であると判定する工程と、該
被験体が奏効群であると判定された場合に、該被験体に該がん免疫療法を施す工程とを含
む、方法が提供される。本発明の別の実施形態において、がんを有する被験体を治療する
方法であって、

以下：

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、
抗腫瘍免疫応答でのCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の
量、および、

抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の量、
制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、および

ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、

からなる群から選択される量(X, Y)を決定する工程と、XのYに対する相対値と閾値
(無効群閾値)との比較を用いて該被験体のがん免疫療法に対する応答について無効群で
あるかどうかを判定する工程と、該被験体が無効群でないと判定された場合であり、かつ
Foxp3⁺CD25⁺T細胞の割合、ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜
集団、LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、またはPD-1⁺C
D62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合の割合が閾値(奏効群閾値)よりも高い場合
に、該被験体が、がん免疫療法に対する応答について奏効群であると判定する工程とによ
って、奏効群であると判定された該被験体に、該がん免疫療法を施す工程とを含む、方法
が提供される。

【0037】

例えば、本発明の方法では、

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、
抗腫瘍免疫応答でのCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の
量、および、

抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の量、
からなる群から選択される値を(X)とすることができる。本発明の方法ではまた、

CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
CCR7⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、

ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、

CD45RA⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

CD45RO⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

HLA-DR⁺樹状細胞亜集団の量、

CD80⁺樹状細胞亜集団の量、

CD86⁺樹状細胞亜集団の量、

10

20

30

40

50

$PD-L1^+$ 樹状細胞亜集団の量、
 $CD62L^{low}CD8^+$ T細胞亜集団の量、
 $CD137^+CD8^+$ T細胞亜集団の量、および
 $CD28^+CD62L^{low}CD8^+$ T細胞亜集団の割合
 からなる群から選択される値を (X) として、変数 (X、Y) を計算することができる。
【0038】

例えば、本発明の方法では、制御性T細胞亜集団の量または制御性T細胞と相関する $CD4^+$ T細胞亜集団の量を (Y) として、変数 (X、Y) を計算することができる。本発明の方法ではまた、

$CCR4^+CD25^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、
 $CD62L^{high}CD25^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、
 $CD127^+CD25^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、
 $CD45RA^+Foxp3^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、および
 $CD4^+Foxp3^+CD25^+$ T細胞亜集団の量
 からなる群から選択される値を (Y) として、変数 (X、Y) を計算することができる。
【0039】

本発明の別の局面では、上記の (X、Y) を用いて無効群でないとは判定された被験体集団において、奏効群 (PR) と安定群 (SD) とを識別する方法を提供する。奏効群 (PR) と安定群 (SD) とを識別する方法においては、

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$ T細胞亜集団の量
 を (Z) として

$CD4^+CD25^+$ T細胞亜集団の量
 $CD4^+Foxp3^+$ T細胞亜集団の量
 $CD4^+Foxp3^+CD25^+$ T細胞亜集団の量
 $CD62L^{high}CD25^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、
 $CD45RA^+Foxp3^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、
 $CCR4^+CD25^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、
 $CD127^+CD25^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、
 からなる群から選択される値を (W) として、変数 (Z、W) を計算し、被験体が奏効群 (PR) であるか、または、安定群 (SD) であるかを予測することができる。

【0040】

本発明のさらなる局面では、 $CD4$ 、 $CD25$ 、 $CD62L$ および $Foxp3$ などから選択される1以上の細胞表面マーカー、例えば、以下：

- ・ $CD4$ および $CD62L$ の組み合わせ、
- ・ $CD4$ 、 $CD45RA$ および $CCR7$ の組み合わせ、
- ・ $CD4$ 、 $CD45RO$ および $CCR7$ の組み合わせ、
- ・ $CD4$ 、 $CD62L$ および $LAG-3$ の組み合わせ、
- ・ $CD4$ 、 $CD62L$ および $ICOS$ の組み合わせ、
- ・ $CD4$ 、 $CD62L$ および $CD25$ の組み合わせ、
- ・ $CD4$ 、 $CD127$ および $CD25$ の組み合わせ、
- ・ $CD4$ 、 $CD45RA$ および $Foxp3$ の組み合わせ、
- ・ $CD4$ 、 $CD45RO$ および $Foxp3$ の組み合わせ、
- ・ $CD4$ 、 $CD25$ および $Foxp3$ の組み合わせ、
- ・ $CD11c$ 、 $CD141$ および $HLA-DR$ の組み合わせ、
- ・ $CD11c$ 、 $CD141$ および $CD80$ の組み合わせ、
- ・ $CD11c$ 、 $CD123$ および $HLA-DR$ の組み合わせ、
- ・ $CD11c$ 、 $CD123$ および $CD80$ の組み合わせ、
- ・ $CD8$ および $CD62L$ の組み合わせ、
- ・ $CD8$ および $CD137$ の組み合わせ、ならびに
- ・ $CD28$ 、 $CD62L$ および $CD8$ の組み合わせ

からなる群から選択されるマーカーの組み合わせに対する検出剤を含む被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するためのキットが提供される。好ましくは、キットは、CD4およびCD62Lのそれぞれに対する検出剤を含む。このような検出剤の組み合わせを、被験体のT細胞組成の決定に用いることができる。このようなキットは、被験体における、本明細書に記載される新規なバイオマーカーとしての特定のT細胞亜集団の割合の測定に用いることができる。

【0041】

本発明の1つの実施形態は、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための、細胞表面マーカーに対する検出剤を含むキットである。被験体のT細胞が発現するこれらの細胞表面マーカーが、被験体のがん免疫療法に対する応答性に関係することが本発明者らによって見出された。それにより、これらの細胞表面マーカーに対する検出剤を含むキットが、がん免疫療法に対する応答性の予測に有用であることが理解される。キットは、好ましくは、CD4およびCD62Lに対する検出剤を含む。キットは、より好ましくは、CD4、CD25、CD62LおよびFoxp3に対する検出剤を含む。1つの実施形態では、検出剤は抗体である。好ましくは、抗体は適切に標識されマーカーの検出を容易にする。

10

【0042】

本発明の別の局面は、被験体においてがんを治療するための、免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物である。

【0043】

20

本発明の1つの実施形態は、被験体においてがんを治療するための、免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物であって、該被験体は、以下：

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の相対量

抗腫瘍免疫応答におけるCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の相対量、および

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の相対量からなる群から選択される相対量が閾値（無効群閾値）以上であることを特徴とする、組成物である。

【0044】

この相対量は、例えば、代表的には、以下：

30

CD4⁺T細胞中のCD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCCR7⁻CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD62L^{low}CD4⁺T細胞中のLAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD62L^{low}CD4⁺T細胞中のICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のFoxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、

40

樹状細胞におけるHLA-DR⁺樹状細胞亜集団の割合、

樹状細胞におけるCD80⁺樹状細胞亜集団の割合、

樹状細胞におけるCD86⁺樹状細胞亜集団の割合、

樹状細胞におけるPD-L1⁺樹状細胞亜集団の割合、

CD8⁺T細胞中のCD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の割合、

CD8⁺T細胞中のCD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の割合、および

CD62L^{low}CD8⁺T細胞中のCD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の割合

からなる群から選択される。

【0045】

50

本発明のさらに別の実施形態は、被験体においてがんを治療するための、免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物であって、該被験体は、該被験体由来のサンプル中の以下：

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、
抗腫瘍免疫応答でのCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量、

抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の量、
制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、および
ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団

からなる群から選択される量(X, Y)と、XのYに対する相対値と閾値(無効群閾値)との比較によって選択された被験体であることを特徴とする、組成物である。量(X, Y)は、代表的には、以下：

- CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CCR7⁻CD4⁺T細胞亜集団の量、
- LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
- ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD45RA⁻CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD45RO⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- HLA-DR⁺樹状細胞亜集団の量、
- CD80⁺樹状細胞亜集団の量、
- CD86⁺樹状細胞亜集団の量、
- PD-L1⁺樹状細胞亜集団の量、
- CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量、
- CD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の量、および
- CD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量

からなる群から選択される。 30

【0046】

例えば、本発明の方法では、

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、
抗腫瘍免疫応答でのCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量、および、

抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の量、
からなる群から選択される値を(X)とすることができる。本発明の方法ではまた、

- CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CCR7⁻CD4⁺T細胞亜集団の量、
- LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
- ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD45RA⁻CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD45RO⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- HLA-DR⁺樹状細胞亜集団の量、
- CD80⁺樹状細胞亜集団の量、
- CD86⁺樹状細胞亜集団の量、
- PD-L1⁺樹状細胞亜集団の量、
- CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量、
- CD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の量、および
- CD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量

50

からなる群から選択される値を (X) として、変数 (X , Y) を計算することができる。

【 0 0 4 7 】

例えば、本発明の方法では、制御性 T 細胞亜集団の量または制御性 T 細胞と相関する C D 4 + T 細胞亜集団の量を (Y) として、変数 (X , Y) を計算することができる。本発明の方法ではまた、

C C R 4 + C D 2 5 + C D 4 + T 細胞亜集団の量、
 C D 6 2 L ^{high} C D 2 5 + C D 4 + T 細胞亜集団の量、
 C D 1 2 7 + C D 2 5 + C D 4 + T 細胞亜集団の量、
 C D 4 5 R A ⁻ F o x p 3 + C D 4 + T 細胞亜集団の量、および
 C D 4 + F o x p 3 + C D 2 5 + T 細胞亜集団の量

10

からなる群から選択される値を (Y) として、変数 (X , Y) を計算することができる。

【 0 0 4 8 】

本発明の方法では、例えば、C D 4 + C D 6 2 L ^{low} T 細胞の量 (X) を測定する工程と、C D 4 + F o x p 3 + C D 2 5 + T 細胞の量 (Y) を測定する工程とを含む、X の Y に対する相対値と閾値 (無効群閾値) との比較を、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを予測するための指標として用いることができる。(Y) としては、制御性 T 細胞または制御性 T 細胞と相関する C D 4 + T 細胞亜集団の量ないし割合を使用することができる。

【 0 0 4 9 】

本発明のさらに別の実施形態は、被験体においてがんを治療するための、免疫チェック

20

ポイント阻害剤を含む組成物であって、該被験体は、

該被験体由来のサンプル中の、以下：
 抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関する C D 4 + T 細胞亜集団の量、
 抗腫瘍免疫応答での C D 4 + T 細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の

量、
 抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する C D 8 + T 細胞亜集団の量、
 制御性 T 細胞または制御性 T 細胞と相関する C D 4 + T 細胞亜集団の量、および
 I C O S + C D 6 2 L ^{low} C D 4 + T 細胞亜集団の量、

から選択される量 (X , Y) との相対値と閾値 (無効群閾値) との比較によって選択された被験体であり、かつ、該被験体由来のサンプル中の C D 4 + T 細胞における F o x p 3 + C D 2 5 + T 細胞亜集団の割合または C D 6 2 L ^{low} C D 4 + T 細胞における I C O S + C D 6 2 L ^{low} C D 4 + T 細胞亜集団の割合が閾値 (奏効群閾値) 以上であることを特徴とする、組成物である。量 (X) および (Y) は、代表的には、以下：

30

C D 6 2 L ^{low} C D 4 + T 細胞亜集団の量、
 C C R 7 ⁻ C D 4 + T 細胞亜集団の量、
 L A G - 3 + C D 6 2 L ^{low} C D 4 + T 細胞亜集団の量、
 I C O S + C D 6 2 L ^{low} C D 4 + T 細胞亜集団の量、
 C C R 4 + C D 2 5 + C D 4 + T 細胞亜集団の量、
 C D 4 5 R A ⁻ C D 4 + T 細胞亜集団の量、
 C D 4 5 R O + C D 4 + T 細胞亜集団の量、
 C D 6 2 L ^{high} C D 2 5 + C D 4 + T 細胞亜集団の量、
 C D 1 2 7 + C D 2 5 + C D 4 + T 細胞亜集団の量、
 C D 4 5 R A ⁻ F o x p 3 + C D 4 + T 細胞亜集団の量、
 F o x p 3 + C D 2 5 + C D 4 + T 細胞亜集団の量、
 H L A - D R + 樹状細胞亜集団の量、
 C D 8 0 + 樹状細胞亜集団の量、
 C D 8 6 + 樹状細胞亜集団の量、
 P D - L 1 + 樹状細胞亜集団の量、
 C D 6 2 L ^{low} C D 8 + T 細胞亜集団の量、
 C D 1 3 7 + C D 8 + T 細胞亜集団の量、および

40

50

CD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量
からなる群から選択される。

【0050】

例えば、本発明の組成物は、

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、

抗腫瘍免疫応答でのCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量、および、

抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の量、

からなる群から選択される値を(X)として、変数(X、Y)によって特徴付けられた被験体を投与の対象とすることができる。本発明の方法ではまた、

CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、

CCR7⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、

ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、

CD45RA⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

CD45RO⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

HLA-DR⁺樹状細胞亜集団の量、

CD80⁺樹状細胞亜集団の量、

CD86⁺樹状細胞亜集団の量、

PD-L1⁺樹状細胞亜集団の量、

CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量、

CD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の量、および

CD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量

からなる群から選択される値を(X)として、変数(X、Y)を計算して、変数(X、Y)によって特徴付けられた被験体を投与の対象とすることができる。

【0051】

例えば、本発明の組成物は、制御性T細胞亜集団の量または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量を(Y)として、変数(X、Y)を計算することができる。本発明の方法ではまた、

CCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

CD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

CD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

CD45RA⁺Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、および

CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団の量、

からなる群から選択される値を(Y)として、変数(X、Y)を計算して、変数(X、Y)によって特徴付けられた被験体を投与の対象とすることができる。

【0052】

本発明の組成物は、例えば、CD4⁺CD62L^{low}T細胞の量(X)と、CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺T細胞の量(Y)とから、XのYに対する相対値と閾値(無効群閾値)との比較によって、がん免疫療法に対して無効群でないことを予測された被験体を投与の対象とすることができる。(Y)としては、制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量ないし割合を使用することができる。本発明の組成物は、任意の他の薬剤と併用されてもよい。

【0053】

1つの実施形態では、組成物は、PD-1阻害剤を含む。PD-1阻害剤は、例えば、PD-L1とPD-1との結合を阻害する抗PD-1抗体であり、例えば、ニボルマブまたはペムブロリズマブであり得る。他の実施形態では、組成物は、PD-L1阻害剤を含む。PD-L1阻害剤は、例えば、PD-L1とPD-1との結合を阻害する抗PD-L1抗体であり、例えば、デュルバルマブ、アテゾリズマブまたはアベルマブであり得る。これらの免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物は、本発明のバイオマーカーによって

10

20

30

40

50

選択した被験体に投与した場合、特に高い確率で治療効果を奏すると考えられる。

【0054】

本発明のさらなる局面では、被験体のがん免疫療法に対する応答性を改善または維持するための方法を提供する。以下：

CD62L^{low}CD4⁺T細胞、
 CCR7⁻CD4⁺T細胞、
 LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞、
 ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞、
 CCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞、
 CD45RA⁻CD4⁺T細胞、
 CD45RO⁺CD4⁺T細胞、
 CD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞、
 CD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞、
 CD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞、
 Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞、
 HLA-DR⁺樹状細胞、
 CD80⁺樹状細胞、
 CD86⁺樹状細胞、
 PD-L1⁺樹状細胞
 CD62L^{low}CD8⁺T細胞、
 CD137⁺CD8⁺T細胞、および
 CD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞

10

20

からなる群から選択される細胞が、がん免疫療法に対する被験体の応答に重要であることが見出され、そのようなT細胞を用いることで、被験体のがん免疫療法に対する応答性を改善または維持することができると考えられる。本発明の1つの実施形態は、CD62L^{low}CD4⁺T細胞を含む組成物である。CD62L^{low}CD4⁺T細胞またはそれを含まない組成物は、癌の治療または予防をするために有用であり、がん免疫療法と併用することができる。本発明の更なる実施形態では、組成物は、CD62L^{low}CD4⁺T細胞などに加えて、CD62L^{low}CD8⁺T細胞を含んでもよい。

【0055】

本発明の1つの実施形態は、以下：

CD62L^{low}CD4⁺T細胞、
 CCR7⁻CD4⁺T細胞、
 LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞、
 ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞、
 CCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞、
 CD45RA⁻CD4⁺T細胞、
 CD45RO⁺CD4⁺T細胞、
 CD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞、
 CD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞、
 CD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞、
 Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞、
 HLA-DR⁺樹状細胞、
 CD80⁺樹状細胞、
 CD86⁺樹状細胞、
 PD-L1⁺樹状細胞、
 CD62L^{low}CD8⁺T細胞、
 CD137⁺CD8⁺T細胞、および
 CD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞

30

40

からなる群から選択される細胞を用いて、がん免疫療法が奏効しないと予測された被験体

50

においてがん免疫療法を奏効させるための方法、またはそのための組成物を提供する。本発明の別の実施形態は、例えば、 $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞を用いて、がん免疫療法の効果を持続させるための方法、またはそのための組成物を提供する。本発明者らの、末梢血の $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞が、がん免疫療法（特に、抗PD-1抗体治療および/または抗PD-L1抗体治療）における抗腫瘍免疫応答のアクセラレーターであることを明らかとした研究成果は、がん治療に新たな画期的な手法を提供する新規知見である。また、本発明者らは、上記に説明した $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞と同様に、以下：

$CCR7^{-}CD4^{+}T$ 細胞、
 $LAG-3^{+}CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞、
 $ICOS^{+}CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞、
 $CCR4^{+}CD25^{+}CD4^{+}T$ 細胞、
 $CD45RA^{-}CD4^{+}T$ 細胞、
 $CD45RO^{+}CD4^{+}T$ 細胞、
 $CD62L^{high}CD25^{+}CD4^{+}T$ 細胞、
 $CD127^{+}CD25^{+}CD4^{+}T$ 細胞、
 $CD45RA^{-}Foxp3^{+}CD4^{+}T$ 細胞、
 $Foxp3^{+}CD25^{+}CD4^{+}T$ 細胞、
 $HLA-DR^{+}$ 樹状細胞、
 $CD80^{+}$ 樹状細胞、
 $CD86^{+}$ 樹状細胞、
 $PD-L1^{+}$ 樹状細胞、
 $CD62L^{low}CD8^{+}T$ 細胞、
 $CD137^{+}CD8^{+}T$ 細胞、および
 $CD28^{+}CD62L^{low}CD8^{+}T$ 細胞

10

20

からなる群から選択される細胞もまた同様に抗腫瘍免疫応答を促進することを見出した。本発明の更なる実施形態では、 $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞に加えて、 $CD62L^{low}CD8^{+}T$ 細胞を使用してもよい。

【0056】

本発明の一部の実施形態では、 $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞の精製または純化方法、あるいは $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞を含む組成物の製造方法が提供される。一部の
 実施形態では、ヒト由来の試料から $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞を単離する。一部の
 実施形態では、被験体から単離した $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞を、該被験体に移入するために調製する方法および該被験体に移入する方法が提供される。本発明の1つの
 実施形態は、 $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞を含む組成物であって、 $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞が、該組成物が投与される被験体由来のものである、組成物である。本発明の更なる局面では、 $CD62L^{low}CD8^{+}T$ 細胞の精製または純化方法、あるいは
 $CD62L^{low}CD8^{+}T$ 細胞を含む組成物の製造方法が提供される。同様の原理を用いて、本発明において、以下：

30

$CCR7^{-}CD4^{+}T$ 細胞、
 $LAG-3^{+}CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞、
 $ICOS^{+}CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞、
 $CCR4^{+}CD25^{+}CD4^{+}T$ 細胞、
 $CD45RA^{-}CD4^{+}T$ 細胞、
 $CD45RO^{+}CD4^{+}T$ 細胞、
 $CD62L^{high}CD25^{+}CD4^{+}T$ 細胞、
 $CD127^{+}CD25^{+}CD4^{+}T$ 細胞、
 $CD45RA^{-}Foxp3^{+}CD4^{+}T$ 細胞、
 $Foxp3^{+}CD25^{+}CD4^{+}T$ 細胞、
 $HLA-DR^{+}$ 樹状細胞、
 $CD80^{+}$ 樹状細胞、

40

50

CD86⁺ 樹状細胞、
 PD-L1⁺ 樹状細胞、
 CD62L^{low} CD8⁺ T細胞、および、
 CD137⁺ CD8⁺ T細胞、および
 CD28⁺ CD62L^{low} CD8⁺ T細胞

からなる群から選択される細胞もまた同様に調製される。

【0057】

CD62L^{low} CD4⁺ T細胞を含む組成物の製造方法は、ヒト由来のT細胞集団からCD62L^{low} CD4⁺ T細胞を純化する工程を含み得る。純化する工程は、T細胞集団からCD62L高発現細胞を除去すること（ネガティブセレクション）を含んでよい。CD62L^{low} CD4⁺ T細胞を、抗体および/または磁気ビーズおよび/またはアフィニティーカラムなどを用いてネガティブセレクションによって純化することは、使用しようとする細胞上に、抗体や磁気ビーズ等の夾雑物が残らないため、好ましい。本発明においてはまた、CD62L^{low} CD8⁺ T細胞を含む組成物の製造方法が提供される。

10

【0058】

本発明の1つの実施形態は、CD62L^{low} CD4⁺ T細胞を純化するための、CD62Lに特異的に結合する物質を含むキットである。CD62Lに特異的に結合する物質としては、限定されるものではないが、CD62Lに特異的な抗体が挙げられる。

【0059】

（本発明のバイオマーカー）

本発明のバイオマーカーは、CD4⁺ T細胞、樹状細胞、および/または、CD8⁺ T細胞を含めた抗腫瘍免疫応答全体のバランスを評価するものであり、腫瘍免疫そのものを全体的に評価するものであると考えられる。そのため、本発明の方法は、幅広い癌腫に対して有効なものであるということが出来る。また、本発明は、抗腫瘍免疫応答全体のバランスを評価するものであることから、PD-1・PD-L1に対する免疫チェックポイント阻害剤のみならず、他の免疫チェックポイントに対して作用する抗癌治療に対しても有効であることが予測される。

20

【0060】

本発明においては、CD62L^{low}の代わりに、あるいはCD62L^{low}に加えて、エフェクターT細胞の指標となるマーカー、例えば、CCR7⁻を用いることも可能である。あるいは、CD45RA⁻および/またはCD45RO⁺を用いることも可能である。例えば、CD4⁺ T細胞中のCD45RA⁻ CD4⁺ T細胞亜集団の割合、および/または、CD4⁺ T細胞中のCD45RO⁺ CD4⁺ T細胞亜集団の割合を用いることも可能である。LAG3およびICOSの発現もまたCD62L^{low}と同様に使用可能であること（追加ないし置換が可能であること）が判明した。同様に、CCR4発現もまたCD62L^{low}と同様に使用可能であること（追加ないし置換が可能であること）が判明した。

30

【0061】

実施例で使用したCD4⁺ T細胞（CD62L^{low} CD4⁺ T細胞）を指標とする代わりに（あるいは、それに加えて）、骨髄樹状細胞（mDC）および/または形質細胞様樹状細胞（pDC）集団におけるHLA-DRおよび/またはCD80および/またはCD86を発現する細胞の数/割合を指標とすることもできる。また、樹状細胞上のPD-L1もまた、本発明のマーカーとして利用可能であると考えられる。

40

【0062】

また、実施例で使用したCD4⁺ T細胞（CD62L^{low} CD4⁺ T細胞）を指標とする代わりに（あるいは、それに加えて）、CD8⁺ T細胞において4-1BBを発現する細胞の数/割合を指標とすることもできる。

【0063】

（本発明のメカニズム）

50

理論に拘束されることは望まないが、本発明者らが提唱する腫瘍局所における抗腫瘍免疫応答現象を模式的に示すと、図 2 2 のようになる。図 2 2 には、末梢血で観測可能な細胞である $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞、骨髓樹状細胞 (mDC)、形質細胞様樹状細胞 (pDC)、および、 $CD62L^{low}CD8^{+}T$ 細胞を記載し、さらに、これら細胞で発現するマーカー分子である LAG-3、ICOS、HLA-DR、CD80、および、CD137 を記載した。PD-L1 は樹状細胞で発現し、PD-1 は、 $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞および $CD62L^{low}CD8^{+}T$ 細胞で発現する。

【0064】

抗腫瘍免疫応答においては、T細胞組成が重要であると考えられる。例えば、 $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞による樹状細胞の刺激が重要であり、 $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞が十分でない場合 (例えば、エフェクターT細胞とナイーブT細胞のバランスがナイーブT細胞に傾く場合)、免疫チェックポイント阻害薬を投与しても、樹状細胞の刺激を十分に行うことができず、その結果、抗腫瘍免疫応答を十分に行うことができない。そのため、 $CD4^{+}T$ 細胞中の $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞の割合は、免疫チェックポイント阻害薬による抗腫瘍効果を予測する指標となる。 $CD62L$ と同様に $CD4^{+}T$ 細胞中の $CD45RA$ 陰性 $CCR7$ 陰性 T細胞の割合もまたエフェクターT細胞とナイーブT細胞のバランスを示すことから、本発明の指標として利用可能である。

10

【0065】

また、 $CD4^{+}T$ 細胞による樹状細胞の刺激は、HLA-DRを介して行われることから、樹状細胞中の HLA-DR 陽性細胞の割合が低下すると、免疫チェックポイント阻害薬を投与しても、樹状細胞の刺激を十分に行うことができず、その結果、抗腫瘍免疫応答を十分に行うことができない。そのため、樹状細胞中の HLA-DR 陽性細胞の割合もまた、免疫チェックポイント阻害薬による抗腫瘍効果を予測する指標となる。

20

【0066】

$CD4^{+}T$ 細胞による刺激を受けた樹状細胞は、 $CD8^{+}T$ 細胞を刺激し、刺激を受けた $CD8^{+}T$ 細胞が最終的に抗腫瘍活性を発揮する。樹状細胞による $CD8^{+}T$ 細胞の刺激は、樹状細胞上に発現する $CD80/CD86$ と $CD8^{+}T$ 細胞上の $CD137$ を介して行われることから、樹状細胞中の $CD80$ 陽性細胞の割合および $CD8^{+}T$ 細胞中の $CD137$ 陽性細胞の割合のいずれも、免疫チェックポイント阻害薬による抗腫瘍効果を予測する指標となる。

30

【0067】

上記のメカニズムから明らかとなったバイオマーカーに加え、実施例に記載のとおり、 $CD4^{+}T$ 細胞における LAG-3、ICOS、および、 $CCR4$ もまた、免疫チェックポイント阻害薬による抗腫瘍効果を予測する指標となることが判明した。

【0068】

例えば、本発明は以下の項目を提供する。

(項目1)

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関する $CD4^{+}T$ 細胞亜集団の相対量を、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標として用いる方法であって、

40

該被験体由来のサンプル中の、該 $CD4^{+}T$ 細胞亜集団の相対量を決定する工程を含み、該相対量が無効群閾値よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを示す、方法。

(項目2)

項目1に記載の方法であって、ここで、前記 $CD4^{+}T$ 細胞亜集団の相対量が、以下：
 $CD4^{+}T$ 細胞中の $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の割合、
 $CD4^{+}T$ 細胞中の $CCR7^{+}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の割合、
 $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞中の LAG-3⁺ $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞亜集団の割合、

$CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞中の ICOS⁺ $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞亜集

50

団の割合、

CD4⁺T細胞中のCCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のCD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のCD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のCD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 および、

CD4⁺T細胞中のFoxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 からなる群から選択される、方法。

(項目3)

被験体のCD4⁺T細胞におけるCD62L^{low}T細胞の割合を、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標として用いる方法であって、

該被験体由来のサンプル中の、CD4⁺T細胞におけるCD62L^{low}T細胞の割合を決定する工程を含み、該割合が無効群閾値よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを示す、方法。

(項目4)

抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の相対量を、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標として用いる方法であって、

該被験体由来のサンプル中の、樹状細胞における該樹状細胞亜集団の割合を決定する工程を含み、該割合が無効群閾値よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを示す、方法。

(項目5)

項目4に記載の方法であって、ここで、前記樹状細胞亜集団が、以下：

HLA-DR⁺樹状細胞亜集団、CD80⁺樹状細胞亜集団、CD86⁺樹状細胞亜集団、およびPD-L1⁺樹状細胞

からなる群から選択される、方法。

(項目6)

抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の相対量を、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標として用いる方法であって、

該被験体由来のサンプル中の、CD8⁺T細胞における該CD8⁺T細胞亜集団の割合を決定する工程を含み、該割合が無効群閾値よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを示す、方法。

(項目7)

項目6に記載の方法であって、ここで、前記CD8⁺T細胞亜集団が、CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団、CD137⁺CD8⁺T細胞亜集団またはCD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団である、方法。

(項目8)

以下：

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、
 抗腫瘍免疫応答でのCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量、

抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の量、
 制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、および

ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
 からなる群から選択される量(X、Y)に対する相対値を、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標として用いる方法であって、

該Xを測定する工程と、

該Yを測定する工程と

を含み、XのYに対する相対値と無効群閾値との比較を、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを予測するための指標として用いる、方法。

(項目9)

10

20

30

40

50

前記量 (X) および (Y) が、それぞれ、以下：

CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
 CCR7⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
 LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
 ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
 Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
 HLA-DR⁺樹状細胞亜集団の量、
 CD80⁺樹状細胞亜集団の量、
 CD86⁺樹状細胞亜集団の量、
 PD-L1⁺樹状細胞亜集団の量、
 CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量、
 CD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の量、および
 CD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量

からなる群から選択される、項目8に記載の方法。

(項目10)

前記相対値が、X / Yである、項目8または9に記載の方法。

(項目11)

前記相対値が、X² / Yである、項目8または9に記載の方法。

(項目12)

前記無効群ではないことが示された被験体における、

CD4⁺T細胞におけるFoxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団の割合、
 CD62L^{low}CD4⁺T細胞におけるICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞
 亜集団の割合、

CD62L^{low}CD4⁺T細胞におけるLAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞
 亜集団の割合、または

CD62L^{low}CD4⁺T細胞におけるPD-1⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞
 亜集団の割合を、該被験体のがん免疫療法に対する応答の指標としてさらに用いる項目
 1 ~ 11のいずれか1項に記載の方法であって、

該CD4⁺T細胞における該Foxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団の割合、

該CD62L^{low}CD4⁺T細胞における該ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T
 細胞亜集団の割合

該CD62L^{low}CD4⁺T細胞における該LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺
 T細胞亜集団の割合、または

該CD62L^{low}CD4⁺T細胞における該PD-1⁺CD62L^{low}CD4⁺T
 細胞亜集団の割合、

が奏効群閾値よりも高いことは、該被験体が奏効群であることを示す、方法。

(項目13)

前記無効群閾値が、無効群の検出についての感度および特異度を考慮して決定される、項
 目1 ~ 12のいずれか1項に記載の方法。

(項目14)

前記無効群閾値が、無効群の検出について感度が約90%超となるように決定される、項
 目1 ~ 13のいずれか1項に記載の方法。

(項目15)

前記無効群閾値が、無効群の検出について特異度が約90%超となるように決定される、
 項目1 ~ 13のいずれか1項に記載の方法。

(項目16)

前記サンプルが末梢血サンプルである、項目1 ~ 15のいずれか1項に記載の方法。

(項目17)

前記がん免疫療法は、免疫チェックポイント阻害剤の投与を含む、項目1 ~ 16のいずれ
 か1項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目18)

前記免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1阻害剤およびPD-L1阻害剤からなる群から選択される、項目17に記載の方法。

(項目19)

前記PD-1阻害剤は、PD-1とPD-L1との相互作用を阻害する抗PD-1抗体である、項目18に記載の方法。

(項目20)

前記PD-L1阻害剤は、PD-1とPD-L1との相互作用を阻害する抗PD-L1抗体である、項目18に記載の方法。

(項目21)

前記PD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤は、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、デュルバルマブ、アテゾリズマブまたはアベルマブを含む、項目18に記載の方法。

(項目22)

がんを有する被験体を治療する方法であって、以下の工程：

(1)以下：

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の相対量、
抗腫瘍免疫応答におけるCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の相対量、および

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の相対量
からなる群から選択される相対量を決定する工程と、

(2)該相対量が無効群閾値よりも高い場合に、該被験体が、がん免疫療法に対する応答について無効群でないと判定する工程と、

(3)該被験体が無効群でないと判定された場合に、該被験体に該がん免疫療法を施す工程とを含む、方法。

(項目23)

項目22に記載の方法であって、ここで、前記相対量が、以下：

CD4⁺T細胞中のCD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCCR7⁻CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD62L^{low}CD4⁺T細胞中のLAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD62L^{low}CD4⁺T細胞中のICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のCD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、

CD4⁺T細胞中のFoxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、

樹状細胞におけるHLA-DR⁺樹状細胞亜集団の割合、

樹状細胞におけるCD80⁺樹状細胞亜集団の割合、

樹状細胞におけるCD86⁺樹状細胞亜集団の割合、

樹状細胞におけるPD-L1⁺樹状細胞亜集団の割合、

CD8⁺T細胞中のCD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の割合、

CD8⁺T細胞中のCD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の割合、および

CD62L^{low}CD8⁺T細胞中のCD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の割合

からなる群から選択される、方法。

(項目24)

