

研究報告書  
令和2年度：B課題

令和4年4月30日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 札幌医科大学附属病院薬剤部

住所 北海道札幌市中央区南1条西16丁目

研究者氏名 福土 将秀



(研究課題)

免疫チェックポイント阻害薬に対する中和抗体の迅速スマート検出ワークフローの開発と  
個別化がん治療への臨床応用

---

令和3年1月19日付助成金交付のあった標記B課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

## 令和2年度がん研究助成金（B 課題）

### 研究成果報告

研究代表者氏名：福土 将秀

所属機関・職：札幌医科大学附属病院薬剤部 薬剤部長

#### 【研究課題名】

免疫チェックポイント阻害薬に対する中和抗体の迅速スマート検出ワークフローの開発と個別化がん治療への臨床応用

#### 【研究内容】

現在、米国において免疫チェックポイント阻害薬としてがん治療に応用されている PD-1/PD-L1 経路遮断薬は、本邦未承認薬の Cemiplimab と Dostarlimab を含めて7剤承認されている (*N Engl J Med* 2022; 386:1297-1301)。中でも、ニボルマブやペムブロリズマブは、薬剤の適応が拡大していく中で、同じ適応症にどちらの薬剤をどのように選択すべきか、最適使用法に関して未解決の課題が多く残されたままである。一方、これらの抗体薬は、“不均一な”タンパク質分子の集合体であり、免疫原性に影響を及ぼす可能性がある。

本研究では、国内で使用されている免疫チェックポイント阻害薬全般の薬物動態評価系を構築するとともに、PD-1 阻害薬の免疫原性の実態解明および臨床アウトカムに対する影響を評価することを目的として、ニボルマブとペムブロリズマブに対する中和抗体を迅速かつ簡便に検出できるワークフローの開発を最終目標とした。

#### 1) 免疫チェックポイント阻害薬全般の薬物動態評価系の構築

研究代表者らによって既に確立済みの PD-1/Fc を固相化した 96 ウェルプレートを用いた間接 ELISA による PD-1 阻害薬（ニボルマブ、ペムブロリズマブ）の測定法を応用して、PD-L1/Fc および CTLA-4/Fc を固相化した 96 ウェルプレートを用いた同手法による PD-L1 阻害薬（アベルマブ、デュバルマブ、アテゾリズマブ）および CTLA-4 阻害薬（イピリムマブ）の血中濃度測定系を構築した。血液試料（2  $\mu$ L）中における薬物の定量下限値は、何れの抗体薬も 0.0125  $\mu$ g/mL であり、測定内・測定間の変動係数はそれぞれ 10%未満と、十分な感度と高い精度での測定が可能であることが確認された。

#### 2) PD-1 阻害薬の免疫原性の実態解明

これまでに研究代表者らが実施してきた臨床研究（CHOPIN Study）「免疫チェックポイント阻害薬の薬物動態および免疫原性と効果・副作用情報の体系的評価と適正使用法確立に関する研究」（UMIN000033036）に登録された Discovery コホート（240 名）の血液サンプルを用いて、ニボルマブおよびペムブロリズマブに対する抗薬物抗体（ADA: anti-drug antibody）の抗体価について評価した。

まず、酸解離ブリッジング ELISA による ADA 検出法を開発した。「タンパク質医薬品の免疫原性評価に関する米国 FDA ガイドライン」（2019 年）に従って、スクリーニング試験で陽性であったサンプルについて、その後の確認試験によって陽性が確定したサンプルを対象に、ネガティブコントロール（健常人由来 pooled ドナー血漿）を用いて 2 倍ずつ段階希釈し、カットポイントを上回る最大希釈倍率を抗体価とした。

ニボルマブおよびペムブロリズマブ治療患者における ADA の抗体価の中央値（範囲）は、それぞれ 8 倍（1-256 倍）および 4 倍（1-256 倍）であった。興味深い結果として、ADA は両薬剤ともに治療開始後早期に発現していることが初めて明らかとなった。また、ADA が持続的に陽性となる症例が、それぞれ約 12%および約 8%の頻度で確認された。

