

統合オミクス解析による免疫チェックポイント阻害薬心筋炎の免疫機構の解明

田尻和子

筑波大学医学医療系 循環器内科

【研究の背景】

免疫チェックポイント阻害剤を用いたがん免疫療法は、様々な悪性腫瘍で有効性が示されている。免疫チェックポイント分子は抑制性共シグナルを伝達することによって免疫細胞の活性化を抑制し、免疫応答の恒常性を維持している分子群である。免疫チェックポイント阻害剤より抗腫瘍免疫が活性化される一方、自己免疫の賦活化によると考えられる免疫関連有害事象の発生が問題となっている。免疫関連有害事象は全身の様々な部位で認められ、従来の抗がん剤による副作用とは異なる特徴を有する。心臓への有害事象の発生頻度は 1%程度と希な合併症と考えられているが^{1,2)}、診断に至っていないケースも多く、実際にはもっと多いものと予想される。臨床像は多彩で、心筋炎、たこつぼ型心筋症、伝導ブロック、致死性不整脈、心膜炎、心タンポナーデ、狭心症等³⁾の報告がある²⁾。心筋炎症例では、心筋生検でマクロファージと CD8 陽性 T 細胞を主体とした炎症細胞浸潤を認める例が多い⁴⁾。今後、がん免疫療法はますます発展していくことが予想され、それに伴い未知の心臓合併症の発症が危惧される。腫瘍医との綿密な連携のもと、がん診療チームの一員として腫瘍循環器医が果たすべき役割も増していくことが予想される。

免疫チェックポイント阻害剤使用後に心筋炎と筋炎を発症した症例の T 細胞受容体レパトア解析結果によると、がん組織と心臓、骨格筋に同じ T 細胞受容体を持つ T 細胞クローンが浸潤していることが明らかとなった⁴⁾。さらに、がん組織のトランスクリプトーム解析によって、がん組織にも骨格筋や心筋特異的な遺伝子発現を認めたことから、がん組織が体細胞遺伝子変異によりネオアンチゲンを合成し、その蛋白には骨格筋や心筋と共通の T 細胞ネオエピトープが存在している可能性が示唆されるが、未だ明らかになっていない。さらに最近の研究結果では、免疫関連有害事象の発生には細胞性免疫だけでなく B 細胞を主体とした液性免疫も大きな役割を果たしていることが示唆されているが⁵⁾、心筋炎において検討はなされていない。

【目 的】

免疫チェックポイント阻害剤によって発症した心筋炎の病態に自己抗体が関与しているかどうかをプロテオーム解析の手法を用いて網羅的に検討すること。

【方 法】

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

表1. 患者背景

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

症例 1 は 70 代男性。肺転移を伴う進行腎細胞がん患者で、nivolumab 投与後に心筋炎、筋炎、重症筋無力症を発症した(初回 nivolumab 投与 30 日後に発症した)。心筋生検では CD3 陽性 T リンパ球と CD68 陽性マクロファージの浸潤を多

数認め、Tリンパ球は CD8 陽性リンパ球が主体であった。また、少数の CD20 陽性 Bリンパ球の浸潤も認めた。心筋炎診断後にステロイドパルス治療を行い心筋炎は改善したが、その後がんが増悪し、8ヶ月後に死亡した⁶⁾。

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

上記 2 名の患者の血清を、免疫チェックポイント阻害剤投与前後に採取し、プロテオーム解析を行うまで -80°C に保存した。自己抗体の網羅的解析に使用したプロテインアレイは、20,000 以上のタンパク質コレクションを搭載し、ヒトプロテオームの 81%を網羅した CDI Laboratories 社の HuProt™ Human Proteome Microarray v3.1 を用いた。また、心筋炎患者の血清中のサイトカイン量を Abcam 社の Cytokine Array - Human Cytokine Antibody Array (Membrane, 80 Targets) を用いて検討した。