がんを有する被験体を治療する方法であって、

以下：

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、

10

20

30

40

50

抗腫瘍免疫応答でのCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量、および、

抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の量、

制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、および

ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、

からなる群から選択される量(X、Y)を決定する工程と

XのYに対する相対値と無効群閾値との比較を用いて該被験体のがん免疫療法に対する応答について無効群であるかどうかを判定する工程と、

該被験体が無効群でないとは判定された場合に、該被験体に該がん免疫療法を施す工程を含む、方法。

10

(項目25)

前記量(X)および(Y)が、それぞれ以下：

CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、

CCR7⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、

ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、

Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

HLA-DR⁺樹状細胞亜集団の量、

CD80⁺樹状細胞亜集団の量、

CD86⁺樹状細胞亜集団の量、

PD-L1⁺樹状細胞亜集団の量、

CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量、

CD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の量、および

CD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量

からなる群から選択される、項目24に記載の方法。

20

(項目26)

がんを有する被験体を治療する方法であって、

以下：

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、

抗腫瘍免疫応答でのCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量、および、

30

抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の量、

制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、および

ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、

からなる群から選択される量(X、Y)を決定する工程と

XのYに対する相対値と無効群閾値との比較を用いて該被験体のがん免疫療法に対する応答について無効群であるかどうかを判定する工程と、

該被験体が無効群でないとは判定された場合であり、かつ、Foxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団の割合、ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、またはPD-1⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合が奏効群閾値よりも高い場合に、該被験体のがん免疫療法に対する応答について奏効群であると判定する工程と、

40

該被験体が奏効群であると判定された場合に、該被験体に該がん免疫療法を施す工程を含む、方法。

(項目27)

以下：

・CD4およびCD62Lの組み合わせ、

・CD4およびCCR7の組み合わせ、

・CD4、CD62LおよびLAG-3の組み合わせ、

・CD4、CD62LおよびICOSの組み合わせ、

50

- ・ CD 4、CD 6 2 L および CD 2 5 の組み合わせ、
- ・ CD 4、CD 1 2 7 および CD 2 5 の組み合わせ、
- ・ CD 4、CD 4 5 R A および Fox p 3 の組み合わせ、
- ・ CD 4、CD 2 5 および Fox p 3 の組み合わせ、
- ・ CD 1 1 c、CD 1 4 1 および H L A - D R の組み合わせ、
- ・ CD 1 1 c、CD 1 4 1 および CD 8 0 の組み合わせ、
- ・ CD 1 1 c、CD 1 2 3 および H L A - D R の組み合わせ、
- ・ CD 1 1 c、CD 1 2 3 および CD 8 0 の組み合わせ、
- ・ CD 8 および CD 6 2 L の組み合わせ、
- ・ CD 8 および CD 1 3 7 の組み合わせ、ならびに
- ・ CD 2 8、CD 6 2 L および CD 8 の組み合わせ

10

からなる群から選択されるマーカーの組み合わせに対する検出剤を含む、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するためのキット。

(項目 2 8)

CD 4 および CD 6 2 L に対する検出剤を含む、項目 2 7 に記載のキット。

(項目 2 9)

CD 4、CD 2 5、CD 6 2 L および Fox p 3 に対する検出剤を含む、項目 2 7 に記載のキット。

(項目 3 0)

前記検出剤が抗体である、項目 2 7 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載のキット。

20

(項目 3 1)

被験体においてがんを治療するための、免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物であって、該被験体は、以下：

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関する CD 4⁺ T 細胞亜集団の相対量

抗腫瘍免疫応答における CD 4⁺ T 細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の相対量、および

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関する CD 8⁺ T 細胞亜集団の相対量

からなる群から選択される相対量が無効群閾値以上であることを特徴とする、組成物。

(項目 3 2)

項目 3 1 に記載の組成物であって、ここで、前記相対量が、以下：

30

CD 4⁺ T 細胞中の CD 6 2 L^{low} CD 4⁺ T 細胞亜集団の割合、

CD 4⁺ T 細胞中の CCR 7⁻ CD 4⁺ T 細胞亜集団の割合、

CD 6 2 L^{low} CD 4⁺ T 細胞中の LAG - 3⁺ CD 6 2 L^{low} CD 4⁺ T 細胞亜集団の割合、

CD 6 2 L^{low} CD 4⁺ T 細胞中の ICOS⁺ CD 6 2 L^{low} CD 4⁺ T 細胞亜集団の割合、

CD 4⁺ T 細胞中の CCR 4⁺ CD 2 5⁺ CD 4⁺ T 細胞亜集団の割合、

CD 4⁺ T 細胞中の CD 6 2 L^{high} CD 2 5⁺ CD 4⁺ T 細胞亜集団の割合、

CD 4⁺ T 細胞中の CD 1 2 7⁺ CD 2 5⁺ CD 4⁺ T 細胞亜集団の割合、

CD 4⁺ T 細胞中の CD 4 5 R A⁻ Fox p 3⁺ CD 4⁺ T 細胞亜集団の割合、

40

CD 4⁺ T 細胞中の Fox p 3⁺ CD 2 5⁺ CD 4⁺ T 細胞亜集団の割合、

樹状細胞における H L A - D R⁺ 樹状細胞亜集団の割合、

樹状細胞における CD 8 0⁺ 樹状細胞亜集団の割合、

樹状細胞における CD 8 6⁺ 樹状細胞亜集団の割合、

樹状細胞における PD - L 1⁺ 樹状細胞亜集団の割合、

CD 8⁺ T 細胞中の CD 6 2 L^{low} CD 8⁺ T 細胞亜集団の割合、

CD 8⁺ T 細胞中の CD 1 3 7⁺ CD 8⁺ T 細胞亜集団の割合、および

CD 6 2 L^{low} CD 8⁺ T 細胞中の CD 2 8⁺ CD 6 2 L^{low} CD 8⁺ T 細胞亜集団の割合

からなる群から選択される、組成物。

50

(項目33)

被験体においてがんを治療するための、免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物であって、該被験体は、

以下：

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、
 抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量、および、
 抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の量、
 制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、および
 ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
 からなる群から選択される量(X、Y)との相対値と無効群閾値との比較によって選択された被験体であることを特徴とする、組成物。

10

(項目34)

被験体においてがんを治療するための、免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物であって、該被験体は、

以下：

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、
 抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量、および、
 抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の量、
 制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、および
 ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
 からなる群から選択される量(X、Y)との相対値と無効群閾値との比較によって選択された被験体であり、かつ、該被験体由来のサンプル中の

20

CD4⁺T細胞におけるFoxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団の割合、
 該CD62L^{low}CD4⁺T細胞における該ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、

該CD62L^{low}CD4⁺T細胞における該LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、または

該CD62L^{low}CD4⁺T細胞における該PD-1⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合

が奏効群閾値以上であることを特徴とする、組成物。

30

(項目35)

前記免疫チェックポイント阻害剤が、PD-1阻害剤およびPD-L1阻害剤からなる群から選択される、項目31~34のいずれか1項に記載の組成物。

(項目36)

前記PD-1阻害剤は、PD-1とPD-L1との相互作用を阻害する抗PD-1抗体である、項目35に記載の組成物。

(項目37)

前記PD-L1阻害剤は、PD-1とPD-L1との相互作用を阻害する抗PD-L1抗体である、項目35に記載の組成物。

(項目38)

前記PD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤が、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、デュルバルマブ、アテゾリズマブまたはアベルマブである、項目35に記載の組成物。

40

(項目39)

以下：

CD62L^{low}CD4⁺T細胞、

CCR7⁺CD4⁺T細胞、

LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞、

ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞、

CCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞、

CD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞、

50

- CD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞、
 CD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞、
 Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞、
 HLA-DR⁺樹状細胞、
 CD80⁺樹状細胞、
 CD86⁺樹状細胞、
 PD-L1⁺樹状細胞、
 CD62L^{low}CD8⁺T細胞、
 CD137⁺CD8⁺T細胞、および
 CD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞
- 10
 からなる群から選択される細胞を含む、癌を治療または予防するための組成物。
- (項目40)
- がん免疫療法と併用するための、項目39に記載の組成物。
- (項目41)
- 前記組成物は、免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、項目39に記載の組成物。
- (項目42)
- 前記免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1阻害剤およびPD-L1阻害剤からなる群から選択される、項目41に記載の組成物。
- 20
 (項目43)
- 前記PD-1阻害剤は、PD-1とPD-L1との相互作用を阻害する抗PD-1抗体である、項目42に記載の組成物。
- (項目44)
- 前記PD-L1阻害剤は、PD-1とPD-L1との相互作用を阻害する抗PD-L1抗体である、項目42に記載の組成物。
- (項目45)
- 前記PD-1阻害剤またはPD-L1阻害剤は、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、デュルバルマブ、アテゾリズマブまたはアベルマブを含む、項目42に記載の組成物。
- (項目46)
- 30
 さらに、CD62L^{low}CD8⁺T細胞を含む、項目39~45のいずれか1項に記載の組成物。
- (項目47)
- がん免疫療法が奏効しないと予測された被験体において、がん免疫療法を奏効させるための、項目39~46のいずれか1項に記載の組成物。
- (項目48)
- がん免疫療法の効果を持続させるための、項目39~47のいずれか1項に記載の組成物。
- (項目49)
- 40
 前記CD62L^{low}CD4⁺T細胞が、前記組成物が投与される被験体由来のものである、項目39~48のいずれか1項に記載の組成物。
- (項目50)
- CD62L^{low}CD4⁺T細胞を含む癌を治療または予防するための組成物の製造方法であって、ヒト由来のT細胞集団からCD62L^{low}CD4⁺T細胞を純化する工程を含む、方法。
- (項目51)
- 前記純化する工程が、T細胞集団からCD62L高発現細胞を除去することを含む、項目50に記載の方法。
- (項目52)
- 50
 CD62L^{low}CD4⁺T細胞を純化するための、CD62Lに特異的に結合する物質を含むキット。

(項目 A 1)

被験体の CD4⁺T 細胞における CD62L^{low}T 細胞の割合を、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標として用いる方法であって、

該被験体由来のサンプル中の、CD4⁺T 細胞における CD62L^{low}T 細胞の割合を決定する工程を含み、該割合が無効群閾値よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを示す、方法。

(項目 A 2)

被験体の CD4⁺T 細胞における Foxp3⁺CD25⁺T 細胞の割合を、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標として用いる方法であって、

該被験体由来のサンプル中の、CD4⁺T 細胞における Foxp3⁺CD25⁺T 細胞の割合を決定する工程を含み、該割合が無効群閾値よりも低いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを示す、方法。

10

(項目 A 3)

被験体の CD4⁺CD62L^{low}T 細胞の量 (X) の、CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺T 細胞の量 (Y) に対する相対値を、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標として用いる方法であって、

該 X を測定する工程と、

該 Y を測定する工程と

を含み、X の Y に対する相対値と無効群閾値との比較を、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを予測するための指標として用いる、方法。

20

(項目 A 4)

前記相対値が、 X / Y である、項目 A 3 に記載の方法。

(項目 A 5)

前記相対値が、 X^2 / Y である、項目 A 3 に記載の方法。

(項目 A 6)

前記無効群ではないことが示された被験体の CD4⁺T 細胞における Foxp3⁺CD25⁺T 細胞の割合を、該被験体のがん免疫療法に対する応答の指標としてさらに用いる項目 A 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法であって、該 CD4⁺T 細胞における Foxp3⁺CD25⁺T 細胞の割合が奏効群閾値よりも高いことは、該被験体が奏効群であることを示す、方法。

30

(項目 A 7)

前記無効群閾値が、無効群の検出についての感度および特異度を考慮して決定される、項目 A 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 A 8)

前記無効群閾値が、無効群の検出について感度が約 90% 超となるように決定される、項目 A 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 A 9)

前記無効群閾値が、無効群の検出について特異度が約 90% 超となるように決定される、項目 A 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 A 10)

前記サンプルが末梢血サンプルである、項目 A 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

(項目 A 11)

前記がん免疫療法は、免疫チェックポイント阻害剤の投与を含む、項目 A 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 A 12)

前記免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1 阻害剤および PD-L1 阻害剤からなる群から選択される、項目 A 11 に記載の方法。

(項目 A 13)

前記 PD-1 阻害剤は、PD-1 と PD-L1 との相互作用を阻害する抗 PD-1 抗体である、項目 A 12 に記載の方法。

50

(項目 A 1 4)

前記 P D - L 1 阻害剤は、P D - 1 と P D - L 1 との相互作用を阻害する抗 P D - L 1 抗体である、項目 A 1 2 に記載の方法。

(項目 A 1 5)

前記 P D - 1 阻害剤または P D - L 1 阻害剤は、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、デュルバルマブ、アテゾリズマブまたはアベルマブを含む、項目 A 1 2 に記載の方法。

(項目 A 1 6)

がんを有する被験体を治療する方法であって、

該被験体由来のサンプル中の C D 4 + T 細胞における C D 6 2 L ¹ o w T 細胞の割合を決定する工程と、

C D 4 + T 細胞における C D 6 2 L ¹ o w T 細胞の割合が無効群閾値よりも高い場合に、該被験体が、がん免疫療法に対する応答について無効群でないと判定する工程と、

該被験体が無効群でないと判定された場合に、該被験体に該がん免疫療法を施す工程とを含む、方法。

10

(項目 A 1 7)

がんを有する被験体を治療する方法であって、

該被験体由来のサンプル中の、C D 4 + T 細胞における F o x p 3 + C D 2 5 + T 細胞の割合を決定する工程と、

C D 4 + T 細胞における F o x p 3 + C D 2 5 + T 細胞の割合が無効群閾値よりも低い場合に、該被験体が、がん免疫療法に対する応答について無効群でないと判定する工程と

20

、
該被験体が無効群でないと判定された場合に、該被験体に該がん免疫療法を施す工程とを含む、方法。

(項目 A 1 8)

がんを有する被験体を治療する方法であって、

C D 4 + C D 6 2 L ¹ o w T 細胞の量 (X) を決定する工程と、

C D 4 + F o x p 3 + C D 2 5 + T 細胞の量 (Y) を決定する工程と

X の Y に対する相対値と無効群閾値との比較を用いて該被験体のがん免疫療法に対する応答について無効群であるかどうかを判定する工程と、

該被験体が無効群でないと判定された場合に、該被験体に該がん免疫療法を施す工程とを含む、方法。

30

(項目 A 1 9)

がんを有する被験体を治療する方法であって、

C D 4 + C D 6 2 L ¹ o w T 細胞の量 (X) を決定する工程と、

C D 4 + F o x p 3 + C D 2 5 + T 細胞の量 (Y) を決定する工程と

X の Y に対する相対値と無効群閾値との比較を用いて該被験体のがん免疫療法に対する応答について無効群であるかどうかを判定する工程と、

該被験体が無効群でないと判定された場合であり、かつ、F o x p 3 + C D 2 5 + T 細胞の割合が奏効群閾値よりも高い場合に、該被験体が、がん免疫療法に対する応答について奏効群であると判定する工程と、

40

該被験体が奏効群であると判定された場合に、該被験体に該がん免疫療法を施す工程とを含む、方法。

(項目 A 2 0)

C D 4、C D 2 5、C D 6 2 L および F o x p 3 から選択される 1 以上の細胞表面マーカーに対する検出剤を含む、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するためのキット。

(項目 A 2 1)

C D 4 および C D 6 2 L に対する検出剤を含む、項目 A 2 0 に記載のキット。

(項目 A 2 2)

C D 4、C D 2 5、C D 6 2 L および F o x p 3 に対する検出剤を含む、項目 A 2 0 または 2 1 に記載のキット。

50

(項目 A 2 3)

前記検出剤が抗体である、項目 A 2 0 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載のキット。

(項目 A 2 4)

被験体においてがんを治療するための、免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物であって、該被験体は、該被験体由来のサンプル中の CD 4 + T 細胞中の CD 6 2 L ¹ o w T 細胞の割合が無効群閾値以上であることを特徴とする、組成物。

(項目 A 2 5)

被験体においてがんを治療するための、免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物であって、該被験体は、該被験体由来のサンプル中の CD 4 + T 細胞中の Fox p 3 + CD 2 5 + T 細胞の割合が無効群閾値以下であることを特徴とする、組成物。

10

(項目 A 2 6)

被験体においてがんを治療するための、免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物であって、該被験体は、該被験体由来のサンプル中の CD 4 + CD 6 2 L ¹ o w T 細胞の量 (X) と、該被験体由来のサンプル中の CD 4 + Fox p 3 + CD 2 5 + T 細胞の量 (Y) との相対値と無効群閾値との比較によって選択された被験体であることを特徴とする、組成物。

(項目 A 2 7)

被験体においてがんを治療するための、免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物であって、該被験体は、該被験体由来のサンプル中の CD 4 + CD 6 2 L ¹ o w T 細胞の量 (X) と、該被験体由来のサンプル中の CD 4 + Fox p 3 + CD 2 5 + T 細胞の量 (Y) との相対値と無効群閾値との比較によって選択された被験体であり、かつ、該被験体由来のサンプル中の CD 4 + T 細胞における Fox p 3 + CD 2 5 + T 細胞の割合が奏効群閾値以上であることを特徴とする、組成物。

20

(項目 A 2 8)

前記免疫チェックポイント阻害剤が、PD - 1 阻害剤および PD - L 1 阻害剤からなる群から選択される、項目 A 2 4 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 A 2 9)

前記 PD - 1 阻害剤は、PD - 1 と PD - L 1 との相互作用を阻害する抗 PD - 1 抗体である、項目 A 2 8 に記載の組成物。

(項目 A 3 0)

前記 PD - L 1 阻害剤は、PD - 1 と PD - L 1 との相互作用を阻害する抗 PD - L 1 抗体である、項目 A 2 8 に記載の組成物。

30

(項目 A 3 1)

前記 PD - 1 阻害剤または PD - L 1 阻害剤が、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、デュルバルマブ、アテゾリズマブまたはアベルマブである、項目 A 2 8 に記載の組成物。

(項目 A 3 2)

CD 6 2 L ¹ o w CD 4 + T 細胞を含む、癌を治療または予防するための組成物。

(項目 A 3 3)

がん免疫療法と併用するための、項目 A 3 2 に記載の組成物。

(項目 A 3 4)

前記組成物は、免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて投与されることを特徴とする、項目 A 3 2 に記載の組成物。

40

(項目 A 3 5)

前記免疫チェックポイント阻害剤は、PD - 1 阻害剤および PD - L 1 阻害剤からなる群から選択される、項目 A 3 4 に記載の組成物。

(項目 A 3 6)

前記 PD - 1 阻害剤は、PD - 1 と PD - L 1 との相互作用を阻害する抗 PD - 1 抗体である、項目 A 3 5 に記載の組成物。

(項目 A 3 7)

前記 PD - L 1 阻害剤は、PD - 1 と PD - L 1 との相互作用を阻害する抗 PD - L 1 抗

50

体である、項目 A 3 5 に記載の組成物。

(項目 A 3 8)

前記 P D - 1 阻害剤または P D - L 1 阻害剤は、ニボルマブ、ペムプロリズマブ、デュルバルマブ、アテゾリズマブまたはアベルマブを含む、項目 A 3 5 に記載の組成物。

(項目 A 3 9)

さらに、C D 6 2 L ¹ o w C D 8 + T 細胞を含む、項目 A 3 2 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 A 4 0)

がん免疫療法が奏効しないと予測された被験体において、がん免疫療法を奏効させるための、項目 A 3 2 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

(項目 A 4 1)

がん免疫療法の効果を持続させるための、項目 A 3 2 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 A 4 2)

前記 C D 6 2 L ¹ o w C D 4 + T 細胞が、前記組成物が投与される被験体由来のものである、項目 A 3 2 ~ 4 1 のいずれか 1 項に記載の組成物。

(項目 A 4 3)

C D 6 2 L ¹ o w C D 4 + T 細胞を含む癌を治療または予防するための組成物の製造方法であって、ヒト由来の T 細胞集団から C D 6 2 L ¹ o w C D 4 + T 細胞を純化する工程を含む、方法。

20

(項目 A 4 4)

前記純化する工程が、T 細胞集団から C D 6 2 L 高発現細胞を除去することを含む、項目 A 4 3 に記載の方法。

(項目 A 4 5)

C D 6 2 L ¹ o w C D 4 + T 細胞を純化するための、C D 6 2 L に特異的に結合する物質を含むキット。

【図面の簡単な説明】

【0069】

【図1】図1は、被験体から得られた末梢血サンプル中の T 細胞のフローサイトメトリーによる分画の結果を示す図である。左上は、F S C、S S C を用いた二次元解析による l y m p h o c y t e r e g i o n の同定である。右上は、C D 8 と C D 4 の発現による分画である。左下は C D 2 5 + F o x P 3 + の分画である。右下は、C D 6 2 L の発現量によるヒストグラムであり、二峰性の分布によって C D 6 2 L 低発現 (C D 6 2 L ¹ o w) 細胞が分画される。

30

【図2】図2は、実施例1における治療効果測定の手順を示す模式図である。

【図3】図3は、無効群と、それ以外とでの細胞数および組成を比較した図である。A のパネル (W B C) は、末梢血白血球 (W h i t e B l o o d C e l l) 数の比較である。B のパネル (L y m) は、リンパ球数の比較である。C のパネルは、C D 4 + 細胞比率の比較である。D のパネルは、C D 8 + 細胞比率の比較である。これらのパラメータについて無効群とそれ以外との間で有意差は認められなかった。

40

【図4】図4は、無効群と、それ以外とでの T 細胞組成を比較した図である。A のパネルは、C D 8 + T 細胞中の C D 6 2 L ¹ o w 細胞の比率の比較である。P D 群で有意に低く、P = 0 . 0 1 3 8 である。B のパネルは、C D 4 + T 細胞中の C D 6 2 L ¹ o w 細胞の比率の比較である。C D 8 + T 細胞中の C D 6 2 L ¹ o w 細胞の比率よりも、P D 群で顕著な低下が観察され、P = 5 . 3 2 × 1 0 ⁻⁷ であった。C のパネルは、C D 4 + T 細胞中の C D 2 5 + F o x P 3 + 細胞の比率の比較である。P D 群で有意に高く、P = 0 . 0 1 3 2 であった。D のパネルは、C D 8 + T 細胞中の C D 6 2 L ¹ o w 細胞の比率と、C D 4 + T 細胞中の C D 6 2 L ¹ o w 細胞の比率との散布図である。これらの値の間には弱い相関が認められた。E のパネルは、C D 4 + T 細胞中の C D 6 2 L ¹ o w 細胞の比率と、C D 4 + T 細胞中の C D 2 5 + F o x P 3 + 細胞の比率との散布図である。これらの値

50

の間には相関が認められず、それぞれが独立して、がん免疫療法の応答性に寄与していることが理解される。

【図5】図5は、 $CD4^+$ T細胞中の $CD62L^{low}$ 細胞の比率の、PR+SD群とPD群とを区別するための指標としての性能を示す。閾値を変化させた場合の感度と特異度をプロットしたものが右のパネルである。プロットした点の下の領域の面積は0.974であり、非常に優れたマーカーであることが理解される。

【図6】図6は、 $CD4^+$ T細胞中の $CD62L^{low}$ 細胞の比率の、PR+SD群とPD群とを区別するための閾値を変化させた場合の感度と特異度を示す。

【図7】図7は、 $CD4^+$ T細胞中の $CD62L^{low}$ 細胞の比率(X)と $CD4^+$ T細胞中の $CD25^+FoxP3^+$ 細胞の比率(Y)との相対値(X/Y)の、PR+SD群とPD群とを区別するための指標としての性能を示す。閾値を変化させた場合の感度と特異度をプロットしたものが右のパネルである。プロットした点の下の領域の面積は0.961であり、非常に優れたマーカーであることが理解される。

【図8】図8は、 $CD4^+$ T細胞中の $CD62L^{low}$ 細胞の比率(X)と $CD4^+$ T細胞中の $CD25^+FoxP3^+$ 細胞の比率(Y)との相対値としてX/Yを使用した場合の、PR+SD群とPD群とを区別するための閾値を変化させた場合の感度と特異度を示す。

【図9】図9は、 $CD4^+$ T細胞中の $CD62L^{low}$ 細胞の比率(X)と $CD4^+$ T細胞中の $CD25^+FoxP3^+$ 細胞の比率(Y)との相対値(X²/Y)の、PR+SD群とPD群とを区別するための指標としての性能を示す。閾値を変化させた場合の感度と特異度をプロットしたものが右のパネルである。プロットした点の下の領域の面積は1.0であり、これは、この指標が、感度、特異度ともに100%という判定が可能となる、極めて有利なマーカーであることを示している。

【図10】図10は、 $CD4^+$ T細胞中の $CD62L^{low}$ 細胞の比率(X)と $CD4^+$ T細胞中の $CD25^+FoxP3^+$ 細胞の比率(Y)との相対値としてX²/Yを使用した場合の、PR+SD群とPD群とを区別するための閾値を変化させた場合の感度と特異度を示す。

【図11】図11は、 $CD4^+$ T細胞中の $CD25^+FoxP3^+$ 細胞の比率の、PR群とSD群とを区別するための指標としての性能を示す。閾値を変化させた場合の感度と特異度をプロットしたものが右のパネルである。プロットした点の下の領域の面積は0.773である。

【図12】図12は、 $CD4^+$ T細胞中の $CD25^+FoxP3^+$ 細胞の比率の、PR群とSD群とを区別するための閾値を変化させた場合の感度と特異度を示す。

【図13】図13は、本発明の、被験体のがん免疫療法に対する応答性を改善または維持するための方法の実施形態の一例を示す模式図である。

【図14】図14は、T細胞移入を行ったマウスにおける治療効果と($CD4^+$ T細胞中の $CD62L^{low}$ 細胞)/($CD4^+$ T細胞中の $CD62L^{high}CD25^+$ 細胞)の比率との関係を示す図である。横軸はマウスにおける腫瘍播種からの日数を示し、ラベルに示される組成の細胞が移入された。縦軸は腫瘍サイズ(mm)である。左のパネルでは、矢印で示される時点で、細胞移入を受けたマウスの脾臓中の($CD4^+$ T細胞中の $CD62L^{low}$ 細胞)/($CD4^+$ T細胞中の $CD62L^{high}CD25^+$ 細胞)の比率が測定され、それぞれ下段に示すとおり値であった。右のパネルにおいては経時的にマウスの脾臓中の($CD4^+$ T細胞中の $CD62L^{low}$ 細胞)/($CD4^+$ T細胞中の $CD62L^{high}CD25^+$ 細胞)の比率が測定され、下段に示されるような推移であった。

【図15】図15は、異なる人種およびマウスの $CD62L$ 染色パターンを示した図である。Aのパネルは、白人の腫瘍ワクチンをdrainingしているリンパ節を用いたFACSであり、リンパ球領域をゲーティングし、 $CD62L$ について観察した。Cは日本人の末梢血由来単核球から同様に $CD62L$ について観察したものである。さらに、Dのパネルは、マウスのリンパ球における $CD62L$ 染色パターンであり、人種・生物種を超

10

20

30

40

50

えて類似した染色パターンが示されることが理解される。蛍光強度 (fluorescence intensity) 10^2 を境界として二峰性の分布をとる。Bのパネルは、Aのパネルの被験体の細胞群から $CD62L^{low}$ 細胞のみを磁気ビーズで分離した後の純度を示すFACSである。

【図16】図16は、骨髄樹状細胞 (mDC) における $HLA-DR^+$ 細胞の割合 (左上) および $CD80$ 細胞の割合 (右上) と、PD、SD、およびPRとの関係を示すグラフ、ならびに、形質細胞様樹状細胞 (pDC) における $HLA-DR^+$ 細胞の割合 (左下) および $CD80$ 細胞の割合 (右下) と、PD、SD、およびPRとの関係を示すグラフである。

【図17】図17は、骨髄樹状細胞 (mDC) における $HLA-DR^+$ 細胞の割合 (左上) および $CD80$ 細胞の割合 (右上) と、 $CD62L^{low} CD4^+$ T細胞との相関関係を示すグラフ、ならびに、骨髄樹状細胞 (mDC) における $HLA-DR^+$ 細胞の割合 (左下) および $CD80$ 細胞の割合 (右下) と X^2/Y (すなわち、 $CD62L^{low} CD4^+$ T細胞の量² / $CD4^+$ Foxp3^{+ $CD25^+$ T細胞) との相関関係を示すグラフである。}

10

【図18】図18は、骨髄樹状細胞 (mDC) における $HLA-DR^+$ 細胞の割合 (左上) および $CD80$ 細胞の割合 (右上) と、 $CD62L^{low} CD8^+$ T細胞に対する $CD137^+ CD62L^{low} CD8^+$ T細胞の割合を示した結果である。

【図19】図19は、 $CD62L^{low} CD4^+$ T細胞におけるLAG3陽性細胞の割合 (左) およびICOS陽性細胞の割合 (右) と、PDおよびPR+SDとの関係を示したグラフである。

20

【図20】図20は、 $CD62L^{low} CD4^+$ T細胞におけるCXCR3陽性細胞の割合 (左上)、CCR4陽性細胞の割合 (右上)、CCR6陽性細胞の割合 (左下)、および、CXCR5陽性細胞の割合 (右下) と、PDおよびPR+SDとの関係を示したグラフである。CCR4のみがマーカーとして十分な相関関係を示した ($p = 0.0250$)。

【図21】図21は、 $CD4^+$ T細胞における $CD25^+ Foxp3^+ CD4^+$ T細胞 (左上)、または、 $CD62L^{low} CD4^+$ T細胞における $ICOS^+ CD62L^{low} CD4^+$ T細胞 (右上) と、PRおよびSDとの関係を示したグラフである。下のパネルは、 $CD4^+$ T細胞における $CD25^+ Foxp3^+ CD4^+$ T細胞の割合 (W)、および $CD62L^{low} CD4^+$ T細胞における $ICOS^+ CD62L^{low} CD4^+$ T細胞の割合 (Z) の積 $W*Z$ を用いて、PR群とSD群とを区別するための $W*Z$ の閾値を変化させた場合の感度と特異度を示す。

30

【図22】図22は、本発明に関連するメカニズムを記載した模式図である。

【図23】図23は、実施例で使用した抗体を示す表である。

【図24】図24は、奏効群の判定についての、示されるバイオマーカーを単独で使した場合のロジスティック回帰を示す図である。

【図25】図25は、奏効群の判定についての、 $CD4^+$ T細胞における $CD25^+ Foxp3^+ CD4^+$ T細胞の割合 (W)、および $CD62L^{low} CD4^+$ T細胞における $ICOS^+ CD62L^{low} CD4^+$ T細胞の割合 (Z) の組み合わせにおいて、適切な式を導出するためのロジスティック回帰を示す図である。

40

【図26】図26は、ロジスティック回帰によって求めた $CD4^+$ T細胞における $CD25^+ Foxp3^+ CD4^+$ T細胞の割合 (W)、および $CD62L^{low} CD4^+$ T細胞における $ICOS^+ CD62L^{low} CD4^+$ T細胞の割合 (Z) の組み合わせの式を用いた場合のROC解析の結果を示す図である。当該式を用いることによって、単独のバイオマーカーと比較して精度の高い奏効群の判定を行うことができることが示される。

【図27】図27は、無効群の判定についての、 $CD4^+$ T細胞中の $CD62L^{low}$ 細胞の比率 (X) と $CD4^+$ T細胞中の $CD25^+ Foxp3^+$ 細胞の比率 (Y) との組み合わせにおいて、適切な式を導出するためのロジスティック回帰を示す図である。

【図28】図28は、 $CD62L^{low}$ と $CD62L^{high}$ との閾値の設定方法の一例

50

を示す図である。

【図29】図29は、CD62Lの発現量によるヒストグラムであり、CD62L低発現(CD62L^{low})細胞が明確に分離されることを示す例である。

【図30】図30は、発見用コホートおよび検証用コホートにおける治療成果の予測を示す図である。(a)患者発見コホートの患者における予測式の値。予測式 X^2/Y は、CD4⁺細胞の全集団におけるCD62L^{low}細胞(X)とCD25⁺FOXp3⁺細胞(Y)の比率に基づく。(b)発見用コホート(n=40)において無効群を予測した予測式の受信者動作特性曲線。予測式の閾値(192)における感度と特異度のパラメータはそれぞれ、85.7%および100%であった(P<0.0001)。(c)予測式の閾値(192)に基づいて無効群または有効群と診断された発見用コホート患者の無増悪生存率(PFS)曲線。(d)発見用コホートの全生存率(OS)。(e)患者の検出用コホートにおける予測式の値。これらの患者では、CT評価の前に末梢血単核細胞を試験した。(f)検証用コホート患者のPFS曲線。(g)検証用コホート患者のOS曲線。パネルaおよびeにおいて、データは、平均±平均の標準誤差として表され、記号は個々の患者からの値を示す。統計的有意差は、Studentの両側t検定(a,e)またはロジック検定(b~d,f,g)によって評価した。

10

【図31】図31は、CD62L^{low}CD8⁺T細胞におけるCD28⁺細胞の割合と、予測式(X^2/Y ; 式中、X=CD4⁺T細胞集団におけるCD62L^{low}T細胞の割合(%), Y=CD4⁺T細胞集団におけるCD25⁺FOXp3⁺T細胞の割合(%))の値との相関を示す図である(N=12)。