ADA 陽性率を癌腫別に比較した結果、ニボルマブ単剤治療が施行された胃癌症例において高い傾向が認められ、さらに ADA 陽性症例において肝機能障害を含む有害事象との関連が示唆された。また、ニボルマブの ADA 陽性率は、イピリムマブとの併用療法を施行された患者において、ニボルマブ単剤治療患者と比較して 2 倍以上高いことが判明した。本結果は、過去に実施された臨床試験における既報とも概ね対応していた。

一方、治療開始（ベースライン）時に ADA が陽性であった症例において、点滴治療開始後に 38°C 以上の発熱が高頻度で認められた（75% [6/8]）。従って、PD-1 阻害薬に対する免疫原性は、点滴静注後の発熱などの全身性症状や免疫関連有害事象に影響を及ぼす可能性が示唆された。

### 3) PD-1 阻害薬に対する中和抗体の検出ワークフローの開発

Dostarlimab およびペムブロリズマブに対する中和抗体検出に関する文献情報（AAPS Open 2021;7:8）や CTD サマリー等を参考に、競合的リガンド結合法を用いた ELISA を本検出ワークフローの基本技術とした。

血液試料中に含まれるフリー薬物によるアッセイへの影響を除去する為に、1) 予めリガンドである PD-1/Fc を結合した 96 ウェルプレートへの吸着処理によるフリー薬物の除去ステップの追加（SPEAD: solid-phase extraction with acid dissociation）、および 2) ストレプトアビジン-ビオチン標識薬物を固相化した 96 ウェルプレートへの中和抗体の捕捉と溶出ステップの追加（ACE: affinity capture elution）による Drug Tolerance の改善を評価した。なお、フリー薬物除去操作と最終ステップの ELISA を同一プレートで実施することにより、測定の迅速化を図った。

先ず、市販の抗ニボルマブ抗体および抗ペムブロリズマブ抗体（マウス由来モノクローナル抗体、ウサギ由来ポリクローナル抗体）を陽性コントロールとして用いて予備検討を実施した結果、マウス由来モノクローナル抗体では、各薬物に対する中和活性が確認されなかった。一方、ウサギ由来ポリクローナル抗体では、各薬物に対する中和活性が確認され、抗イディオタイプ抗体が含まれることが明らかとなった（第 13 回 JBF シンポジウム、2021 年発表）。以降の検討において、ウサギ由来ポリクローナル抗体を用いて、SPEAD 法および ACE 法のパフォーマンスを評価した。

最初に検討した SPEAD 法では、十分な Drug Tolerance の改善が達成されないことが明らかとなり、次いで ACE 法を用いた中和抗体の検出性能を評価した。ACE 法の最終ステップの ELISA において、陽性コントロールによる競合的阻害が確認されたことから、Drug Tolerance を更に改善する為に、ACE 条件の最適化を現在進めている。

以上、本研究において確立した免疫チェックポイント阻害薬の薬物動態評価系は、PD-1 阻害薬のみならず、PD-L1 阻害薬や CTLA-4 阻害薬に対する高感度・高精度かつ低コストでの血中濃度測定に臨床応用が可能であると考えられる。また、本研究課題の遂行により、日本人における PD-1 阻害薬ニボルマブおよびペムブロリズマブに対する ADA の発現状況と抗体価に関する詳細なリアルワールド・データを得ることができた。PD-1 阻害薬に対する中和抗体の有無については、今後 ACE 法の最適な条件が設定され次第、陽性サンプルを用いた中和活性の評価を行い、臨床アウトカムとの関連を精査する予定である。

最後に、本研究を遂行する上で、免疫原性評価に関して技術的な助言を頂きました石井明子部長（国立医薬品食品衛生研究所生物薬品部）に深謝致します。また、多大なる御支援を賜りましたががん研究振興財団に心より感謝申し上げます。