【結 果】

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

表 2. 心筋炎関連自己抗体の関与

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

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

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

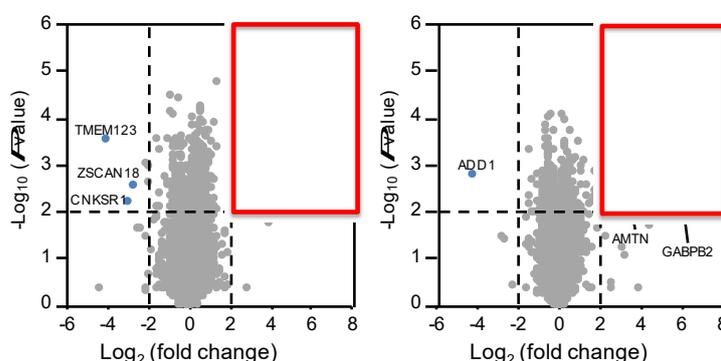


図 1. プロテオーム解析による未知の自己抗体の網羅的検出
左：症例1、右：症例2。赤枠内は心筋炎発症時に免疫チェックポイント阻害剤投与前に比べて4倍以上に有意に ($p < 0.01$) 増加していた自己抗体を示す。

さらに、免疫チェックポイント阻害剤の投与やステロイド治療により生じたサイトカインプロファイルの変化をサイトカインアレイを用いて検討した(図 2)。心筋炎発症時には免疫チェックポイント阻害剤投与前と比べ、fibroblast growth factor-4 (FGF-

4)、neurotrophin-4(NT-4)が上昇し、interleukin(IL)-7、macrophag-derived chemokine(MDC/CCL22)、insulin-like growth factor 1(IGF-1)、TIMP metalloproteinase inhibitor 1(TIMP-1)が減少していた。ステロイドパルス治療により心筋炎発症時より IL-4、interferon- γ (IFN- γ)、thymus and activation regulated chemokine (TARC/CCL17)、B lymphocyte chemoattractant (BLC/CXCL13)、FGF-4、FGF-6、fractalkine(CX3CL1)、insulin-like growth factor-binding protein(IGFBP-3)、leukemia inhibitory factor(LIF)、TNF superfamily member 14(LIGHT)、monocyte chemotactic protein-4(MCP-4/CCL13)、NT-4、pulmonary and activation-regulated chemokine(PARC/CCL18)、placental growth factor(PIGF)、transforming growth factor, beta 3(TGF- β 3)が有意に減少し、IGF-1 が有意に増加していた。