20

【図32】図32は、異なる治療成果を有する非小細胞肺癌患者における、T細胞亜集団の比率および予測式値の違いを示す。ニボルマブ治療後の最初の腫瘍応答性評価中の8週時点で著効群(GR)、中程度有効群(IR)および無効群(NR)であった患者(合計N=81)の3つの亜集団の末梢血サンプルからFACS(Fluorescence-activated cell sorting)を行った。CD62L^{low}CD4⁺細胞の全集団およびCD62L^{high}CD4⁺細胞の全集団におけるPD-1⁺細胞、LAG-3⁺細胞、ICOS⁺細胞の比率を、それぞれ、d~fに示す。データは、平均±平均の標準誤差として表され、記号は個々の患者からの値を示す。統計的有意差は、一元配置分散分析(ANOVA)とその後の事後検定(Benjamini, KriegerおよびYekutieliの二段階上昇法)によって評価した。

30

【図33】図33は、ニボルマブ治療に対する良好な応答性を担う遺伝子発現を示す図である。図33aは、著効群(GR)、中程度有効群(IR)および無効群(NR)からのCD62L^{high}CD4⁺およびCD62L^{low}CD4⁺T細胞間で遺伝子発現データを比較することによって得られたシグネチャである。図33bにおいては、上記シグネチャにおいて抗腫瘍免疫と関連することが周知の39種の遺伝子のうち、29種の遺伝子発現がニボルマブ治療に対する応答性の観点で示される。IRおよびNRと比較してGRで、そして、NRと比較してGRおよびIRで、比較的より高い遺伝子発現を示す遺伝子の、CD62L^{low}CD4⁺T細胞における発現の程度が示される。

【図34】図34aは、GR群、IR群およびNR群の全ての患者において共通して、CD62L^{high}CD4⁺およびCD62L^{low}CD4⁺T細胞の間で示差的な発現を示した免疫関連遺伝子を示す。記載される遺伝子は、細胞亜集団の判別において使用可能であると考えられる。図34bは、Nivolumabに対する応答に応じて、CD62L^{low}CD4⁺T細胞上で異なる発現を示した53遺伝子を示す。記載される遺伝子は、CD62L^{low}CD4⁺T細胞上でそれらの発現を調べることによって、患者群の識別のためのマーカーとして使用可能であることが理解される。著効群; GR(Good Responder)、中程度有効群; IR(Intermediate Responder)、および無効群; NR(Non-responder)。

40

【図35】図35は、マウス腫瘍モデルにおける、(1)対照群、(2)抗体群、および(3)抗体+細胞群の生存率変化を示す図である。

【発明を実施するための形態】

50

【0070】

以下に本発明を、必要に応じて、添付の図面を参照して例示の実施例により記載する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

【0071】

（定義）

本明細書において、「バイオマーカー」とは、通常の生物学的過程、病理学的過程、もしくは治療的介入に対する薬理的応答の指標として、客観的に測定され評価される特性をいう。

【0072】

本明細書において「がん」または「癌」は、互換可能に用いられ、異型性が強く、増殖が正常細胞より速く、周囲組織に破壊性に浸潤し得るあるいは転移をおこし得る悪性腫瘍またはそのような悪性腫瘍が存在する状態をいう。本発明においては、がんは固形がんおよび造血器腫瘍を含むがそれらに限定されない。

【0073】

本明細書において、「がん免疫療法」とは、生物の有する免疫機構などの生体防御機構を用いてがんを治療する方法をいう。

【0074】

本明細書において、「抗腫瘍免疫応答」とは、生体内の腫瘍に対する任意の免疫応答をいう。

【0075】

本明細書において、「抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激」とは生体内の腫瘍に対する免疫応答の過程で発生する、樹状細胞に対して刺激を与える任意の現象をいう。この刺激は、直接的ないし間接的に抗腫瘍免疫応答を生じる要因の一つとなり得る。限定されることはないが、代表的には、抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激は、 $CD4^+$ T細胞（例えば、エフェクターT細胞）によって与えられ、この刺激の結果、樹状細胞は $CD8^+$ T細胞に刺激を与え、刺激を受けた $CD8^+$ T細胞は抗腫瘍効果を発揮する。

【0076】

本明細書において、「相関」とするとは、2つの事象が統計学的に有意な相関関係を有することをいう。例えば、「Aと相関するBの相対量」とは、事象Aが発生した場合に、Bの相対量が統計学的に有意に影響を受ける（例えば、増加ないし減少すること）ことをいう。

【0077】

本明細書において、「細胞亜集団」とは、細胞集団全体の一部を構成する細胞集団をいう。

【0078】

本明細書において、細胞に関する用語「相対量」は、「割合」と互換可能に使用される。代表的には、用語「相対量」および「割合」は、特定の細胞集団（例えば、 $CD4^+$ T細胞集団）を形成する細胞の数に対する、所期の細胞亜集団（例えば、 $CD62L^{low}$ $CD4^+$ T細胞亜集団）を形成する細胞の数を意味する。

【0079】

本明細書において、「感度（sensitivity）」とは、被験体の集団の中から所期の特徴を有する被験体を選択する場合において、被験体集団に含まれる所期の特徴を有する総被験体数に対する、選択された対象中の所期の特徴を有する被験体数の割合、すなわち、（選択された対象中の所期の特徴を有する被験体数）/（被験体集団に含まれる

10

20

30

40

50

所期の特徴を有する総被験体数)をいう。

【0080】

本明細書において、「特異度(specificity)」とは、被験体の集団の中から所期の特徴を有する被験体を選択する場合において、選択された対象の総数に対する、選択された対象中の所期の特徴を有する被験体数の割合、すなわち、(選択された対象中の所期の特徴を有する被験体数)/(選択された対象の総数)をいう。

【0081】

本明細書において、「無効群」とは、がん治療を受けた場合の治療効果が、RECIST ver 1.1に従って判定した場合に、治療開始後約9週までの早期に病勢増悪(PD、Progressive disease)と判定される被験体の群をいう。無効群は、PD群、進行群、NR(Non-responder)とも称され、本明細書において互換的に使用される。

10

【0082】

本明細書において、「部分奏効群」とは、がん治療を受けた場合の治療効果が、RECIST ver 1.1に従って判定した場合に、部分奏効(PR、Partial response)と判定される被験体の群をいう。部分奏効群は、PR群とも称され、本明細書において互換的に使用される。

【0083】

本明細書において、「安定群」とは、がん治療を受けた場合の治療効果が、RECIST ver 1.1に従って判定した場合に、治療開始後約9週時点で安定(SD、Stable disease)と判定される被験体の群をいう。「安定群」は、SD群、中間群とも称され、本明細書において互換的に使用される。また、治療開始後一旦病勢制御を得た後、約1年で病勢進行に転じる群をIR(Intermediate Responder)と呼称しているが、この群のほとんどが治療開始後9週時点でSDと判定されることから、「安定群」は、IR(Intermediate Responder)群とも互換的に使用される。

20

【0084】

本明細書において、「完全奏効群」とは、がん治療を受けた場合の治療効果が、RECIST ver 1.1に従って判定した場合に、完全奏効(CR、Complete response)と判定される被験体の群をいう。「完全奏効群」は、CR群とも称され、本明細書において互換的に使用される。なお、本発明においては、被験体の集団が部分奏効群(PR)に加えて完全奏効群(CR)を含む場合であっても、あるいは部分奏効群(PR)を含まずに完全奏効群(CR)を含む場合であっても、部分奏効群(PR)と同様であるとして検出される。

30

【0085】

本明細書において、「奏効群」は、「部分奏効群」および「完全奏効群」を包括的に称する場合に用いられ、「著効群」とも称される。また、治療開始後1年以上の長期病勢制御を得られる群を、GR(Good Responder)と呼称しているが、この群のほとんどが治療開始後9週時点で「部分奏効群」または「完全奏効群」と判定されることから、「奏効群」は、GR(Good Responder)群とも互換的に使用される。

40

【0086】

本明細書において、「相対値」とは、ある値について、他の値を比較の対象として算出される値をいう。

【0087】

本明細書において使用される場合、用語「検出剤」とは、広義には、目的の物質(例えば、細胞表面マーカーなど)を検出できるあらゆる因子をいう。

【0088】

本明細書において、ある細胞亜集団の「量」とは、ある細胞の絶対数と、細胞集団における割合の相対量とを包含する。

【0089】

50

本明細書において、「閾値」とは、ある変化する値に対して設定される値であって、変化する値がそれ以上であるか、またはそれ以下である場合に何らかの意味付けを与える値をいう。本明細書において、カットオフ (cut-off) 値とも称される。

【0090】

本明細書において、「無効群閾値」とは、所与の被検体の集団において、無効群と、安定群 + 奏効群とを識別するために使用される閾値をいう。無効群閾値は、所与の被検体の集団における無効群を選択する場合に、所定の感度および特異度を達成するように選択される。

【0091】

本明細書において、「奏効群閾値」とは、所与の被検体の集団において、あるいは、無効群閾値を用いて所与の被検体の集団から無効群を除いた集団において、安定群と奏効群とを識別するために使用される閾値をいう。奏効閾値は、所与の被検体の集団において、あるいは、無効群閾値を用いて所与の被検体の集団から無効群を除いた集団において、奏効群を選択する場合に、所定の感度および特異度を達成するように選択される。

10

【0092】

本明細書において数値を修飾して用いられる場合、「約」は、記載される数値の ± 10 % までの範囲を含むことを意味して用いられる。

【0093】

本明細書において「フローサイトメトリー」とは、液体中に懸濁する細胞，個体およびその他の生物粒子の粒子数，個々の物理的・化学的・生物学的性状を計測する技術をいう。

20

【0094】

(がん免疫療法)

がん免疫療法とは、生物の有する生体防御機構を用いてがんを治療する方法である。がん免疫療法には、大きく分けて、がんに対する免疫機能を強化することによるがん免疫療法と、がんの免疫回避機能を阻害することによるがん免疫療法が存在する。さらに、がん免疫療法には、体内での免疫機能を賦活化する能動免疫療法と、体外で免疫機能を賦活化させた、または増殖させた免疫細胞を体内に戻すことによる受動免疫療法とがある。本発明のバイオマーカーは、CD4⁺T細胞免疫全体のバランスを評価するものであり、腫瘍免疫そのものを全体的に評価するものであると考えられるため、がん免疫療法全般の治療効果を広く予測することが可能なものであると考えられる。

30

【0095】

がん免疫療法の例としては、非特異的免疫賦活薬、サイトカイン療法、がんワクチン療法、樹状細胞療法、養子免疫療法、非特異的リンパ球療法、がん抗原特異的T細胞療法、抗体療法、免疫チェックポイント阻害療法などが挙げられる。限定されるものではないが、本発明のバイオマーカーは、特に、免疫チェックポイント阻害療法の治療効果を正確に予測するものであることが本明細書の実施例において実証されている。

【0096】

免疫チェックポイント阻害剤の代表的な例は、PD-1阻害剤である。PD-1阻害剤としては、抗PD-1抗体であるニボルマブ (Nivolumab; オブジーボTMとして販売されている) およびペムブロリズマブ (Pembrolizumab) が挙げられるがこれらに限定されない。1つの好ましい実施形態では、ニボルマブが対象として選択され得る。理論に束縛されることを望まないが、ニボルマブを用いた療法が好ましい一つの理由としては、本発明のバイオマーカーを用いると、応答性の被験者と非応答性被験者とを明確に識別することができることが実施例において示されており、特に、特定の閾値により明確に応答性と非応答性とを区別することができることが判明しているからである。もちろん、他のPD-1阻害剤についても同程度に本発明のバイオマーカーを利用することができると考えられる。

40

【0097】

本発明においては、PD-L1阻害剤もまたPD-1阻害剤と同様に使用することが可

50

能である。

【0098】

抗PD-1抗体は、PD-1シグナルによるT細胞活性化の抑制を解除することによって抗がん効果を奏するものと考えられている。抗PD-L1抗体もまた、PD-1シグナルによるT細胞活性化の抑制を解除することによって抗がん効果を奏するものと考えられている。PD-1がT細胞機能を阻害するメカニズムは完全には解明されていないものの、PD-1 (programmed death 1) とPD-L1あるいはPD-L2とが相互作用すると、PD-1の細胞質ドメインにチロシン脱リン酸化酵素の一種であるSHP-1, 2がリクルートされ、T細胞受容体シグナル伝達タンパク質であるZAP70を不活性化させることにより、T細胞の活性化が抑制されると考えられている (Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y. et al.: A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. Nat. Immunol., 14, 1212-1218 (2013))。これは、ITSMモチーフという部分にSHP-1, 2がリクルートされ、近傍のT cell receptorのproximal signaling kinaseを脱リン酸化することによると考えられ、換言すると、抗原刺激を受けたT細胞からこの「抗原刺激を受けた」という記憶を消してしまうとも言える。

10

【0099】

PD-1は、がん組織に浸潤しているキラーT細胞およびナチュラルキラー細胞において高レベルで発現している。また、腫瘍上のPD-L1によって、PD-1によるPD-1シグナルを介する免疫応答が減弱していると考えられている。PD-L1によって、このPD-1シグナルを介する免疫応答が減弱するが、抗PD-1抗体によってPD-1とPD-L1との相互作用および/または相互作用によって生じるシグナル伝達を阻害すると、抗腫瘍免疫応答の増強効果が得られる。

20

【0100】

免疫チェックポイント阻害剤の他の例としては、PD-L1阻害剤 (例えば、抗PD-L1抗体であるアベルマブ、デュルバルマブまたはアテゾリズマブ) が挙げられる。

【0101】

PD-L1阻害剤は、上記のPD-1経路をPD-L1の側に結合して阻害し、PD-1とPD-L1との相互作用および/または相互作用によって生じるシグナル伝達を阻害し、抗腫瘍免疫応答を生じさせる。したがって、理論に束縛されることを望まないが、実施例に示される結果から、本発明のバイオマーカーを用いると、PD-1経路を阻害する療法 (例えば、抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体) に対して応答性の被験者と非応答性被験者とを明確に識別することができるということが出来る。

30

【0102】

免疫チェックポイント阻害剤の他の例としては、CTLA-4阻害剤 (例えば、抗CTLA-4抗体であるイピリムマブまたはトレメリルマブ) が挙げられる。

【0103】

CTLA-4阻害剤は、T細胞を活性化し、抗腫瘍免疫応答を生じさせる。T細胞は、表面のCD28が、CD80またはCD86と相互作用することによって活性化される。しかしながら、一旦活性化されたT細胞であっても、表面に発現したCTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) が、CD80またはCD86と、CD20よりも高い親和性で優先的に相互作用し、それによって活性化が抑制されると考えられている。CTLA-4阻害剤は、CTLA-4を阻害することによって、CD20とCD80またはCD86との相互作用が阻害されることを防ぐことによって、抗腫瘍免疫応答を生じさせる。

40

【0104】

さらなる実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、TIM-3 (T-cell

50

immunoglobulin and mucin containing protein - 3)、LAG-3 (lymphocyte activation gene - 3)、B7-H3、B7-H4、B7-H5 (VISTA)、またはTIGIT (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domain) などの免疫チェックポイントタンパク質を標的としてもよい。

【0105】

上記のような免疫チェックポイントは、自己組織への免疫応答を抑制していると考えられるが、ウイルスなどの抗原が生体内に長期間存在する場合にもT細胞に免疫チェックポイントが増加する。腫瘍組織についても、生体内に長期間存在する抗原となっているため、これらの免疫チェックポイントによって抗腫瘍免疫応答を回避していると考えられ、上記のような免疫チェックポイント阻害剤は、このような回避機能を無効化し、抗腫瘍効果を奏する。理論に拘束されるものではないが、本発明のバイオマーカーは、ヒトの抗腫瘍免疫応答全体のバランスを評価するものであって、このような免疫チェックポイント阻害剤の治療効果を正確に予測するための指標として使用できるものと考えられる。

10

【0106】

本発明の1つの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物が提供される。免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物は、本発明のバイオマーカーによって評価して選択した被験体に投与されることにより、顕著に高確率で治療効果を得ることができる。

【0107】

本発明の免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物は、通常、全身的または局所的に、経口または非経口の形で投与される。

20

【0108】

投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、通常、例えば、成人一人あたり、1回につき、0.1mgから100mgの範囲で、1日1回から数回経口投与されるか、または成人一人あたり、1回につき、0.01mgから30mgの範囲で、1日1回から数回非経口投与（好ましくは、静脈内投与）されるか、または1日1時間から24時間の範囲で静脈内に持続投与される。もちろん、投与量は種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて必要な場合もある。

30

【0109】

免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物は、投与にあたり、経口投与のための内服用固形剤、内服用液剤、および非経口投与のための注射剤、外用剤、坐剤等の剤形をとり得る。経口投与のための内服用固形剤には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等が含まれる。カプセル剤には、ハードカプセルおよびソフトカプセルが含まれる。

【0110】

本発明の組成物は、必要に応じて、1またはそれ以上の活性成分（例えば、免疫チェックポイントタンパク質に対する抗体）がそのままか、または賦形剤（ラクトース、マンニトール、グルコース、微結晶セルロース、デンプン等）、結合剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）、崩壊剤（繊維素グリコール酸カルシウム等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム等）、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸等）等と混合され、常法に従って製剤化して用いられる。また、必要によりコーティング剤（白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）で被覆していてもよいし、また2以上の層で被覆していてもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも包含される。

40

【0111】

本発明の組成物は、経口投与のために内服用液剤として製剤化される場合、薬学的に許容される水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤等を含む。このような液剤においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質が、一般的に用いられる希釈剤（精製水、エタ

50

ノールまたはそれらの混液等)に溶解、懸濁または乳化される。さらにこの液剤は、湿潤剤、懸濁化剤、乳化剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、保存剤、緩衝剤等を含有していてもよい。

【0112】

非経口投与のための注射剤としては、溶液、懸濁液、乳濁液および用時溶剤に溶解または懸濁して用いる固形の注射剤を包含する。注射剤は、ひとつまたはそれ以上の活性物質を溶剤に溶解、懸濁または乳化させて用いられる。溶剤として、例えば注射用蒸留水、生理食塩水、植物油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エタノールのようなアルコール類等およびそれらの組み合わせが用いられる。さらにこの注射剤は、安定剤、溶解補助剤(グルタミン酸、アスパラギン酸、ポリソルベート80(登録商標)等)、懸濁化剤、乳化剤、無痛化剤、緩衝剤、保存剤等を含んでいてもよい。これらは最終工程において滅菌するか無菌操作法によって調製される。また無菌の固形剤、例えば凍結乾燥品を製造し、その使用前に無菌化または無菌の注射用蒸留水または他の溶剤に溶解して使用することもできる。

10

【0113】

(がん)

本発明において対象とされるがんとしては、メラノーマ(悪性黒色腫)、非小細胞肺癌、腎細胞癌、悪性リンパ腫(ホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫)、頭頸部癌、泌尿器科癌(膀胱癌、尿路上皮癌、前立腺癌)、小細胞肺癌、胸腺癌、胃癌、食道癌、胃食道接合部癌、肝癌(肝細胞癌、肝内胆管細胞癌)、原発性脳腫瘍(膠芽腫、中枢神経系原発リンパ腫)、悪性胸膜中皮腫、婦人科癌(卵巣癌、子宮頸癌、子宮体癌、)、軟部肉腫、胆道癌、多発性骨髄腫、乳癌、大腸癌などを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

20

【0114】

(バイオマーカー)

本発明においては、がん免疫療法の治療効果を予測するための新規なバイオマーカーが提供される。1つの局面では、被験体のT細胞組成が、がん免疫療法の治療効果を予測するための指標として用いられる。

【0115】

1つの実施形態では、被験体のT細胞組成のある指標が、奏効群閾値以上である場合に、被験体のがん免疫療法に対して奏効群であることが示される。別の実施形態では、被験体のT細胞組成のある指標が、奏効群閾値以下である場合に、被験体のがん免疫療法に対して奏効群であることが示される。さらなる実施形態では、被験体のT細胞組成のある指標が、無効群閾値以上である場合に、被験体のがん免疫療法に対して無効群であることが示される。さらなる別の実施形態では、被験体のT細胞組成のある指標が、無効群閾値以下である場合に、被験体のがん免疫療法に対して無効群であることが示される。

30

【0116】

そのような指標のそれぞれに対して、当業者は、閾値を適切に定めることができる。当業者は、本明細書に記載される閾値(無効群閾値および/または奏効群閾値)を用いることで、示されるような感度および/または特異度で、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測することが可能である。

40

【0117】

当業者は、本明細書に記載される指標について、リファレンスとなる被験体群のがん免疫療法の効果判定の結果から、所望の感度および特異度を達成するように適宜閾値を定めることができる。本明細書の実施例において実証されている被験体群は、1つのリファレンス被験体群と見ることが可能である。すなわち、本発明を実施するにあたり、当業者は、実施例に記載される実験結果から閾値を決めても、あるいは、新たにリファレンス被験体集団の結果から閾値を決めてもよい。

【0118】

感度(sensitivity)は、被験体の集団の中から所期の特徴を有する被験体

50

を選択する場合において、被験体集団に含まれる所期の特徴を有する総被験体数に対する、選択された対象中の所期の特徴を有する被験体数の割合をいう。例えば、被検体の集団に含まれる所期の特徴を有する被検体が全て選択された場合には感度は100%であり、被検体の集団に含まれる所期の特徴を有する被検体の半数が選択された場合には感度は50%であり、被検体の集団に含まれる所期の特徴を有する被検体が全く選択されなかった場合には感度は0%である。感度は、例えば、(選択された対象中の所期の特徴を有する被験体数)/(被験体集団に含まれる所期の特徴を有する総被験体数)として決定される。感度が高い判定は、ある状態(例えば、がん免疫療法に対して無効群である)である被験体を見つけ出したい場合に、そのような被験体が確実にそのような状態として判定され易いことを意味する。

10

【0119】

感度が高い判定を可能にする本発明のバイオマーカーは、例えば、ある治療に対する無効群を確実に見つけ出すことに非常に有用である。また、そのような目的に応じて、閾値を感度が高くなるように選択することが可能である。

【0120】

特異度(specificity)は、被験体の集団の中から所期の特徴を有する被験体を選択する場合において、選択された対象の総数に対する、選択された対象中の所期の特徴を有する被験体数の割合をいう。例えば、被検体集団の中から選択された候補が全て所期の特徴を有する場合には特異度は100%であり、被検体集団の中から選択された候補の半数が所期の特徴を有する場合には特異度は50%であり、被検体集団の中から選択された候補の全てが所期の特徴を有さない場合には特異度は0%である。例えば、特異度は、(選択された対象中の所期の特徴を有する被験体数)/(選択された対象の総数)として決定される。特異度が高い判定は、ある状態(例えば、がん免疫療法に対して奏効群である)ではない被験体が、誤ってそうではない状態(例えば、がん免疫療法に対して奏効群である)として判定される確率が低いことを意味する。

20

【0121】

特異度が高い判定を可能にする本発明のバイオマーカーは、例えば、ある治療に対する奏効群を誤って無効群と判定し治療を行うのを中止してしまうような判定を防ぐのに有用である。また、そのような目的に応じて、閾値を特異度が高くなるように選択することが可能である。

30

【0122】

例えば、ある指標の上昇が、がん免疫療法の効果と相関している場合に、その指標がある閾値(無効群閾値)以下であれば無効群であるという識別を行う場合、閾値を高く設定するほど、無効群であるのにも拘らず無効群ではない(すなわち、安定群または奏効群)と判定される被験体は減少する(感度が上昇)が、無効群ではない(すなわち、安定群または奏効群)のに無効群であると判定される被験体が増加する(特異度が低下)。逆に、閾値を低く設定するほど、無効群ではない(すなわち、安定群または奏効群)のに無効群であると判定される被験体が増加する(特異度が上昇)が、無効群であるのに無効群ではない(すなわち、安定群または奏効群)と判定される被験体は増加する(感度が低下)。

40

【0123】

本発明のバイオマーカーは、特異度および/または感度が非常に高くなるよう閾値を設定して用いることができ、がん免疫療法の治療効果予測において、今までにない有利なマーカーとして使用可能である。また、そのような特異度および感度の両方が非常に高くなるような閾値の範囲の中でも、当業者は、目的に応じて適切に閾値を設定することが可能である。閾値の例として、具体的な値が示されている場合であっても、目的の判定を行うことができる限り、具体的な値の近傍の値が使用可能であることは理解されるべきである。

【0124】

被験体のCD4⁺T細胞におけるCD62L^{low}T細胞の割合を、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標、例えば、無効群を選択する指標として用いる

50

ことができる。この場合、CD4⁺T細胞におけるCD62L^{low}T細胞の割合が無効群閾値よりも高いことは、非常に高い精度で該被験体ががん免疫療法に対して無効群でないことを予測可能であることが本発明者らによって見出された。

【0125】

CD4⁺T細胞におけるCD62L^{low}T細胞の割合に対する無効群閾値としては、当業者がリファレンスに基づいて適宜決定できる他、無効群閾値として、図6に示されるような閾値(Cutoff)を使用することができる。割合は以下パーセント(%)の値で表記する必要があることに留意されたい。

【0126】

例えば図6の結果では、無効群閾値として19.4を用いた場合には、CD4⁺T細胞におけるCD62L^{low}T細胞の割合を、感度92.9%、特異度96.7%で無効群かどうかを判別するためのバイオマーカーとして用いることができることが理解される。

10

【0127】

同様に図6の結果では、CD4⁺T細胞におけるCD62L^{low}T細胞の割合に対する無効群閾値として14.45以下の値(例えば、14.45、13.8、13.3、12.3、10.9)を用いた場合には、特異度100%のバイオマーカーとして無効群を予測することができる。

【0128】

CD4⁺T細胞におけるCD62L^{low}T細胞の割合に対する無効群閾値として22.55以上の値(例えば、23.1、24.1、24.8、25.05、25.45、25.95、27、28.75など)を用いた場合には、感度100%のバイオマーカーとして無効群を予測することができる。

20

【0129】

すなわち、CD4⁺T細胞におけるCD62L^{low}T細胞の割合としての無効群閾値は、約10~約30(%)の範囲であり得る。そのような無効群閾値の例としては、例えば、約10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30(%)が挙げられる。

【0130】

被験体のCD4⁺T細胞におけるFoxp3⁺CD25⁺T細胞の割合もまた、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標、例えば、無効群閾値として用いることができる。被験体由来のサンプル中の、CD4⁺T細胞におけるFoxp3⁺CD25⁺T細胞の割合が無効群閾値よりも低いことは、被験体ががん免疫療法に対して無効群でないことを示すことが本発明者らにより見出された。

30

【0131】

被験体のCD4⁺T細胞におけるFoxp3⁺CD25⁺T細胞の割合についての無効群閾値は、当業者が適宜リファレンス被験体から決定することができる。そのような無効群閾値は、約2~約4(%)の範囲であり得る。閾値の例としては、約2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9または4.0(%)が挙げられる。

40

【0132】

本明細書において記載されるT細胞組成の指標は、好ましい場合には、組み合わせて用いることができる。本発明者らによって、複数の指標が独立に応答性との相関を示していることが見出されているため、複数の指標を組み合わせて、応答性の指標として用いることにより、より予測の精度を向上させることができると考えられる。

2つ以上の指標を組み合わせて、応答性の指標とする場合には、任意の数の変数を用いた式によって表される指標を用いることができる。複数の指標(X_1 、 X_2 、 X_3 ・・・ X_n)を用いる場合、応答性の指標としては、例えば、以下が挙げられるがそれに限定されるものではない：

$$F = a_1 X_1^{b_1} + a_2 X_2^{b_2} + a_3 X_3^{b_3} \dots + a_n X_n^{b_n}$$

50

$$F = X_1^{c_1} * X_2^{c_2} * X_3^{c_3} \dots * X_n^{c_n}$$

(式中、各 a、b、c は任意の実数である)。このような式によって計算される指標の大小から、応答性の予測が可能である。本発明者らによって見出された新規な指標について、判別分析、ロジスティック回帰などによる多変量解析を行うことによって係数を決定し、被験体のがん免疫療法への応答性の指標として用いることができる。

【0133】

組み合わせる指標は制限されないが、抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関する CD4⁺T細胞亜集団の量、抗腫瘍免疫応答での CD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量、抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する CD8⁺T細胞亜集団の量、制御性T細胞または制御性T細胞と相関する CD4⁺T細胞亜集団の量、および ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量等の指標が、本発明者らによって見出されており、異なる機序から応答性を予測する指標同士を組み合わせることで、偽相関ではない応答性とのより強い相関を示す指標として用いることが可能であり得る。

10

例えば、以下：

- CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CCR7⁻CD4⁺T細胞亜集団の量、
- LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
- ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD45RA⁻CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD45RO⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- HLA-DR⁺樹状細胞亜集団の量、
- CD80⁺樹状細胞亜集団の量、
- CD86⁺樹状細胞亜集団の量、
- PD-L1⁺樹状細胞亜集団の量、
- CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量、
- CD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の量
- CD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量、
- CCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、および
- CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団の量

20

からなる群から選択される、2以上の指標、例えば、3つ、4つ、5つ、またはそれ超の指標を組み合わせることで用いることができる。

【0134】

がん免疫療法に対する応答性として、被験体のがん免疫療法に対して無効群でないことを、指標の組み合わせによって示すことが可能である。また、同様に、がん免疫療法に対する応答性として、被験体が、がん免疫療法に対する応答について奏効群であることを指標の組み合わせによって判定することも可能である。

40

【0135】

代表的には、本明細書に記載される2つの指標(X, Y)を変数とした式F(X, Y)によって、応答性を予測することが可能であり、一部の場合には、式は、XのYに対する相対値である。

【0136】

XのYに対する相対値としては、任意のXとYの関数(F(X, Y))を用いることができる。特に、Xが応答性と正に相関し、Yが応答性と負に相関していると考えられる場合、限定されるものではないが、Xに対して単調増加であり、Yに対して単調減少である、任意のXとYの関数(F(X, Y))を用いることができる。応答性を示す式は、応答性を表す2以上の変数が与えられた場合、それぞれの変数の応答性への寄与を計算するこ

50

とによって、例えば、ロジスティック回帰等によって回帰的に求めることが可能である。

応答性を示す式 $F(X, Y)$ としては、例えば、以下が挙げられるがそれに限定されるものではない：

$$F = aX^r + bY^s$$

$$F = X^r * Y^s$$

(式中、 a 、 b 、 r 、 s は任意の実数である)。

【0137】

r 、 s としては、式の簡便性のため、整数を用いることができる。一部の実施形態では、 X の Y に対する相対値の例としては、 X^n / Y^m (n および m は任意の整数)、例えば、 X / Y 、 X^2 / Y が挙げられるが、これに限定されるものではない。

10

【0138】

X 、 Y の因子がそれぞれ異なる機序から治療に対する応答性を示している場合、このように指標を組み合わせることは、応答性の予測をより正確なものとすることができる。本発明者らによる検証によって、 r および s が $-5 \sim 5$ の範囲の式を用いて、被験体のがん免疫療法への応答性を正確に予測することができたことが示されている。

【0139】

1つの実施形態では、抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する T 細胞の量を X 、制御性 T 細胞または抑制性 T 細胞と相関する $CD4^+$ T 細胞亜集団の量を Y として、被験体が、がん免疫療法に対して無効群でないことを示すことが可能である。この場合、 r および s が $-5 \sim 5$ の範囲の式を用いて、被験体のがん免疫療法への応答性を正確に予測することができたことが示されている。そのような式としては、例えば、 X / Y 、 X^2 / Y 、 X^3 / Y 、 X^4 / Y 、 X^5 / Y 、 X / Y^2 、 X^2 / Y^2 、 X^3 / Y^2 、 X^4 / Y^2 、 X^5 / Y^2 、 X / Y^3 、 X^2 / Y^3 、 X^3 / Y^3 、 X^4 / Y^3 、 X^5 / Y^3 、 X / Y^4 、 X^2 / Y^4 、 X^3 / Y^4 、 X^4 / Y^4 、 X^5 / Y^4 、 X / Y^5 、 X^2 / Y^5 、 X^3 / Y^5 、 X^4 / Y^5 、 X^5 / Y^5 等が挙げられる。

20

【0140】

本明細書の実施例においては、被験体の $CD4^+$ T 細胞における $CD62L^{low}$ T 細胞の量 (X) と、 $CD4^+$ T 細胞における $Foxp3^+ CD25^+$ T 細胞の量 (Y) との組み合わせについて、ロジスティック回帰によって $F = X^{2.475} / Y$ を指標として用いることが可能であることが示されているが、当業者は、本明細書に記載される指標について、異なる組み合わせや、異なる式を、同様の分析によって適宜導出することが可能である。

30

【0141】

回帰分析においては、組み合わせる変数の数 + 1 より多いサンプルにおける結果を用いて変数の組み合わせの式における係数を計算することができる。2つの指標の組み合わせにおける式の形を回帰分析により求める場合、少なくとも4つのサンプルにおける結果を用いて回帰分析を行う。好ましくは、20以上のサンプルにおける結果を用いて回帰分析を行う。より好ましくは、30以上のサンプルにおける結果を用いて回帰分析を行う。より多いサンプル数での回帰分析は、被験体の応答性をより正確に予測する指標の組み合わせを求めることができ得る点で有利であり得る。

40

【0142】

1つの実施形態では、被験体の $CD4^+$ T 細胞における $CD62L^{low}$ T 細胞の量 (X) と、 $CD4^+$ T 細胞における $Foxp3^+ CD25^+$ T 細胞の量 (Y) とは、組み合わせた指標として無効群閾値として用いることができ、例えば、 X に対する Y の相対値を、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標として用いることができる。

