

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/175275

発行日 平成30年3月15日 (2018.3.15)

(43) 国際公開日 平成28年11月3日 (2016.11.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/68 (2018.01)	C12Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 Z	4 B O 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Y	4 H O 4 5
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 33 頁) 最終頁に続く

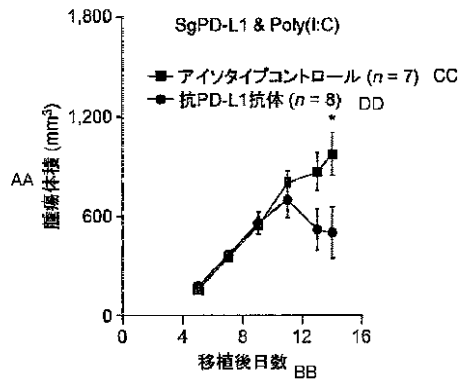
出願番号 特願2017-515602 (P2017-515602)	(71) 出願人 504132272 国立大学法人京都大学 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(21) 国際出願番号 PCT/JP2016/063326	
(22) 国際出願日 平成28年4月28日 (2016.4.28)	
(31) 優先権主張番号 特願2015-93599 (P2015-93599)	(71) 出願人 000173588 公益財団法人がん研究会 東京都江東区有明三丁目8番31号
(32) 優先日 平成27年4月30日 (2015.4.30)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 110002572 特許業務法人平木国際特許事務所
	(72) 発明者 小川 誠司 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内
	(72) 発明者 片岡 圭亮 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PD-L1 (CD274) の異常を指標としたPD-1/PD-L1阻害剤の治療効果予測方法

(57) 【要約】

本発明は、PD-1/PD-L1阻害剤の治療効果を予測するための有効な方法の提供を目的とする、悪性腫瘍を罹患している被験体において、PD-1/PD-L1阻害剤が治療に有効であるか否かを予測する方法であって、前記被験体から採取した腫瘍細胞においてPD-1/PD-L1阻害剤の有効性に関連するゲノムの異常を検出し、異常が存在する場合に、PD-1/PD-L1阻害剤が前記被験体の治療に有効であると評価する方法である。



AA Tumor volume (mm³)
 BB Days after transplantation
 CC Isotype control (n=7)
 DD Anti-PD-L1 antibody (n=8)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

悪性腫瘍を罹患している被験体において、PD-1/PD-L1阻害剤が治療に有効であるか否かを予測する方法であって、前記被験体から採取した腫瘍細胞においてPD-1/PD-L1阻害剤の有効性に関連するゲノムの異常を検出し、異常が存在する場合に、PD-1/PD-L1阻害剤が前記被験体の治療に有効であると評価する方法。

【請求項 2】

PD-1/PD-L1阻害剤の有効性に関連するゲノムの異常が、PD-L1 (CD274) 遺伝子の発現亢進に関連するPD-L1遺伝子の異常である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

PD-L1 遺伝子の異常が、PD-L1 遺伝子の3'UTR領域の完全なまたは部分的な欠失である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

PD-L1 遺伝子の異常が、PD-L1 遺伝子の3'UTR領域の欠失を引き起こすコピー数変化である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 5】

PD-L1 遺伝子の異常が、PD-L1 転写物からのエクソン 6 およびエクソン 7 の全部または部分的な切断である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 6】

PD-L1 遺伝子の異常が、PD-L1 転写物からのエクソン 5、エクソン 6 およびエクソン 7 の全部または部分的な切断である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 7】

PD-L1 遺伝子のエクソン 1 ~ エクソン 5 のいずれかの転写産物とPD-L1 遺伝子の3'UTR領域の転写産物を定量し、エクソン転写産物の量と3'UTR領域の転写産物の量の比を算出し、該比が所定の値以上の場合にPD-1/PD-L1阻害剤ががん治療に有効であると評価する、請求項 2 記載の方法。

【請求項 8】

PD-L1 遺伝子の異常が、PD-L1 mRNAの発現の亢進である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 9】

PD-L1 遺伝子の異常が、ウイルスの挿入による異常である、請求項 2 記載の方法。

【請求項 10】

ウイルスがHuman papilloma virus (HPV) 又はEBV (Epstein-barr virus) である、請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

被験体から採取した腫瘍細胞中のPD-L1タンパク質を、PD-L1に対する抗C末端抗体およびPD-L1に対する抗N末端抗体を使用した免疫組織染色により染色し、PD-L1に対する抗N末端抗体で染色が認められるが、PD-L1に対する抗C末端抗体では染色が認められない場合、PD-1/PD-L1阻害剤が前記被験体の治療に有効であると評価する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 12】

悪性腫瘍が、成人T細胞白血病/リンパ腫、胃がん、大腸がん、膀胱がん、子宮頸がん、腎がん、肺腺がん、皮膚悪性黒色腫およびB細胞リンパ腫からなる群から選択される、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

悪性腫瘍が、食道がん、頭頸部がん、直腸がんおよび子宮体がんからなる群から選択される、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

PD-1/PD-L1阻害剤が抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体である、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 1 】

本発明は、腫瘍細胞のPD-L1遺伝子の異常の有無を調べることにより抗PD-1抗体等のPD-1/PD-L1阻害剤の治療効果を予測する方法に関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

近年、転移性悪性黒色腫、腎がん、肺がんやホジキン病をはじめとする様々な悪性腫瘍にPD-1/PD-L1阻害剤が有効であることが明らかになってきた。PD-1/PD-L1阻害剤としては、抗PD-1モノクローナル抗体であるニボルマブ(Nivolumab)が既に実用化されている(特許文献1を参照)。現在、この阻害剤の治療効果を予測するためのバイオマーカーの探索が喫緊の課題となっており、免疫染色により腫瘍細胞および周囲の免疫細胞でPD-L1陽性が認められる場合に奏効率が高いことが明らかとなっている。しかし、免疫染色によるPD-L1陽性率の評価は感度・特異度が十分ではなく、今後更なる治療の奏効率予測の改善が望まれる。

10

【 0 0 0 3 】

また、PD-1/PD-L1阻害剤はすでに多くの悪性腫瘍において有効であることが明らかになりつつあるが、中には奏効率が低い悪性腫瘍も含まれる。しかし、そのような腫瘍においても一部にPD-L1の構造異常およびそれに伴う高発現を有する症例は存在する可能性が見込まれる。しかし、PD-1/PD-L1阻害剤が有効な可能性がある症例を選別する有用な方法は確立されていない。

20

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 4 】

【 特許文献 1 】 特開2006-340714号公報

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 5 】

本発明は、PD-1/PD-L1阻害剤の治療効果を予測するために有効な方法の提供を目的とする。さらに、これまでPD-1/PD-L1阻害剤が使用されていない腫瘍においても、これらの阻害剤が有効な可能性が高い症例を選別して治療を行うプラットフォームを開発する。

30

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 6 】

本発明者らは、成人T細胞白血病/リンパ腫(adult T-cell leukemia/lymphoma: ATL)の網羅的遺伝子解析(RNAシーケンス 57例、全ゲノムシーケンス 11例)を行うことにより、ATL症例の約20%にPD-L1(CD274)の構造異常が存在することを明らかにした。この構造異常には欠失(deletion), 増幅(tandem duplication), 逆位(inversion), 転座(translocation)の全ての構造異常が含まれ、すべてに共通して3' UTRの欠失が認められた。さらに、構造異常を伴う例では、全例で顕著なPD-L1 mRNAの上昇を認め、フローサイトメトリーにより細胞表面におけるPD-L1蛋白の発現上昇も認めた。さらに、TCGAデータを用いて他のがんにおいて同様の異常が認められないか検索した結果、胃がん、肺がん、大腸がん、子宮頸がん、悪性黒色腫、B細胞リンパ腫など様々な悪性腫瘍において同様の異常が認められることを見出した。この結果は、様々な悪性腫瘍に共通に起こる異常としてPD-L1の3' UTRが欠損する構造異常とそれに伴うPD-L1高発現があることを示唆している。

40

【 0 0 0 7 】

これらの結果より、本発明者らはPD-L1遺伝子の3' UTRの欠失を指標にして、PD-1/PD-L1阻害剤の効果を判定評価し得ることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【 0 0 0 8 】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] 悪性腫瘍を罹患している被験体において、PD-1/PD-L1阻害剤が治療に有効であるかを予測する方法であって、前記被験体から採取した腫瘍細胞においてPD-1/PD-L1阻害剤の有効性に関連するゲノムの異常を検出し、異常が存在する場合に、PD-1/PD-L1阻害剤

50

が前記被験体の治療に有効であると評価する方法。

[2] PD-1/PD-L1阻害剤の有効性に関連するゲノムの異常が、PD-L1 (CD274) 遺伝子の発現亢進に関連するPD-L1遺伝子の異常である、[1]の方法。

[3] PD-L1遺伝子の異常が、PD-L1遺伝子の3'UTR領域の完全なまたは部分的な欠失である、[2]の方法。

[4] PD-L1遺伝子の異常が、PD-L1遺伝子の3'UTR領域の欠失を引き起こすコピー数変化である、[2]の方法。

[5] PD-L1遺伝子の異常が、PD-L1転写物からのエクソン 5、エクソン 6 およびエクソン 7 の全部または部分的な切断である、[2]の方法。

[6] PD-L1遺伝子の異常が、PD-L1転写物からのエクソン 5、エクソン 6 およびエクソン 7 の全部または部分的な切断である、[2]の方法。

[7] PD-L1遺伝子のエクソン 1 ~ エクソン 4 のいずれかの転写産物とPD-L1遺伝子の3'UTR領域の転写産物を定量し、エクソン転写産物の量と3'UTR領域の転写産物の量の比を算出し、該比が所定の値以上の場合にPD-1/PD-L1阻害剤ががん治療に有効であると評価する、[2]の方法。

[8] PD-L1遺伝子の異常が、PD-L1 mRNAの発現の亢進である、[2]の方法。

[9] PD-L1遺伝子の異常が、ウイルスの挿入による異常である、[2]の方法。

[1 0] ウイルスがHuman papilloma virus (HPV) 又はEBV (Epstein-barr virus) である、[9]の方法。

[1 1] 被験体から採取した腫瘍細胞中のPD-L1タンパク質を、PD-L1に対する抗C末端抗体およびPD-L1に対する抗N末端抗体を使用した免疫組織染色により染色し、PD-L1に対する抗N末端抗体で染色が認められるが、PD-L1に対する抗C末端抗体では染色が認められない場合、PD-1/PD-L1阻害剤が前記被験体の治療に有効であると評価する[2]の方法。

[1 2] 悪性腫瘍が、成人T細胞白血病/リンパ腫、胃がん、大腸がん、膀胱がん、子宮頸がん、腎がん、肺腺がん、皮膚悪性黒色腫およびB細胞リンパ腫からなる群から選択される、[1] ~ [1 1] のいずれかの方法。

[1 3] 悪性腫瘍が、食道がん、頭頸部がんおよび子宮体がんからなる群から選択される、[1] ~ [1 1] のいずれかの方法。

[1 4] PD-1/PD-L1阻害剤が抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体である、[1] ~ [1 3] のいずれかの方法。

[1 5] 悪性腫瘍を罹患している被験体から採取した腫瘍細胞においてPD-1/PD-L1阻害剤の有効性に関連するゲノムの異常を検出し、異常が存在する場合に、PD-1/PD-L1阻害剤を用いて治療する方法。

【発明の効果】

【 0 0 0 9 】

実施例に示したように、様々な悪性腫瘍においてPD-L1遺伝子の構造異常によりPD-L1が高発現する症例が存在する。すなわち、免疫チェックポイントの中心であるPD-L1の構造異常およびその結果起こる非コーディング領域との融合遺伝子という、通常の予想を超えた遺伝子異常を様々な悪性腫瘍において同定した。本研究におけるpreclinical study(マウスモデル)、およびゲノム異常によりPD-L1の恒常的活性化が起こると唯一知られているホジキン病において、抗PD-1/PD-L1阻害剤が圧倒的に有効であること(奏効率約90%)を鑑みると、PD-L1構造異常を有する患者では抗PD-1/PD-L1阻害剤が極めて有効であると期待され、有望なバイオマーカーとなることが期待される。従って、効果の高い治療に直結する遺伝子異常は臨床検査の対象として極めて有望である。