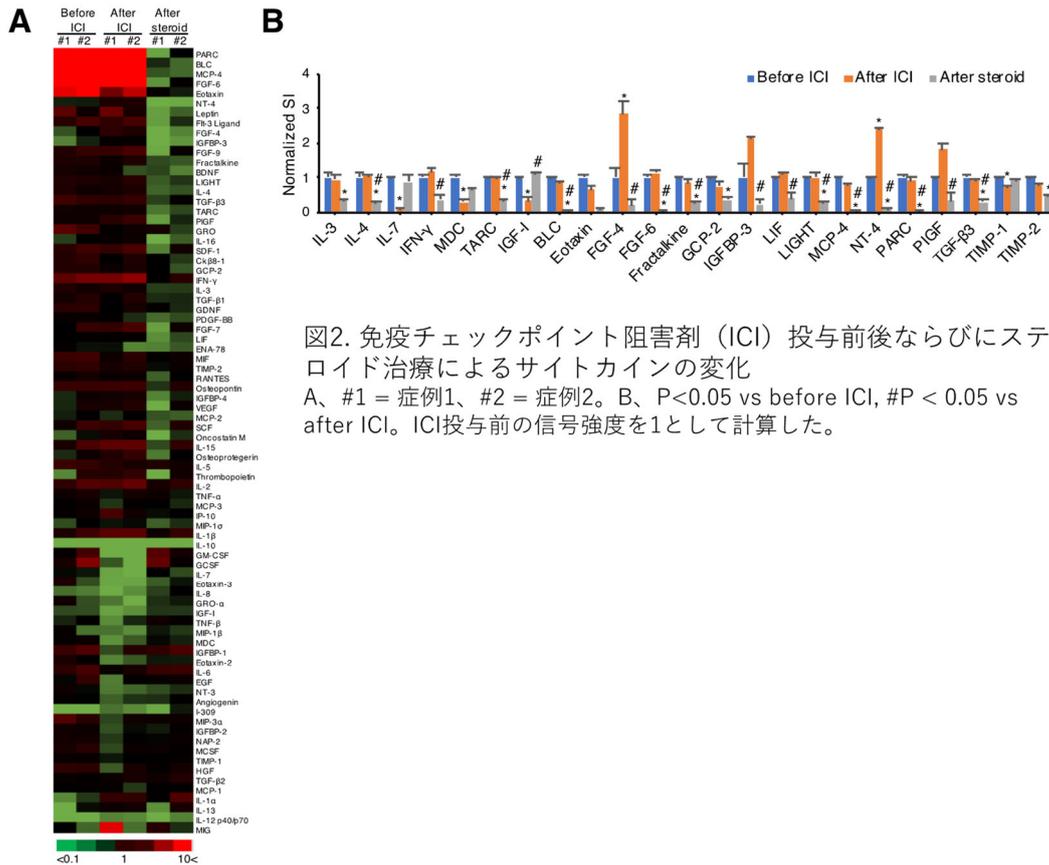


図2. 免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) 投与前後ならびにステロイド治療によるサイトカインの変化
A、#1 = 症例1、#2 = 症例2。B、P<0.05 vs before ICI, #P < 0.05 vs after ICI。ICI投与前の信号強度を1として計算した。

【考 察】

本研究で、tropomyosin1-4、Na-K ATPase、熱ショック蛋白 60 に対する自己抗体が免疫チェックポイント阻害剤による心筋炎の2症例で検出された。Latifら⁷⁾は、抗 tropomyosin 抗体は拡張型心筋症(DCM)患者の55%に、虚血性心疾患患者の21%で検出されると報告しているが、その機能は明らかになっていない。Babaら⁸⁾は DCM 患者 100 症例と年齢を一致させた健常人 100 例の抗 Na-K ATPase 抗体の有無を検討したところ、DCM 患者では 26%に検出されたのに対して、健常人では 2%の陽性率にとどまると報告している。また本抗体の存在は心室頻拍の独立した予測因子であるとともに、心臓突然死や低心機能の予測因子であることも報告した。心室頻拍を高頻度に認めることも明らかにした。さらに、抗 Na-K ATPase 抗体陽性患者血清中の IgG は in vitro で Na-K ATPase 活性を抑制したことから、本抗体は病態形成に一定の役割を果たしていることが示唆されている。熱ショック蛋白 60 に対する自己抗体は DCM 患者の 85%に、虚血性心疾患患者の 42%で検出されると報告されているが、その病態生理学的な影響は不明である。我々が経験した 2 症例は免疫チェックポイント阻害剤投与前からこのような自己抗体が検出されたことから、免疫チェックポイント阻害剤による心筋炎発症の予測因子として用いることができる可能性が考えられる。しかし、免疫チェックポイント阻害剤投与後の心筋炎発症時に有意な上昇を

示さなかったことから、病態への関与は少ないことが示唆される。

免疫チェックポイント阻害剤による心筋炎発症時に有意な上昇を認めた自己抗体は、両症例で共通するものは認めなかった。症例 1 では制御性 T 細胞の分化に有用な IL2-inducible T cell kinase (ITK)⁹⁾や、NF- κ B を介した炎症の活性化を負に制御する蛋白である TAX1 binding protein 1 (TAX1BP1)¹⁰⁾に対する自己抗体の著明な増加を認め、心筋炎の発症と進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。一方、症例 2 においてはがんの進展に関連する蛋白 (serine-threonine kinase receptor-associated protein (STRAP)¹¹⁾、transmembrane protein 106A (TMEM106A)¹²⁾、chaperonin containing TCP1 (T-Complex Protein 1) subunit 5 (CCT5)¹³⁾)に対する自己抗体の著明な上昇を認め、免疫チェックポイント阻害剤による抗腫瘍作用に影響を与えている可能性が示唆された。