本発明では、例えば、

$CD62L^{low} CD4^+$ T 細胞亜集団の量、

$CCR7^+ CD4^+$ T 細胞亜集団の量、

$LAG-3^+ CD62L^{low} CD4^+$ T 細胞亜集団の量、

$ICOS^+ CD62L^{low} CD4^+$ T 細胞亜集団の量、

50

$CD45RA^-CD4^+$ T細胞亜集団の量、
 $CD45RO^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、
 $HLA-DR^+$ 樹状細胞亜集団の量、
 $CD80^+$ 樹状細胞亜集団の量、
 $CD86^+$ 樹状細胞亜集団の量、
 $PD-L1^+$ 樹状細胞亜集団の量、
 $CD62L^{low}CD8^+$ T細胞亜集団の量、
 $CD137^+CD8^+$ T細胞亜集団の量、および
 $CD28^+CD62L^{low}CD8^+$ T細胞亜集団の量

からなる群から選択される値を (X) として、変数 (X、Y) を計算することができる。

10

【0143】

また本発明の方法では、制御性T細胞亜集団の量または制御性T細胞と相関する $CD4^+$ T細胞亜集団の量を (Y) として、変数 (X、Y) を計算することができる。本発明の方法ではまた、

$CCR4^+CD25^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、
 $CD62L^{high}CD25^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、
 $CD127^+CD25^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、
 $CD45RA^-Foxp3^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、および
 $CD4^+Foxp3^+CD25^+$ T細胞亜集団の量

からなる群から選択される値を (Y) として、変数 (X、Y) を計算することができる。

20

【0144】

本発明はさらに、上記の (X、Y) を用いて無効群でないとは判定された被験体集団において、奏効群 (PR) と安定群 (SD) とを識別する方法を提供する。奏効群 (PR) と安定群 (SD) とを識別する方法においては、

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$ T細胞亜集団の量

を (Z) として

$CD4^+CD25^+$ T細胞亜集団の量
 $CD4^+Foxp3^+$ T細胞亜集団の量
 $CD4^+Foxp3^+CD25^+$ T細胞亜集団の量
 $CD62L^{high}CD25^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、
 $CD45RA^-Foxp3^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、
 $CCR4^+CD25^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、および
 $CD127^+CD25^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、

からなる群から選択される値を (W) として、変数 (Z、W) を計算し、被験体が奏効群 (PR) であるか、または、安定群 (SD) であるかを予測することができる。

30

【0145】

XのYに対する相対値としては、特に限定されるものではないが、Xに対して単調増加であり、Yに対して単調減少である、任意のXとYの関数 ($F(X, Y)$) を用いることができる。そのような関数として、例えば、

$F(X, Y) = G(X) / H(Y)$; または

40

$F(X, Y) = G(X) - H(Y)$

であって、 $G(X)$ および $H(Y)$ はそれぞれ X および Y に対して単調増加となる関数であり得る。例えば、 $G(X)$ は、 X^R 、 $\log_R X$ 、または R^X 等であり得る (R は条件を満たす任意の実数、好ましくは正の整数)。例えば、 $H(Y)$ は、 Y^R 、 $\log_R Y$ 、または R^Y 等であり得る (R は条件を満たす任意の実数、好ましくは正の整数)。このような形であれば、Xのがん免疫療法の治療効果に対する正の予測と、Yのがん免疫療法に対する負の予測を組み合わせて指標として予測の正確性を向上させることができる。

【0146】

XのYに対する相対値の例としては、 X^n / Y^m (n および m は任意の正の実数)、例えば、 X / Y 、 X^2 / Y が挙げられるが、これに限定されるものではない。X、Yの因子

50

がそれぞれ異なる機序から治療に対する応答性を示している場合、このように指標を組み合わせることは、応答性の予測をより正確なものとする事ができる。

【0147】

ZとWとを用いた関数としては、特に限定されるものではないが、任意のZとWの関数 ($J(Z, W)$) を用いることができる。そのような関数として、例えば、

$$J(Z, W) = K(Z) * L(W); \text{ または}$$

$$J(Z, W) = K(Z) + L(W)$$

であって、 $K(Z)$ および $L(W)$ は、代表的には、それぞれZおよびWに対して単調増加となる関数であり得る。例えば、 $K(Z)$ は、 Z^R 、 $\log_R Z$ 、または R^Z 等であり得る (R は条件を満たす任意の実数、好ましくは正の整数)。例えば、 $L(W)$ は、 W^R 、 $\log_R W$ 、または R^W 等であり得る (R は条件を満たす任意の実数、好ましくは正の整数)。 $J(Z, W)$ に基づいて、無効群における奏効群 (PR) と安定群 (SD) との判定の正確性を向上させることができる。ZのWに対する相対値の例としては、 $Z^n * W^m$ (n および m は任意の正の実数)、例えば、 $W^5 * Z$ が挙げられるが、これに限定されるものではない。W、Zの因子がそれぞれ異なる機序から治療に対する応答性を示している場合、このように指標を組み合わせることは、応答性の予測をより正確なものとする事ができる。

10

【0148】

CD4⁺T細胞におけるCD62L^{low}T細胞の量をX、CD4⁺T細胞におけるFoxp3⁺CD25⁺T細胞の量をYとした場合、X/Yを被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標として用いることができる。本発明者らは、かかるX/Yが高い被験体では、がん免疫療法に対して無効群でないことが示されることを見出した。したがって、X/Yに対する値は、無効群閾値として使用可能である。

20

【0149】

X/Yに対する無効群閾値としては、当業者がリファレンスに基づいて適宜決定できる他、閾値として、図8に示されるような値 (Cutoff) を無効群閾値として使用することができる。

【0150】

X/Yの無効群閾値として7.35を用いた場合には、X/Yを、感度71.4%、特異度100%で無効群かどうかを判別するためのバイオマーカーとして無効群を予測することができる。

30

【0151】

X/Yの無効群閾値として7.35以下の値 (例えば、7.35、6.83、6.31、5.64、5.01等) を用いた場合には、特異度100%のバイオマーカーとして無効群を予測することができる。

【0152】

X/Yの無効群閾値として9.305以上の値 (例えば、9.895、10.19、11.71、12.07、12.32、12.42など) を用いた場合には、感度100%のバイオマーカーとして無効群を予測することができる。

40

【0153】

すなわち、X/Yの無効群閾値は、約5~約13の範囲であり得る。X/Yの無効群閾値の例としては、約5、6、7、8、9、10、11、12または13が挙げられる。

【0154】

さらに、XのYに対する相対値として、 X^2/Y を被験体のがん免疫療法に対する応答を予測するための指標である無効群閾値として用いることができる。本発明者らは、かかる X^2/Y が高い被験体では、がん免疫療法に対して無効群でないことが示される可能性が非常に高いことを見出した。

【0155】

X^2/Y に対する無効群閾値は、当業者がリファレンスに基づいて適宜決定できる他、無効群閾値として、図10に示されるような閾値 (Cutoff) を使用することができる。

50

る。

【0156】

X^2 / Y に対する無効群閾値として174.3を用いた場合には、 X^2 / Y は、感度、特異度ともに100%で無効群かどうかを判別するためのバイオマーカーとして無効群を予測することができる。

【0157】

X^2 / Y に対する無効群閾値としては、それ以外の値としても、110.6、118.2、134.9、151.6、157.4、174.3、194.2、202.3、208.3等の値を用いることができる。

【0158】

すなわち、 X^2 / Y に対する無効群閾値は、約110～約210の範囲であり得る。 X^2 / Y に対する無効群閾値の例としては、約110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、または210が挙げられる。

【0159】

その他の X の Y に対する相対値についても、少なくとも本明細書に記載されるデータから、当業者は適切に閾値を設定して、マーカーとして使用することが可能である。

さらに本発明の2種類以上の指標（バイオマーカー、BM）を演算（例えば、乗算）した結果を用いて、PRとSDを区別すること（被験体が奏効群であることを示すこと）も可能である。限定されることはないが一つの実施形態において、第1のバイオマーカーを「Z」とし、第2のバイオマーカーを「W」とし、 $Z^n * W^m$ の値（ n と m は正の実数）を用いてPRとSDを区別することが可能である。また、PRとSDを区別するために3種類以上のバイオマーカーを演算（例えば、加算および/または乗算）した結果を用いることもできる。例えば、CD4⁺T細胞におけるCD25⁺Foxp3⁺CD4⁺T細胞の割合（W）、およびCD62L^{1.0}CD4⁺T細胞におけるICOS⁺CD62L^{1.0}CD4⁺T細胞の割合（Z）の積 $W * Z$ を用いてPR群とSD群とを区別する場合、 $W * Z$ の閾値を1.816とした場合、感度80%、特異度89.5%のマーカーとして利用可能であることが実証された（図21の中央下図）。あるいは、 $Z * W^5$ を用いた場合には、感度54.55%、特異度100%のマーカーとして利用可能であることが実証された。

【0160】

その他、上記のとおり任意のZとWの関数（ $J(Z, W)$ ）を用いることができる。例えば、 r および s が-5～6の範囲の $J = Z^r * W^s$ のような式を用いて、被験体のがん免疫療法への応答性を正確に予測することができ、そのような式としては、例えば、 $Z * W$ 、 $Z^2 * W$ 、 $Z^3 * W$ 、 $Z^4 * W$ 、 $Z^5 * W$ 、 $Z^6 * W$ 、 $Z * W^2$ 、 $Z^2 * W^2$ 、 $Z^3 * W^2$ 、 $Z^4 * W^2$ 、 $Z^5 * W^2$ 、 $Z^6 * W^2$ 、 $Z * W^3$ 、 $Z^2 * W^3$ 、 $Z^3 * W^3$ 、 $Z^4 * W^3$ 、 $Z^5 * W^3$ 、 $Z^6 * W^3$ 、 $Z * W^4$ 、 $Z^2 * W^4$ 、 $Z^3 * W^4$ 、 $Z^4 * W^4$ 、 $Z^5 * W^4$ 、 $Z^6 * W^4$ 、 $Z * W^5$ 、 $Z^2 * W^5$ 、 $Z^3 * W^5$ 、 $Z^4 * W^5$ 、 $Z^5 * W^5$ 、 $Z^6 * W^5$ 、 $Z * W^6$ 、 $Z^2 * W^6$ 、 $Z^3 * W^6$ 、 $Z^4 * W^6$ 、 $Z^5 * W^6$ 、 $Z^6 * W^6$ 等が挙げられる。本明細書の実施例では、例えば、ロジスティック回帰によって、CD4⁺T細胞におけるCD25⁺Foxp3⁺CD4⁺T細胞の割合（W）、およびCD62L^{1.0}CD4⁺T細胞におけるICOS⁺CD62L^{1.0}CD4⁺T細胞の割合（Z）を組み合わせた、 $Z * W^5$ を好ましい予測式として用いることができることが示されている（図25および26）が、当業者は、本明細書に記載される指標について、異なる組み合わせや、異なる式を、同様の分析によって適宜導出することが可能である。

【0161】

本明細書において、さらに提供されるものは、無効群でないとして判定された被験体集団の中で、奏効群（完全奏効+部分奏効）と、安定群（中間群）とを区別するのに用いることのできる指標である。

【0162】

CD4⁺T細胞におけるFoxp3⁺CD25⁺T細胞の割合を、無効群ではないと予

10

20

30

40

50

測された被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する指標として用いることができる。本発明者らにより、無効群ではないことが示された被験体の中で、 $CD4^+T$ 細胞における $Foxp3^+CD25^+T$ 細胞の割合が高いことは、該被験体のがん免疫療法に対する奏効群である可能性が高いことが見出された。 $CD4^+Foxp3^+CD25^+T$ 細胞は、制御性T細胞であり、免疫抑制性の性質を持つため、このような細胞の割合が高い被験体が癌免疫療法に対して応答する可能性が高いということは予想外の発見であった。

【0163】

$CD62L^{low}CD4^+T$ 細胞における $LAG-3^+CD62L^{low}CD4^+T$ 細胞亜集団の割合、または $CD62L^{low}CD4^+T$ 細胞における $PD-1^+CD62L^{low}CD4^+T$ 細胞亜集団の割合を、無効群ではないと予測された被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する指標として用いることができる。本発明者らにより、このような細胞亜集団は、奏効群（完全奏効+部分奏効）と、安定群（中間群）とを区別するのに用いることができることが示されている。

10

本発明ではまた、 $CD80^+$ 樹状細胞亜集団の量（X）を測定する工程と、 $CD28^+CD62L^{low}CD8^+T$ 細胞亜集団の量（Y）を測定する工程とを含む、XのYに対する相対値と閾値（無効群閾値）との比較を、該被験体のがん免疫療法に対して無効群でないことを予測するための指標として用いることができる。

【0164】

無効群ではないことは、本明細書において記載される任意のバイオマーカーを任意の無効群閾値を組み合わせて用いて予測することが可能であり、それらの指標について設定した閾値を無効群閾値として無効群を予測し、さらに、被験体集団（好ましくは無効群を除いた被験体集団）のがん免疫療法に対する奏効群であることを予測するための $CD4^+T$ 細胞における $Foxp3^+CD25^+T$ 細胞の割合に対する閾値を、奏効群閾値として用いることが可能である。

20

【0165】

あるいは、無効群でない判定された被験体集団において、奏効群（PR）と安定群（SD）とを識別する方法を提供する。奏効群（PR）と安定群（SD）とを識別する方法においては、

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+T$ 細胞亜集団の量を（Z）として

30

$CD4^+CD25^+T$ 細胞亜集団の量

$CD4^+Foxp3^+T$ 細胞亜集団の量

$CD4^+Foxp3^+CD25^+T$ 細胞亜集団の量

$CD62L^{high}CD25^+CD4^+T$ 細胞亜集団の量、

$CD45RA^+Foxp3^+CD4^+T$ 細胞亜集団の量、

$CCR4^+CD25^+CD4^+T$ 細胞亜集団の量、

$CD127^+CD25^+CD4^+T$ 細胞亜集団の量、

からなる群から選択される値を（W）として、変数（Z、W）を計算し、被験体が奏効群（PR）であるか、または、安定群（SD）であるかを予測することができる。

40

【0166】

$CD4^+T$ 細胞における $Foxp3^+CD25^+T$ 細胞の割合に対する奏効群閾値は、当業者がリファレンスに基づいて適宜決定できる他、奏効群閾値として、図12に示された結果から適宜選択することができる。割合は以下パーセント（%）の値で表記する場合があることに留意されたい。

【0167】

$CD4^+T$ 細胞における $Foxp3^+CD25^+T$ 細胞の割合に対する奏効群閾値として2.05を用いた場合には、 $CD4^+T$ 細胞における $Foxp3^+CD25^+T$ 細胞の割合を、感度52.6%、特異度100%で奏効群かどうかを予測するためのバイオマーカーとして用いることができる。

【0168】

50

CD4⁺T細胞におけるFoxp3⁺CD25⁺T細胞の割合に対する奏効群閾値として2.05以下の値(例えば、2.05、1.895、1.76、1.7、1.61など)を用いた場合には、特異度100%のバイオマーカーとして奏効群を予測するために用いることができる。

【0169】

CD4⁺T細胞におけるFoxp3⁺CD25⁺T細胞の割合に対する奏効群閾値として3.35以上の値(例えば、3.35、3.63、4.365など)を用いた場合には、感度100%のバイオマーカーとして奏効群を予測するために用いることができる。

【0170】

すなわち、CD4⁺T細胞におけるFoxp3⁺CD25⁺T細胞の割合に対する奏効群閾値は、約1.6~約4.4(%)の範囲であり得る。CD4⁺T細胞におけるFoxp3⁺CD25⁺T細胞の割合に対する奏効群閾値の例としては、約1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4(%)が挙げられる。

【0171】

本発明の別の局面では、上記に記載したいずれかのバイオマーカー(好ましくは、バイオマーカーの組み合わせ)によって選択した被験体にがん免疫療法を施す方法が提供される。1つの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤を、上記のいずれかのバイオマーカーが本明細書に記載されるいずれかの閾値によって示される状態となっている被験体に投与する方法が提供される。

【0172】

(細胞の分画・分離)

T細胞の分画・分離のためのサンプルは、常法によって、被験体から適切に採取することができる。例えば、被験体の末梢血、骨髄、腫瘍組織、造血組織、脾臓、正常組織、リンパ液等から行うことができる。末梢血からのサンプル採取は、非侵襲的で簡便であるため、有利であり得る。

【0173】

被験体のサンプル中のT細胞の組成は、当業者が常法によって測定することができる。通常には、サンプル中の目的とする細胞亜集団を規定するマーカー(例えば、CD4)について、陽性である細胞の数を、フローサイトメトリーなどを用いて測定することが可能である。本発明の一部の実施形態は、CD4⁺T細胞におけるCD62L^{low}T細胞の量(X)および/またはCD4⁺T細胞におけるFoxp3⁺CD25⁺T細胞の量(Y)を測定することを含む。細胞集団の組成の測定は、フローサイトメトリーを用いることが一般的であるが、その他にも、細胞を含むサンプルに対する免疫染色、抗体アレイを用いる方法、細胞を含むサンプル中でのタンパク質発現分析(例えば、ウエスタンブロット、質量分析、HPLCなど)、細胞を含むサンプル中でのmRNA発現分析(例えば、マイクロアレイ、次世代シーケンシングなど)などを用いて行ってもよい。

【0174】

CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団や、CD4⁺CD25⁺CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団等の細胞亜集団のそれぞれの細胞数を計測するには、全体の細胞からそれぞれの細胞の亜集団以外の細胞を実験的に除いておいて求めてもよい。それを実現するキットがある。たとえば、CD4⁺Effector Memory T cellアイソレーションキット、ヒト(Miltenyi Biotech社)を用いると、CD4抗体とCD62L抗体を用いずに、末梢血からCD4⁺CD62L^{low}

T細胞亜集団に相当する細胞を分離することができる。全体の生細胞数を数えて記録しておき、またこのキットを用いて得られた細胞の数を数え記録すればよい。またCD4⁺CD25⁺Regulatory T cellアイソレーションキット、ヒト(Miltenyi Biotech社)を用いると、抗FoxP3抗体を用いずにCD4⁺CD25⁺CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団に相当する細胞の数を求めることができる。FoxP3は細胞内の核に局在するので、核内の分子を染色するためのステップを省く利点がある。同様なキットとして、CD4⁺CD25⁺CD127di

10

20

30

40

50

m/-Regulatory T cellアイソレーションキット、ヒト (Militenyi Biotech社)、CD25+CD49d-Regulatory T cellアイソレーションキット、ヒト (Militenyi Biotech社) も選択できる。

【0175】

また、抗体を用いなくてもよい。抗体は、個々の細胞に発現している分子を特異的に認識して結合できるものであって、さらに抗体が細胞表面上、または細胞内で発現している分子に結合しているときに発色できるようにして検出し、発色している細胞の数を計測する。ここで、それらの細胞表面上、または細胞内で発現している分子はタンパク質であるので、そのタンパク質を発現している場合にはそれをコードしているmRNAも細胞内にできている。すなわち、個々の細胞内のmRNAを調べて、注目しているタンパク質分子をコードしているmRNAの有無を調べればよい。これを可能にしているのが、シングル・セルの遺伝子発現解析、つまり1細胞レベルのmRNA解析である。単細胞の遺伝子発現解析としては、たとえば、1)Quartz-Seqにより次世代シーケンシングを行う方法、2)Fluidigm C1 SystemやICELL8 Single-Cell Systemを用いて細胞を単離してSMART-Seq v4でライブラリー調製する方法、3)セルソーターで細胞を分離し、Ambion Single Cell-to-CTキットを用い定量PCRで計測する方法、4)CyTOF SYSTEM (Helios社) などが挙げられる。

10

【0176】

すなわち、血液を取得し、生細胞数を数え、セルソーター等で細胞を分離する。分離した個々の細胞に対し、例えば、Ambion Single Cell-to-CTキットを用い、特定の遺伝子について発現量を定量PCR法の装置で計測することができる。その結果に基づいて、個々の細胞がCD62L^{low} CD4⁺ T細胞亜集団や、CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺ T細胞亜集団のどの亜集団に該当するかを調べて、それぞれの亜集団に該当した細胞の数を数える。そして数の比(xとyの比)を求める。発現を調べる遺伝子の候補としては、TCR、CD3、CD4、CD25、CTLA4、GITR、FoxP3、STAT5、FoxO1、FoxO3、IL-10、TGFbeta、IL-35、SMAD2、SMAD3、SMAD4、CD62L^{low}、CD44、IL-7R(CD127)、IL-15R、CCR7^{low}、BLIMP1、などがある。

20

【0177】

本明細書の実施例に示されるように、CD62L^{low} CD4⁺ T細胞において、CD62L^{high} CD4⁺ T細胞よりも発現が亢進している遺伝子としては、AURAKA、CCL17、CD101、CD24、FOXF1、GZMA、GZMH、IL18RAP、IL21、IL5RA、ND2、SMAD5、SMAD7、およびVEGFAが挙げられる(図34a)。これらの遺伝子の発現を調べることによって、取得したT細胞がいずれのT細胞亜集団に属するかを判定し、細胞亜集団の量および/または割合を測定してもよい。

30

【0178】

本明細書の実施例に示されるように、CD62L^{high} CD4⁺ T細胞において、CD62L^{low} CD4⁺ T細胞よりも発現が亢進している遺伝子としては、BACH2、CCL28、CCR7、CD27、CD28、CD62L、CSNK1D、FOXP1、FOXP3、IGF1R、IL16、IL27RA、IL6R、LEF1、MAL、およびTCF7が挙げられる(図34a)。これらの遺伝子の発現を調べることによって、取得したT細胞がいずれのT細胞亜集団に属するかを判定し、細胞亜集団の量および/または割合を測定してもよい。

40

【0179】

本発明における、細胞亜集団の割合の測定、または閾値との比較は、規定されたシグナルを有する標準サンプルを用いて行ってもよい。所定の細胞亜集団に対応する蛍光シグナルを生じるように調製された標準(例えば、蛍光色素を付着させた粒子)と、細胞集団を含むサンプルとの間でのシグナルを比較し、標準との比較によって、サンプル中の細胞亜集団の量または割合を測定することができる。また、所定の閾値に対応する蛍光シグナルを生じるように調製された標準(例えば、蛍光色素を付着させた粒子)と、細胞集団を含むサンプルとの間でのシグナルを比較し、標準との比較によって、サンプル中のT細胞組

50

成における本発明のマーカーの有無もしくは量を判定することが可能である。

【0180】

本発明において、特定のマーカーについて、high（高発現）またはlow（低発現）を判定する場合、当業者は、当技術分野で一般的に用いられている発現強度の分類基準を用いて行うことができる。例えば、CD62Lについて、PE標識抗ヒトCD62L抗体を用いた場合の10E2のシグナルに対応するシグナル強度を境界として、CD62L^{low}とCD62L^{high}とを分割することが可能である。

【0181】

1つの実施形態では、CD62Lについて以下のようにhigh（高発現）またはlow（低発現）を判定することも可能である。抗CD62L抗体と同じアイソタイプのネガティブコントロールとなる抗体を用意する。ネガティブコントロールとなる抗体は、T細胞上のいかなる抗原も認識しない（結合しない）はずであるが非特異的な吸着はある。たとえば、アイソタイプコントロールとして発売されている抗体を用いる。蛍光標識も、抗CD62L抗体とネガティブコントロール抗体は同じものとしておく。調整後、それぞれの蛍光パターンを重ね合わせると、アイソタイプコントロールは蛍光量の小さい部分に1つにピーク、抗CD62L抗体は蛍光量の大きいところに1つのピークがあり、それより低いところは少しずつ蛍光量が下がっていくのが典型的なパターンである（図28）。図28において、紫の線がネガティブコントロール、線の下を薄い青で色づけたものが抗CD62L抗体による染色パターンである。この2つのパターンを比較すると、ネガティブコントロールと同じ蛍光量のところもあるが、ネガティブコントロールのピーク全体が右に移行した（=染色された）と判定される。通常これで、ほぼすべての細胞が抗体によって染色されたと判定される。

【0182】

次にlowとhighのx軸（FL4-H）上の境目の決定について考察する。図の右側はlowとhighのピークを2つ分けたとした場合を想定した模式図である。highのピークは左右対称と思われるが、lowは複合的なピークで左右対称とは考えにくい。highのピークは、FL4-Hが400程度のところに頂点がある。highのピークのFL4-Hの最大量（=A）は2,000程度である。highのピークが左右対称とすれば、ピークのあるFL4-HのところからAまでの距離と同じだけ離れていて、Aとピークを挟んで反対側に本来のhighの最小量（=B）が90程度にある。この辺りまでlowのピークと重なっているはずである。また、このhighのピークが左右対称として、Dの辺りで左右対称が崩れている。つまりDの辺りまで、lowのピークがあることを意味する、Dがlowのピークの本来の最大値と推察できる。結局、highとlowを分ける点として、lowの最大値であるDと、highの最小値であるBの中央、つまりCにおいて、highとlowを分けることができる。この値は、10E2に対応する。すなわち、highの範囲はCからAまで、lowの範囲はEからCまでとすることが可能である。それぞれの範囲とピークで作る面積が、細胞数に相当する。BD上のCの位置は、highとlowのピークの大きさの比率、ピークの鋭さ等で変わるはずであるが、Cの位置をBDの中央とした場合との違いは小さいと考えられる。

【0183】

図29にFACS分析によるCD62Lのヒストグラムを示している。10E2を境界として、極めて明瞭にCD62L^{low}が分離できることが理解される。

【0184】

本明細書において「フローサイトメトリー」とは、液体中に懸濁する細胞、個体およびその他の生物粒子の粒子数、個々の物理的・化学的・生物学的性状を計測する技術をいう。

【0185】

フローサイトメトリー技術を用いて種々の細胞の解析が行われるようになっている。特に、血液細胞の分化の判定が、フローサイトメトリー技術により可能となっている。このような分化判定は、研究用のほか診断にも利用されはじめている。

【0186】

フローサイトメトリーの利点としては、例えば、芽球の占める割合を把握しやすいこと

10

20

30

40

50

、特異性および感度が高いこと、再現性が高いこと、多数の細胞を解析することができること、所要時間が短いことなどが挙げられる。

【0187】

この技術を用いた装置は、「フローサイトメーター」という。フローサイトメーターは、細胞の均一な浮遊液より、浮遊物（細胞）の光学特性を測定する機器である。細胞は液流に乗ってレーザー光の焦点を通過するが、その通過時に毎秒500～4,000個の細胞より前方散乱光、側方散乱光、及び1つ以上の異なる波長の蛍光の光学特性を、個々の細胞について同時に測定し、それら細胞の大きさ、内部構造、及び細胞膜・細胞質・核内に存在する種々の抗原あるいは核酸量等の、生物学的特性を迅速、かつ正確に測定することができる。

10

【0188】

散乱光とは、レーザーが細胞に当たって周囲に散乱した光である。前方散乱光（Forward Scatter：FSC）はレーザー光軸に対して前方で検出し、散乱光強度は細胞の表面積に比例する。すなわち、相対的にFSCの値が大きければ細胞も大きく、FSCの値が小さければ細胞も小さいと考えられる。側方散乱光（Side Scatter：SSC）はレーザー光軸に対して90度（直角）の位置で検出し、細胞の顆粒や細胞内構造の状態に散乱光強度が比例する。すなわち、相対的にSSCの値が大きければ細胞の内部構造は複雑であり、SSCの値が小さければ細胞の内部構造は単純であると考えられる。

【0189】

フローサイトメトリーの結果は、代表的には、FSCをX軸に、SSCをY軸にとったドットプロットとして表現され得る。各細胞は図の中の一つのドット（点）で示されており、それらの位置は、FSCとSSCとの相対値によって決められる。比較的サイズが小さく内部構造が単純なリンパ球は左下部に、サイズが大きく内部に顆粒を持つ顆粒球は右上部に、またサイズは大きい内部構造が単純な単球はリンパ球と顆粒球の間に、それぞれお互いに分離した集団を作って表示される。

20

【0190】

蛍光とは、細胞に標識されている蛍光色素が照射されたレーザー光によって励起され、エネルギーを放出する際生じた光をいう。フローサイトメーター（例えば、製品名：Becton & Dickinson FACSCalibur）は、代表的には、488nmの単一波長レーザー光と635nmの単一波長レーザー光とを照射する。細胞はそれ自体も弱い蛍光を発する性質を有しているが（自家蛍光）、実際に細胞の持つ分子を蛍光を用いて特異的に検出しようとする場合は、あらかじめ何らかの形で細胞あるいはその持つ分子に蛍光色素を結合させる必要がある。例えば、FITC（Fluorescein isothiocyanate）は、488nmの励起光を吸収し、主に530nmの蛍光（緑色）を発する。抗体にあらかじめFITCを標識しておけば、細胞の表面に存在する抗原量に応じて結合する抗体量に差が生じ、その結果FITCの蛍光強度が異なってくるため、その細胞の表面に存在する抗原量を推定することができる。例示的に使用され得るFACSCaliburは、異なる蛍光波長域を検出できる4本の蛍光検出器を搭載しており、異なった波長の光を発する複数の蛍光色素を用意しておけば、最大4つの異なる抗原を同時に検出することが可能である。488nmの単一波長レーザー光によって励起されるFITC以外の蛍光色素として、PE（phycoerythrin）は主に585nmの蛍光を発し、PerCP（peridinin chlorophyll protein）およびPE-Cy5（carbocyanin-5）は主に670nmの蛍光を発する。635nmの単一波長レーザー光によって励起される蛍光色素であるAPC（allophycocyanin）は、主に670nmの蛍光を発する。これらの蛍光色素が種々の抗体と組み合わせられ、細胞の二重染色や三重染色に用いられる。Tリンパ球の表面に発現しているCD4、CD8、CD62L、CD25、Foxp3分子などを、これらと特異的に反応するモノクローナル抗体で検出することができる。

30

40

【0191】

50

厳密にいうと、フローサイトメーターには、細胞を解析するだけの機器と、解析した細胞を分取（ソーティング）することが可能な機器の2種類があり、後者は「FACS」と呼ばれる。本明細書において「FACS」とは、*fluorescence-activated cell sorter*の略で、レーザー光線を使ってリンパ球などの遊離細胞の表面抗原の解析をしたり、表面抗原の有無などによって、ある特定の細胞を分取する方法において用いられる装置をいう。

【0192】

フローサイトメトリーの結果は、ヒストグラム、ドットプロットなどで表すことができる。

【0193】

本明細書において「ヒストグラム」とは、フローサイトメーターを用いた蛍光測定において、各パラメータの光信号の強度をX軸に、細胞数をY軸にとったグラフをいう。このような形態により、総計で1万個以上の細胞を計数することが可能である。

【0194】

本明細書において「ドットプロット」とは、二種類の蛍光色素の蛍光強度をX軸とY軸にとったプロットをいう。二重染色および三重染色をした場合には、それぞれの蛍光強度をXあるいはY軸におき、個々の細胞が二次元グラフ上の一つ一つの点に対応するような表示方法を用いて解析することができる。

【0195】

例えば、末梢血もしくは骨髄液を採取後、溶血法か比重遠心法にて赤血球を除いた後に蛍光標識抗体（目的とする抗原に対する抗体とそのコントロール抗体）と反応させ、十分に洗浄してからフローサイトメトリーを用いて観察することができる。検出された散乱光や蛍光は電気信号に変換されコンピュータにより解析される。その結果は、FSCの強さは細胞の大きさを表しSSCの強さは細胞内構造を表すことによりリンパ球、単球、顆粒球を区別することが可能である。その後、必要に応じて目的とする細胞集団にゲートをかけて、それらの細胞における抗原発現様式を検討する。

【0196】

本発明の方法の実施において、当業者は、示される細胞の表面マーカーを適切に識別して、細胞を分画または計数することが可能である。

【0197】

CD抗原は、国際ワークショップによって、主にそれが認識する抗原の生化学的特徴（とくに分子量）を基準として群別（*cluster*）して分類する（*clustering*）ことが合意された。これがCD分類（*CD classification*）とよばれるもので、これにより特定の白血球分化抗原を認識する多くの種類のモノクローナル抗体は、CDに続けて番号すなわちCD番号（*CD number*）をつけた形（例えばCD1, CD2など）の統一的な名称がつけられている。

【0198】

本明細書において使用される、CDマーカーを含む細胞表面マーカーの代表例の説明を以下に示す。

【0199】

CD4（6.2）：抗原提示細胞上のMHCクラスII分子に結合しTリンパ球抗原受容体複合体の共受容体として機能する。MHCクラスII拘束性のヘルパーTリンパ球に発現する。

【0200】

CD8（6.4）：鎖と鎖のS-S結合による二量体タンパク質である。抗原提示細胞上のMHCクラスI分子に結合し、Tリンパ球抗原受容体複合体の共受容体として機能する。MHCクラスI拘束性のキラーTリンパ球に発現する。

【0201】

CD25：CD25は低親和性インターロイキン-2レセプター鎖（IL-2R）としても知られている、55kDaの糖タンパク質である。CD25は活性化したT細胞

10

20

30

40

50

、B細胞とマクロファージ、また活性化していないCD4⁺T細胞の一部にも発現しており、これは制御性T細胞として働くため、CD25は制御性T細胞のマーカーとして利用される。