【 0 0 1 0 】

すでにPD-1/PD-L1阻害剤が使用されている悪性腫瘍に関しては、PD-L1構造異常を検出することにより、PD-1/PD-L1阻害剤の治療効果を予測できる可能性がある。また、現在PD-1/PD-L1阻害剤が使用されていない腫瘍に関しても、PD-L1遺伝子の異常を有する場合にPD-1/PD-L1阻害剤が有効である可能性が考えられ、そのような症例を選別することにより新規の治療法を確立できる可能性が見込まれる。また、PD-L1の構造異常を指標として

10

20

30

40

50

臨床試験を行うことにより、効率的に適応疾患を拡大できる可能性がある。このことは、現在、適応が承認あるいは検討中の悪性腫瘍のみならず、全体としては有効性が不十分である悪性腫瘍に対しても、適応が拡大できる可能性がある。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

【図 1】RNAシーケンス57例および全ゲノムシーケンス11例における9p24.1領域の構造異常の検索の結果を示す図である。

【図 2】RNAシーケンス 57例の構造異常とCD274発現の関係の解析結果を示す図である。

【図 3】CD274の各エクソンにおける発現の解析結果を示す図である。

【図 4】エクソン3における発現、およびエクソン3における発現と3' UTRの発現の比とCD274構造異常の関係を示す図である。 10

【図 5】ATLにおいて同定されたCD274の途中で切断された転写産物の解析結果を示す図である。

【図 6】CD274の転写産物が途中で切断される例のアミノ酸配列を示す図である。

【図 7】ATL患者由来細胞を用いたCD274蛋白の膜表面での発現を示す図である。

【図 8】TCGAデータを用いた種々のがんにおけるCD274構造異常と発現の解析結果を示す図である。

【図 9】悪性黒色腫・大腸がん・胃がん・B細胞リンパ腫におけるCD274の発現を示す図である。

【図 10】TCGAデータにおける各種悪性腫瘍のCD274の発現解析結果を示す図である（その1）。 20

【図 11】TCGAデータにおける各種悪性腫瘍のCD274の発現解析結果を示す図である（その2）。

【図 12】SNPアレイを用いたCD274異常の検出結果（GISTICの結果）を示す図である。

【図 13】SNPアレイを用いたCD274異常の検出結果（CNAGの結果）を示す図である。

【図 14】RQ-PCRを用いたCD274異常の検出結果を示す図である。

【図 15】ATL患者におけるPD-L1発現の免疫染色結果を示す図である。

【図 16】TCGAデータを用いた種々のがんにおけるCD274構造異常と発現の解析結果を示す図である（その2）。

【図 17】発がんウイルスのCD274領域への挿入とCD274 3' UTR異常を示す図である。 30

【図 18】ヒト・マウス細胞株においてCD274 3' UTRの異常の導入によりCD274過剰発現が誘導されることを示す図である。

【図 19】CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現がPD-1発現T細胞にアポトーシスを誘導することを示す図である。

【図 20 - 1】CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現が造腫瘍能に与える影響を評価する実験のプロトコルを示す図である。

【図 20 - 2】CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現が造腫瘍能に与える影響を示す図である。

【図 21 - 1】CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現はCD8陽性T細胞の腫瘍内への浸潤を抑制することを示す図（染色像）である。 40

【図 21 - 2】CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現はCD8陽性T細胞の腫瘍内への浸潤を抑制することを示す図（細胞数のグラフ）である。

【図 22 - 1】CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現による造腫瘍能に対するPD-1/PD-L1阻害剤の効果を腫瘍径の経時的変化により示す図である。

【図 22 - 2】CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現による造腫瘍能に対するPD-1/PD-L1阻害の効果を免疫染色により示す図である。

【図 22 - 3】CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現による造腫瘍能に対するPD-1/PD-L1阻害剤の効果を細胞数により示す図である。

【図 23】CD274 open reading frameが切断された変異体のPD-1結合能をフローサイトメトリーによる評価により示す図である。 50

【図24】CD274領域のコピー数に独立して、CD274構造異常はCD274過剰発現に関係することを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0013】

本発明は、悪性腫瘍患者におけるPD-1/PD-L1阻害剤の有効性に関連するゲノム異常を指標にして、該患者におけるPD-1/PD-L1阻害剤の有効性を評価、判定する方法、あるいは該患者におけるPD-1/PD-L1阻害剤の有効性を評価、判定するための補助的データを取得する方法である。本発明において、評価、判定を予測ともいう。PD-L1はCD274、B7-H1とも称する。

10

【0014】

ここで、PD-1/PD-L1阻害剤の有効性に関連するゲノム異常とは、悪性腫瘍患者のゲノムにその異常が認められる場合に、PD-1/PD-L1阻害剤の有効性が高くなる異常をいう。このような異常として、例えば、PD-L1遺伝子が存在する染色体9p24.1の異常、PD-L1遺伝子の異常が挙げられる。このような異常をPD-L1遺伝子の構造異常(SV: structural variation)とも呼ぶ。これらの異常に伴い、悪性腫瘍患者の腫瘍細胞においてPD-L1の発現異常が引き起こされ得る。PD-1/PD-L1阻害剤の有効性に関連するゲノム異常には、遺伝子の増幅(tandem duplication)、欠失(deletion)、逆位(inversion)、転座(translocation)などの構造的な異常および増幅・欠失・片親性ダイソミーなどのコピー数および発現産物や転写産物の質的(3' UTRの欠失)、量的な異常も含む。腫瘍細胞におけるPD-L1の発現異常とは、健常人の細胞に比べて、あるいは、PD-L1遺伝子の異常が認められない腫瘍細胞におけるPD-L1遺伝子の発現に比べて亢進していることをいい、例えば、PD-L1の発現がmRNAまたはタンパク質レベルで5倍以上、好ましくは10倍以上、さらに好ましくは20倍以上、さらに好ましくは50倍以上になっている場合をいう。PD-L1の発現異常を検出することにより、PD-1/PD-L1阻害剤の有効性に関連するゲノム異常が存在することを予測することができる。

20

【0015】

生体はT細胞が腫瘍細胞を攻撃する抗腫瘍免疫機能を有しているが、腫瘍細胞が発現しているPD-L1リガンドがT細胞に発現しているPD-1(Programmed cell death 1)と結合すると、T細胞の細胞死が誘導され、抗腫瘍免疫機能が抑制される。PD-1/PD-L1阻害剤は、腫瘍細胞のPD-L1とT細胞のPD-1の結合を阻害することにより、T細胞の抗腫瘍免疫機能が抑制されることを防止する。PD-1/PD-L1阻害剤としては、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体が挙げられ、がん治療薬として用いられている抗PD-1/PD-L1抗体として、ニボルマブ(Nivolumab)やMPDL3280A、pembrolizumab(MK-3475)、MED14736、MSB0010718C、Pidilizumab、MED10680などが挙げられる。PD-1/PD-L1阻害剤は、腫瘍細胞やその周囲の免疫細胞においてPD-L1が高発現している患者において、有効性が高い。従って、PD-L1の発現量を測定することによって、PD-1/PD-L1阻害剤の有効性を判断できる可能性がある。例えば、免疫染色により、腫瘍細胞におけるPD-L1の発現を確認することが可能であるが、免疫染色によるPD-L1陽性率の評価は感度、特異度が十分ではなかった。

30

40

【0016】

悪性腫瘍患者におけるゲノム異常が腫瘍細胞におけるPD-1/PD-L1阻害剤の有効性に関連しているか否かは、ゲノム異常がPD-L1遺伝子の発現亢進に関連しているか否かを調べればよく、腫瘍細胞において全ゲノムの構造異常を網羅的に解析するとともに、その腫瘍細胞におけるPD-L1遺伝子の発現をmRNAレベルまたはタンパク質レベルで測定し、ゲノム異常とPD-L1遺伝子の発現亢進を関連付けることにより決定することができる。例えば、腫瘍細胞からDNAを単離し、全ゲノムのシーケンスを行い、増幅(tandem duplication)、逆位(inversion)、転座(translocation)、欠失(deletion)等のゲノムの構造異常を解析し、同時に前記腫瘍細胞の全RNAのシーケンスを行い、PD-L1遺伝子の発現を測定し、ゲノム異常とPD-L1遺伝子の発現との関連を解析すればよい。例えば、あるゲノム異常を有

50

する腫瘍細胞の多くにおいて、PD-L1遺伝子の発現の亢進が認められる場合、その異常はPD-L1遺伝子の発現亢進と関連しており、PD-1/PD-L1阻害剤の有効性に関連していると決定することができる。

【0017】

実際、ゲノム異常によりPD-L1遺伝子の発現が亢進している場合、PD-1を発現するT細胞にアポトーシスが誘導される。また、ゲノム異常によりPD-L1遺伝子の発現が亢進している場合、CD8陽性細胞傷害性T細胞の腫瘍内への浸潤が抑制され、腫瘍の増殖が亢進する。さらに、PD-L1ゲノム異常による免疫からの回避は抗PD-1/PD-L1阻害により抑止される。

【0018】

本発明の方法により、PD-L1/PD-1阻害剤の有効性を評価、判定し得る腫瘍は限定されず、少なくとも、成人T細胞白血病/リンパ腫、胃がん、大腸がん、膀胱がん、子宮頸がん、腎がん、肺腺がん、皮膚悪性黒色腫、B細胞リンパ腫、食道がん、頭頸部がん、子宮体がん等が挙げられる。大腸がんは結腸がんおよび直腸がんも含む。

【0019】

本発明の方法においては、悪性腫瘍に罹患している被験体の腫瘍検体を採取し、該検体の腫瘍細胞のゲノム異常を解析すればよい。

【0020】

本発明の方法において、解析対象とする、PD-1/PD-L1阻害剤の有効性に関連するゲノム異常の具体的な例として、以下の異常が挙げられる。

【0021】

(1) PD-L1遺伝子の3'UTR(3'非翻訳領域)欠失を伴うゲノム異常

PD-L1遺伝子は9p24.1領域に存在し、その構造異常として、増幅(tandem duplication)、逆位(inversion)、転座(translocation)、欠失(deletion)が挙げられる。PD-L1遺伝子の構造異常により3'UTRに欠失がある場合、PD-L1の高発現が引き起こされる。これは、3'UTRがmRNAの安定性や翻訳調節に重要な役割を果たす領域であり、この領域の欠失によりこれらの機能が失われるからである。PD-L1遺伝子の3'UTRの欠失とは、完全な欠失も部分的な欠失も含まれる。また、PD-L1遺伝子を含む9p24.1領域のコピー数の異常(CNV)として増幅や減少・片親性ダイソミーが挙げられる。コピー数の異常は構造異常に伴って起きるが、3'UTRが欠損する場合にはPD-L1の高発現が引き起こされる。

【0022】

3'UTRを欠失したPD-L1遺伝子の一部はエクソン領域の途中で切断されており、野生型のPD-L1とは異なるタンパク質が産生される。PD-L1は細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内ドメインの3つのドメインからなり、PD-1との結合には細胞外ドメインと膜貫通ドメインが関与する。PD-L1遺伝子がエクソン領域の途中で切断された場合においても、PD-L1はPD-1との結合能を保持している。すなわち、PD-L1遺伝子がエクソン領域の途中で切断された場合においても、PD-L1は細胞外ドメインと膜貫通ドメインを保持している限り抗腫瘍免疫を抑制する機能は有している。従って、PD-L1タンパク質の切断の有無に関わらず、PD-L1遺伝子のゲノム異常によりPD-L1タンパク質を高発現している腫瘍細胞はPD-1/PD-L1阻害剤により腫瘍免疫を抑制する機能を阻害され得る。従って、PD-1/PD-L1阻害はPD-L1遺伝子のゲノム異常を有する悪性腫瘍の治療に有効である。