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

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

【臨床的意義・臨床への貢献度】

我々が経験した 2 症例は免疫チェックポイント阻害剤投与前から心筋症関連自己抗体が検出されたことから、免疫チェックポイント阻害剤による心筋炎発症の予測因子として用いることができる可能性が考えられた。しかし、免疫チェックポイント阻害剤投与後の心筋炎発症時に有意な上昇を示さなかったことから、病態への関与は少ないことが示唆された。

【参考・引用文献】

1. Tajiri K, Aonuma K, Sekine I. Immune checkpoint inhibitor-related myocarditis. *Jpn J Clin Oncol* 2018;48:7-12. doi:10.1093/jjco/hyx154.
2. Tajiri K, Ieda M. Cardiac Complications in Immune Checkpoint Inhibition Therapy. *Front Cardiovasc Med* 2019;6:3. doi:10.3389/fcvm.2019.00003.
3. Otsu K, Tajiri K. Vasospastic angina following immune checkpoint blockade. *Eur Heart J* 2019;2019. doi:10.1093/eurheartj/ehz796.
4. Johnson DB, Balko JM, Compton ML, Chalkias S, Gorham J, Xu Y, et al. Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. *N Engl J Med* 2016;375:1749-55. doi:10.1056/NEJMoa1609214.
5. Das R, Bar N, Ferreira M, Newman AM, Zhang L, Bailur JK, et al. Early B cell changes predict autoimmunity following combination immune checkpoint blockade. *J Clin Invest* 2018;128:715-20. doi:10.1172/JCI96798.
6. Sakai S, Tajiri K, Li S, Ieda M, Hassan M. Fatal cerebral haemorrhagic infarction due to left ventricular thrombus after healing of immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis. *Eur Hear J - Case Reports* 2020;4. doi:10.1093/ehjcr/ytaa126.
7. Latif N, Baker CS, Dunn MJ, Rose ML, Brady P, Yacoub MH. Frequency and specificity of antiheart antibodies in patients with dilated cardiomyopathy detected using SDS-PAGE and western blotting. *J Am Coll Cardiol* 1993;22:1378-84.
8. Baba A, Yoshikawa T, Ogawa S. Autoantibodies produced against sarcolemmal Na-K-ATPase: possible upstream targets of arrhythmias and sudden death in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1153-9.
9. Huang W, Solouki S, Koylass N, Zheng S-G, August A. ITK signalling via the Ras/IRF4 pathway regulates the development and function of Tr1 cells. *Nat Commun* 2017;8:15871. doi:10.1038/ncomms15871.
10. Shembade N, Pujari R, Harhaj NS, Abbott DW, Harhaj EW. The kinase IKK α inhibits activation of the transcription factor NF- κ B by phosphorylating the regulatory molecule TAX1BP1. *Nat Immunol* 2011;12:834-43. doi:10.1038/ni.2066.

11. Yuan G, Zhang B, Yang S, Jin L, Datta A, Bae S, et al. Novel role of STRAP in progression and metastasis of colorectal cancer through Wnt/ β -catenin signaling. *Oncotarget* 2016;7:16023-37. doi:10.18632/oncotarget.7532.
12. Liu J, Zhu H. TMEM106A inhibits cell proliferation, migration, and induces apoptosis of lung cancer cells. *J Cell Biochem* 2019;120:7825-33. doi:10.1002/jcb.28057.
13. Gao H, Zheng M, Sun S, Wang H, Yue Z, Zhu Y, et al. Chaperonin containing TCP1 subunit 5 is a tumor associated antigen of non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 2017;8:64170-9. doi:10.18632/oncotarget.19369.