【0202】

CD62L：CD62L（L-セレクチン）は、リンパ臓器に特異的に存在するhigh endothelial venule（HEV）を認識しホーミングするために必要な分子である。ナイーブT細胞はリンパ臓器を巡回して抗原提示に備えるためにこの分子を有する。ナイーブT細胞はリンパ臓器において樹状細胞により提示された抗原をT細胞レセプターで抗原認識してエフェクター型T細胞にプライミングされると同時にこのホーミング分子を失う。故に、抗原認識によるプライミングを受けクローン増殖したエフェクター型T細胞はCD62L^{low}のフェノタイプを有する。

10

【0203】

Foxp3：Foxp3は制御性T細胞（Treg）のマスター転写因子、すなわち、Tregの分化・機能発現・分化状態の維持すべてにおいて必須の役割を担う転写因子である。発現はTregにほぼ特異的であるため、Tregを同定する際のマーカー分子として一般的に用いられる。Foxp3はCD25やCTLA4の発現を上昇させ、一方でエフェクターサイトカイン（IL-2、IFN、IL-4、IL-17など）の産生を抑制する。

【0204】

PD-1は、T cell exhaustion（T細胞の疲弊）という現象と深く関わっている。この現象は、まとめると、大量、長期間存在する抗原に対するT細胞反応の減弱ということになる。一旦ナイーブT細胞が抗原提示細胞からのプライミングにより高いエフェクター機能を持ったT細胞になったとしても、大量長期の抗原提示に曝されるとPD-1 LAG-3 CD244と免疫チェックポイント分子が表出されるようになり機能を失い、最後にはアポトーシスに至ってしまう。がん細胞は「大量」「長期間」存在しているため、このシステムが稼働しているものと考えることができる。

20

【0205】

（CD62L^{low}CD4⁺T細胞移入による癌の予防/治療効果）

本発明のさらなる局面は、特定の細胞を移入することによって、がん免疫療法の治療効果を改善、または維持・継続するための方法、またはそのための組成物である。

30

【0206】

CD62L^{low}CD4⁺T細胞が、がん免疫療法に対する被験体の応答に重要であることが見出され、そのようなT細胞を用いることで、被験体のがん免疫療法に対する応答性を改善または維持することができると考えられる。本発明の1つの実施形態は、CD62L^{low}CD4⁺T細胞を含む組成物である。CD62L^{low}CD4⁺T細胞またはそれを含む組成物は、がん免疫療法と併用するために有用である。

【0207】

理論に拘束されることは望まないが、PD-1阻害剤および/またはPD-L1阻害剤により癌に対する十分な予防/治療効果が奏されない患者に対するCD62L^{low}CD4⁺T細胞移入による治療効果は、以下のように理解できる。

40

【0208】

癌細胞表面に発現するPD-L1がT細胞表面に発現するPD-1と結合すると、T細胞による抗腫瘍効果が抑制される（癌細胞による免疫逃避機構）が、抗PD-1抗体は、このPD-L1とPD-1との結合を阻害し、癌細胞による免疫逃避機構をブロックすることによってT細胞による抗腫瘍効果が発揮できるようにする抗体分子である。故に、PD-1/PD-L1結合阻害による抗腫瘍効果は主にT細胞が腫瘍を攻撃するエフェクター相で発揮され、T細胞プライミング相における効果は少ないと考えられている。すなわち、T細胞プライミングがすでになされており、十分なエフェクターT細胞が予め存在しなければPD-1、PD-L1阻害剤が抗腫瘍効果を発揮することは難しい。抗PD-1抗体により最大の抗腫瘍効果が発揮されるのは癌患者の20%~30%程度であるが、抗P

50

D - 1抗体が抗腫瘍効果を発揮する為に必要なT細胞免疫状態、及びその免疫状態を評価するための方法は不明であった。

【0209】

CD62L (L - セレクチン) は、リンパ球の「ホーミングレセプター」である。CD62Lは、ナイーブT細胞の細胞表面に発現し、リンパ節内への移動を促進する。リンパ節においてナイーブT細胞が抗原提示細胞による抗原刺激を受けると、エフェクターT細胞へと活性化され、CD62L発現量が低下し(CD62L^{low})、CD4⁺T細胞(ヘルパーT細胞)またはCD8⁺T細胞(細胞傷害性T細胞)に分化する。本発明者らは、癌抗原が不明で癌抗原特異的T細胞の同定が不可能な状況において、CD62L^{low}T細胞は癌抗原によりプライミングされたT細胞を同定する方法として極めて有効であることを見出した。マウスモデルにおいて腫瘍所属リンパ節から分離したCD62L^{low}T細胞を養子移入することで担癌マウスを治癒せしめることが可能である。このようにして分離したエフェクター型T細胞を用いた場合、CD62L^{low}CD4⁺T細胞を導入することによってより大きな抗腫瘍効果が奏された(実施例4および図14)。この実験に用いた腫瘍系を含めてほとんどの癌細胞はMHC class II抗原を表出しないため、この高いCD62L^{low}CD4⁺T細胞の抗腫瘍効果は直接の殺細胞機能ではなく、樹状細胞などの抗原提示細胞の機能を左右することでT細胞免疫全体をオーケストレートして得られていると理解される。また、CD62L^{low}CD4⁺T細胞とあわせてCD62L^{low}CD8⁺T細胞を用いた場合にも優れた抗腫瘍効果が奏された(実施例4および図14)。

10

20

【0210】

本発明者らは、総T細胞中のCD62L^{low}CD4⁺T細胞の割合と、抗PD-1抗体の抗腫瘍効果との間に明確な相関関係があること、具体的には、抗PD-1抗体による抗腫瘍効果が発揮されるためには、抗腫瘍効果を発揮するT細胞であるCD62L^{low}CD4⁺T細胞を多く含むことが必須であることを見出した。

【0211】

理論に拘束されるものではないが、この知見から、CD62L^{low}CD4⁺T細胞を多く含む癌患者の場合には、本来抗腫瘍効果を発揮するのに十分なT細胞免疫が準備されながら、PD-1/PD-L1による抗原認識シグナルの減弱により免疫回避されているものと理解される。CD62L^{low}CD4⁺T細胞は、樹状細胞などの抗原提示細胞を活性化することによりプライミング相を活性化する。また、プライミングされたCD8⁺T細胞が細胞障害機能を獲得するためにはエフェクターCD4⁺T細胞により活性化された局所抗原提示細胞からの抗原提示を受ける必要がある。この意味で、主にエフェクター相における抗原認識シグナルの減弱を回復させるPD-1/PD-L1結合阻害薬とエフェクターCD4⁺T細胞の機能は相補的な関係にあると理解される。CD62L^{low}CD4⁺T細胞を多く含まない患者では、抗PD-1抗体によって免疫逃避機構をブロックしたとしても、癌抗原を提示するべき抗原提示細胞機能が抑制されたままであり、結果として満足な抗腫瘍効果が発揮されないと考えられる。

30

【0212】

以上より、CD62L^{low}CD4⁺T細胞が少なく、そのために抗PD-1抗体による抗腫瘍効果が発揮されない患者に対しては、CD62L^{low}CD4⁺T細胞を投与することによって抗PD-1抗体による抗腫瘍効果を発揮することが可能であると考えられる。

40

【0213】

(細胞含有組成物の製造および使用)

CD62L^{low}CD4⁺T細胞を含む組成物の製造方法は、ヒト由来のT細胞集団からCD62L^{low}CD4⁺T細胞を純化する工程を含み得る。純化する工程は、T細胞集団からCD62L高発現細胞を除去すること(ネガティブセレクション)を含んでよい。CD62L^{low}CD4⁺T細胞を、抗体および/または磁気ビーズなどを用いてネガティブセレクションによって純化することは、使用しようとする細胞上に、抗体や磁気ビ

50

ーズ等の夾雑物が残らないため、好ましい。

【0214】

本発明の1つの実施形態は、CD62L^{low}CD4⁺T細胞を純化するための、CD62Lに特異的に結合する物質を含むキットである。CD62Lに特異的に結合する物質としては、限定されるものではないが、CD62Lに特異的な抗体が挙げられる。当業者は、本明細書に記載される方法に従って、例えば、フローサイトメトリーにより、本明細書に記載される特定のT細胞亜集団を単離し、増殖させることが可能である。1つの実施形態で、本明細書に記載された組成物は、CD4⁺CD62L^{low}T細胞を提供する。

【0215】

Tリンパ球は、公知の技術に従って収集して、フローサイトメトリーおよび/または免疫磁気選択などの抗体への親和結合などの公知の技術により濃縮し、または枯渇させることができる。濃縮および/または枯渇ステップ後、所望のTリンパ球のインビトロ増殖は、公知の技術(Riddleらの米国特許第6,040,177号に記載されたものが挙げられるが、それらに限定されない)または当業者に明らかであろうそれらのパリエーションに従って実行することができる。

【0216】

例えば、所望のT細胞集団または亜集団を、インビトロで最初のTリンパ球集団を培地へ加え、その後、その培地へフィーダー細胞を加え(例えば、生じる細胞集団が、増殖されるべき最初の集団における1個のTリンパ球に対して少なくとも約5個、10個、20個、または40個、またはそれ以上のフィーダー細胞を含有するように)、その培養物を(例えば、T細胞の数を増加させるのに十分な時間)インキュベートすることにより増殖させてもよい。培養物は、典型的には、Tリンパ球の成長に適している温度などの条件下でインキュベートすることができる。ヒトTリンパ球の成長について、例えば、温度は、一般的には、少なくとも摂氏約25度、好ましくは少なくとも約30度、より好ましくは約37度であろう。

【0217】

細胞は、本明細書で記載される、または当技術分野で周知の方法に従って、分離および/または増殖したのち、必要に応じて保存し、その後被験体に投与することができる。

【0218】

本発明の細胞を含む組成物における目的の細胞(例えば、CD62L^{low}CD4⁺T細胞)の量は、意図される効果を奏するように当業者が適切に決定することができるが、例えば、少なくとも 2×10^8 個、好ましくは少なくとも 6×10^8 個、より好ましくは少なくとも 2×10^9 個であり得る。

本明細書に記載される細胞を含む組成物は、目的の細胞(例えば、CD62L^{low}CD4⁺T細胞)に加えて、薬学的に許容しうるキャリアもしくは賦形剤を含み得る。本明細書において「薬学的に許容しうる」は、動物、そしてより詳細にはヒトにおける使用のため、政府の監督官庁に認可されたか、あるいは薬局方または他の一般的に認められる薬局方に列挙されていることを意味する。本明細書において使用される「キャリア」は、治療剤と一緒に投与する、培養液、移入液、灌流液、希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルを指す。本発明の細胞を含む組成物は、細胞を主成分として含むため、キャリアとしては、培養液、移入液、灌流液などの、細胞を維持し得るものが好ましい。例えば、医薬組成物を静脈内投与する場合は、生理食塩水および水性デキストロースが好ましいキャリアである。好ましくは、生理食塩水溶液、並びに水性デキストロースおよびグリセロール溶液が、注射可能溶液の液体キャリアとして使用される。医薬を経口投与する場合は、水が好ましいキャリアである。適切な賦形剤には、軽質無水ケイ酸、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルア

10

20

30

40

50

ミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩等が含まれる。組成物は、望ましい場合、少量の湿潤剤または乳化剤、あるいはpH緩衝剤もまた含有することも可能である。これらの組成物は、溶液、懸濁物、エマルジョン、錠剤、ピル、カプセル、粉末、持続放出配合物等の形を取ることも可能である。伝統的な結合剤およびキャリア、例えばトリグリセリドを用いて、組成物を座薬として配合することも可能である。経口配合物は、医薬等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリン・ナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的キャリアを含むことも可能である。適切なキャリアの例は、E. W. Martin, Remington's Pharmaceutical Science (Mark Publishing Company, Easton, U.S.A) に記載される。このような組成物は、患者に適切に投与する形を提供するように、適切な量のキャリアと一緒に、治療有効量の療法剤、好ましくは精製型のものを含有する。配合物は、投与様式に適していなければならない。これらのほか、例えば、界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含んでいてもよい。

10

【0219】

(好ましい実施形態)

本発明の1つの実施形態は、被験体における
以下：

20

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、
抗腫瘍免疫応答でのCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量、
および、

抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の量、
制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、および

ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
から選択される量を、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数(指標)
として用いる方法である。1つの実施形態において、被験体のがん免疫療法に対する応答
を予測する式の変数(指標)は、以下：

CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、

30

CCR7⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

CD45RA⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

CD45RO⁺CD4⁺T細胞亜集団の量

LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、

ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、

CCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

CD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

CD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

CD45RA⁺Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

CD4⁺CD25⁺T細胞亜集団の量

40

CD4⁺Foxp3⁺T細胞亜集団の量

Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

HLA-DR⁺樹状細胞亜集団の量、

CD80⁺樹状細胞亜集団の量、

CD86⁺樹状細胞亜集団の量、

PD-L1⁺樹状細胞亜集団の量、

CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量、

CD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の量、および

CD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量

からなる群から選択される。

50

【0220】

本発明の1つの実施形態は、被験体における以下：

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の相対量、
抗腫瘍免疫応答におけるCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の相対量、

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の相対量、
制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の相対量、および
ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の相対量、

から選択される相対量を、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数（指標）として用いる方法である。1つの実施形態において、被験体のがん免疫療法に対する
10 応答を予測する式の変数（指標）としての前記相対量は、以下：

CD4⁺T細胞中のCD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、
CD4⁺T細胞中のCCR7⁻CD4⁺T細胞亜集団の割合、
CD4⁺T細胞中のCD45RA⁻CD4⁺T細胞亜集団の割合、
CD4⁺T細胞中のCD45RO⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
CD62L^{low}CD4⁺T細胞中のLAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜
集団の割合、

CD62L^{low}CD4⁺T細胞中のICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集
20 団の割合、

CD4⁺T細胞中のCCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
CD4⁺T細胞中のCD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
CD4⁺T細胞中のCD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
CD4⁺T細胞中のCD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
CD4⁺T細胞中のCD4⁺CD25⁺T細胞亜集団の割合、
CD4⁺T細胞中のCD4⁺Foxp3⁺T細胞亜集団の割合、
CD4⁺T細胞中のFoxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、

樹状細胞におけるHLA-DR⁺樹状細胞亜集団の割合、
樹状細胞におけるCD80⁺樹状細胞亜集団の割合、
樹状細胞におけるCD86⁺樹状細胞亜集団の割合、
30 樹状細胞におけるPD-L1⁺樹状細胞亜集団の割合、

CD8⁺T細胞中のCD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の割合、
CD8⁺T細胞中のCD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の割合、および
CD62L^{low}CD8⁺T細胞中のCD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集
団の割合

からなる群から選択される。

【0221】

本発明の1つの実施形態は、被験体における以下：

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、
40 抗腫瘍免疫応答でのCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量、

抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の量、および
制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量

から選択される量を、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数（指標）
として用いる方法であって、指標となる式が閾値（無効群閾値）よりも高いことは、該被
験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを示す、方法である。1つの実施形態に
10 において、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数（指標）は、以下：

CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
50

- CCR7⁺CD4⁺T細胞亜集団の量
- CD45RA⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD45RO⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- HLA-DR⁺樹状細胞亜集団の量、
- CD80⁺樹状細胞亜集団の量、
- CD86⁺樹状細胞亜集団の量、
- PD-L1⁺樹状細胞亜集団の量、
- CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量、
- CD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の量
- CD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量、
- CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団の量
- CD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD45RA⁺Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量

10

からなる群から選択され、指標となる式が閾値（無効群閾値）よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを示す。

【0222】

本発明の1つの実施形態は、被験体における以下：

20

- 抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の相対量、
- 抗腫瘍免疫応答におけるCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の相対量、
- 抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の相対量、および

制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の相対量から選択される相対量を、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数（指標）として用いる方法であって、指標となる式が閾値（無効群閾値）よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを示す、方法である。1つの実施形態において、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数（指標）としての前記相対量は、以下：

30

- CD4⁺T細胞中のCD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、
- CD62L^{low}CD4⁺T細胞中のLAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、
- CD4⁺T細胞中のCD4⁺T細胞中のCCR7⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
- CD4⁺T細胞中のCD45RA⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
- CD4⁺T細胞中のCD45RO⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
- 樹状細胞におけるHLA-DR⁺樹状細胞亜集団の割合、
- 樹状細胞におけるCD80⁺樹状細胞亜集団の割合、
- 樹状細胞におけるCD86⁺樹状細胞亜集団の割合、
- 樹状細胞におけるPD-L1⁺樹状細胞亜集団の割合、
- CD8⁺T細胞中のCD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の割合、
- CD8⁺T細胞中のCD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の割合、
- CD62L^{low}CD8⁺T細胞中のCD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の割合、
- CD4⁺T細胞中のCD4⁺Foxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団の割合
- CD4⁺T細胞中のCD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
- CD4⁺T細胞中のCD45RA⁺Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
- CD4⁺T細胞中のCCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
- CD4⁺T細胞中のCD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合

40

50

からなる群から選択され、指標となる式が閾値（無効群閾値）よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを示す。

【0223】

本発明の1つの実施形態は、被験体における以下：

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、
抗腫瘍免疫応答でのCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量

、
抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の量、および
制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量 10

から選択される量（X，Y）を式F（X，Y）の変数（指標）として用いて、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する方法であって、式F（X，Y）が閾値（無効群閾値）よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを示す、方法である。1つの実施形態において、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数（指標）は、以下：

- CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
- LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CCR7⁻CD4⁺T細胞亜集団の量
- CD45RA⁻CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD45RO⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、 20
- HLA-DR⁺樹状細胞亜集団の量、
- CD80⁺樹状細胞亜集団の量、
- CD86⁺樹状細胞亜集団の量、
- PD-L1⁺樹状細胞亜集団の量、
- CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量、
- CD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の量、および
- CD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量

からなる群から選択される値を（X）として式F（X，Y）を計算することができる。1つの実施形態において、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数（指標）は、以下： 30

- CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団の量
- CD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
- CD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量

からなる群から選択される値を（Y）として、式F（X，Y）を計算することができる。式F（X，Y）が閾値（無効群閾値）よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを示す。

【0224】

本発明の1つの実施形態は、被験体における以下： 40

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団の相対量、
抗腫瘍免疫応答におけるCD4⁺T細胞による樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の相対量、

抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD8⁺T細胞亜集団の相対量、および

制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の相対量
から選択される量（X，Y）を式F（X，Y）の変数（指標）として用いて、該被験体の

がん免疫療法に対する応答を予測する方法であって、式F（X，Y）が閾値（無効群閾値）よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを示す、方法 50

である。1つの実施形態において、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数（指標）は、以下：

CD4⁺T細胞中のCD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 CD62L^{low}CD4⁺T細胞中のLAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のCD4⁺T細胞中のCCR7⁻CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のCD45RA⁻CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のCD45RO⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 樹状細胞におけるHLA-DR⁺樹状細胞亜集団の割合、
 樹状細胞におけるCD80⁺樹状細胞亜集団の割合、
 樹状細胞におけるCD86⁺樹状細胞亜集団の割合、
 樹状細胞におけるPD-L1⁺樹状細胞亜集団の割合
 CD8⁺T細胞中のCD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の割合、
 CD8⁺T細胞中のCD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の割合、および
 CD62L^{low}CD8⁺T細胞中のCD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の割合

10

からなる群から選択される値を（X）として式F（X，Y）を計算することができる。1つの実施形態において、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数（指標）は、以下：

CD4⁺T細胞中のCD4⁺Foxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団の割合
 CD4⁺T細胞中のCD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のCD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のCCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のCD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合

20

からなる群から選択される値を（Y）として、式F（X，Y）を計算することができる。式F（X，Y）が閾値（無効群閾値）よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを示す。

【0225】

本発明のさらなる実施形態は、被験体におけるがん免疫療法に対する応答を予測する方法であって、式F（X，Y）が閾値（無効群閾値）よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを示す、方法であり、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数（指標）は、以下：

30

CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
 LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
 CCR7⁻CD4⁺T細胞亜集団の量
 CD45RA⁻CD4⁺T細胞亜集団の量、
 CD80⁺樹状細胞亜集団の量、
 CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量、
 CD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の量、および
 CD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の量

40

からなる群から選択される値を（X）とし、
 CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団の量
 CD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、および
 CD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
 からなる群から選択される値を（Y）として、式F（X，Y）を計算することができる。

【0226】

本発明のさらなる実施形態は、被験体におけるがん免疫療法に対する応答を予測する方法であって、式F（X，Y）が閾値（無効群閾値）よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して無効群でないことを示す、方法であり、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数（指標）は、以下：

50

CD4⁺T細胞中のCD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 CD62L^{low}CD4⁺T細胞中のLAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜
 集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のCD4⁺T細胞中のCCR7⁻CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のCD45RA⁻CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 樹状細胞におけるCD80⁺樹状細胞亜集団の割合、
 CD8⁺T細胞中のCD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集団の割合、
 CD8⁺T細胞中のCD137⁺CD8⁺T細胞亜集団の割合、および
 CD62L^{low}CD8⁺T細胞中のCD28⁺CD62L^{low}CD8⁺T細胞亜集
 団の割合

10

からなる群から選択される値を(X)とし、
 CD4⁺T細胞中のCD4⁺Foxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団の割合
 CD4⁺T細胞中のCD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、および
 CD4⁺T細胞中のCD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 からなる群から選択される値を(Y)として、式F(X, Y)を計算することができる。
 【0227】

上述の式F(X, Y)は、Xに対して単調増加であり、Yに対しても単調減少である、
 任意のXとYの関数(F(X, Y))を用いることができる。応答性を示す式F(X, Y)
)としては、例えば、F = X^r * Y^s (式中、r、sは任意の実数である)が挙げられる
 。Xが応答性と正に相関し、Yが応答性と負に相関する場合には、好ましくは、rは正の
 数であり、sは負の数である。r、sとしては、式の簡便性のため、整数を用いることが
 できる。例えば、F(X, Y)は、Xⁿ * Y^m (nおよびmは任意の整数)と表すことが
 できる。本発明者らによる検証によって、rおよびsが-3~3の範囲の式を用いて、被
 験体のがん免疫療法への応答性を正確に予測することができたことが示されており、限定
 されるものではないが、例えば、X/Y、X²/Y、X * Yなどが好ましい式の形として
 挙げられる。

20

【0228】

本発明の1つの実施形態は、無効群でないと判断された被験体における
 以下：

制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、
 ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
 LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、および
 PD-1⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量
 から選択される量を、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数(指標)
 として用いる方法であって、指標となる式が閾値(奏効群閾値)よりも高いことは、該被
 験体が該がん免疫療法に対して奏効群であることを示す、方法である。1つの実施形態に
 おいて、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数(指標)は、以下：

30

ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量
 CD4⁺CD25⁺T細胞亜集団の量
 CD4⁺Foxp3⁺T細胞亜集団の量
 CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団の量
 CD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
 CD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
 CCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
 CD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
 LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、および
 PD-1⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量

40

からなる群から選択される。

【0229】

本発明の1つの実施形態は、無効群でないと判断された被験体における

50

以下：

制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の相対量、
 ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の相対量、
 LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の相対量、および
 PD-1⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の相対量から選択される相対量を、
 該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数（指標）として用いる方法であ
 って、指標となる式が閾値（奏効群閾値）よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法
 に対して奏効群であることを示す、方法である。1つの実施形態において、被験体のがん
 免疫療法に対する応答を予測する式の変数（指標）は、以下：

CD62L^{low}CD4⁺T細胞中のICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集
 団の割合、 10

CD4⁺T細胞中のCD4⁺CD25⁺T細胞亜集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のCD4⁺Foxp3⁺T細胞亜集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のCD4⁺Foxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のCD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のCD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のCCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のCD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の割合、
 CD4⁺T細胞中のLAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合、およ
 び 20

CD4⁺T細胞中のPD-1⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の割合
 からなる群から選択される。

【0230】

本発明の1つの実施形態は、無効群でないとは判断された被験体における
 以下：

制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の量、および
 ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量、
 から選択される量（W，Z）を式J（W，Z）の変数（指標）として用いて、該被験体の
 がん免疫療法に対する応答を予測する方法であって、式J（W，Z）が閾値（奏効群閾値
 ）よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して奏効群であることを示す、方法 30
 である。1つの実施形態において、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変
 数（指標）は、以下：

ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量
 を（Z）として式J（W，Z）を計算することができる。1つの実施形態において、被験
 体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数（指標）は、以下：

CD4⁺CD25⁺T細胞亜集団の量
 CD4⁺Foxp3⁺T細胞亜集団の量
 CD4⁺Foxp3⁺CD25⁺T細胞亜集団の量
 CD62L^{high}CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
 CD45RA⁻Foxp3⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、 40
 CCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、および
 CD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、

からなる群から選択される値を（W）として、式J（W，Z）を計算することができる。
 式J（W，Z）が閾値（奏効群閾値）よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対
 して奏効群であることを示す。

【0231】

本発明の1つの実施形態は、無効群でないとは判断された被験体における
 以下：

制御性T細胞または制御性T細胞と相関するCD4⁺T細胞亜集団の相対量、および
 ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の相対量、 50

から選択される量 (Z, W) を式 J (W, Z) の変数 (指標) として用いて、該被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する方法であって、式 J (W, Z) が閾値 (奏効群閾値) よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して奏効群であることを示す、方法である。1つの実施形態において、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数 (指標) は、以下:

CD62L^{low} CD4⁺ T細胞中のICOS⁺ CD62L^{low} CD4⁺ T細胞亜集団の割合

を (Z) として式 F (Z, W) を計算することができる。1つの実施形態において、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数 (指標) は、以下:

CD4⁺ T細胞中のCD4⁺ CD25⁺ T細胞亜集団の割合

10

CD4⁺ T細胞中のCD4⁺ Foxp3⁺ T細胞亜集団の割合

CD4⁺ T細胞中のCD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺ T細胞亜集団の割合

CD4⁺ T細胞中のCD62L^{high} CD25⁺ CD4⁺ T細胞亜集団の割合、

CD4⁺ T細胞中のCD45RA⁻ Foxp3⁺ CD4⁺ T細胞亜集団の割合、

CD4⁺ T細胞中のCCR4⁺ CD25⁺ CD4⁺ T細胞亜集団の割合、および

CD4⁺ T細胞中のCD127⁺ CD25⁺ CD4⁺ T細胞亜集団の割合、

からなる群から選択される値を (W) として、J (W, Z) を計算することができる。式 J (W, Z) が閾値 (奏効群閾値) よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して奏効群であることを示す。

【0232】

20

本発明のさらなる実施形態は、無効群でないと判断された被験体におけるがん免疫療法に対する応答を予測する方法であって、式 J (W, Z) が閾値 (奏効群閾値) よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して奏効群であることを示す、方法であり、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数 (指標) は、以下:

ICOS⁺ CD62L^{low} CD4⁺ T細胞亜集団の量

を (Z) とし、

CD4⁺ CD25⁺ T細胞亜集団の量

CD4⁺ Foxp3⁺ T細胞亜集団の量

CD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺ T細胞亜集団の量

CD62L^{high} CD25⁺ CD4⁺ T細胞亜集団の量、および

30

CD45RA⁻ Foxp3⁺ CD4⁺ T細胞亜集団の量、

からなる群から選択される値を (W) として、式 J (W, Z) を計算することができる。

【0233】

本発明のさらなる実施形態は、無効群でないと判断された被験体におけるがん免疫療法に対する応答を予測する方法であって、式 J (Z, W) が閾値 (奏効群閾値) よりも高いことは、該被験体が該がん免疫療法に対して奏効群であることを示す、方法であり、被験体のがん免疫療法に対する応答を予測する式の変数 (指標) は、以下:

CD62L^{low} CD4⁺ T細胞中のICOS⁺ CD62L^{low} CD4⁺ T細胞亜集団の割合

を (Z) とし、

40

CD4⁺ T細胞中のCD4⁺ CD25⁺ T細胞亜集団の割合

CD4⁺ T細胞中のCD4⁺ Foxp3⁺ T細胞亜集団の割合

CD4⁺ T細胞中のCD4⁺ Foxp3⁺ CD25⁺ T細胞亜集団の割合

CD4⁺ T細胞中のCD62L^{high} CD25⁺ CD4⁺ T細胞亜集団の割合、および

CD4⁺ T細胞中のCD45RA⁻ Foxp3⁺ CD4⁺ T細胞亜集団の割合、

からなる群から選択される値を (W) として、式 J (Z, W) を計算することができる。

【0234】

上述の式 J (Z, W) は、Z に対して単調増加であり、W に対しても単調増加である、任意の Z と W の関数 (J (Z, W)) を用いることができる。応答性を示す式 J (Z, W) としては、例えば、 $J = Z^r * W^s$ (式中、r、s は任意の実数である) が挙げられる

50

。Zが応答性と正に相関し、Wが応答性と負に相関する場合には、好ましくは、rは正の数であり、sは負の数である。r、sとしては、式の簡便性のため、整数を用いることができる。例えば、J(Z、W)は、 $Z^n * W^m$ (nおよびmは任意の実数)と表すことができる。本発明者らによる検証によって、rおよびsが-5~6の範囲の式を用いて、被験体のがん免疫療法への応答性を正確に予測することができたことが示されており、限定されるものではないが、例えば、 Z/W 、 Z^2/W 、 $Z * W$ 、 $Z * W^5$ が好ましい式の形として挙げられる。

【0235】

上記のものを含めた本明細書に記載の方法を用いて、がん免疫療法に対して無効群でないこと、および/または奏効群であることが示された被験体に、該がん免疫療法を施すことができる。がん免疫療法は、本明細書に記載の任意のものであり得る。

10

【0236】

1つの実施形態では、上記のものを含めた本明細書に記載の方法を用いて、がん免疫療法に対して無効群でないこと、および/または奏効群であることが示された被験体においてがんを治療するための組成物が提供される、組成物は、本明細書に記載される任意の有効成分を含み、本明細書に記載される任意の構成を採り得る。

【0237】

(一般技術)

本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、Sambrook J. et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harborおよびその3rd Ed. (2001); Ausubel, F.M. (1987). Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Ausubel, F.M. (1989). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience; Innis, M.A. (1990). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press; Ausubel, F.M. (1992). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Ausubel, F.M. (1995). Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Innis, M.A. et al. (1995). PCR Strategies, Academic Press; Ausubel, F.M. (1999). Short Protocols in Molecular Biology, Wiley, and annual updates; Sninsky, J.J. et al. (1999). PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic Press、別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されており、これらは本明細書において関連する部分(全部であり得る)が参考として援用される。

20

30

40

【0238】

本明細書において「または」は、文章中に列挙されている事項の「少なくとも1つ以上

50

」を採用できるときに使用される。「もしくは」も同様である。本明細書において「2つの値」の「範囲内」と明記した場合、その範囲には2つの値自体も含む。

【0239】

本明細書において引用された、科学文献、特許、特許出願などの参考文献は、その全体が、各々具体的に記載されたのと同じ程度に本明細書において参考として援用される。

【0240】

以上、本発明を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本発明を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本発明を限定する目的で提供したのではない。従って、本発明の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。

10

【実施例】

【0241】

本明細書では、以下の実施例によって本発明を例示する。

(1) [マーカーの発明の実施可能性を実証する例]

実施例1：抗PD-1抗体の治療効果とT細胞集団組成

末梢血を用いてCD62L^{low}CD4⁺T細胞、Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞を解析することで抗PD-1抗体による治療を行った場合の治療効果を予測することが可能であることを示す。

(2) [細胞移入の発明の実施可能性を実証する例]

20

実施例2：CD62L^{low}細胞を移入させる仮想例

実施例3：経過観察

患者の抗腫瘍免疫応答が、T細胞組成と関連していること、すなわち、CD62L^{low}細胞が増えると抗PD-1治療を受けている患者で抗腫瘍免疫応答が増強し腫瘍が縮小することを示す。

実施例4：マウスに対する細胞移入

マウスにおいて、CD62L^{low}CD4⁺T細胞を移入することでCD62L^{low}CD4⁺T細胞比率が増大することを示す。マウスにおいても、CD62L^{low}CD4⁺T細胞とTregの比率が上がると抗腫瘍免疫応答が増強される。

実施例5：CD62L^{low}細胞の単離・増殖

30

CD62L^{low}細胞を成功裡に単離することができ、増殖させることができることを示す。

【0242】

(実施例1：抗PD-1抗体の治療効果とT細胞集団組成)

1-1. 目的

本実施例では、末梢血を用いてCD62L^{low}CD4⁺T細胞、Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺T細胞を解析することで抗PD-1抗体による治療を行った場合の治療効果を予測することが可能であることを示すことを目的とした。抗PD-1抗体の治療効果とT細胞集団組成との関係性を調査した。

【0243】

40

1-2. 方法および材料

図2に示されるプロトコルにしたがって非小細胞肺癌患者におけるNivolumab治療の効果を調べた。

【0244】

既治療非小細胞肺癌の患者からニボルマブ治療前日に末梢血採取を行った。

【0245】

ニボルマブ治療開始後8週目で効果判定目的のCTを行い、この時点での部分奏効(PR)、安定(SD)、進行(PD)を判定した。判定基準はRECIST ver. 1.1に従った。以下の表1は患者のCharacteristicsを示す。

【表1】

表1. 患者の特徴付け(n=44)