【0023】

PD-L1遺伝子の塩基配列は、NM_014143として登録されている。PD-L1遺伝子の3'UTRの塩基配列を配列番号2に示す。

【0024】

(2) PD-L1遺伝子の転写産物および翻訳産物の異常

PD-L1のmRNAの異常として、mRNAの3'UTRの全部または部分的な切断およびそれに伴う高発現が挙げられる。さらに、エクソン5または6以降の切断を伴う場合がある。エクソンの切断として、エクソン6およびエクソン7全体の切断、エクソン7全体の切断、エクソン7の途中からの切断が挙げられる。本発明において、このようなエクソンの切断をエ

10

20

30

40

50

クソン6またはエクソン7の全部または部分的な切断という。さらに、エクソン4以降の切断、すなわち、エクソン5、エクソン6およびエクソン7全体の切断が生じ得る。

【0025】

PD-L1タンパク質の異常として、高発現が挙げられる。PD-L1タンパク質の高発現は、PD-L1遺伝子のコピー数の増幅とは独立して、PD-L1遺伝子の構造異常と関係している。また、エクソン5または6はPD-L1タンパクの細胞内ドメインを構成するので、エクソン4以降の欠失を伴う場合、PD-L1タンパク質の異常は細胞内ドメインの部分的欠失を含む。

【0026】

また、Human papilloma virus (HPV) 16等のHPVやEBV (Epstein-barr virus)等の発がんウイルス遺伝子がPD-L1遺伝子領域に挿入され、構造異常を引き起こすこともある。例えば、Human papilloma virus (HPV)がPD-L1遺伝子のintron 6に挿入されることがあり、また、Epstein-Barr virus(EBV)遺伝子がPD-L1遺伝子に隣接した上流の遺伝子に挿入され、PD-L1転写産物が3'UTRで切断されることがある。

10

【0027】

PD-1/PD-L1阻害剤の有効性に関連するゲノム異常の解析は、悪性腫瘍患者から採取した腫瘍細胞を用いて、通常のゲノムの構造異常や遺伝子の異常の解析方法によって行うことができる。例えば、腫瘍細胞からDNAまたはRNAを抽出し、PCR/サンガーシーケンス法、ジデオキシ法やMaxam-Gilbert法等の公知の方法により直接配列決定するシーケンス解析による解析法、全ゲノムシーケンス、全エクソンシーケンス、標的シーケンス等を含む次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析法、FISH(蛍光in situハイブリダイゼーション)法、SNPアレイやCGHアレイ等を用いるコピー数解析法などの遺伝子の異常が存在する領域に特異的なプローブや該プローブを固定化したマイクロアレイ(DNAチップ)などを用いるハイブリダイゼーション法、遺伝子の異常が存在する領域に特異的なプライマーを用いる種々の方法があげられる。プライマーを用いる方法として、PCR法、NASBA法、LCR法、SDA法、LAMP法、制限断片長多型(RFLP)を利用する方法、プライマー伸長法(TaqMan(登録商標)法)等が挙げられる。次世代シーケンサーとしては、Genome Sequencer FLX(GD FLX)(Roche社)、Illumina HiSeq/MiSeq(Illumina社)等を用いることができる。

20

【0028】

PD-L1遺伝子の3'UTRの欠失は、プローブやプライマーを用いた方法により検出することができる。また、RNAシーケンスやFISH法によって検出することもできる。

30

【0029】

mRNAにおける3'UTRの欠失の検出は、欠失が認められていないPD-L1遺伝子のエクソン(エクソン1~5)の転写量と3'UTRの転写量の比を算出することにより実施可能である。例えば、PD-L1遺伝子のエクソン1~5のいずれか、例えばエクソン3またはエクソン4のmRNAと、3'UTR領域のmRNAをRNAシーケンスや定量的PCRにより定量し、エクソン3またはエクソン4の発現/3'UTRの発現の比を算出することにより、3'UTRの発現の有無、すなわち、3'UTRの欠失の有無を決定することができる。該比が大きい場合、3'UTRが欠失していると判断することができる。エクソン3の発現/3'UTRの発現の比が大きいとは、PD-L1遺伝子の異常が認められない腫瘍細胞におけるエクソン3の発現/3'UTRの発現の比に対して大きい場合をいい、例えば、エクソン3の発現/3'UTRの発現の比が所定の値以上の場合、例えば、2倍以上、好ましくは3倍以上、さらに好ましくは5倍以上になっている場合をいう。また、エクソン4の発現/3'UTRの発現の比が大きいとは、PD-L1遺伝子の異常が認められない腫瘍細胞におけるエクソン4の発現/3'UTRの発現の比に対して大きい場合をいい、例えば、エクソン4の発現/3'UTRの発現の比が所定の値以上の場合、例えば、2倍以上、好ましくは3倍以上、さらに好ましくは5倍以上になっている場合をいう。

40

【0030】

PD-L1遺伝子の発現異常は、腫瘍細胞中のPD-L1のmRNAをRQ-PCRやRT-PCR等の(半)定量的PCRを用いて検出することができる。RQ-PCRはPCR過程の間に連続的にPCR産物の蓄積を検出し、それによってPCRの初期の指数関数相における容易かつ正確な定量を可能にする手

50

法である。

【0031】

上記の手法で用いるプローブやプライマーは、PD-L1遺伝子の発現亢進に関連するゲノム異常部位を含む塩基配列または該塩基配列に相補的な塩基配列或いはストリンジェント条件下でそれらの配列にハイブリダイズし得る配列からなるヌクレオチド断片（好ましくは、DNA断片）からなり、塩基の数は5～50、好ましくは10～30、さらに好ましくは10～25である。

【0032】

また、PD-L1遺伝子の構造異常により、エクソン4以降が欠失され、すなわち、PD-L1タンパク質のC末端領域が欠失し、ORFが切断された場合、発現した異常タンパク質はPD-L1タンパク質のC末端領域に対する抗体（PD-L1に対する抗C末端抗体）とは反応するが、PD-L1タンパク質のN末端領域に対する抗体（PD-L1に対する抗N末端抗体）とは反応しない。従って、PD-L1に対する抗C末端抗体およびPD-L1に対する抗N末端抗体を用いて、両抗体を産生されたPD-L1タンパク質との反応性を調べることにより、PD-L1遺伝子の構造異常を同定することができる。具体的には、例えば、蛍光色素等で染色したPD-L1に対する抗C末端抗体およびPD-L1に対する抗N末端抗体を用いて腫瘍細胞中のPD-L1タンパク質を染色し、可視化すればよい。抗N末端抗体で染色が認められるが、抗C末端抗体では染色が認められない場合、PD-L1遺伝子に構造異常があると判断することができる。

10

【0033】

本発明の方法により、被験体から採取した腫瘍細胞においてPD-L1遺伝子の発現亢進に関連するPD-L1遺伝子の異常の存在が認められた場合、該被験体の悪性腫瘍の治療にPD-1/PD-L1阻害剤が有効である可能性が高いと評価、判定することができる。また、ある悪性腫瘍の腫瘍細胞において、PD-L1遺伝子の発現亢進に関連するPD-L1遺伝子の異常の存在が認められた場合、該悪性腫瘍の治療にPD-1/PD-L1阻害剤が有効である可能性が高いと評価、判定することができる。

20

【0034】

悪性腫瘍によって、PD-1/PD-L1阻害剤が有効である患者の割合は異なると考えられる。例えば、成人T細胞白血病/リンパ腫、胃がん、大腸がん、膀胱がん、子宮頸がん、腎がん、肺線がん、皮膚悪性黒色腫、B細胞リンパ腫、食道がん、頭頸部がん、子宮体がんでは、転写産物の3'UTR異常例において、PD-L1の発現が亢進していることが判明している。これらの悪性腫瘍を罹患している患者については、本発明の方法により、PD-1/PD-L1阻害剤が有効か否かを評価、判定することができる。また、これら以外の悪性腫瘍に罹患している患者についても、本発明の方法により、悪性腫瘍に罹患している患者に対して、PD-1/PD-L1阻害剤が有効か否かを評価、判定することができる。

30

【0035】

さらに、例えば、成人T細胞白血病、胃がん等ではPD-1/PD-L1阻害剤が有効である患者の割合は高いが、悪性黒色腫、肺がん、腎がん等では低い可能性がある。本発明の方法により、PD-1/PD-L1阻害剤が有効である患者の割合が高い悪性腫瘍において、悪性腫瘍に罹患している患者に対してPD-1/PD-L1阻害剤の有効性を評価、判定することができるだけでなく、PD-1/PD-L1阻害剤が有効である患者の割合が低く、従来はPD-1/PD-L1の適用を行わなかった悪性腫瘍において、悪性腫瘍に罹患している患者に対して、PD-1/PD-L1阻害剤の有効性を評価、判定することができるようになる。

40

【0036】

すなわち、本発明は、悪性腫瘍を罹患している被験体において、PD-1/PD-L1阻害剤が治療に有効であるか否かを予測する方法において、悪性腫瘍が、PD-1/PD-L1阻害剤の有効性が低い悪性腫瘍であり、被験体から採取した被験体から採取した腫瘍細胞においてPD-1/PD-L1阻害剤の有効性に関連するゲノムの異常を検出し、異常が存在する場合に、PD-1/PD-L1阻害剤が前記被験体の治療に有効であると評価することにより、PD-1/PD-L1阻害剤の有効性が低い腫瘍に、PD-1/PD-L1阻害剤の適応を拡大する方法も包含する。

【0037】

50

以上のように、本発明の方法により、種々の悪性腫瘍について、あるいは種々の悪性腫瘍に罹患している患者個人についてPD-1/PD-L1阻害剤が有効か否かを評価、判定することができ、患者に対して適した治療法を選択することが可能になる。

【0038】

被験体から採取した腫瘍細胞においてPD-L1遺伝子の発現亢進に関連するPD-L1遺伝子の異常の存在が認められ、該被験体の悪性腫瘍の治療にPD-1/PD-L1阻害剤が有効である可能性が高いと評価、判定することができた場合、該被験体に、抗PD-1モノクローナル抗体、抗PD-L1モノクローナル抗体を含むPD-1/PD-L1阻害剤等の免疫チェックポイント阻害剤を投与すればよい。

【0039】

投与量は、年齢、体重、症状等により異なるが、数日、数週間あるいは数ヶ月おきに1回あたり、0.001mg~100mgを静脈注射、腹腔内注射、皮下注射、筋肉注射等の非経口投与や経口投与によって投与すればよい。投与する阻害剤は、薬理的に許容され得る担体、希釈剤若しくは賦形剤を含んでいてもよい。また、阻害剤の形態は限定されず、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、あるいは注射剤、点滴剤、座薬、スプレー剤などによる非経口投与等が挙げられる。

【実施例】

【0040】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0041】

1. RNAシーケンス57例および全ゲノムシーケンス11例における9p24.1領域の構造異常の検索

(方法)

ATL(成人T細胞白血病)57例の腫瘍検体を用いたRNAシーケンスとATL11例の腫瘍・正常(頬粘膜)ペアの全ゲノムシーケンスを行った。

【0042】

腫瘍検体のRNAはRNeasy Mini kit(QIAGEN)により抽出し、Agilent RNA ScreenTape System(Agilent)を用いてRINeを測定した。

【0043】

RNAシーケンス用のライブラリ作成は、200~500ngかつRINe 7以上のRNAを用いてNEBNext Ultra RNA Library Prep Kit(New England Biolabs)により行い、HiSeq2000/2500を用いて塩基配列を決定した。そのデータを東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターが公開しているGenomon Fusion(<http://genomon.hgc.jp/rna/>)というアルゴリズムを用いて解析し、融合遺伝子の同定および発現解析を行った。

【0044】

全ゲノムシーケンスのライブラリ作成はWGS using NEBNext DNA Library Prep Reagent(New England Biolabs)を用いて行い、HiSeq2000/2500を用いて塩基配列を決定した。

【0045】

解析はTOTOKI Y. et al., NATURE GENETICS 46, 1267-1273 (2014)(doi:10.1038/ng.3126)の記載の通りに実施した。

【0046】

(結果)