年齢(歳)	
中央値	67
範囲	51-84
性別-数(%)	
男性	30 (68)
女性	14 (32)
組織学的診断-数(%)	
扁平	12 (27)
非扁平	32 (73)
喫煙歴-数(%)	
現在または以前に喫煙	33 (75)
喫煙歴無し	11 (25)
病期-数(%)	
c-stageIII	9 (20)
c-stageIV	26 (59)
術後再発	9 (20)
EGFRステータス-数(%)	
野生型	37 (84)
変異(エクソン19delまたはL858R)	7 (16)

10

【0246】

被験体の末梢血T細胞集団の組成を以下に示すとおり分析した。

20

【0247】

(1) 採血

単核球分離用採血管(商品名BDバキュティナ^(R)CPTTM・社名日本BD)に8mlの採血を行い室温で静かに転倒混和した。

【0248】

(2) 遠心分離(比重遠心法による単核細胞の分離)

採血後、BDバキュティナ^(R)CPTTMを1500~1800×gで15分間遠心した(遠心機名・社名クボタ)。

【0249】

(3) 回収

ゲルバリアの上にある細胞層を乱さないようにして血漿層を約半分吸引した。パストゥールピペットを用いてゲルバリア上の細胞層を回収し50mlチューブ(ファルコンチューブなど)に移した。10% fetal bovine serumを添加したphosphate-buffered balanced salt solution(10% FBS PBS)を加え30ml以上として2回遠心(400-450g×5分)・洗浄を行った。

30

【0250】

(4) 細胞数カウント

1回目の洗浄・遠心終了後、10% FBS(5630分で非働化)を添加したPBSを10ml加え、細胞を再浮遊させた。遠心管の細胞浮遊液を50μlとり、0.1%トリパンプルー溶液(50μl)と細胞浮遊液を攪拌した。Improved Neubauer血球計算盤にて細胞を用いて、細胞数をカウントした。

40

【0251】

(5) 凍結

2回目の洗浄・遠心終了後、CELL BANKERTM2(タカラバイオ社)を用いて $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6 / ml$ に細胞を再懸濁し、クライオジェニックバイアル2.0ml(コーニング社)に移した。処理後速やかに-80 deep freezer(パナソニック社)において凍結した。上記処理後24時間以降1週間以内に、液体窒素(液相下)へ移管した。

【0252】

50

(6) 培養

解凍した細胞をRPMI 1640培地(FBS 10%)で $1 \sim 5 \times 10^5 / \text{ml}$ となるよう調整し、T-25細胞培養フラスコで37 $^{\circ}\text{C}$ 5%CO₂で24~36時間培養した。

【0253】

(7) 細胞調整

細胞培養液を15ml遠心管に集め、1500rpm、10分間遠心することで細胞を遠心管の底に集めた。遠心後、上清を除去した。細胞ペレットにFACS bufferを10ml加えてピペットで細胞を再浮遊させ、再び1500rpm、10分間遠心した後、上清を吸引した。細胞数をカウントし、最終的な細胞濃度が 1.0×10^6 個/mlになるようにした。FACS buffer: 2%FBS、0.05% Azide in PBS。

10

【0254】

(8) 抗体反応

末梢血単核細胞の浮遊液をFACSチューブに0.5mlずつ入れた(1チューブあたり 5×10^5 個の細胞が入ることになる)。遠心機にて1,500rpm、5分間遠心して、細胞ペレットを残して上清のみを吸引除去した。

・チューブ1

FITC標識抗ヒトCD4抗体(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を20 μl

PE標識抗ヒトCD62L抗体(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を20 μl

20

PE-Cy5標識抗ヒトCD8抗体(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を20 μl

抗体液と細胞浮遊液を攪拌混合した。チューブを4に保ち30分が経過したら、それぞれのチューブに駒込ピペットでFACS bufferを1mlずつ加え、遠心機にて1,500rpm、5分間遠心して、上清を吸引除去した。細胞ペレットのみを残して上清を吸引した各チューブに、1% paraformaldehydeを0.5mlずつ加え細胞を浮遊させた。

・チューブ2

FITC標識抗ヒトCD4抗体(25 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を20 μl

PE-Cy5標識抗ヒトCD25抗体(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を20 μl

30

抗体液と細胞浮遊液を攪拌混合した。チューブを4に保ち30分が経過したら、それぞれのチューブにFACS bufferを1mlずつ加え、遠心機にて1,500rpm、5分間遠心して、上清を吸引除去した。Intracellular Fixation and Permeabilization buffer setTM(eBioscience)を用い、PE標識抗ヒトFOXP3抗体(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)3 μl にて細胞質内染色を行った。細胞ペレットのみを残して上清を吸引した各チューブに、1% paraformaldehydeを0.5mlずつ加え細胞を浮遊させた。

【0255】

(9) フローサイトメトリー(商品名FACS CaliburTM・社名日本BD)による解析

サンプルの測定

40

チューブ1、2の蛍光の測定を行う。

30,000個の細胞解析データを取り込む

解析

STEP1 チューブ1を解析し、FSC、SSCを用いた二次元解析を用いてlymphocyte regionを同定する。lymphocyte regionでGatingした細胞をCD4陽性分画でさらにGateし、CD62Lのヒストグラムプロットを得る(水色の領域の細胞数)。

STEP2 チューブ2を解析し、lymphocyte regionかつCD4陽性のregionでGateしたFoxp3とCD25による二次元解析データを得る。(橙色の領域の細胞数)

50

STEP 3 CD62L^{low} CD4⁺ / Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ の比を算出

計算式 STEP 1の細胞数 / STEP 2の細胞数

【0256】

フローサイトメトリーにおける細胞分画の結果の例は、図1に示される。なお、CD62L^{low}とCD62L^{high}との間でmicroarrayを行ってmRNAを測定した。本実施例ではフローサイトメトリーを用いて細胞を分画しているが、他の分別方法を用いることも可能である。

【0257】

(判定)

所定の値より低い場合、薬が効かないProgressive Diseaseとなると予測される。

10

所定の値より高い場合、STEP 4へ

STEP 4

計算式 橙色の領域の細胞数 / STEP 1におけるR1かつR2細胞数 * 100 (%)

【0258】

(判定)

所定の値より低い場合、Stable Disease (SD) となると予測される。

所定の値より高い場合、Partial Response (PR) となると予測される。

20

【0259】

得られたT細胞集団の組成と、観察された治療効果の関係について、統計的な解析を行った。

【0260】

1-3. 結果

以下の表2は、観察された患者の治療効果を示す。

【表2】

表2. Nivolumabに対する応答

8週での客観的応答-数 (%)

30

完全または部分奏効	11 (25)
安定	19 (43)
進行	14 (32)

確認された完全および部分奏効は、調査者により、the Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, version 1.1に従って評価された。

【0261】

本実施例で観察された、治療効果の割合は、checkmate 017およびcheckmate 017という第III臨床試験で得られている奏効率とほぼ同じであり、Nivolumabへの応答に偏りはないと考えられる。

40

【0262】

図3に示されるように、PR + SD群と、PD群との間で末梢血白血球数、リンパ球数、CD4⁺細胞比率、CD8⁺細胞比率に有意差はなかった。今回の被検体集団は、完全奏効 (CR) 群を含まなかった。なお、仮にCR群が存在した場合には、本発明のPR群の一部として識別される。

【0263】

CD8細胞におけるCD62L^{low}細胞の比率は、PD群で有意に低い結果となった (図4A)。しかしながら、PR + SD群とPD群とで重なっている比率の範囲が大きく、有意差検定でもp = 0.0138という値であった。これに対し、CD4⁺細胞におけるCD62L^{low}細胞の比率は、PR + SD群とPD群とで全く異なっておりほとんど重なり

50

りはなかった(図4B)。一方、CD4+細胞における制御性T細胞であるCD25+Foxp3+細胞の比率はPD群で有意に高い結果となった(図4C)。CD25+Foxp3+CD4+細胞分画は、制御性T細胞分画として扱うことができることが当技術分野ではコンセンサスとなっている。

【0264】

さらに、PD群とPR+SD群との間で差がついたこれら3つのT細胞亜集団の間の相関について解析した結果を図4のDおよびEのパネルに示した。CD62L^{low}CD8+の比率と、CD62L^{low}CD4+の比率との間には強い相関関係が認められた(図4D)。生物学的な意義としては、CD8+エフェクター数はCD4+エフェクターの制御下にあることが示唆されている。また、これは、バイオマーカーとして、何れか一方のみを使用するのが好ましいことを示している。p値が非常に小さいCD62L^{low}CD4+の比率をエフェクター側のバイオマーカーとして使用することが、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果の予測に非常に有用であることが実証される。

10

【0265】

さらに、制御性T細胞と、CD62L^{low}CD4+の比率との間には相関は認められなかった。これは、異なる機序によってそれぞれの細胞数が制御されていることを示しており、これらの双方を組み合わせるバイオマーカーとして使用することによって、治療効果の予測の精度をより高めることができることが理解される。

【0266】

バイオマーカーとして使用することができるパラメータについてさらに検討を行った結果を図5~12に示した。

20

【0267】

大きな差がついているCD62L^{low}CD4+比率のみを用いても、19.4%を閾値とすると感度92.6%、特異度96.7%というかなり良好な結果となった(図5)。様々な閾値を設定した場合の、感度・特異度を図6に示す。

【0268】

制御性T細胞と、CD62L^{low}CD4+の比率との相対値を用いた場合の予測精度について検討した。CD62L^{low}CD4+比率をX、CD25+Foxp3+CD4+細胞比率をYとした場合、PD群で異なる動きをするこの2つの因子を分子と分母に持ってきた比(X/Y)の結果が図7に示される。この指標を用いることで、制御性T細胞が非常に増加して抗腫瘍効果が見られなくなっている患者をよりはっきりと区別することができると考えられる。様々な閾値を設定した場合の、感度・特異度を図8に示す。7.35を閾値とした場合、特異度100%、感度71.4%というマーカーとなることが理解される。

30

【0269】

これらの因子の組み合わせの式については、これらの因子の治療効果への影響の重みを考慮し、N=40のサンプルにおける結果から、ロジスティック回帰を用いて適切な式を検討した。ロジスティック回帰モデルを使用して、係数を求めた結果、 $X^{2.475}/Y$ という式が導出された(図27)。かかる係数の近傍の式($X^{2\sim 3}/Y$)を用いることで応答性を正確に予測することが可能であると考えられ、例えば、 X^2/Y や、 X^3/Y といった式が使用可能と考えられる。

40

【0270】

特に、CD62L^{low}CD4+比率を2乗し、XとYとの相対値として X^2/Y を用いた場合の結果を、図9および図10に示す。感度、特異度ともに100%という非常に優れたバイオマーカーとして利用可能であることが理解される。様々な閾値を設定した場合の、感度・特異度を図10に示す。この値を用いた場合、174.3を閾値とすると、感度および特異度が100%という極めて優れたバイオマーカーとして利用可能であることが理解される。

【0271】

また、PD群を鑑別した後に、PRとSDを予測できるバイオマーカーを検討した結果

50

を図11に示す。予想外に、 $CD62L^{low}CD4^{+}$ 比率ではなく、 $CD25^{+}Foxp3^{+}CD4^{+}$ 細胞比率に差があることが見出された。また、 $CD25^{+}Foxp3^{+}CD4^{+}$ 細胞は、Tregであり、免疫抑制性の作用があることから、より抗腫瘍免疫応答が大きいPR群において $CD25^{+}Foxp3^{+}CD4^{+}$ 細胞比率が高くなっていることは予想外の結果であった。

【0272】

$CD25^{+}Foxp3^{+}CD4^{+}$ 細胞比率の閾値を2.05%とすると、感度52.8%、特異度100%でPRとSDを識別することが可能であった(図11)。様々な閾値を設定した場合の、感度・特異度を図12に示す。

【0273】

理論に拘束されることは望まないが、本発明におけるがん免疫療法の臨床効果予測のメカニズムは、以下のように理解できる：

・ $CD4^{+}$ T細胞はMHCクラスII分子を介して樹状細胞に指令を出し、指令を受けた樹状細胞は、MHCクラスI分子を介して $CD8^{+}$ T細胞に刺激を出すと理解される。この $CD4^{+}$ T細胞は、エフェクターT細胞(例えば、 $CD62L^{low}CD4^{+}$ T細胞)と制御性T細胞(例えば、 $Foxp3^{+}CD25^{+}$ T細胞)を包含するが、本発明は、 $CD62L^{low}CD4^{+}$ T細胞と $Foxp3^{+}CD25^{+}$ T細胞の両者のバランスを評価することによって、がん免疫療法の臨床効果を予測する。 $CD62L$ (L-セレクチン)は、リンパ臓器に特異的に存在するhigh endothelial venule(HEV)を認識しホーミングするために必要な分子であるが、ナイーブT細胞が抗原提示細胞からの刺激を受けるとエフェクターT細胞にプライミングされ $CD62L$ 発現が低下するので、エフェクターT細胞はホーミングしなくなる。ナイーブT細胞のエフェクターT細胞へのプライミングのマーカースとして、 $CD62L$ と同様にCCR7が挙げられ、プライミングの結果CCR7の発現量が低下する。それゆえ、 $CD62L^{low}$ の代わりにCCR7を用いることも可能である。例えば、 $CD62L^{low}CD4^{+}$ T細胞の代わりに(あるいは、それに加えて)、 $CCR7^{low}CD4^{+}$ T細胞および/または $CCR7-CD4^{+}$ T細胞を用いることができる。エフェクターT細胞の指標として使用できる細胞亜集団としては、例えば、 $CD62L^{low}CD4^{+}$ T細胞亜集団、 $CCR7-CD4^{+}$ T細胞亜集団、LAG-3 $^{+}CD62L^{low}CD4^{+}$ T細胞亜集団、ICOS $^{+}CD62L^{low}CD4^{+}$ T細胞亜集団、 $CD45RA-CD4^{+}$ T細胞亜集団、 $CD45RO^{+}CD4^{+}$ T細胞亜集団、HLA-DR $^{+}$ 樹状細胞亜集団、 $CD80^{+}$ 樹状細胞亜集団、 $CD86^{+}$ 樹状細胞亜集団、PD-L1 $^{+}$ 樹状細胞亜集団、 $CD62L^{low}CD8^{+}$ T細胞亜集団、および、および、 $CD137^{+}CD8^{+}$ T細胞亜集団からなる群から選択される細胞亜集団が挙げられるがこれらに限定されない。これら細胞亜集団の量(絶対量)および/または比率(相対量)を、エフェクターT細胞の指標として利用することが可能である。制御性T細胞の指標として使用できる細胞亜集団としては、例えば、 $CCR4^{+}CD25^{+}CD4^{+}$ T細胞亜集団の量、 $CD62L^{high}CD25^{+}CD4^{+}$ T細胞亜集団の量、 $CD127^{+}CD25^{+}CD4^{+}$ T細胞亜集団の量、 $CD45RA^{+}Foxp3^{+}CD4^{+}$ T細胞亜集団の量、 $CD4^{+}Foxp3^{+}CD25^{+}$ T細胞亜集団の量、および、ICOS $^{+}CD62L^{low}CD4^{+}$ T細胞亜集団からなる群から選択される細胞亜集団が挙げられるがこれらに限定されない。これら細胞亜集団の量(絶対量)および/または比率(相対量)を、制御性T細胞の指標として利用することが可能である。

【0274】

(実施例2：がん免疫療法の治療効果を改善または維持継続する細胞療法)

がん免疫療法による治療を開始する前に、被験体の末梢血サンプルから $CD62L^{low}CD4^{+}$ T細胞を単離し、保存する。単離した $CD62L^{low}CD4^{+}$ T細胞を、*ex vivo*で増殖させる(図13の「*ex vivo expansion*」)。単離した $CD62L^{low}CD4^{+}$ T細胞は、凍結して保存しておくことができる。

【0275】

被験体が実施例 1 に示されるような手順によって無効群ではないことが判定されている場合、例えば、図 1 3 上図のように、 $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞/ $CD25^{+}Foxp3^{+}CD4^{+}T$ 細胞の比率が高い場合には、Nivolumab のような抗 PD - 1 抗体による治療などのがん免疫療法を施す。治療中に、実施例 1 に示される手法によって、被験体の $CD4^{+}T$ 細胞組成をモニタリングする。

【0276】

ここで、被験体の $CD4^{+}T$ 細胞組成において、 $CD62L^{low}CD4^{+}$ 比率/ $CD25^{+}Foxp3^{+}CD4^{+}$ 細胞比率等の指標が低下し、無効群型の免疫状態となった場合には、*ex vivo*で増殖させた $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞を移入することで、元の免疫状態に戻し、がん免疫療法の効果を持続させる。

10

【0277】

$CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞のみを培養して移入することで保存・培養コストを抑えることができ、抗 PD - 1 抗体等の免疫チェックポイント阻害剤のみを 2 週間ごとに継続するよりも経済的である。

【0278】

また、被験体の $CD4^{+}T$ 細胞組成において、 $CD62L^{low}CD4^{+}$ 比率/ $CD25^{+}Foxp3^{+}CD4^{+}$ 細胞比率等の指標が低く、無効群であると判定された被験体（例えば、図 1 3 下図のように、 $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞/ $CD25^{+}Foxp3^{+}CD4^{+}T$ 細胞の比率が低い場合）に、被験体から単離して *ex vivo*で増殖させた $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞を移入することで、奏効型の免疫状態に変化させ、その後、Nivolumab のような抗 PD - 1 抗体によるがん免疫療法を施す。これにより、従来は抗 PD - 1 抗体によるがん免疫療法の恩恵を受けられなかった被験体においても、がん免疫療法の抗腫瘍免疫応答を生じさせることができる。

20

【0279】

（実施例 3：経過観察）

7 名の被験体について、経過を追って、 $CD62L^{low}CD4^{+}T$ 細胞比率を観察した。4 週間ごとに末梢血単核球解析を行った。

【0280】

結果は、以下の表 3 に示され、1 ~ 7 はそれぞれ異なる患者についての結果を表している。

30

【表3】

表3

	%CD4 T cells	CD62Llow CD4
1	29.6	23.6
	32.5	14.9
2	60.5	25.8
	54.4	39.9
3	40.4	43.7
	43.3	39.8
	44.8	39.7
	41.2	34.4
4	30.3	25
	33.3	28.4
	31.9	24.3
	26.4	28.5
5	39	30.2
	34.5	39.3
6	36	24.6
	33.8	32.6
7	34.3	24.6
	24.7	30.2

10

20

【0281】

1. の患者では、Nivolumab治療開始早期に腫瘍縮小が認められたが、一時期頸部リンパ節の腫大があった。PDかとも思われたが、8週間後の評価CT時点では縮小しており、PRと判定された。腫瘍増大が観察された時に、CD62L^{low}CD4⁺T細胞比率が低下していた。再び腫瘍が縮小した時点でCD62L^{low}CD4⁺T細胞比率が再上昇している。他の被験体は全て治療前からCD62L^{low}CD4⁺T細胞比率が高い状態を保っており、PRまたはSDと判定されている。

30

【0282】

実施例1の知見と併せると、CD62L^{low}CD4⁺比率が19.4%未満になるような場合には奏効しなくなると考えられるが、さらにCD62L^{low}CD4⁺T細胞比率が再び回復した場合には奏効するようになることも理解される。

【0283】

(実施例4：マウスに対する細胞移入)

腫瘍モデルマウスにおいて、CD62L^{low}CD4⁺ 2×10^6 / CD62L^{low}CD8⁺ 5×10^6 (図14A「 \square 」)、CD62L^{low}CD8⁺ 5×10^6 (図14A「 \square 」)、およびCD62L^{low}CD4⁺ 1×10^6 (図14B「 \square 」)の組成の細胞を移入した。その後、経時的に腫瘍サイズの推移を観察した。

40

【0284】

さらに、CD62L^{low}CD4⁺ 2×10^6 / CD62L^{low}CD8⁺ 5×10^6 (図14A「 \square 」)、CD62L^{low}CD8⁺ 5×10^6 (図14A「 \square 」)の細胞を移入した群と、細胞を移入しなかった群(図14A「 \circ 」)では、腫瘍播種後13日目に脾臓における(CD4⁺T細胞中のCD62L^{low}細胞) / (CD4⁺T細胞中

50

のCD62L^{high}CD25⁺細胞)の比率を測定した。CD62L^{low}CD4⁺1×10⁶の細胞を移入した群(図14B「」)では、経時的に脾臓における(CD4⁺T細胞中のCD62L^{low}細胞)/(CD4⁺T細胞中のCD62L^{high}CD25⁺細胞)の比率を測定した。マウスでは末梢血液のT細胞解析は難しく、代替として一般的に脾臓の細胞解析が用いられ、マウスの脾臓におけるT細胞解析はヒトにおけるPBM Cと同等と考えられている。CD4⁺CD62L^{high}CD25⁺のT細胞画分は、制御性T細胞(Treg)を含む画分である。

【0285】

結果は、図14に示される。13日目のT細胞組成の解析では、(CD4⁺T細胞中のCD62L^{low}細胞)/(CD4⁺T細胞中のCD62L^{high}CD25⁺細胞)の比率は、CD62L^{low}CD4⁺2×10⁶/CD62L^{low}CD8⁺5×10⁶の細胞を移入した群で10.6、CD62L^{low}CD8⁺5×10⁶の細胞を移入した群で2.94、細胞を移入しなかった群で2.70となっており、CD62L^{low}CD4⁺細胞を移入することにより、T細胞組成中のCD62L^{low}CD4⁺細胞の比率が増大していることが理解される。さらに、(CD4⁺T細胞中のCD62L^{low}細胞)/(CD4⁺T細胞中のCD62L^{high}CD25⁺細胞)の比率が高くなっているCD62L^{low}CD4⁺2×10⁶/CD62L^{low}CD8⁺5×10⁶の細胞を移入した群では、顕著な腫瘍縮小が観察されている(図14A「」)。

10

【0286】

上記の結果は、CD62L^{low}CD4⁺細胞を移入すること、および、CD62L^{low}CD4⁺細胞とCD62L^{low}CD8⁺細胞の混合物を移入することによって、抗腫瘍効果が奏されることを示す。

20

【0287】

CD62L^{low}CD4⁺1×10⁶の細胞を移入した群では、腫瘍縮小が停止した段階では、細胞移入により、CD4⁺T細胞中のCD62L^{low}細胞比率/CD4⁺T細胞中のCD62L^{high}CD25⁺細胞の比率が高くなっている(3.70-9.09)ことが分かるが、腫瘍が再増大に転じた時点では(CD4⁺T細胞中のCD62L^{low}細胞)/(CD4⁺T細胞中のCD62L^{high}CD25⁺細胞)の比率が低下(4.55)していることが分かる。この結果は、CD4⁺T細胞集団の中で腫瘍縮小効果を奏するのは、CD62L^{low}細胞であり、CD62L^{high}CD25⁺細胞のようなCD62L高発現細胞ではないこと、さらには、抗腫瘍効果を奏する細胞含有組成物からCD62L高発現細胞を除去することが好ましいことを示す。

30

【0288】

(実施例5:CD62L^{low}細胞の単離・増殖)

異なる人種およびマウスについて、CD62L染色パターンを観察した。結果は、図15に示される。Aのパネルは、白人の腫瘍ワクチンをdrainingしているリンパ節を用いたFACSであり、リンパ球領域をゲーティングし、CD62Lについて観察した。Cは日本人の末梢血由来単核球から同様にCD62Lについて観察したものである。さらに、Dのパネルは、マウスのリンパ球におけるCD62L染色パターンであり、人種・生物種を超えて類似した染色パターンが示されることが理解される。蛍光強度(fluorescence intensity)10²を境界として二峰性の分布をとる。

40

【0289】

Bのパネルは、Aのパネルの被験体の細胞群からCD62L^{low}細胞のみを磁気ビーズで分離した後の純度を示すFACSである。蛍光強度10²を超える細胞集団をほぼ完璧にdepleteすることができている。この細胞を分離した後に疑似TCR刺激を加えて低濃度IL-2存在下で培養した。細胞数を1000倍以上に増殖させることが可能であった。

【0290】

(実施例6:樹状細胞上に発現するマーカーの利用)

6-1.目的

50

抗PD-1抗体の治療効果と樹状細胞上に発現するマーカーとの関係性を調査し、樹状細胞上に発現するマーカーを用いて本発明におけるがん免疫療法の臨床効果予測に利用できるか検討した。

【0291】

6-2. 方法および材料

方法および材料は、実施例1と同様である。樹状細胞上に発現するHLA-DRおよびCD80/CD86を検出するために、図23に示す抗体を使用した。判定手法は、実施例1と同様である。

【0292】

6-3. 結果

結果を図16に示す。骨髄樹状細胞(mDC、CD141⁺CD11c⁺樹状細胞)および形質細胞様樹状細胞(pDC、CD123⁺CD11c⁺樹状細胞)におけるHLA-DR⁺細胞の割合およびCD80細胞の割合は、PD、SD、および、PRを識別するのに優れた指標であった。pDCにおけるHLA-DR、pDCにおけるCD80、mDCにおけるHLA-DR、および、mDCにおけるCD80をPD対PR+SDの判別を使用した時のp値は、それぞれ、0.0008735、0.002689351、6.87852×10⁻⁶、および、0.003033095という優れた値であった。また、図17に示すように、mDCにおけるこれらマーカーの結果は、CD62L^{low}CD4⁺T細胞の割合と相関していた。

【0293】

以上の結果から、CD4⁺T細胞(CD62L^{low}CD4⁺T細胞)を指標とする代わりに(あるいは、それに加えて)、骨髄樹状細胞(mDC)および/または形質細胞様樹状細胞(pDC)集団におけるHLA-DRおよび/またはCD80および/またはCD86を発現する細胞の数/割合を指標とすることもできる。

【0294】

(実施例7: CD8⁺T細胞上に発現するマーカーの利用)

7-1. 目的

抗PD-1抗体の治療効果とCD8⁺T細胞上に発現するマーカーとの関係性を調査し、CD8⁺T細胞上に発現するマーカーを本発明におけるがん免疫療法の臨床効果予測に利用できるか検討した。

【0295】

7-2. 方法および材料

方法および材料は、実施例1と同様である。CD8⁺T細胞上に発現する4-1BB(CD137)を検出するために、図23に示す抗体を使用した。判定手法は、実施例1と同様である。

【0296】

7-3. 結果

結果を図18に示す。骨髄樹状細胞(mDC、CD141⁺CD11c⁺樹状細胞)におけるHLA-DR⁺細胞の割合およびCD80細胞の割合は、CD62L^{low}CD8⁺T細胞上に発現するマーカー4-1BB(CD137)と相関していた。実施例6の結果と同様に実施例7の結果は、CD62L^{low}CD8⁺T細胞中の4-1BB細胞の数/割合を、CD62L^{low}CD4⁺T細胞の数/割合と同様に本発明のがん免疫療法の臨床効果予測に利用できることを示す。

【0297】

理論に拘束されることは望まないが、(1)CD4⁺T細胞はMHCクラスII分子を介して樹状細胞に指令を出し、HLA-DRおよび/またはCD80および/またはCD86を発現する樹状細胞が増加し、(2)指令を受けた樹状細胞は、MHCクラスI分子を介してCD8⁺T細胞に刺激を出し、CD62L^{low}CD137(4-1BB)⁺CD8⁺T細胞が増加する、ことから、CD62L^{low}CD4⁺T細胞の数/割合と同様に、HLA-DRおよび/またはCD80および/またはCD86を発現する樹状細胞、

10

20

30

40

50

ならびに、 $CD62L^{low}CD137(4-1BB)^+CD8^+$ T細胞の数/割合を本発明におけるがん免疫療法の臨床効果予測に使用できると考えられる。

【0298】

さらに、この一連の抗腫瘍メカニズムにおける疲弊(exhaustion)が抗PD-1抗体および抗PD-L1抗体によって復活する一方で、T細胞上のPD-1の発現は本発明の効果予測に有効ではない(データ示さず)。この結果から、樹状細胞上のPD-L1発現もまた、本発明におけるがん免疫療法の臨床効果予測に使用できると考えられる。

【0299】

(実施例8： $CD4^+$ T細胞上に発現する他のマーカーの利用)

10

8-1. 目的

$CD4^+$ T細胞上に発現する $CD62L$ 以外のマーカーを治療効果予測に利用できるか検討した。

【0300】

8-2. 方法および材料

方法および材料は、実施例1と同様である。 $CD4^+$ T細胞上に発現する各種マーカーを検出するために、図23に示す抗体を使用した。判定手法は、実施例1と同様である。

【0301】

8-3. 結果

結果を図19および図20に示す。 $CXCR3$ 、 $CCR6$ 、および、 $CXCR5$ と比較して、 $CD4^+$ T細胞上に発現する $LAG3$ 、 $ICOS$ 、および $CCR4$ のいずれも本発明におけるがん免疫療法の臨床効果予測により有効に使用できると考えられる。

20

【0302】

(実施例9：PRとSDを分ける他のマーカー)

9-1. 目的

実施例1では、 $CD25+Foxp3+CD4+$ 細胞比率がPRとSDを分ける優れたマーカーであることが示された。PRとSDを分ける他のマーカーについて検討した。

【0303】

9-2. 方法および材料

方法および材料は、実施例1と同様である。 $CD4^+$ T細胞上に発現する $ICOS$ を検出するために、以下の抗体を使用した。マーカーは、実施例8で使用した抗体と同一である。判定手法は、実施例1と同様である。

30

【0304】

9-3. 結果

図21に示す結果から明らかなように、 $CD4^+$ T細胞上に発現する $ICOS$ は、 $Foxp3+CD25^+$ よりもさらに優れたマーカーであることが判明した。さらに、 $CD4^+$ T細胞における $CD25^+Foxp3+CD4^+$ T細胞の割合(W)、および $CD62L^{low}CD4^+$ T細胞における $ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$ T細胞の割合(Z)を、積 $Z*W$ として組み合わせて用いてPR群とSD群とを区別する場合、 $Z*W$ の閾値を1.816とすると、感度80%、特異度89.5%のマーカーとして利用可能であることが判明した(図21)。またこの結果は、本発明の2種類以上のWを演算(例えば、乗算)した結果を用いて、PRとSDを区別することも可能であることを示す。限定されることはないが一つの実施形態において、

40

$ICOS^+CD62L^{low}CD4^+$ T細胞亜集団の量を(Z)として

$CD4^+CD25^+$ T細胞亜集団の量

$CD4^+Foxp3^+$ T細胞亜集団の量

$CD4^+Foxp3^+CD25^+$ T細胞亜集団の量

$CD62L^{high}CD25^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、

$CD45RA^+Foxp3^+CD4^+$ T細胞亜集団の量、

50

CCR4⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
 CD127⁺CD25⁺CD4⁺T細胞亜集団の量、
 からなる群から選択される値を(W)として、変数(Z、W)、例えば、Z*WまたはZⁿ*W^m(nおよびmは、それぞれ正の実数)の値を用いてPRとSDを区別することが可能である。また、PRとSDを区別するために3種類以上のバイオマーカーを演算(例えば、加算および/または乗算)した結果を用いることもできる。

【0305】

さらに詳細な指標の式を導出するため、ロジスティック回帰を行い、CD4⁺T細胞におけるCD25⁺Foxp3⁺CD4⁺T細胞の割合(W)、およびCD62L^{low}CD4⁺T細胞におけるICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞の割合(Z)を組み合わせた式をさらに検討した。

10

【0306】

図24および25に示されるように、N=32のサンプルにおける結果から、J=Z*W⁵という式が導出された。J=Z*W⁵の式を指標として、PRとSDの分離を行ったところ、Z、Wのそれぞれと比較して能力が改善されていることが、ROC解析により示された(図26)。この他、類似した形の式、J=Z*W⁴⁻⁶を用いることで、PRとSDの分離を成功裡に行うことができると考えられる。

【0307】

CD4⁺T細胞は、PD-1/PD-L1遮断治療のNRを予測するために重要であるので、発明者らは次に、CD4⁺T細胞上での、PD-1およびLAG-3の発現が、PR群とSD群とを識別するマーカーとなるかを、ICOSの発現に加えてさらに検証した。活性型T細胞上に発現されるリンパ球活性化遺伝子3(LAG-3)タンパク質は、T細胞においてPD-1と相互作用して、T細胞の消耗を維持する。LAG-3は、MHCクラスII抗原と結合し、抗原活性化後に拡大したエフェクターT細胞集団のサイズを調節する(28-30 Hui, E., et al. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. Science 355, 1428-1433 (2017); Baixeras, E., et al. Characterization of the lymphocyte activation gene 3-encoded protein. A new ligand for human leukocyte antigen class II antigens. J Exp Med 176, 327-337 (1992); Workman, C.J., et al. Lymphocyte activation gene-3 (CD223) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo. J Immunol 172, 5450-5455 (2004))。したがって、発明者らは、ゲーティングしたCD62L^{high}およびCD62L^{low}CD4⁺T細胞上のPD-1、LAG-3およびICOSの発現を調べた。

20

30

【0308】

結果を図32に示した。これらの分子は、CD62L^{low}CD4⁺T細胞上では発現されたが、CD62L^{high}CD4⁺T細胞上では最小限にしか検出されなかった(図32d~e)。特筆すべきことに、一元配置分散分析(ANOVA)後の事後検定は、IR(SD)が、CD62L^{low}CD4⁺T細胞集団全体において、GR(PR)およびNRと比較して有意に低いPD-1⁺細胞、LAG-3⁺細胞およびICOS⁺細胞の比率を有することを示した(図32a~c)。IRはおそらく、GRのものとは異なるCD4⁺T細胞免疫状態を有することから、これらの細胞亜集団の量を用いてPRをSDと区別することが可能である。