結果を図1に示す。ATL患者57例中11例に9p24.1領域の構造異常(融合遺伝子)を認めた。

【0047】

構造異常はtandem duplication(増幅)(右上から左下への太い斜線)3例、inversion(逆位)(左上から右下への細い斜線)3例、translocation(転座)(白)3例、deletion(欠失)(右上から左下への細い斜線)2例と多岐に渡っていた。

【0048】

10

20

30

40

50

しかし、それら全ての例で3' UTR(untranslated region: 非翻訳領域 転写後調節に
与する)の欠損を認めるという共通点があった。

【0049】

また、CD274のエクソン5までは全例で保たれているが、それ以降は症例により一部切断
されていた。

【0050】

2. RNAseq 57例の構造異常とCD274発現の関係の解析

(方法)

1. のATL57例の腫瘍検体を用いたRNAシーケンスの結果を用いて、構造異常とCD274発
現の関係について解析した。

【0051】

発現値としてはFPKM(Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments
sequenced)を用いた。

【0052】

(結果)

結果を図2に示す。図2の棒グラフの模様(右上から左下への太い斜線、左上から右下
への細い斜線、白、右上から左下への細い斜線)は図1の模様に対応している。

【0053】

構造異常(1. と共通)を認める例でCD274の高発現が認められた。

【0054】

構造異常がない例(黒)と比較して、構造異常(+)の場合は、ほとんどの症例でCD274を著
明に高発現していた。

【0055】

3. CD274の各エクソンにおける発現の解析

(方法)

2. のATL57例のRNAシーケンスデータをIGV(integrative genome viewer) (提供: Broa
d Institute)を用いて、シーケンスリードをCD274(NM_014143)の各エクソン毎に表示し
た。

【0056】

CD274は7個のエクソンからなり、エクソン7の大部分を3' UTRが占める。

【0057】

(結果)

結果を図3に示す。図3の下の1~7の数字はエクソンの番号を示す。構造異常(-)例(
Miy31)では他のエクソンと比較して相対的に3' UTRにおける発現が高かった。一方、構
造異常(+)例(Miy26 & 30)では3' UTRにおける発現が消失していた。他の構造異常(+)例
も同様であった。この結果は、構造異常(+)例では、3' UTRの欠失に伴い、同部位の発現も
消失していることを示す。

【0058】

4. エクソン3における発現、およびエクソン3における発現と3' UTRの発現の比とCD274 構造異常の関係

(方法)

構造異常(+)例では3' UTRの発現が消失するので、3. のように遺伝子全体で発現を評
価する場合、発現が過小評価されて、構造異常との関係が不明瞭になっている可能性があ
る。そのため、3. のATL57例のRNAシーケンスデータを用いて、CD274の各エクソンの発
現および3' UTRの発現との比を計算した。その中で、構造異常との関係が最も明確であ
ったエクソン3の発現およびエクソン3の発現/3' UTRの発現(ex3 exp/3'UTR exp)を散布図
として表示した。

【0059】

(結果)

結果を図4に示す。図4中、白丸は構造異常(+), 黒丸は構造異常(-)の例を示す。「ex 50

10

20

30

40

50

3」はエクソン3を示し、「exp」は発現 (expression) を示す。CD274のエクソン3のみの発現、エクソン3の発現と3' UTRの発現の比を見ると、構造異常(+)例で、ex3 exp/3'UTR expが高く、構造異常(+)例 (白丸) が明確に分離された。

【0060】

5 . ATLにおいて同定されたCD274の途中で切断された転写産物の解析
(方法)

ATL57例のRNAシーケンスの結果から同定された11例のCD274構造異常(+)症例の中で、約半数ではエクソン5またはエクソン6で転写産物が切断されていた。それらの例で、RNAシーケンスで配列を確認し、転写産物の配列の同定を試みた。

【0061】

(結果)

結果を図5に示す。図5下部の塩基配列は構造異常(+)の症例(Miya26)における転写産物の配列である。エクソン6の3'末端までは野生型CD274が転写されるが、それ以降は3番染色体上のCBLB遺伝子のイントロン領域に繋がる(枠で囲んだ部分)。その領域では、終止コドン(イタリックで表したTGA)、polyAシグナル配列(AATAAA: polyAが結合するのに必要な配列、下線部)、polyA配列(二重下線部)を含んでいる。この結果は、CD274の構造異常により形成されたalternativeな転写産物が適切な転写産物として機能することを示している。これらの、図5に示した配列の全体を配列番号1に示し、3'UTRの配列を配列番号2に示す。

【0062】

6 . CD274の転写産物が途中で切断される例のアミノ酸配列
(方法)

リファレンス配列としてNP_054862を参照した。5 . の転写産物の配列を元に、CD274が途中で切断される例において、そのアミノ酸配列をin silicoで同定した。

【0063】

(結果)

結果を図6に示す。CD274はExtracellular domain(細胞外ドメイン)、Transmembrane domain(膜貫通ドメイン)、Cytoplasmic domain(細胞内ドメイン)で構成されるが、PD1/PD-L1 機構による腫瘍細胞の免疫回避には、前二者のドメインが重要と考えられている。

【0064】

図6においては、膜貫通ドメイン(枠で囲んだ部分で示す配列)の途中の配列から示してある。枠で囲んだ部分が膜貫通ドメインの配列であり、下線部のイタリック体で示した部分が細胞内ドメインの配列を示す。また、図6の上の「CD274 Wt」は野生型配列を示す。

【0065】

これらのCD274が途中で切断されている例(Miya15、Miya24、Miya26、Miya30、Sas8、Kyo4)においても前二者のドメインは保たれており、alterativeな転写産物もCD274として機能的し得る可能性が高いことが示唆された。

【0066】

7 . ATL患者由来細胞を用いたCD274蛋白の膜表面での発現の評価
(方法)

RNAシーケンスでCD274構造異常が同定された症例の腫瘍細胞を用いてフローサイトメトリーにより細胞表面におけるCD274の発現を評価した。腫瘍細胞はPE/Cy7 anti-human CD274 (B7-H1, PD-L1) Antibody (clone: 29E.2A3, BioLegend)を用いて染色し、LSR2 Fortessa(BD Biosciences)を用いて解析した。

【0067】

(結果)

結果を図7に示す。図7の枠で囲んだものが構造異常(+)例である。構造異常(-)例でもCD274の低発現が認められるが、構造異常(+)例ではCD274の顕著な高発現が確認され、発現量は100倍程度に増加していた。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 8 】

この結果は、構造異常(+)例でタンパク質レベルでCD274高発現があることを示している。

【 0 0 6 9 】

8 . TCGAデータを用いた種々の悪性腫瘍におけるCD274構造異常と発現の解析

(方法)

米国の様々な悪性腫瘍の次世代シーケンスデータのデータベースであるTCGA(<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>)に蓄積されているRNAシーケンスデータを用いて様々な悪性腫瘍におけるCD274の構造異常と発現の解析を行った。

【 0 0 7 0 】

(結果)

結果を図8に示す。図中の略語は以下のがん腫を表す。ACC：副腎がん、BLCA：膀胱がん、CESC：子宮頸がん、COAD：大腸がん、DLBC：びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、ESCA：食道がん、GBM：神経膠芽腫、HNSC：頭頸部がん、KICH：腎嫌色素性細胞がん、KIRC：胃淡明細胞がん、KIRP：乳頭状腎細胞がん、LAML：急性骨髄性白血病、LGG：低悪性度神経膠腫、LIHC：肝細胞がん、LUAD：肺腺がん、LUSC：肺扁平上皮がん、MESO：悪性中皮腫、OV：卵巣がん、PAAD：膵がん、PCPG：褐色細胞腫、PRAD：前立腺がん、READ：結腸がん、SARC：肉腫、SKCM：皮膚悪性黒色腫、STAD：胃がん、TGCT：精巣腫瘍、THCA：甲状腺がん、THYM：胸腺腫、UCEC：子宮体がん、UCS：子宮肉腫、UVM：ぶどう膜悪性黒色腫

10

20

【 0 0 7 1 】

(CTRL:コントロール)

図中の数字は各腫瘍におけるRNAシーケンスの例数であり、合計で10,000例以上を解析した。

【 0 0 7 2 】

9 . 各がんにおけるCD274の発現

(方法)

TCGAでは、RNAシーケンスデータより算出した発現データ(RSEM値を採用、胃がんのみRPKM値を採用)も公表している。そのデータを用いて、各がんにおいて症例ごとにCD274の発現(対数変換後)をヒストグラムとして表示した。

30

【 0 0 7 3 】

(結果)

図9に4種類のがんの結果を例として示す。様々ながんにおいて一部の症例のみにCD274の高発現が認められた。そのため、発現値でカットオフ値を決めて、詳細な解析を行うこととした。カットオフ値としては、胃がん以外はRSEM値、胃がんはRPKM値をそれぞれ対数変換した値を用いて、胃がん以外の場合は8、胃がんの場合は11を用いた(カットオフ値は評価のために適宜設定した値である)。図9中、SKCMは皮膚悪性黒色腫を(図9A)、COADREADは大腸がんを(図9B)、STADは胃がんを(図9C)、DLBCはびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(図9D)を示す。

40

【 0 0 7 4 】

10 . TCGAデータにおけるCD274の発現解析

(方法)

TCGAのカットオフ値以上の症例(CD274高発現例)について、4.と同じ方法を用いて、既にマッピング済みのRNAシーケンスデータにおける各エクソン毎の発現を評価し、IGV(integrative genome viewer)(提供:Broad Institute)で表示した。

【 0 0 7 5 】

(結果)

結果を図10に示す。その中で、一部でATLと同様の発現パターン(高発現かつ3'UTRの発現が欠損)が認められた。さらに、それらの症例でRNAシーケンスデータを用いて配列を詳細に解析すると、CD274の構造異常が確認できた。例として胃がん(STAD)(図10A)

50

、大腸がん(COAD)(図10B)を挙げている。それ以外に膀胱がん(BLCA)1例、子宮頸がん(CESC)1例、腎がん(KIRC)1例、肺腺がん(LUAD)2例、結腸がん(COAD)1例(計2例)・直腸がん(READ)1例、皮膚悪性黒色腫(SKCM)1例、胃がん(STAD)3例(計4例)にATLと同様のCD274高発現かつ3'UTRの発現が欠損が確認できた。

【0076】

図11には、同様にB細胞リンパ腫(DLBC)2例を例として示した(図11AおよびB)。DLBCにおいては、RNAシーケンスデータがある48例中CD274高発現2例中2例で同様の構造異常が認められた。

【0077】

図10および11の下の1~7はエクソンの番号を示している。

10

【0078】

図10および11に示す結果は、様々ながんにおいて3'UTRを含むCD274の構造異常とそれに伴うCD274高発現が起きていることを示している。

【0079】

1.1. SNPアレイを用いたCD274異常の検出
(方法)

ATL426例においてSNPアレイを用いたコピー数解析(手法:GISTIC)を行った。

【0080】

ATLと診断されインフォームドコンセントが得られた患者について、京都大学の倫理委員会によって承認されたプロトコルに従って、腫瘍検体を採取し、網羅的な遺伝子変異解析を行った。

20

【0081】

まず、ATL426例の腫瘍検体を用いてSNPアレイによるコピー数解析を行った(Affymetrix 250K 282例、Illumina 610K 144例)。アルゴリズムとしてはCNAG/AsCNARおよびGISTIC2.0を用いて局所的なコピー数増幅・減少部位の同定を行った。

【0082】

(結果)

GISTICの結果を図12に示す。ATL患者において26個の局所的なコピー数増幅および50個の局所的なコピー数減少を同定した。その一つに9p24.1領域のCD274(PD-L1)に増幅(14%)を認めた。

30

【0083】

CNAGの結果を図13に示す。図13中、上段がコピー数の増幅を示し、下段がコピー数減少を示す。GISTICでコールされる9p24.1領域のコピー数増幅の多くがCD274遺伝子の途中まで含み、3'UTRが欠損するようなコピー数増幅を引き起こしている。CD274遺伝子の3'側の一部を含むコピー数減少も認められ、3'UTRの欠損がコピー数減少によっても引き起こされることが確認される。少なくともMiya23, Miya24, Miya26のコピー数増幅を伴う症例では、全ゲノムシーケンスにて3'UTRの欠損を伴う構造異常(+)およびRNAシーケンスにてCD274高発現が確認された。また、Miya37, Miya38, Sas2のコピー数減少を伴う症例でも同様に確認された。