40

【0309】

本実施例の結果から、ICOS⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞に加えて、LAG-3⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞およびPD-1⁺CD62L^{low}CD4⁺T細胞亜集団の量/割合が、PRをSDと区別するマーカーとして使用可能であることが理解される。

【0310】

(実施例10:生存分析)

50

10 - 1 . 概要

予測式 (X ² / Y ; 式中、 X = C D 4 + T細胞集団における C D 6 2 L ¹ o w T細胞の割合 (%)、 Y = C D 4 + T細胞集団における C D 2 5 + F O X P 3 + T細胞の割合 (%)) による治療効果の予測をさらに実証するため、治療効果 (P D、 S D、 C R) を判定した発見用コホート (実施例 1 で対象とした患者集団の一部) において、その後の生存期間の分析を行った。また、予測式の分析が腫瘍応答性の評価の前になされた 4 1 人の治療継続患者から構成される独立した検証用コホートにおいて、予測式が N R (P D) を区別できたかどうかを調査した。

【 0 3 1 1 】

10 - 2 . 材料および方法

発見用コホートおよび検証用コホートに含まれる患者群の特性は、以下の表に示すとおりであった。各患者についての予測式の値の算出は、実施例 1 に記載される手順に従った。

【表 4】

a. Patient characteristics

Discovery cohort; n = 40		Validation cohort; n = 41	
Age-yr		Age-yr	
Median	67	Median	71
Range	51-84	Range	38-85
Sex-no. (%)		Sex-no. (%)	
Male	26 (65)	Male	35 (85.4)
Female	14 (35)	Female	6 (14.6)
Histology-no. (%)		Histology-no. (%)	
Sq	10 (25)	Sq	10 (24.4)
Non-Sq	30 (75)	Non-Sq	31 (75.6)
Smoking history-no. (%)		Smoking history-no. (%)	
Current or former smoker	29 (72.5)	Current or former smoker	38 (92.7)
Never smoked	11 (27.5)	Never smoked	3 (7.3)
Disease stage-no. (%)		Disease stage-no. (%)	
c-stage III	9 (22.5)	c-stage III	9 (22.0)
c-stage IV	22 (55)	c-stage IV	25 (61.0)
post-operative recurrence	9 (22.5)	post-operative recurrence	7 (17.1)
EGFR status-no. (%)		EGFR status-no. (%)	
Wild type	33 (82.5)	Wild type	41 (100)
Mutated (Exon19 del or L858R)	7 (17.5)	Mutated (Exon19 del or L858R)	0 (0)

【 0 3 1 2 】

10 - 3 . 結果

発見用コホートにおける各患者についての予測式 (X ² / Y ; 式中、 X = C D 4 + T細胞集団における C D 6 2 L ¹ o w T細胞の割合 (%)、 Y = C D 4 + T細胞集団における C D 2 5 + F O X P 3 + T細胞の割合 (%)) の値を図 3 0 a に示す (P < 0 . 0 0 4 7 , t = 3 . 0 0 4 , d f = 3 8)。発見用コホートにおいて 8 週時点での無効 (N R) 群を検出するための予測式の受信者動作特性 (R O C) 分析を図 3 0 b に示す。予測式の閾値 = 1 9 2 のとき、感度と特異度はそれぞれ 8 5 . 7 % および 1 0 0 % であった。ニボルマブ治療を受ける前に得られた P B M C に基づいて有効型 (X ² / Y = 1 9 2) および N R 型 (X ² / Y < 1 9 2) と診断された患者の無増悪生存率 (P F S) と全生存率 (O S) 曲線をそれぞれ、図 3 0 c、 d に示す。発見用コホート (閾値 = 1 9 2) において、有効型と無効型は、 P F S と O S の両方で有意に異なっていた (P < 0 . 0 0 0 1)。

【 0 3 1 3 】

続いて、ニボルマブ治療を受ける前に末梢血が発見用コホートとして採取されたが、その分析が腫瘍応答性の評価の前になされた 4 1 人の治療継続患者から構成される独立した検証用コホートにおいて、予測式の閾値 (X ² / Y < 1 9 2) が N R を区別できたかどうか

10

20

30

40

50

かが調査された。図 30e に示すように、予測式の値は、検証用コホートのうち有効であった患者において有意により高かった ($P = 0.00068$, $t = 3.693$, $df = 39$)。予測式の閾値が < 192 のとき、検証用コホートの NR 患者予測の感度と特異度はそれぞれ 90.9% および 89.5% であった。検証用コホートにおいて、有効型の PFS は、NR 型よりも有意に長かった (図 30f; $P < 0.0001$)。追跡期間の中央値は 195 日に過ぎなかったが、有効型の患者はまた、有意により高い OS も有した (図 30g; $P = 0.0022$)。

【0314】

各コホートにおける客観的な 8 週時点での応答性は以下のとおりであった。

【表 5】

b. Responses to Nivolumab

Discovery cohort; n = 40		Validation cohort; n = 41	
Objective response at 8 weeks- no. (%)		Objective response at 8 weeks- no. (%)	
Complete or partial response	11 (27.5)	Complete or partial response	7 (17.1)
Stable disease	15 (37.5)	Stable disease	12 (29.3)
Progressive disease	14 (35)	Progressive disease	22 (53.7)

Abbreviations: Sq, squamous; c-stage, clinical stage; del, deletion.

本実施例における結果から、本明細書に記載されるがん免疫療法に対する応答性の予測方法は、前向き試験においても、がん免疫療法に対する応答性を正確に予測することが示された。また、がん免疫療法に対する応答性の予測は、患者の全体としての治療反応（全生存（OS）または無増悪生存（PFS））に対しても直接的な予測を提供する。

【0315】

（実施例 11：CD28⁺T 細胞亜集団のマーカーとしての使用可能性）

近年、CD28 は PD-1 依存性シグナル阻害の主要標的であるが、T 細胞受容体（TCR）はそうではないことが実証された。したがって、発明者らは、CD8⁺T 細胞の全集団における CD28⁺細胞の比率が、予測式の値と相関するかどうかを調べた。

【0316】

発明者らは、予測式 (X^2 / Y ; 式中、 $X = CD4^+T$ 細胞集団における $CD62L^{low}CD8^+T$ 細胞の割合 (%), $Y = CD4^+T$ 細胞集団における $CD25^+FOXP3^+T$ 細胞の割合 (%)) の値が、 $CD62L^{low}CD8^+T$ 細胞の全集団における $CD28^+$ 細胞の比率と有意に相関する ($P = 0.0045$) ことを見出した (図 31)。本実施例の結果から、 $CD28^+CD62L^{low}CD8^+T$ 細胞亜集団の量、および / または $CD62L^{low}CD8^+T$ 細胞集団における $CD28^+$ 細胞亜集団の割合を、上記予測式の値と同様に、患者のがん免疫療法に対する応答の予測に使用可能であることが理解される。

【0317】

（実施例 12：各群の患者における $CD62L^{low}CD4^+T$ 細胞遺伝子の発現）

12-1. 概要

PBMC フローサイトメトリー (FCM) 分析は、 $CD62L^{low}CD4^+T$ 細胞の量と質が抗腫瘍免疫において重要な役割を担い、PD-1 遮断治療の応答性を決定づけることを明らかにした。発明者らは、本実施例において、GR 患者、IR 患者および NR 患者間で、 $CD62L^{low}CD4^+T$ 細胞の分子レベルでの違いを検討するためにマイクロアレイ分析を行った。発明者らはまず、 $CD62L^{high}CD4^+$ および $CD62L^{low}CD4^+T$ 細胞における遺伝子発現の違いを明らかにした。次いで、各群の患者の $CD62L^{low}CD4^+T$ 細胞において発現に差がある遺伝子の探索を行った。

【0318】

12-2. 材料および方法

10

20

30

40

50

TRIzol試薬(Thermo Fisher Science, Waltham, MA)を用いて、各有効型の2人から精製されたPBMC中のCD62L^{high}CD4⁺およびCD62L^{low}CD4⁺T細胞から全RNAを単離した。WT Plus Reagent Kit(Thermo Fisher Scientific)を用い、製造メーカーの説明書に従って、cDNAおよびcRNAの合成と、一本鎖cDNA(ssDNA)標識反応を行った。全RNA(0.5 μg)をcDNAに逆転写し、その後、cRNAへと合成した。ssDNAを15 μgのcRNAから逆転写し、標識を付けた。1.8 μgの標識ssDNAをGeneChip Hybridization Oven 645において、ヒト用マイクロアレイClariom Sアッセイ(Thermo Fisher Scientific)とハイブリダイズさせた。ハイブリダイズさせたアレイを、GCS3000 7G System(Thermo Fisher Scientific)を用いてスキャンした。遺伝子発現データのアクセッション番号IDはGSE103157である。

10

【0319】

2セットの遺伝子発現データから遺伝子発現シグネチャを同定するために、発明者らは以下のようにして2つのセット間の遺伝子発現の違いを見積もった。まず、プローブのすべての値について外れ値検定を行い、次いで、外れ値を除いたプローブ値の平均と分散を用いて、各プローブについてz-スコアを計算した。2つの遺伝子セットのz-スコアを比較するために、各遺伝子のz-スコアを確率に変換し、次いで、2セット間の遺伝子の確率のそれぞれの違い、 p^d を計算した；つまり、

20

【数1】

$$p_k^d = |p(z_k^a) - p(z_k^b)| = \left| \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{z_k^a} e^{-\frac{z^2}{2}} dz - \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{z_k^b} e^{-\frac{z^2}{2}} dz \right|$$

上記式において、2つの遺伝子セット(aとb)間でk番目の遺伝子を比較した。この分析において、発明者らは、

【数2】

$$p_k^d > 0.2$$

30

を持つ遺伝子を遺伝子シグネチャとして選択した。

【0320】

12-3. 結果

このために発明者らはまず、CD62L^{high}CD4⁺およびCD62L^{low}CD4⁺T細胞における遺伝子発現の違いを明らかにした。CD62L^{high}CD4⁺T細胞およびCD62L^{low}CD4⁺T細胞は、別個の遺伝子発現プロファイルを有する(図33aおよび34a)。以前の報告と一致して、CD62L^{high}CD4⁺T細胞の大部分はナイーブなT細胞と考えられる。なぜなら、GR群、IR群およびNR群の全ての患者で、CD62L^{high}CD4⁺T細胞においてC-Cケモカイン受容体7型(CCR7)、CD28および転写因子7(TCF7)遺伝子が高発現されていたからである。少数のCD62L^{high}CD4⁺T細胞は、foxp3発現がより高いことから、調節性T細胞と考えられる。

40

【0321】

さらに、発明者らは、GRとIR、GRとNR、IRとNR、GR+IRとNR、および、GRとIR+NRからの細胞間で比較したシグネチャ内の遺伝子(それぞれ、1884、1826、1410、1167および1513遺伝子)をマージした(合計3484遺伝子)(図33b)。これらのうち、T細胞免疫と関連することが知られる53種の遺伝子らの30種の発現が、ニボルマブ治療に対する応答性の観点で示された(図34b)。これにより、GRおよび/またはIR由来のCD62L^{low}CD4⁺T細胞において

50

、C-X-Cケモカイン受容体3型(CXCR3)、インターロイキン-23受容体(IL23R)、インターロイキン-13受容体サブユニット2(IL13RA2)、PD-1リガンド2(PDL2)、CD80、C型レクチンドメインファミリー2メンバーA(CLEC2A)、インターロイキン7(IL7)、トランスフォーミング増殖因子受容体3(TGFR3)およびヒストンデアセチラーゼ9(HDAC9)などが優先的に発現されることが示された。

【0322】

本実施例の結果から、CD62L^{high}CD4⁺およびCD62L^{low}CD4⁺T細胞において異なる発現を示す遺伝子の発現を調べることにより、取得された細胞の属する細胞亜集団の判定が可能であり、これにより細胞亜集団の量および/または割合を測定することが可能であることが理解される。さらに、CD62L^{low}CD4⁺T細胞上において、各患者群ごとに異なる発現を示す遺伝子の発現を調べることにより、患者群の識別が可能であることも理解される。

10

【0323】

(実施例13：細胞移入実験)

腫瘍流入リンパ節からのCD62L^{low}CD4⁺T細胞の調製

B6マウスに 1.5×10^6 B16BL6メラノーマ細胞(HBSS中)を、皮下に播種した。9~10日後に、鼠径部リンパ節を回収した。回収したリンパ節から、CD4⁺T cellアイソレーションキット+LSカラムでCD4⁺T細胞を分離した。さらに、CD62Lマイクロビーズによるネガティブセレクション(LSカラム)でCD62L^{low}CD4⁺T細胞を精製した。このCD62L^{low}CD4⁺T細胞を、腫瘍モデルマウスに経静脈的移入するのに用いた。

20

【0324】

腫瘍モデル

HBSS中 3×10^6 B16BL6メラノーマ細胞を、B6マウスの腹部の正中線上で皮下に播種した。マウスを、(1)対照群(N=10)、(2)抗体群(N=17)、および(3)抗体+細胞群(N=4)に分割した。対照群には処置を施さなかった。抗体+細胞群には、腫瘍播種後、上記CD62L^{low}CD4⁺T細胞(1×10^6)を、腫瘍播種後4日目または5日目に移入し、抗PD-1抗体(RMP1-14 BioXcell 250 μ g)を腹腔内投与した(細胞投与日、3日後、6日後)。抗体群には、腫瘍播種後、抗PD-1抗体(RMP1-14 BioXcell 250 μ g)を腹腔内投与した(細胞投与日、3日後、6日後)。各群のマウスの生存率を追跡した。

30

【0325】

結果

抗体および/またはT細胞の投与後16日目において、対照群の全個体が死亡したが、細胞+抗体群の生存率は、50%であり、抗体群よりも高かった(図35)。これらの結果から、CD62L^{low}CD4⁺T細胞の移入によって、抗PD-1抗体の効果を増強できることが示唆された。

【産業上の利用可能性】

【0326】

ほぼ全ての進行期癌治療の基幹的治療となると考えられる抗PD-1/PD-L1抗体であるが、高価な薬剤費は社会保障費の拡大を招くことが危惧され、増分費用効果比(薬剤費増加に対する治療効果増分比)を高くすることが厚生労働省からも勧告されている。本発明において提供されるバイオマーカーは、簡便、安価、正確に抗PD-1/PD-L1抗体効果を予測することに利用でき、医学的、社会的に必須である。本発明は、全世界、全癌腫において必要な技術と考えられ、極めて大きな市場的価値を有しているものと考えられる。

40

【要約】

被験体のT細胞組成に基づく被験体のがん免疫療法に対する応答性の予測、およびその予測に基づくがん免疫療法を用いた治療の方法に関する。本発明はまた、被験体のがん免疫

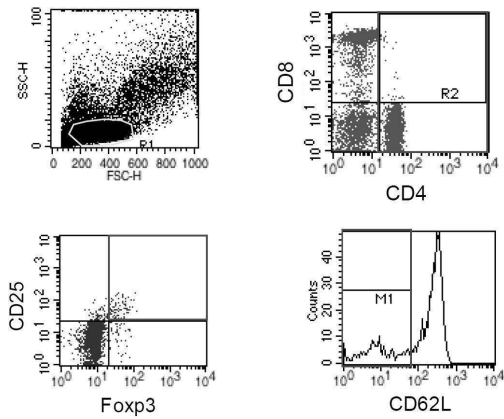
50

療法に対する応答性を改善または維持するための方法を提供する。被験体由来のサンプル中の、抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するCD4⁺T細胞亜集団、樹状細胞亜集団、および/または、CD8⁺T細胞亜集団の相対値を決定することによって、がん免疫療法に対する応答性の予測を行う。また、CD62L^{low}CD4⁺T細胞などの細胞を含む癌を治療または予防するための組成物が提供される。

【選択図】図22

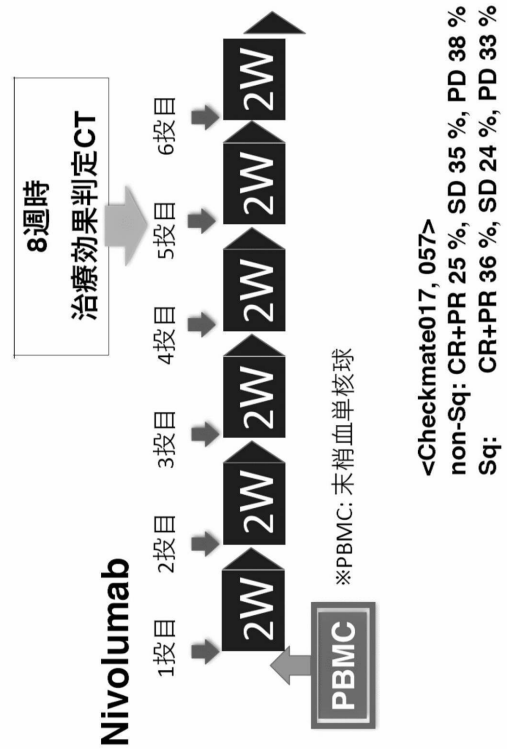
【図1】

Fig.1

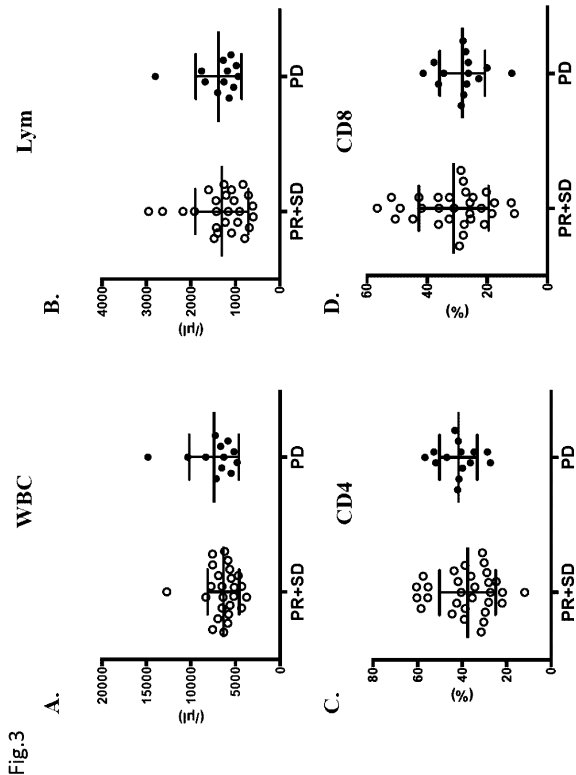


【図2】

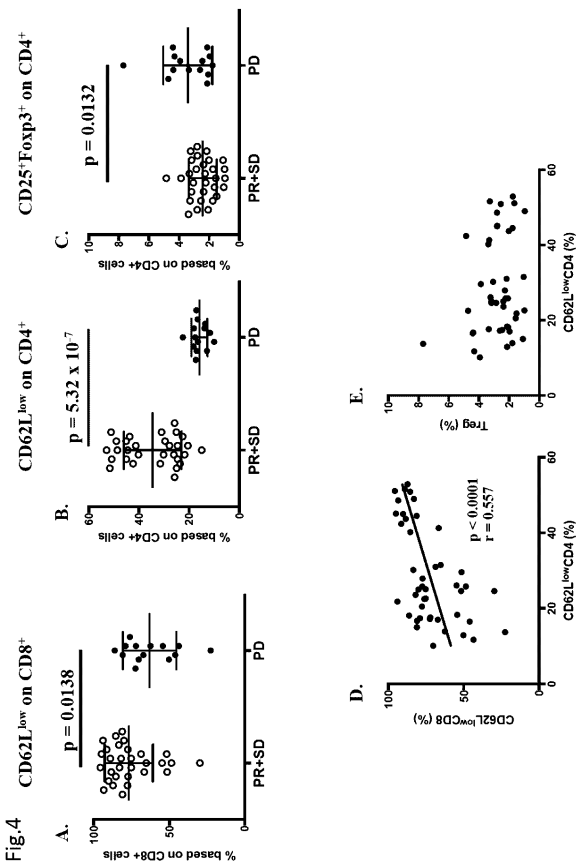
Fig.2



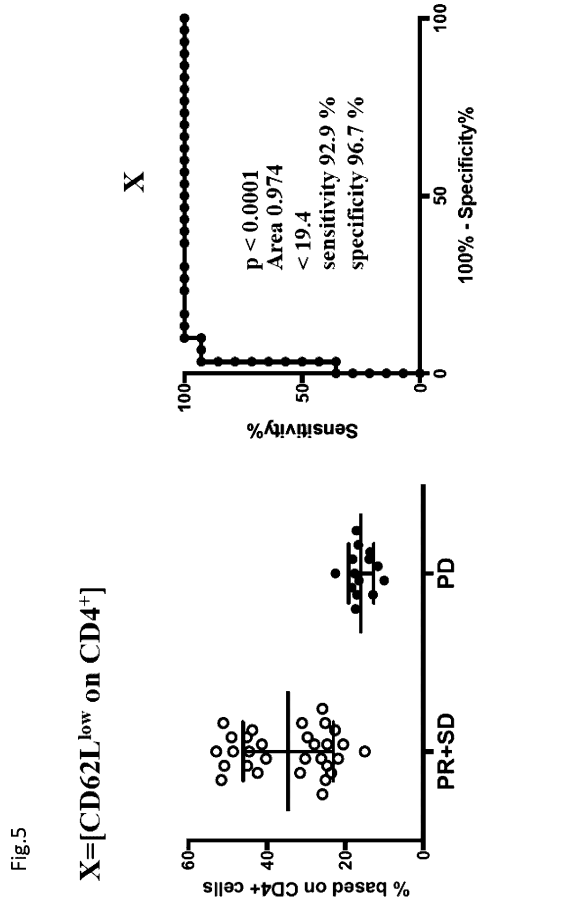
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】

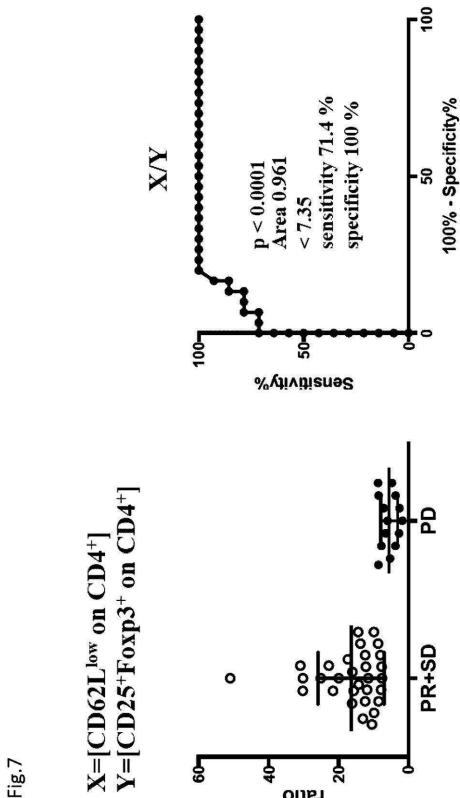


【 図 6 】

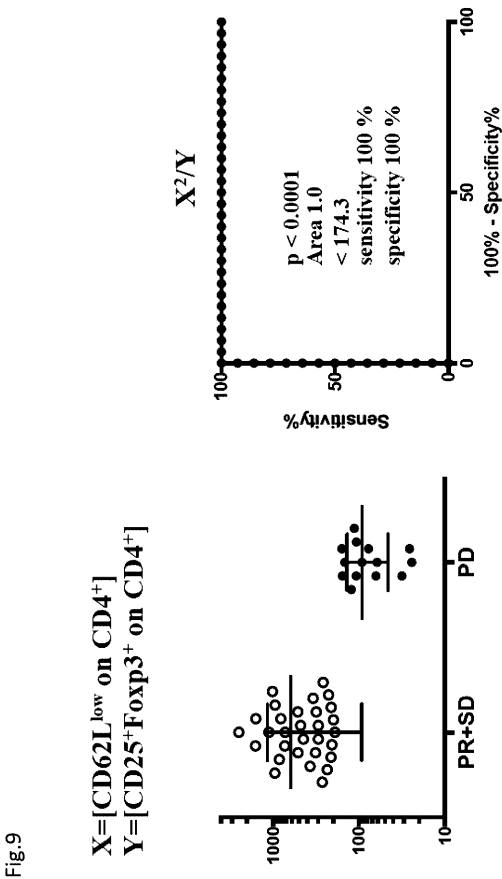
Fig.6

Cutoff	Sensitivity%	95% CI	Specificity%	95% CI	Likelihood ratio
< 10.9	7.143	0.1807% to 33.87%	100	88.43% to 100%	
< 12.3	14.29	1.779% to 42.81%	100	88.43% to 100%	
< 13.3	21.43	4.658% to 50.8%	100	88.43% to 100%	
< 13.8	28.57	8.389% to 58.1%	100	88.43% to 100%	
< 14.45	35.71	12.76% to 64.86%	100	88.43% to 100%	
< 15.75	35.71	12.76% to 64.86%	96.67	82.78% to 99.92%	10.71
< 16.6	42.86	17.66% to 71.14%	96.67	82.78% to 99.92%	12.86
< 16.85	50	23.04% to 76.96%	96.67	82.78% to 99.92%	15
< 17.1	57.14	28.86% to 82.34%	96.67	82.78% to 99.92%	17.14
< 17.3	64.29	35.14% to 87.24%	96.67	82.78% to 99.92%	19.29
< 17.5	71.43	41.9% to 91.61%	96.67	82.78% to 99.92%	21.43
< 17.85	78.57	49.2% to 95.34%	96.67	82.78% to 99.92%	23.57
< 18.2	85.71	57.19% to 98.22%	96.67	82.78% to 99.92%	25.71
< 19.4	92.86	66.13% to 99.82%	96.67	82.78% to 99.92%	27.86
< 21.15	92.86	66.13% to 99.82%	93.33	77.93% to 99.18%	13.93
< 22.15	92.86	66.13% to 99.82%	90	73.47% to 97.89%	9.286
< 22.55	100	76.84% to 100%	90	73.47% to 97.89%	10
< 23.1	100	76.84% to 100%	86.67	69.28% to 96.24%	7.5
< 24.1	100	76.84% to 100%	83.33	65.28% to 94.36%	6
< 24.8	100	76.84% to 100%	76.67	57.72% to 90.07%	4.286
< 25.05	100	76.84% to 100%	73.33	54.11% to 87.72%	3.75
< 25.45	100	76.84% to 100%	70	50.6% to 85.27%	3.333
< 25.95	100	76.84% to 100%	63.33	43.86% to 80.07%	2.727
< 27	100	76.84% to 100%	60	40.6% to 77.34%	2.5
< 28.75	100	76.84% to 100%	56.67	37.43% to 74.54%	2.308
< 29.9	100	76.84% to 100%	53.33	34.33% to 71.66%	2.143
< 30.6	100	76.84% to 100%	50	31.3% to 68.7%	2
< 31.25	100	76.84% to 100%	46.67	28.34% to 65.67%	1.875
< 35.85	100	76.84% to 100%	43.33	25.46% to 62.57%	1.765
< 40.75	100	76.84% to 100%	40	22.66% to 59.4%	1.667
< 41.85	100	76.84% to 100%	36.67	19.93% to 56.14%	1.579
< 43.05	100	76.84% to 100%	33.33	17.29% to 52.81%	1.5
< 44.1	100	76.84% to 100%	30	14.73% to 49.4%	1.429
< 44.75	100	76.84% to 100%	26.67	12.28% to 45.89%	1.364
< 45.05	100	76.84% to 100%	23.33	9.934% to 42.28%	1.304
< 46.85	100	76.84% to 100%	20	7.714% to 38.57%	1.25
< 48.8	100	76.84% to 100%	16.67	5.642% to 34.72%	1.2
< 49.95	100	76.84% to 100%	13.33	3.755% to 30.72%	1.154
< 51	100	76.84% to 100%	10	2.112% to 26.53%	1.111
< 51.35	100	76.84% to 100%	6.667	0.8178% to 22.07%	1.071
< 52.25	100	76.84% to 100%	3.333	0.08436% to 17.22%	1.034

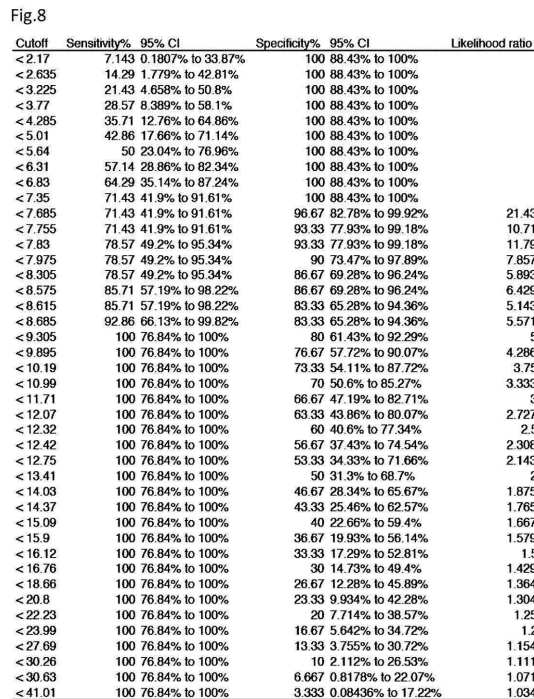
【 図 7 】



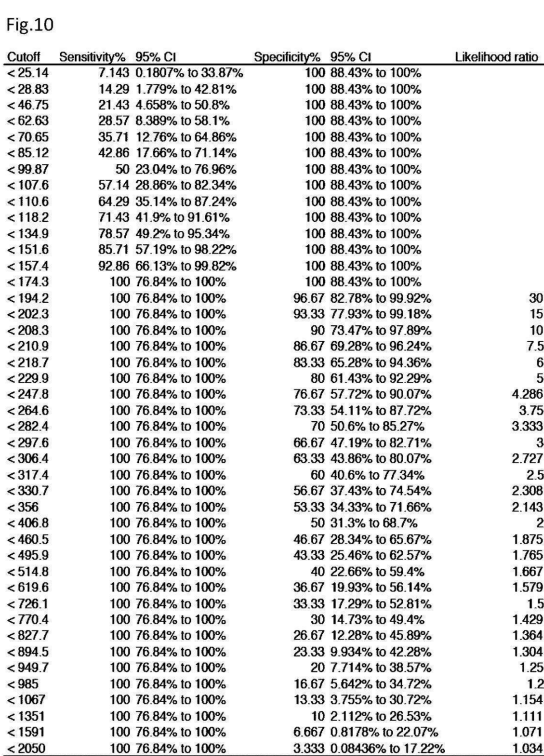
【 図 9 】



【 図 8 】

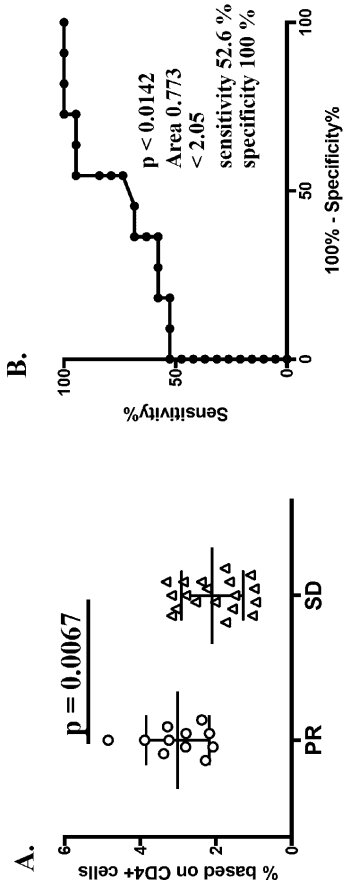


【 図 10 】



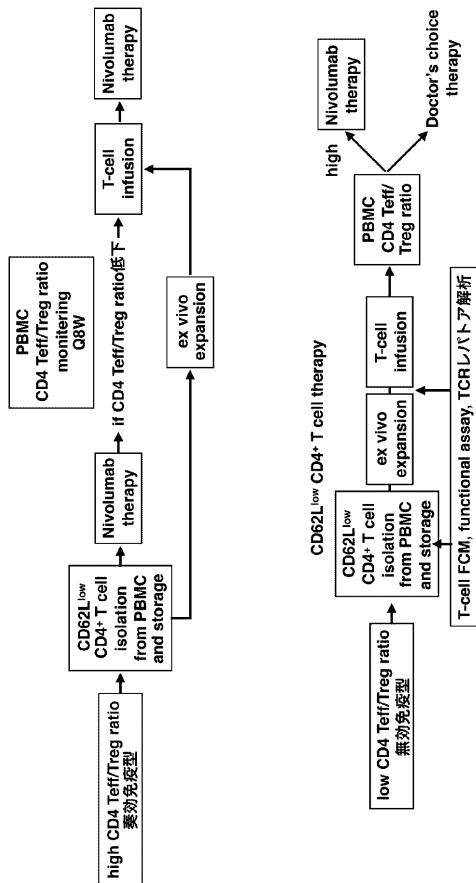
【 1 1 】

Fig.11



【 1 3 】

Fig.13



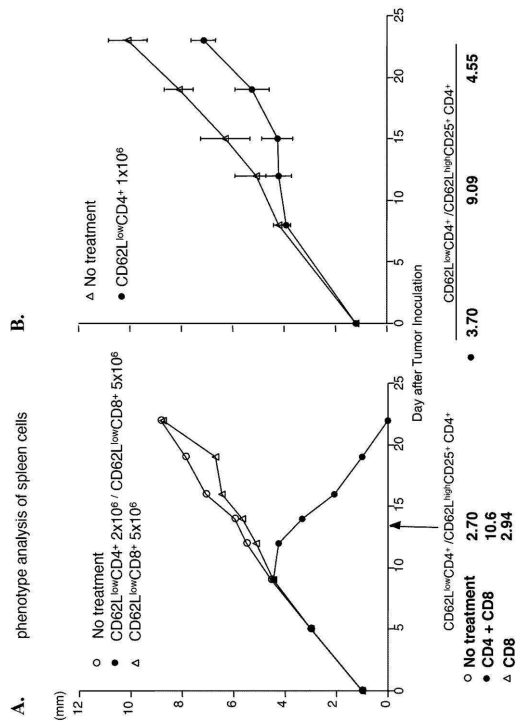
【 1 2 】

Fig.12

Cutoff	Sensitivity% 95% CI	Specificity% 95% CI	Likelihood ratio
<0.975	5.263 0.1332% to 26.03%	100 71.51% to 100%	5.789
<1.015	10.53 1.301% to 33.14%	100 71.51% to 100%	2.895
<1.065	15.79 3.383% to 39.58%	100 71.51% to 100%	3.184
<1.3	21.05 6.052% to 45.57%	100 71.51% to 100%	2.123
<1.54	26.32 9.147% to 51.2%	100 71.51% to 100%	1.592
<1.61	31.58 12.58% to 56.55%	100 71.51% to 100%	1.737
<1.7	36.84 16.29% to 61.64%	100 71.51% to 100%	1.882
<1.895	42.11 20.25% to 66.5%	100 71.51% to 100%	1.351
<2.05	47.37 24.45% to 71.14%	100 71.51% to 100%	1.447
<2.125	52.63 28.86% to 75.55%	100 71.51% to 100%	1.544
<2.205	52.63 28.86% to 75.55%	100 71.51% to 100%	1.544
<2.26	57.89 33.5% to 79.75%	100 71.51% to 100%	1.737
<2.33	57.89 33.5% to 79.75%	100 71.51% to 100%	1.737
<2.385	57.89 33.5% to 79.75%	100 71.51% to 100%	1.737
<2.47	63.16 38.36% to 83.71%	100 71.51% to 100%	1.882
<2.67	68.42 43.45% to 87.42%	100 71.51% to 100%	1.505
<2.795	68.42 43.45% to 87.42%	100 71.51% to 100%	1.505
<2.83	73.68 48.8% to 90.85%	100 71.51% to 100%	1.351
<2.96	78.95 54.43% to 93.95%	100 71.51% to 100%	1.447
<3.12	84.21 60.42% to 96.62%	100 71.51% to 100%	1.544
<3.21	94.74 73.97% to 99.87%	100 71.51% to 100%	1.737
<3.26	94.74 73.97% to 99.87%	100 71.51% to 100%	1.737
<3.3	94.74 73.97% to 99.87%	100 71.51% to 100%	1.737
<3.35	100 82.35% to 100%	100 82.35% to 100%	1.375
<3.63	100 82.35% to 100%	100 82.35% to 100%	1.222
<4.365	100 82.35% to 100%	100 82.35% to 100%	1.1