【0084】

1.2. RQ-PCRを用いたCD274異常の検出
(方法)

ATL13例においてRQ-PCRを用いてCD274の発現を評価した。

40

【0085】

ATL腫瘍検体からRNeasy Mini kit(QIAGEN)によりRNAを抽出し、ReverTra Ace(登録商標)qPCR RT Kit(TOYOBO)を用いて逆転写を行い、SYBR Premix Ex Taq II(TAKARA)を用いてPCR反応を行った。フォワードプライマーの配列は、GGCATCCAAGATACAAACTCAA(配列番号10)であり、リバープライマーの配列は、CAGAAGTTCCAATGCTGGATTA(配列番号11)であった。PCRはHolding 95 10sec, Cycling(95 5sec, 60 30sec, 72 30sec)×50cyclesで行った。検出はLightCycler(登録商標)480 System(Roche Applied Scie

50

nce)を用いて行った。Internal controlとして18Sを用いて、CD274との比を示した。

【0086】

(結果)

結果を図14に示す。ATL患者において構造異常を認める3例(棒グラフの右上から左下への太斜線のバーの2例(増幅(tandem duplication)が認められたもの)および左上から右下への細斜線のバーの1例(逆位(inversion)が認められたもの))においてCD274の高発現を認めた。

【0087】

13. ATLにおけるPD-L1の免疫染色

(方法)

PD-L1 構造異常(SV: structural variation)がないATL059, PD-L1 SV(+)でORFが保たれているATL075, SV(+)でORFが切断されているATL012の3症例で、PD-L1に対する抗N末端抗体(E1J2J, Cell Signaling Technology)と抗C末端抗体(SP142, Spring Bioscience)を用いて免疫染色を実施した。

【0088】

抗原抗体複合体はHistofine(登録商標) Simple Stain MAX PO (Nichirei Bioscience)を用いて可視化した。

【0089】

(結果)

結果を図15に示す。図15AはPD-L1 SVがないATL059(ATL059: PD-L1 SV(-))、図15BはPD-L1 SV(+)でORFが保たれているATL075(ATL075: PD-L1 SV(+), intact ORF)、図15CはSV(+)でORFが切断されているATL012(ATL012: PD-L1 SV(+), truncated ORF)の結果を示す。また、図15の上段は、抗N末端抗体を用いた免疫染色の結果を示し、図15の下段は、抗C末端抗体を用いた免疫染色の結果を示す。図15Aに示すように、PD-L1 SVがないATL059では腫瘍細胞の染色は認められなかった(図15Aには、散発的に染色されておりモノクロ写真ではグレーに見える大型の細胞が認められるが、これはマクロファージである)。

【0090】

図15Bに示すように、PD-L1 SV(+)でORFが保たれているATL075では、抗N末端抗体、抗C末端抗体の両方で強い染色が認められた。

【0091】

また、図15Cに示すように、SV(+)でORFが切断されているATL012では、抗N末端抗体で強い染色が認められたが、抗C末端抗体では染色は認められなかった。

【0092】

この結果は、PD-L1 SVがあるとPD-L1発現が蛋白レベルで強く増加することを示しており、ATL012で抗C末端抗体で染色されないことはORFが切断されていることと一致している。さらに、この結果は、抗N末端抗体と抗C末端抗体の2重染色によりPD-L1 SVが同定可能であることを示している。

【0093】

ウエスタンブロットでも、PD-L1に対する抗N末端抗体と抗C末端抗体を用いることにより、同様の結果が得られることを示している。

【0094】

14. 様々ながん腫におけるPD-L1の発現

(方法)

TCGAで公開されている33のがん腫(固形がん)、10210例のRNAシーケンスデータより算出した発現データ(RSEM値)に基づいて上位10%(最低30例)の症例を抽出し、RNAシーケンスデータをダウンロードし、CD274融合遺伝子(+)および/またはCD274領域にウイルスの挿入(+)および/またはCD274エクソン4/3'UTR比高値の症例を抽出した。DLBCおよびSTADについては頻度が高かったため、全症例を対象とした。

【0095】

10

20

30

40

50

合計1691例のRNAシーケンスデータをダウンロードして解析した。そのデータを用いて、各がん腫において症例ごとにCD274の発現(エクソン 4のRPKM値を対数変換後)を表示した。

【 0 0 9 6 】

(結果)

結果を図 1 6 に示す。

【 0 0 9 7 】

図 1 6 中、黒丸はCD274融合遺伝子(+)および/またはCD274 エクソン 4 / 3 ' UTR比高値の症例であり、二重丸はCD274領域にウイルスの挿入(+)の症例である。

【 0 0 9 8 】

合計12組織(計26例)のがんにおいてCD274融合遺伝子(+)および/またはCD274領域にウイルスの挿入(+)および/またはCD274 エクソン 4 / 3 ' UTR比高値が認められた。この結果から、CD274の3 ' UTRが切断される異常は様々ながんで認められることが明らかとなった。さらに、これらの症例は、各がん腫の中でも、最もCD274高発現である症例が多く、CD274発現調節において3 ' UTRが極めて重要であることが示唆される。

BLCA: 膀胱がん 1例

CESC: 子宮頸がん 2例

COAD: 結腸がん 2例

DLBC: B細胞性リンパ腫 4例

ESCA: 食道がん 1例

HNSC: 頭頸部がん 1例

KIRC: 腎がん 1例

LUAD: 肺腺がん 2例

READ: 直腸がん 1例

SKCM: 悪性黒色腫 1例

STAD: 胃がん 9例

UCEC: 子宮体がん 1例

【 0 0 9 9 】

1 5 . 発がんウイルスのCD274領域への挿入とCD274 3 ' UTR異常

(方法)

TCGAよりダウンロードした1,691例のRNAシーケンスデータで、がん関連ウイルスのゲノムへの挿入がCD274遺伝子内または周囲で認められるかを検証した。

【 0 1 0 0 】

(結果)

その中で、前述の26例の中で、3例(CESC 1例、HNSC 1例、STAD 1例)で発がんウイルスのCD274領域への挿入を認めた。

【 0 1 0 1 】

図 1 7 にVS-A9U7-01症例(CESC) (図 1 7 A) およびFP-7998-01症例(STAD) (図 1 7 B) の検証結果を示す。

【 0 1 0 2 】

Human papilloma virus (HPV) 16の挿入をCD274のイントロン 6に認めたVS-A9U7-01症例(CESC)では、CD274転写産物のORFはエクソン 6で切断されて、CD274 イントロン6からHPV (human papilloma virus) E2/E5遺伝子へと続く転写産物が形成されていた。

【 0 1 0 3 】

またはEpstein-Barr virus(EBV)の挿入をCD274の隣接した上流の遺伝子であるPLGRKT イントロン 3に認めるFP-7998-01症例(STAD)では、その領域を含むtandem duplicationが生じ、CD274転写産物が3 ' UTRで切断されていた。

【 0 1 0 4 】

これらの結果はCD274領域への発がんウイルスの挿入とCD274 3 ' UTR異常の関連があることを示している。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 5 】

16. CRISPR/Cas9システムを用いてCD274 3' UTRに欠失または逆位を導入することにより、CD274発現が顕著に上昇する。

(方法)

ヒト(上段)またはマウス(下段)の細胞株に対して、CD274 3' UTRの5' 末端および3' 末端の2カ所を標的とするsgRNAおよびCas9をトランスフェクションすることにより、これらの細胞株にCD274 3' UTRのほぼ全長(2.7kb)に渡る欠失または逆位をCRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9システムを用いて導入した。その細胞を純化して、フローサイトメトリーによりCD274の細胞表面での発現を評価した。目的の欠失または逆位が導入されていることは、PCRおよびシーケンスにて確認した。

10

【 0 1 0 6 】

対象としては、ヒト細胞株であるHEK293T(胎児腎)、T2(T細胞とB細胞のハイブリッド)、PC-9(肺がん)および、マウス細胞株であるEG7-OVA(T細胞リンパ腫、Ovalbuminを発現)、P815(マスト細胞腫)、B16-F10(悪性黒色腫)を選択した。

【 0 1 0 7 】

(結果)

結果を図18に示す。上段はヒト細胞株の結果を、下段はマウス細胞株の結果を示す。

【 0 1 0 8 】

その結果、対象とした全てのヒト・マウス細胞株で、親細胞株やMock導入細胞株と比較して、3' UTRの欠失・逆位を導入した細胞株(SgPD-L1 F×R)で顕著なCD274の発現上昇を認めた。

20

【 0 1 0 9 】

これらの結果は、遺伝子解析により同定されたCD274 3' UTRの構造異常とCD274高発現の間に因果関係があることを実験的に証明している。すなわち、CD274 3' UTRの異常によりCD274過剰発現が誘導されることを示している。

【 0 1 1 0 】

17. CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現はPD-1発現T細胞にアポトーシスを誘導する。

(方法)

CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現が免疫系に与える影響をin vitroで評価するために、CRISPR-Cas9システムによりCD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現が誘導されたPC-9細胞株またはコントロール細胞株(Mock)と、PD-1を導入したJurkat T細胞株またはPD-1を導入していないコントロール細胞株(Mock)を共培養後に、Jurkat T細胞のアポトーシスの程度をAnnexin-Vを用いたフローサイトメトリーにより評価した。

30

【 0 1 1 1 】

(結果)

結果を図19に示す。横軸の「PC-9」の「SgPD-L1」は、CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現が誘導されているPC-9細胞株を示し、「(-)」はCD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現が誘導されていないPC-9細胞株を示す。横軸の「Jurkat」のPD-1はPD-1を導入したJurkat T細胞株を示し、「Mock」はPD-1を導入していないコントロール細胞株を示す。

40

【 0 1 1 2 】

CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現はPD-1を発現するT細胞のアポトーシスを強く誘導することが示された(図19の右のアイソタイプコントロールの結果)。

【 0 1 1 3 】

この結果は、CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現が免疫からの回避に関与する可能性を示唆している。

【 0 1 1 4 】

18. CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現は腫瘍形成を促進する。

(方法)

CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現が造腫瘍能に与える影響をin vivoで評価するため

50

に、CRISPR-Cas9システムによりCD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現が誘導されたEG7-OVA細胞株 (SgPd-L1) およびコントロール細胞株 (Mock) を同系マウスに皮下移植し、免疫賦活化剤であるpoly(I:C)またはコントロールとしてPBSを移植後7日目より投与し、定期的に腫瘍径を測定した。この実験では、poly(I:C)は腫瘍(特にovalbumin)に対する免疫が誘導されると考えられる。

【0115】

(結果)

図20-1に実験のプロトコルを示し、図20-2にMock(図20-2A)およびCD274高発現が誘導されたEG7-OVA細胞株 (SgPD-L1) (図20-2B)における腫瘍径の変化を示す。

【0116】

コントロール細胞株では、poly(I:C)投与により腫瘍径の縮小が認められたが、CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現細胞株では、poly(I:C)投与しても、投与なしと同程度の腫瘍の増大が認められた。

【0117】

この結果は、*in vivo*において、CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現は抗腫瘍免疫による腫瘍抑制効果を克服することができることを示している。

【0118】

19. CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現はCD8陽性T細胞の腫瘍内への浸潤を抑制する。

(方法)

18の実施例と同様のEG7-OVA細胞株の同系移植の実験において、移植後14または15日目にマウスから腫瘍を採取し、CD8およびDAPIの免疫染色によりCD8陽性T細胞の腫瘍内への浸潤の程度を評価した。CD8陽性細胞数は代表的な2~3匹のマウスから得られた切片より20視野以上計測した。

【0119】

(結果)

図21-1に染色像を示し、図21-2に腫瘍内のCD8陽性T細胞を示す。図21-1の染色像では、poly(I:C)投与を投与したコントロール細胞株 (Mock) の染色像 (右上) において、緑色に染色されたCD8陽性T細胞の数の増加が認められる。

【0120】

コントロール細胞株 (Mock) では、poly(I:C)投与によりCD8陽性T細胞の腫瘍内への浸潤の増加が認められたが、CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現細胞株 (SgPD-L1) では、poly(I:C)投与しても浸潤細胞数のわずかな増加が認められたのみであった。

【0121】

この結果は、*in vivo*において、CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現はCD8陽性細胞傷害性T細胞の腫瘍内への浸潤を抑制する効果があることを示唆している。

【0122】

20. PD-1/PD-L1阻害はCD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現による腫瘍形成促進および免疫抑制効果を抑制することができる。

(方法)

CD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現による造腫瘍能に対するPD-1/PD-L1阻害の効果を *in vivo*で検証するために、CRISPR-Cas9システムによりCD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現が誘導されたEG7-OVA細胞株を同系マウスに皮下移植し、免疫賦活化剤であるpoly(I:C)を投与したマウスに対して抗PD-L1抗体またはアイソタイプコントロールの腹腔内注射を行い、EG7-OVA腫瘍に与える影響を評価した。これらのレシピエントマウスについては、定期的に腫瘍径を測定し、移植後14または15日目にCD8およびDAPIの免疫染色によりCD8陽性T細胞の腫瘍内への浸潤の程度を評価した。

【0123】

(結果)

10

20

30

40

50

図 2 2 - 1 に腫瘍径の経時的変化のグラフを、図 2 2 - 2 にCD8およびDAPIの免疫染色像を、図 2 2 - 3 に腫瘍内のCD8陽性T細胞を示す。図 2 2 - 2 の染色像では、抗PD-L1抗体を投与したマウスにおいて（図 2 2 - 3 B）、アイソタイプコントロールを投与したマウス（図 2 2 - 3 A）よりも、緑色に染色されたCD8陽性T細胞の数の増加が認められる。

【 0 1 2 4 】

図に示すように、抗PD-L1抗体により腫瘍形成能およびCD8陽性T細胞の腫瘍内への浸潤の抑制が認められた。

【 0 1 2 5 】

この結果は、*in vivo*において、PD-1/PD-L1阻害はCD274 3' UTR異常に伴うCD274高発現による腫瘍形成および免疫抑制効果を抑制することが可能であることを示している。

10

【 0 1 2 6 】

2 1 . CD274 SVによりCD274 ORFが切断された変異体はPD-1結合能を保持している。

(方法)

ATL患者検体(ATL049、ATL050、ATL022およびATL079の5検体)またはレトロウイルスによりCD274野生型(WT)または切断変異体を導入したPC-9細胞株を用いて、PD-1 Igに対する結合能をフローサイトメトリーにて評価した。ATL患者検体において、ATL050はORF切断がなく(Intact)、ATL022およびATL079はORF切断が認められた(Truncated)。PC-9に導入した変異体はATL020(Ex7を欠損)、ATL079(Ex6および7欠損)由来であった。

【 0 1 2 7 】

(結果)

20

図 2 3 に結果を示す。図 2 3 A はATL患者検体の評価結果を示し、図 2 3 B はPC-9細胞株の結果を示す。

【 0 1 2 8 】

ATL患者検体およびCD274遺伝子導入PC-9細胞株のいずれにおいても、ORF切断の有無に関わらず、PD-L1の受容体であるPD-1に対する結合が認められた。

【 0 1 2 9 】

この結果は、CD274構造異常によるCD274 ORF切断がPD-1結合能には影響を及ぼさず、CD274 SV(+)例に認められる過剰発現したCD274の機能が保たれていることを示している。

【 0 1 3 0 】

2 2 . CD274領域のコピー数に独立して、CD274 SVはCD274過剰発現に関係する。

30

(方法)

TCGAからダウンロードしたDLBC 48検体、STAD415検体、自験例であるATL43検体で、RNAシーケンス解析により求めたCD274発現(エクソン 4 RPKM)とSNPアレイより求めたCD274領域のコピー数がCD274発現とどのように関係する検討した。統計手法としては共分散分析を用いた。

【 0 1 3 1 】

(結果)

図 2 4 に結果を示す。図 2 4 A がDLBC (B細胞性リンパ腫)の結果、図 2 4 B がSTAD (胃がん)の結果、図 2 4 C がATL (成人T細胞白血病)の結果を示す。図 2 4 中、黒丸はCD274融合遺伝子(+)および/またはCD274 エクソン 4 / 3' UTR比高値の症例であり、二重丸はCD274領域にウイルスの挿入(+)の症例である。

40

【 0 1 3 2 】

DLBC、STAD、ATLのいずれにおいても、CD274 SVは有意に独立してCD274高発現と関係していた。

【 0 1 3 3 】

CD274コピー数増幅はCD274高発現と関係することが知られているが、この結果は、CD274 SVはCD274コピー数と独立してCD274発現と関係することを示している。

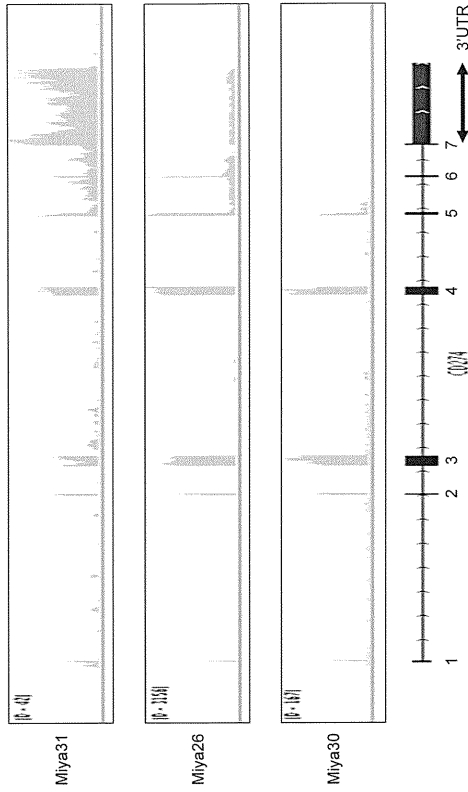
【 産業上の利用可能性 】

【 0 1 3 4 】

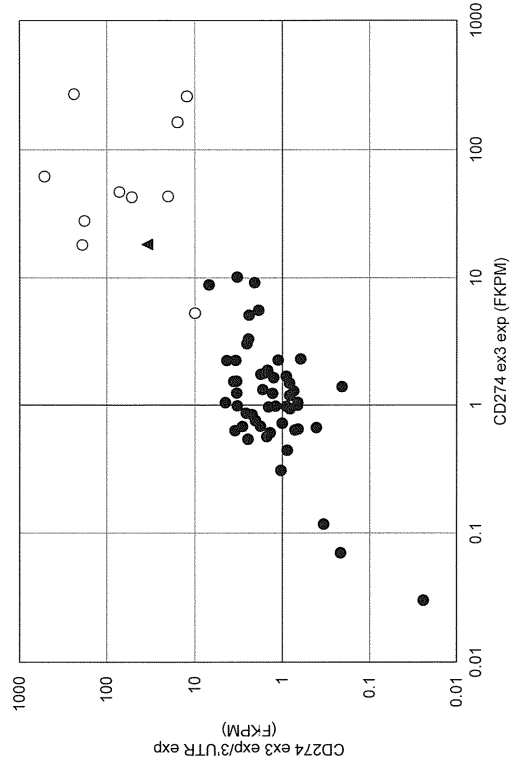
本発明により、種々のがんにおけるPD-1/PD-L1阻害剤の有効性を判断することができ、