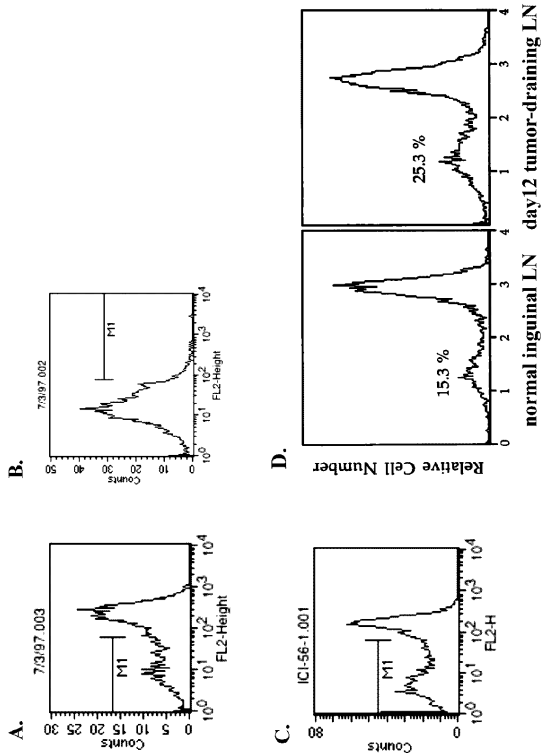
【 1 4 】

Fig.14



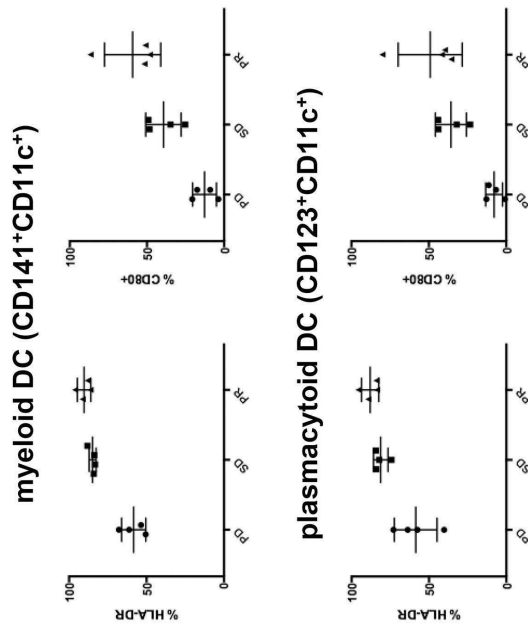
【 15 】

Fig.15



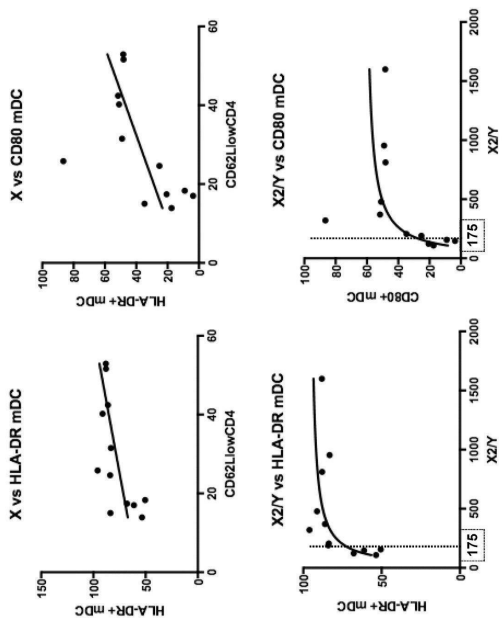
【 16 】

Fig.16



【 17 】

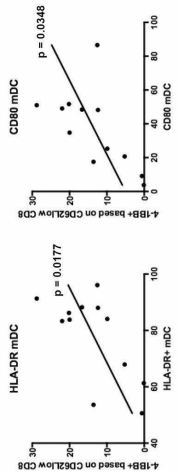
Fig.17



【 18 】

Fig.18

Correlation between DC and CD8

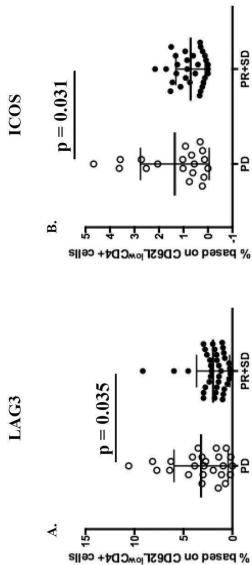


4-1BB ⁺ based on CD62L ^{low} CD8 vs		X ² /Y	HLA-DR ⁺ mDC	CD80 ⁺ mDC
Pearson r		0.4022	0.6675	0.6111
r		-0.2233 to 0.793	0.1517 to 0.8976	0.05724 to 0.8773
95% confidence interval				
R squared		0.1617	0.4435	0.3734
P value				
P (two-tailed)		0.195	0.0177	0.0348
P (one-tailed)		ns	*	*
P (nonparametric)		ns	Yes	Yes
Significant? (alpha = 0.05)		No	Yes	Yes
Number of XY Pairs		12	12	12

【 図 19 】

CD62L^{low}CD4上の各種分子発現

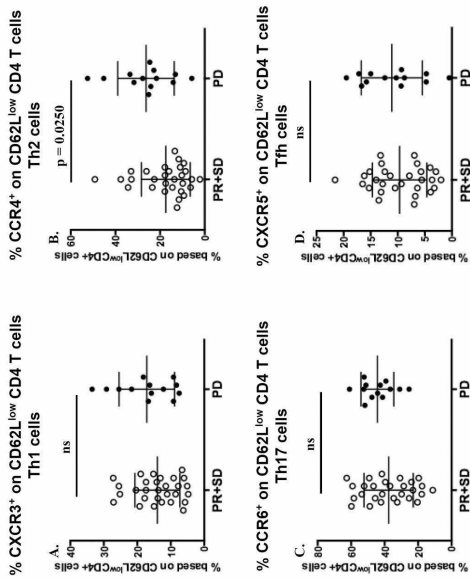
Fig.19



【 図 20 】

CD62L^{low}CD4のsubgroup解析

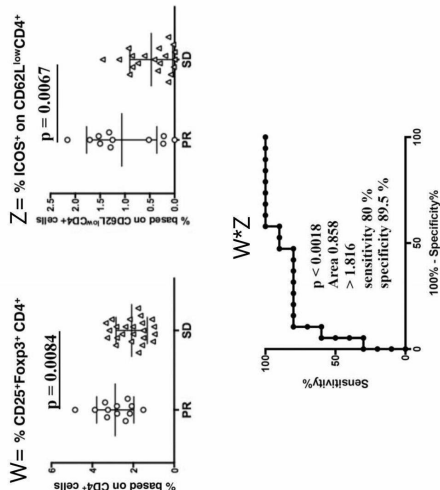
Fig.20



【 図 21 】

Prediction of PR

Fig.21



【 図 22 】

Fig.22

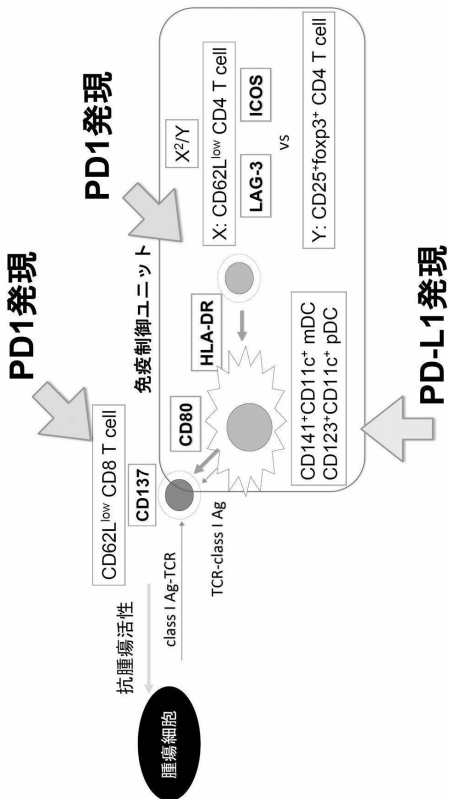


Fig.25

Multiple-marker signature, 2 BMs cont.

• Logit (8週時点PR率) = $\hat{a} + \hat{b} \times (BM1) + \hat{c} \times (BM2)$

モデル4.	推定係数	P値	AUC
切片 (a)	-1.488		
対数CD25+Foxp3+CD4+ T	2.639	0.04	0.84
対数ICOS+CD62L ^{low} based on CD4+ T	0.512	0.15	

(CD25+Foxp3+CD4+T)⁵ × (ICOS+CD62L^{low} based on CD4+ T)

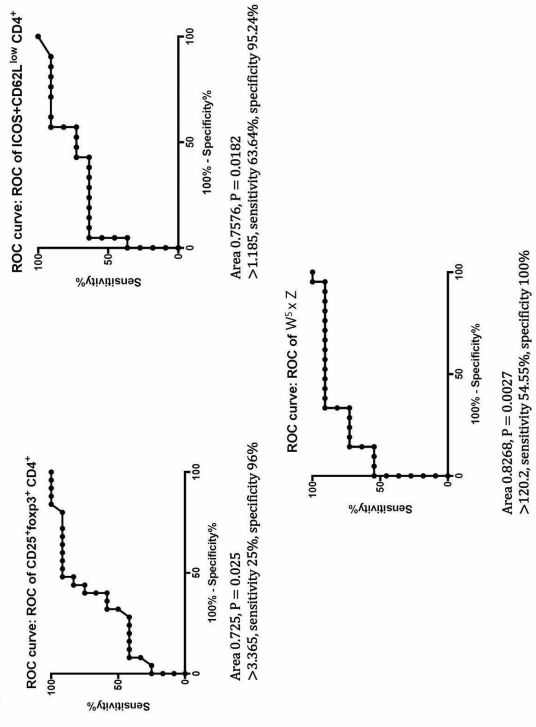
【 図 2 5 】

Fig.23

一語名	商品名	メーカー名	75507の番号	isotype	対応疾患
CD4	FTC Mouse Anti-Human CD4	BD	555346	Mouse IgG1, κ	RPA-TR(UO)
CD8	FTC Mouse Anti-Human CD8	BD	553386	Mouse IgG1, κ	RPA-TR(UO)
CD25	FTC Mouse Anti-Human CD25	BD	555444	Mouse IgG1, κ	RPA-TR(UO)
CD183(CXCR3)	PE Mouse Anti-Human CD183(CXCR3)	BD	555432	Mouse IgG1, κ	DREG-56(RUO)
CD184(CCR4)	PE Mouse Anti-Human CD184(CCR4)	BD	555432	Mouse IgG1, κ	M-Δ251(RUO)
CD185(CCR6)	PE Mouse Anti-Human CD185(CCR6)	BD	555432	Mouse IgG1, κ	M-Δ251(RUO)
CD187(CCR7)	PE Mouse Anti-Human CD187(CCR7)	BD	555432	Mouse IgG1, κ	M-Δ251(RUO)
LAG-3	PE Mouse Anti-Human LAG-3(CD223)	BD	555432	Mouse IgG1, κ	M-Δ251(RUO)
CD278(HVEM)	PE Mouse Anti-Human CD278(HVEM)	BD	555432	Mouse IgG1, κ	M-Δ251(RUO)
Foxp3	PE Mouse Anti-Human Foxp3	BD	555432	Mouse IgG1, κ	M-Δ251(RUO)
HLA-DR	PE Mouse Anti-Human HLA-DR	BD	555432	Mouse IgG1, κ	M-Δ251(RUO)
CD25	CD25 PE-Cy5	BD	555432	Mouse IgG1, κ	M-Δ251(RUO)
CD80	Anti-Human CD80 PE	BD	555432	Mouse IgG1, κ	M-Δ251(RUO)
CD133	PE Mouse Anti-Human CD133	BD	555432	Mouse IgG1, κ	M-Δ251(RUO)
ICOS	PE Mouse Anti-Human ICOS	BD	555432	Mouse IgG1, κ	M-Δ251(RUO)

【 図 2 3 】

Fig.26



【 図 2 6 】

Fig.24

Single-marker signature

• Logit (8週時点PR率) = $\hat{a} + \hat{b} \times (\text{biomarker})$

単変量解析	推定値 (b)	P値	AUC
対数CD62L ^{low} CD4+ T	1.919	0.10	0.67
CD62L ^{low} CD4+ T	0.047	0.16	
対数CD25+Foxp3+CD4+ T	2.952	0.03	0.75
CD25+Foxp3+CD4+ T	1.264	0.02	
対数ICOS+CD62L ^{low} based on CD4+ T	0.582	0.06	0.76
ICOS+CD62L ^{low} based on CD4+ T	5.535	0.01	
対数ICOS+ based on CD62L ^{low} CD4+ T	0.308	0.20	0.76
ICOS+ based on CD62L ^{low} CD4+ T	1.909	0.01	

* ICOS+ based on CD62L^{low}CD4+ T=0%の症例は(0.001%)として解析。
 * ICOS+CD62L^{low} based on CD4+ T=(ICOS+ based on CD62L^{low}CD4+ T)×(CD62L^{low}CD4+ T)にて算出。
 * AUC, area under the curve. N=32

ロジスティック回帰の推定結果

(updated; development set N=40例)

ロジスティック回帰モデルによって推定された予測式

Logit (8w時点SD以上率)

$$= -23.00 + 8.776 \times \text{対数CD62L}^{\text{low}}\text{CD4} + \text{T cell 分画}$$

$$- 3.545 \times \text{対数CD25} + \text{Foxp3} + \text{CD4} + \text{T cell 分画}$$

$$\approx -23.00 + 3.5 \times \text{対数}(X^{2.475}/Y)$$

予測因子	推定値	P値
切片	-22.999	-
対数CD62L ^{low} CD4 + T (X)	8.776	0.004
対数CD25+Foxp3+CD4+ T (Y)	-3.545	0.068

※ 完全分離状態である為、Firth法によるペナルティ付最小推定量を求めた。

Fig.27

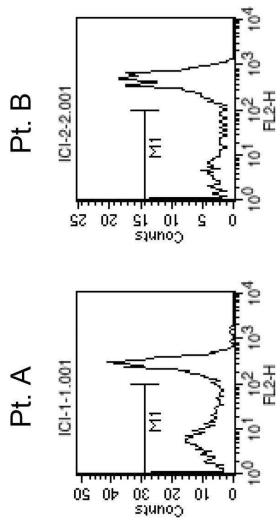


Fig.29

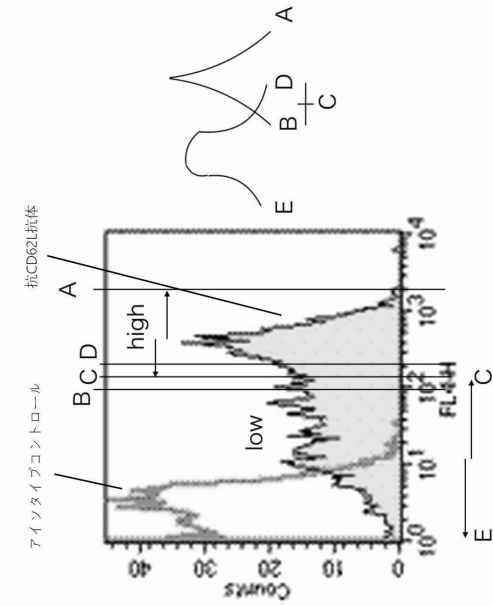


Fig.28

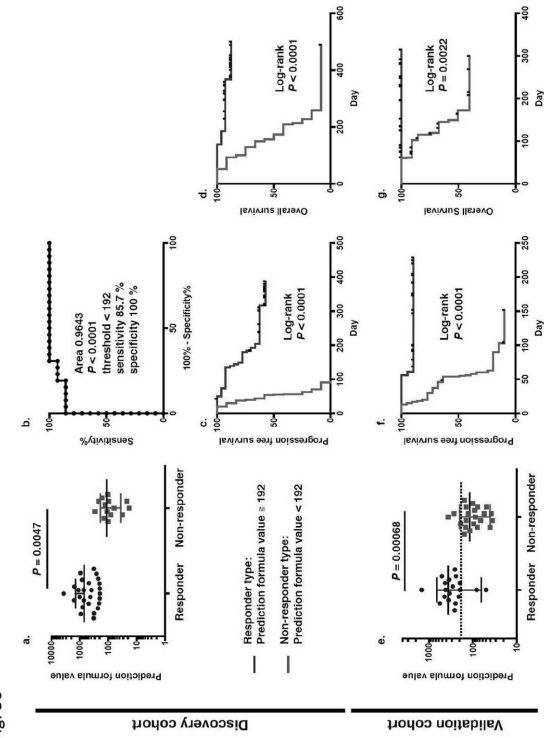
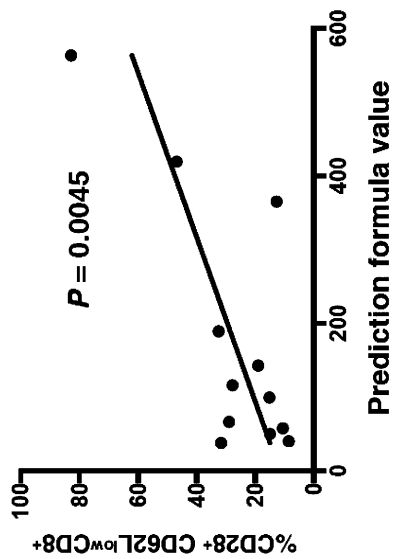


Fig.30

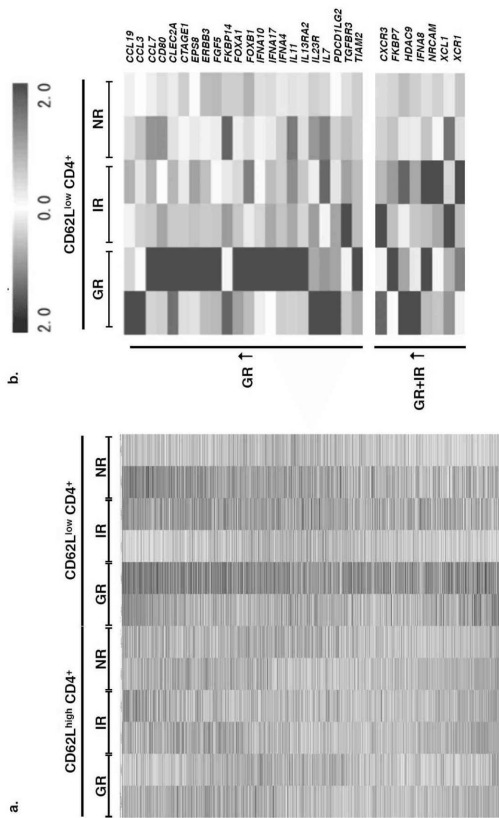
【 3 1 1 】

Fig. 31



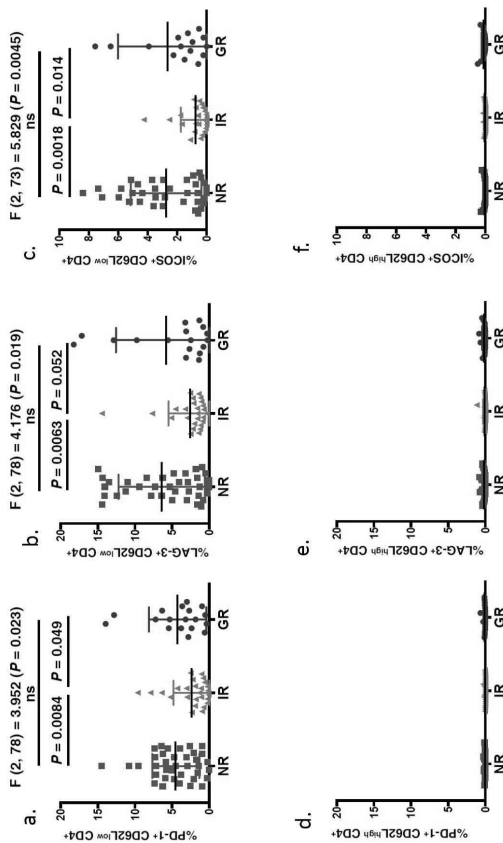
【 3 3 3 】

Fig. 33



【 3 2 2 】

Fig. 32



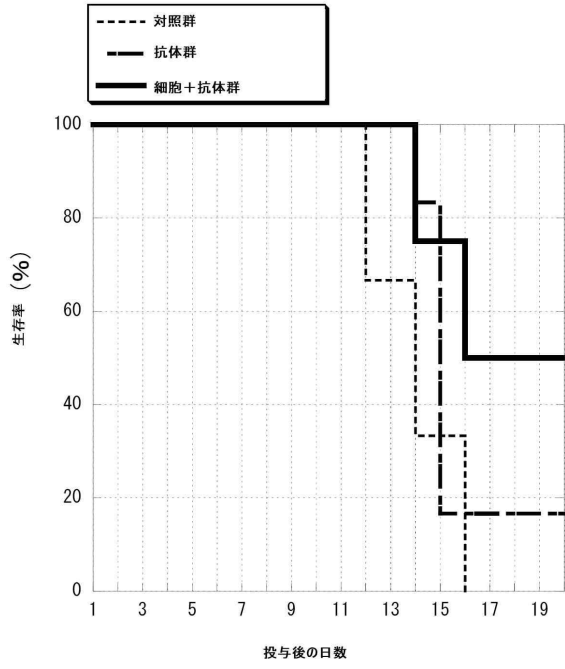
【 3 4 4 】

a. Immunoprecipitated genes that showed differential expression between CD62L^{low} CD4⁺ T cells and CD62L^{high} CD4⁺ T cells, commonly in good, intermediate or poor responders. The number of genes that showed differential expression in the response to Nivolumab in CD62L^{low} CD4⁺ T cells: good responder (GR), intermediate responder (IR), and non-responder (NR).

Gene	CD62L ^{low} > CD62L ^{high}	CD62L ^{low} < CD62L ^{high}	GR:NR	GR:IR	GR:NR	GR:IR	GR:NR	GR:IR
AURKA		BACT2						
CCL17		CCL28						
CD81		CCR7						
CD24		CD27						
FOXF1		CD28						
GZMA		CD2L						
GZMB		CSNK1D						
IL13RA1P		FOXP1						
IL21		FOXP3						
IL3RA		IGF1R						
ND2		IL16						
SMAD5		IL27RA						
VEGFA		IL6R						
		LEF1						
		MAL						
		IL13RA2						
		IL13						
		IL14						
		PKCHLG2						
		TGFB3						
		TIM3						
		TIM4						
		HLA-DPA3						
		HLA-DPA4						
		HLA-DRA						
		TGFB1L						
		CD89						
		HLA-DQA1						
		HLA-DQA2						
		HLA-DQA3						
		HLA-DQA4						
		HLA-DQA5						
		HLA-DQA6						
		HLA-DQA7						
		HLA-DQA8						
		HLA-DQA9						
		HLA-DQA10						
		HLA-DQA11						
		HLA-DQA12						
		HLA-DQA13						
		HLA-DQA14						
		HLA-DQA15						
		HLA-DQA16						
		HLA-DQA17						
		HLA-DQA18						
		HLA-DQA19						
		HLA-DQA20						
		HLA-DQA21						
		HLA-DQA22						
		HLA-DQA23						
		HLA-DQA24						
		HLA-DQA25						
		HLA-DQA26						
		HLA-DQA27						
		HLA-DQA28						
		HLA-DQA29						
		HLA-DQA30						
		HLA-DQA31						
		HLA-DQA32						
		HLA-DQA33						
		HLA-DQA34						
		HLA-DQA35						
		HLA-DQA36						
		HLA-DQA37						
		HLA-DQA38						
		HLA-DQA39						
		HLA-DQA40						
		HLA-DQA41						
		HLA-DQA42						
		HLA-DQA43						
		HLA-DQA44						
		HLA-DQA45						
		HLA-DQA46						
		HLA-DQA47						
		HLA-DQA48						
		HLA-DQA49						
		HLA-DQA50						
		HLA-DQA51						
		HLA-DQA52						
		HLA-DQA53						
		HLA-DQA54						
		HLA-DQA55						
		HLA-DQA56						
		HLA-DQA57						
		HLA-DQA58						
		HLA-DQA59						
		HLA-DQA60						
		HLA-DQA61						
		HLA-DQA62						
		HLA-DQA63						
		HLA-DQA64						
		HLA-DQA65						
		HLA-DQA66						
		HLA-DQA67						
		HLA-DQA68						
		HLA-DQA69						
		HLA-DQA70						
		HLA-DQA71						
		HLA-DQA72						
		HLA-DQA73						
		HLA-DQA74						
		HLA-DQA75						
		HLA-DQA76						
		HLA-DQA77						
		HLA-DQA78						
		HLA-DQA79						
		HLA-DQA80						
		HLA-DQA81						
		HLA-DQA82						
		HLA-DQA83						
		HLA-DQA84						
		HLA-DQA85						
		HLA-DQA86						
		HLA-DQA87						
		HLA-DQA88						
		HLA-DQA89						
		HLA-DQA90						
		HLA-DQA91						
		HLA-DQA92						
		HLA-DQA93						
		HLA-DQA94						
		HLA-DQA95						
		HLA-DQA96						
		HLA-DQA97						
		HLA-DQA98						
		HLA-DQA99						
		HLA-DQA100						

Fig. 34

【 図 3 5 】



フロントページの続き

(72)発明者 各務 博

埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人 埼玉医科大学内

審査官 黒田 浩一

(56)参考文献 特表2015-533796(JP,A)

Shien, K. et al., Predictive biomarkers of response to PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in non-small cell lung cancer, *Lung Cancer*, 2016年9月, vol.99, pp.79-87

WANG, X. et al., PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes, *OncoTargets and Therapy*, 2016年, vol.9, pp.5023-5039

O'MAHONY, D. et al., A Pilot Study of CTLA-4 Blockade after Cancer Vaccine Failure in Patients with Advanced Malignancy, *Clinical Cancer Research*, 2007年2月1日, Vol.13, Issue 3, pp.958-964

MARTENS, A. et al., Baseline Peripheral Blood Biomarkers Associated with Clinical Outcome of Advanced Melanoma Patients Treated with Ipilimumab, *Clinical Cancer Research*, 2016年1月19日, Vol.22, Issue 12, pp.2908-2918, 特に第2908ページ左欄第1行~右欄第14行、第2911ページ左欄第4行~12行、第2915ページ右欄第3行~7行

MACCALLI, C. et al., Immunological markers and clinical outcome of advanced melanoma patients receiving ipilimumab plus fotemustine in the NIBIT-M1 study [online], *ONCOIMMUNOLOGY*, 2016年2月26日, vol.5, No.2, e1071007, [検索日 2019.10.16], インターネット<URL: <http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2015.1071007>>, 特に"Introduction", "Immunofluorescence and flow cytometry analysis", "T cell subsets and clinical outcome of MM patients"

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	免疫生物标志物预测癌症免疫疗法的临床疗效		
公开(公告)号	JP6664684B1	公开(公告)日	2020-03-13
申请号	JP2019526634	申请日	2018-02-06
申请(专利权)人(译)	学校法人 埼玉医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	学校法人 埼玉医科大学		
[标]发明人	各務博		
发明人	各務博		
IPC分类号	G01N33/53 A61P35/00 A61K39/395		
CPC分类号	A61K2039/505 A61K2039/545 A61P35/00 C07K16/2818 G01N33/5011 G01N33/505 G01N33/57492 G01N2800/52 C07K16/18 C07K16/2812 G01N2333/70514 G01N2333/70564 G01N2333/7155		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/53.D A61P35/00 A61K39/395.T		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
审查员(译)	黒田孝一		
优先权	2017020685 2017-02-07 JP 2017110069 2017-06-02 JP		
其他公开文献	JP2020512530A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)	(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B1)	(11) 特許番号 特許第6664684号 (P6664684)
	(45) 発行日 令和2年3月13日(2020.3.13)		(24) 登録日 令和2年2月21日(2020.2.21)
<p>本发明涉及基于受试者的T细胞组成的受试者对癌症免疫疗法的响应性的预测，以及基于该预测的使用癌症免疫疗法的治疗方法。本发明还提供了一种用于改善或维持对受试者的癌症免疫疗法的响应性的方法。通过确定CD4的相对值可预测对癌症免疫疗法的反应性。T细胞亚群，树突细胞亚群和/或CD8 + T细胞亚群与来自受试者的样品中抗肿瘤免疫反应中的树突细胞刺激相关。还提供了用于治疗或预防癌症的组合物，其包含细胞，例如CD62LlowCD4 + T细胞。</p>	(51) Int. Cl.	F I	
	<p>G O 1 N 33/53 (2006.01) A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 K 39/395 (2006.01)</p>	<p>G O 1 N 33/53 Y G O 1 N 33/53 D A 6 1 P 35/00 A 6 1 K 39/395 T</p>	
	請求項の数 20 (全 94 頁)		
(21) 出願番号	特願2019-526634 (P2019-526634)	(73) 特許権者	504013775
(86) (22) 出願日	平成30年2月6日(2018.2.6)		学校法人 埼玉医科大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2018/004090		埼玉県久野郡毛呂山町毛呂本郷3-8
(87) 国際公開番号	W02018/147291	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成30年8月16日(2018.8.16)		弁理士 山本 秀敏
審査請求日	令和1年5月17日(2019.5.17)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	特願2017-20685 (P2017-20685)		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成29年2月7日(2017.2.7)	(74) 代理人	100143638
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		弁理士 長谷部 真久
(31) 優先権主張番号	特願2017-110069 (P2017-110069)	(74) 代理人	100181674
(32) 優先日	平成29年6月2日(2017.6.2)		弁理士 飯田 貴敏
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)	(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74) 代理人	230113332
			弁理士 山本 健作
早期審査対象出願			最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 がん免疫療法の臨床効果を予測する免疫学的バイオマーカー			