50

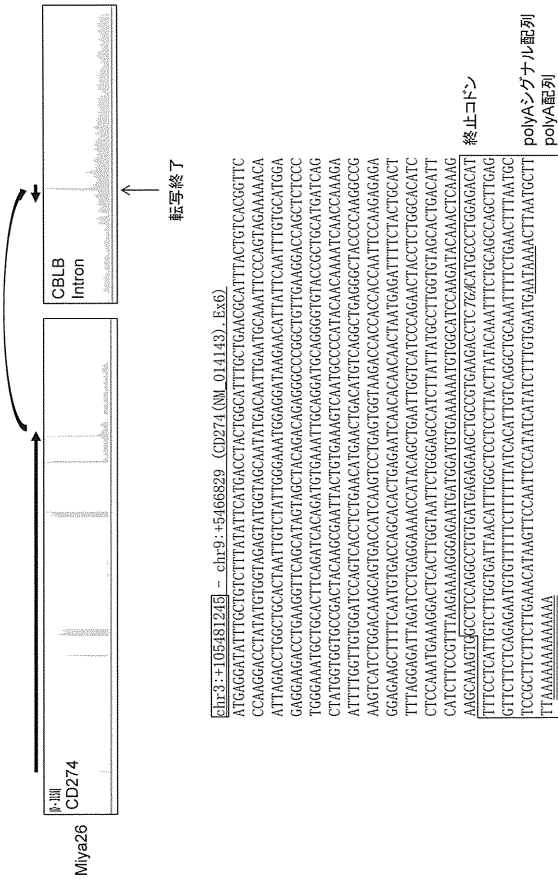
【 図 3 】



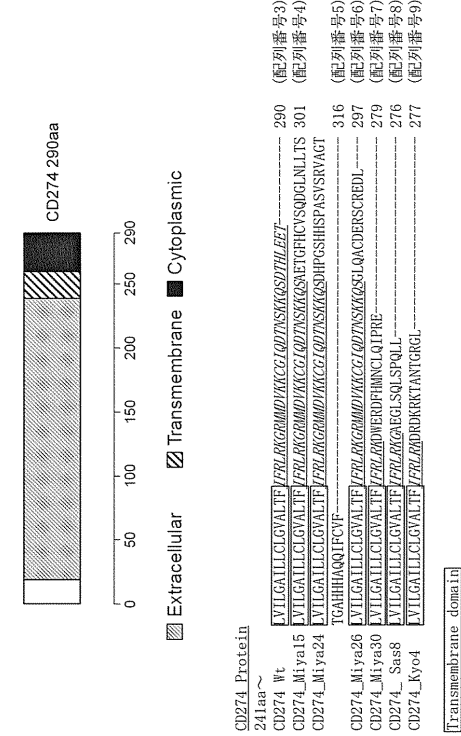
【 図 4 】



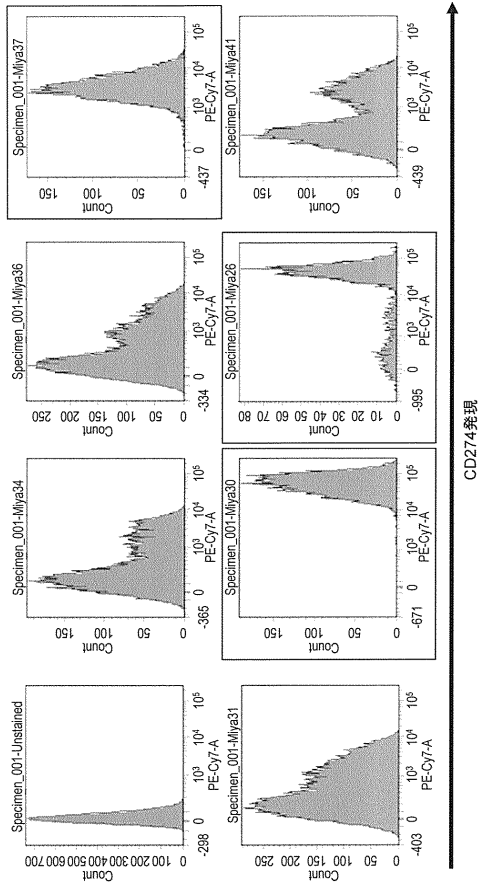
【 図 5 】



【 図 6 】



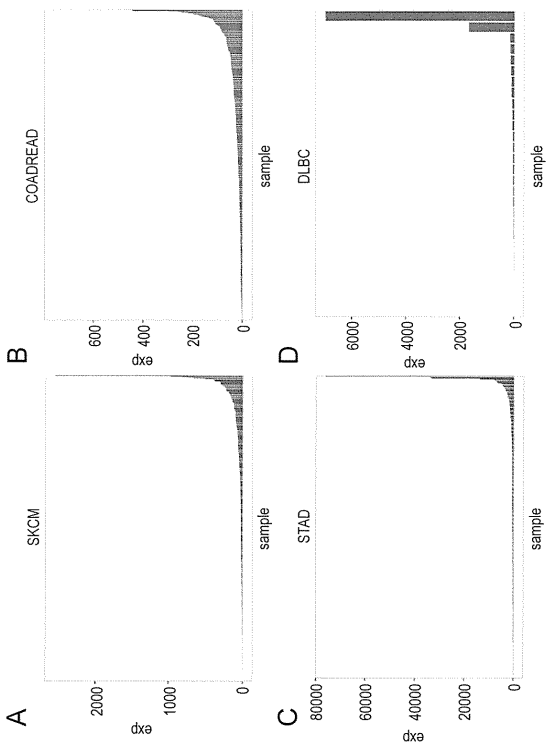
【 7 】



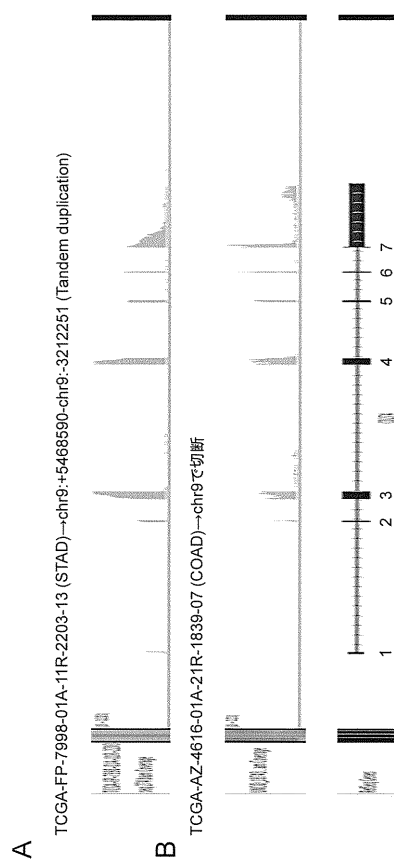
【 8 】

TCGA					
ACC	BLCA	BRCA	CESC	CHOL	CNTL
79	414	1119	306	36	1
COAD	DLBC	ESCA	GBM	HNSC	KICH
486	48	185	170	522	66
KIRC	KIRP	LAML	LGG	LIHC	LUAD
542	291	179	534	374	541
LUSC	MESO	OV	PAAD	PCPG	PRAD
502	87	420	179	184	502
READ	SARC	SKCM	STAD	TGCT	THCA
167	263	472	420	156	513
THYM	UCEC	UCS	UVM	TOTAL	
120	557	57	80	10572	

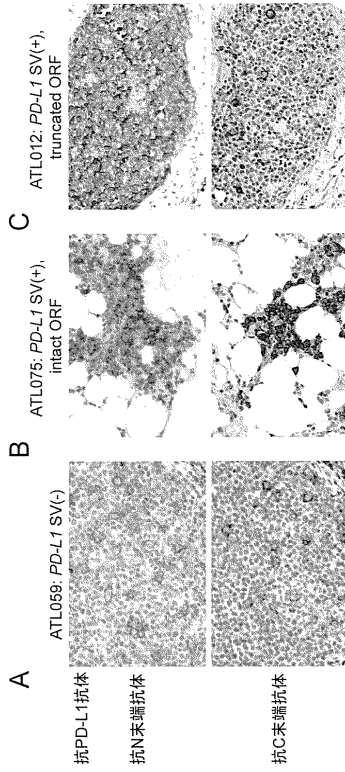
【 6 】



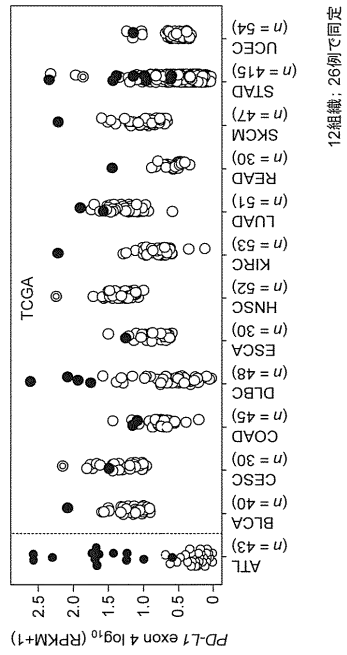
【 10 】



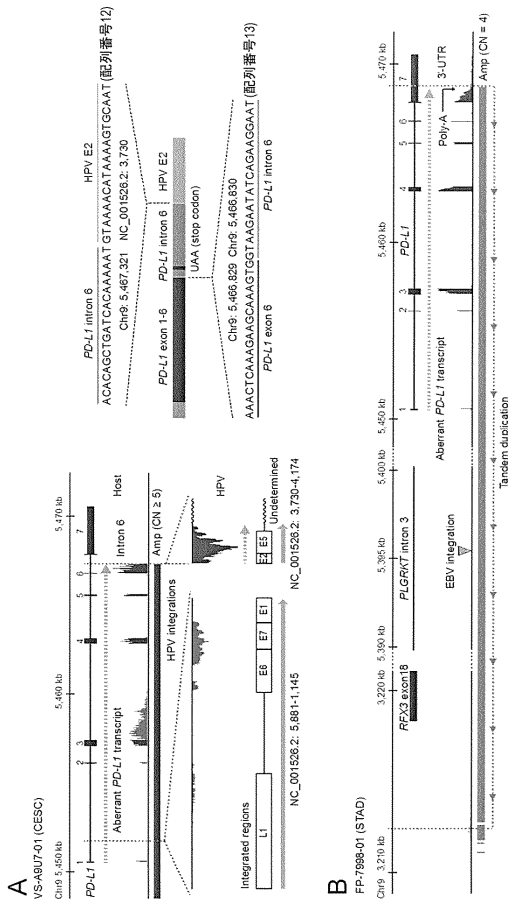
【 図 1 5 】



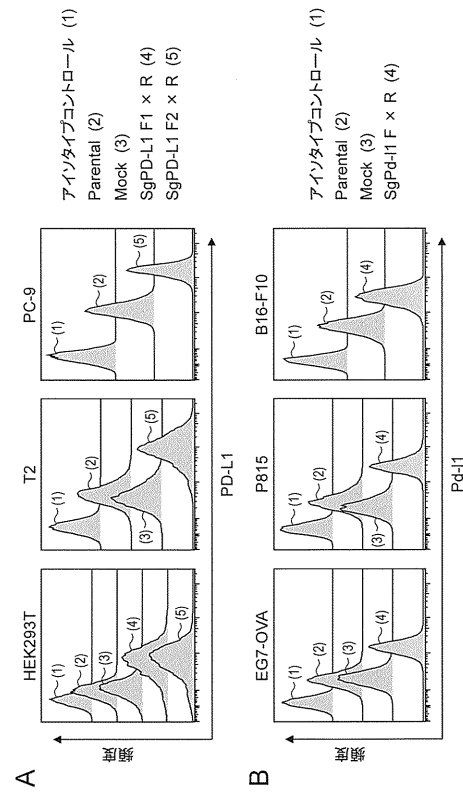
【 図 1 6 】



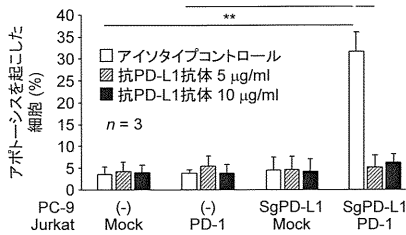
【 図 1 7 】



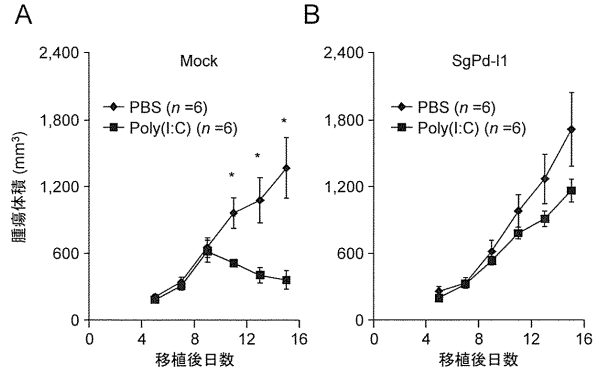
【 図 1 8 】



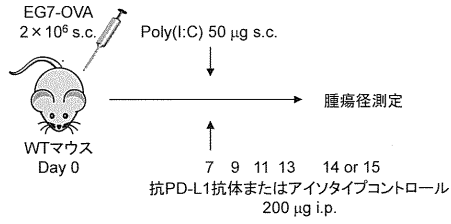
【 図 1 9 】



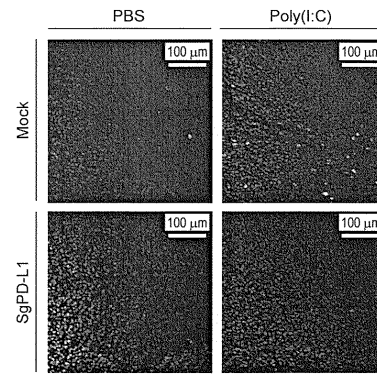
【 図 2 0 - 2 】



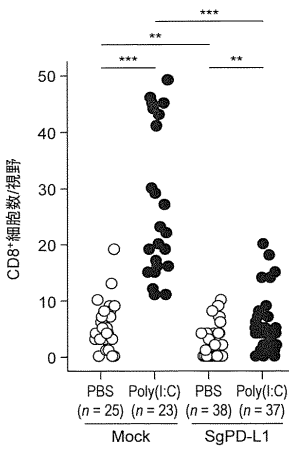
【 図 2 0 - 1 】



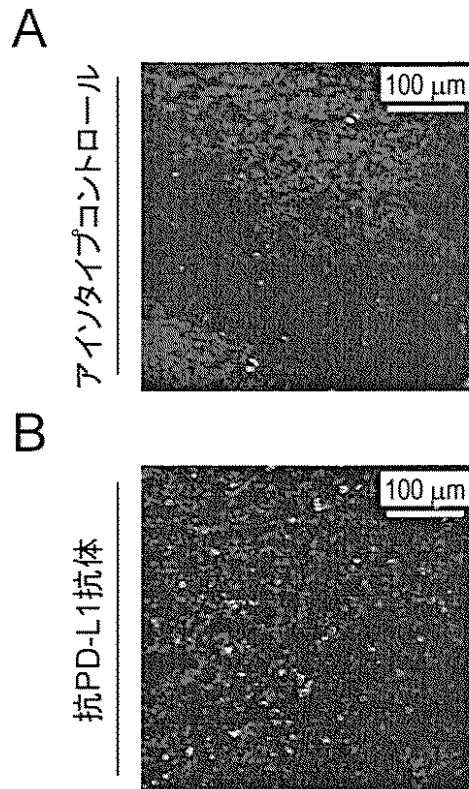
【 図 2 1 - 1 】



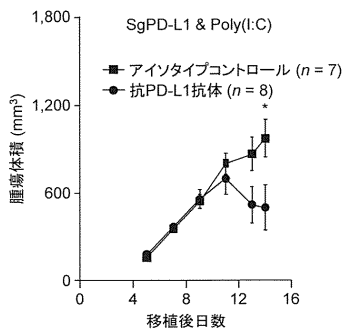
【 図 2 1 - 2 】



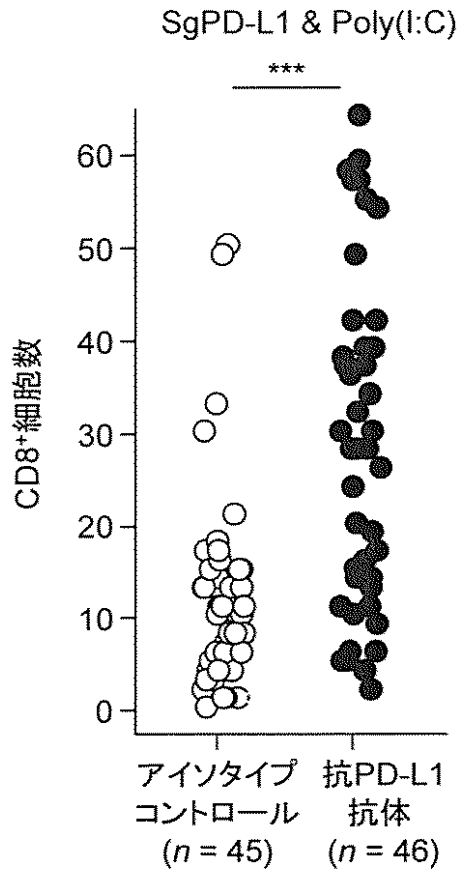
【 図 2 2 - 2 】



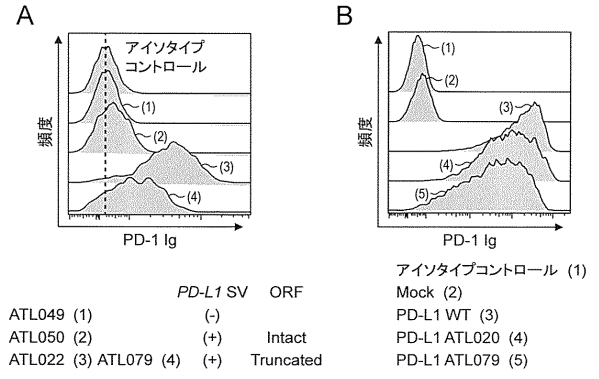
【 図 2 2 - 1 】



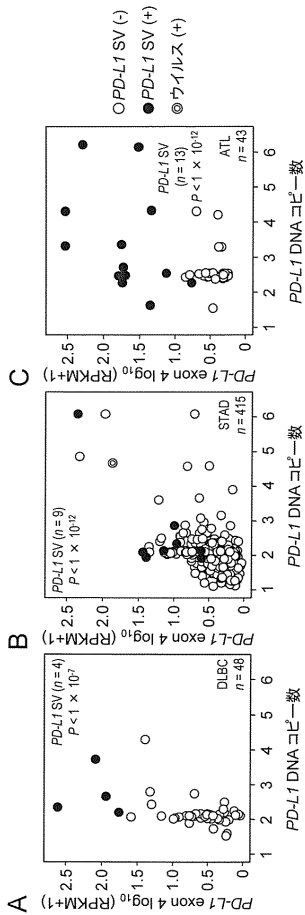
【 図 2 2 - 3 】



【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



【配列表】

2016175275000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年10月4日(2016.10.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

悪性腫瘍を罹患している被験体において、PD-1/PD-L1阻害剤が治療に有効であるか否かを予測する方法であって、前記被験体から採取した腫瘍細胞において、PD-L1遺伝子の3'UTR領域の完全なまたは部分的な欠失を検出し、PD-L1遺伝子の3'UTR領域の完全なまたは部分的な欠失が存在する場合に、PD-1/PD-L1阻害剤が前記被験体の治療に有効であると評価する方法。

【請求項2】

(削除)

【請求項3】

(削除)

【請求項4】

PD-L1遺伝子の3'UTR領域の欠失がPD-L1遺伝子のコピー数変化により引き起こされる、請求項1記載の方法。

【請求項5】

(削除)

【請求項6】

(削除)

【請求項7】

PD-L1遺伝子のエクソン1～エクソン5のいずれかの転写産物とPD-L1遺伝子の3'UTR領域の転写産物を定量し、エクソン転写産物の量と3'UTR領域の転写産物の量の比を算出し、該比が所定の値以上の場合にPD-1/PD-L1阻害剤ががん治療に有効であると評価する、請求項1又は4に記載の方法。

【請求項8】

(削除)

【請求項9】

(削除)

【請求項10】

(削除)

【請求項11】

被験体から採取した腫瘍細胞中のPD-L1タンパク質を、PD-L1に対する抗C末端抗体およびPD-L1に対する抗N末端抗体を使用した免疫組織染色により染色し、PD-L1に対する抗N末端抗体で染色が認められるが、PD-L1に対する抗C末端抗体では染色が認められない場合、PD-1/PD-L1阻害剤が前記被験体の治療に有効であると評価する、請求項1に記載の方法。

【請求項12】

悪性腫瘍が、成人T細胞白血病/リンパ腫、胃がん、大腸がん、膀胱がん、子宮頸がん、腎がん、肺腺がん、皮膚悪性黒色腫およびB細胞リンパ腫からなる群から選択される、請求項1、4及び7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項13】

悪性腫瘍が、食道がん、頭頸部がん、直腸がんおよび子宮体がんからなる群から選択さ

れる、請求項 1、4 及び 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

PD-1/PD-L1 阻害剤が抗 PD-1 抗体または抗 PD-L1 抗体である、請求項 1、4 及び 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

さらに、PD-L1 遺伝子の 3' UTR 領域の完全なまたは部分的な欠失に伴う、9 p 24.1 領域の増幅、逆位、転座又は欠失のいずれかの構造異常を検出する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 16】

悪性腫瘍が、成人 T 細胞白血病/リンパ腫である、請求項 12 記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2016/063326
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09, A61K39/395, A61K45/00, A61P35/00, A61P35/02, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574, C07K16/18 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	CHENG L, et al., Programmed Death-Ligand 1 Expression Predicts Tyrosine Kinase Inhibitor Response and Better Prognosis in a Cohort of Patients With Epidermal Growth Factor Receptor Mutation-Positive Lung Adenocarcinoma, Clinical Lung Cancer, 2015.02.19, Vol.16, No.5, p.e25-35, ISSN 1525-7304	<u>1-2, 8, 12, 14</u> 1-14
Y	WANG W, et al., A Frequent Somatic Mutation in CD274 3'-UTR Leads to Protein Over-Expression in Gastric Cancer by Disrupting miR-570 Binding, Human Mutation, 2011.12, Vol.33, p.480-484, ISSN 1059-7794	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 June 2016 (27.06.16)		Date of mailing of the international search report 05 July 2016 (05.07.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/063326

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2012-529895 A (Merck Patent GmbH), 29 November 2012 (29.11.2012), abstract; claim 1; paragraph [0005] & US 2012/0094863 A1 paragraphs [0013] to [0014] & US 2015/0197819 A1 & WO 2010/145796 A2 & KR 10-2012-0047912 A & CN 105177119 A	1-14
A	WO 2008/041594 A1 (Olympus Corp.), 10 April 2008 (10.04.2008), (Family: none)	1-14
A	WO 2012/133047 A1 (Konica Minolta Medical & Graphic, Inc.), 04 October 2012 (04.10.2012), & JP 5900489 B	1-14
A	WO 2012/035705 A1 (Tohoku University), 22 March 2012 (22.03.2012), & JP 5682976 B & US 2013/0230866 A1 & EP 2618154 A1 & CN 103154741 A	1-14
T	KATAOKA K, et al., Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers, Nature, 2016.06, Vol.534, No.402-406, ISSN 1476-4687	1-14

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 6 3 3 2 6	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/574(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)n			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, A61K39/395, A61K45/00, A61P35/00, A61P35/02, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/574, C07K16/18			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2016年 日本国実用新案登録公報 1996-2016年 日本国登録実用新案公報 1994-2016年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), PubMed			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
X Y	CHENG L, et al., Programmed Death-Ligand 1 Expression Predicts Tyrosine Kinase Inhibitor Response and Better Prognosis in a Cohort of Patients With Epidermal Growth Factor Receptor Mutation-Positive Lung Adenocarcinoma, Clinical Lung Cancer, 2015.02.19, Vol.16, No.5, p.e25-35, ISSN 1525-7304	1-2, 8, 12, 14 1-14	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリ 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 27.06.2016		国際調査報告の発送日 05.07.2016	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 伊藤 良子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3644

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2016/063326

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WANG W, et al., A Frequent Somatic Mutation in CD274 3'-UTR Leads to Protein Over-Expression in Gastric Cancer by Disrupting miR-570 Binding, Human Mutation, 2011.12, Vol.33, p.480-484, ISSN 1059-7794	1-14
Y	JP 2012-529895 A (メルク パテント ゲゼルシャフト ミット ベ シュレンクテル ハフツング) 2012. 11. 29, [要約]、[請求項1]、[0005] & US 2012/0094863 A1 [0013] - [0014] & US 2015/0197819 A1 & WO 2010/145796 A2 & KR 10-2012-0047912 A & CN 105177119 A	1-14
A	WO 2008/041594 A1 (オリンパス株式会社) 2008.04.10, (ファミリ ーなし)	1-14
A	WO 2012/133047 A1 (コニカミノルタエムジー株式会社) 2012. 10. 04, & JP 5900489 B	1-14
A	WO 2012/035705 A1 (国立大学法人東北大学) 2012. 03. 22, & JP 5682976 B & US 2013/0230866 A1 & EP 2618154 A1 & CN 103154741 A	1-14
T	KATAOKA K, et al., Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers, Nature, 2016.06, Vol.534, No.402-406, ISSN 1476-4687	1-14

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
 C 0 7 K 14/47 (2006.01) C 0 7 K 14/47

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

(出願人による申告)平成27年度、国立研究開発法人日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業「産学連携医療イノベーション創出プログラム」委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

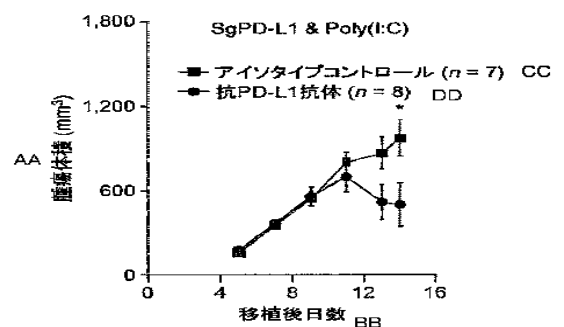
(72) 発明者 竹内 賢吾
 東京都江東区有明三丁目8番31号 公益財団法人がん研究会内
 Fターム(参考) 2G045 AA40 BB24 CB02 DA36 DA78 FB02 FB03
 4B063 QA01 QA19 QQ52 QQ58 QR32 QR40 QS25 QS32
 4H045 BA09 BA10 CA40 DA50 EA50

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

专利名称(译)	用PD-L1 (CD 274) 异常作为指标预测PD-1 / PD-L1抑制剂的治疗效果的方法		
公开(公告)号	JPWO2016175275A1	公开(公告)日	2018-03-15
申请号	JP2017515602	申请日	2016-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人京都大学 癌症研究基金会会议		
[标]发明人	小川誠司 片岡圭亮 竹内賢吾		
发明人	小川 誠司 片岡 圭亮 竹内 賢吾		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/15 C12N15/09 C07K14/47		
CPC分类号	A61K39/395 A61K45/00 C07K16/18 C12N15/09 C12Q1/68 G01N33/574 C07K16/2827 G01N33/57407 G01N33/57411 G01N33/57423 G01N33/57426 G01N33/5743 G01N33/57446 G01N2333/70521 G01N2333/70532 G01N2800/52		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A G01N33/50.Z G01N33/53.Y G01N33/15.Z C12N15/00.A C07K14/47		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB24 2G045/CB02 2G045/DA36 2G045/DA78 2G045/FB02 2G045/FB03 4B063 /QA01 4B063/QA19 4B063/QQ52 4B063/QQ58 4B063/QR32 4B063/QR40 4B063/QS25 4B063/QS32 4H045/BA09 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA50		
优先权	2015093599 2015-04-30 JP		
其他公开文献	JPWO2016175275A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明旨在提供一种预测PD-1 / PD-L1抑制剂在患有恶性肿瘤的受试者中PD-1 / PD-L1抑制的治疗效果的有效方法。一种预测药物是否有效的方法，该方法包括在从受试者收集的肿瘤细胞中检测与PD-1 / PD-L1抑制剂功效相关的基因组异常，存在PD-1 / PD-L1抑制剂被评价为有效治疗该受试者。



AA Tumor volume (mm³)
 BB Days after transplantation
 CC Isotype control (n=7)
 DD Anti-PD-L1 antibody (n=8)