

免疫チェックポイント阻害薬誘発性肺障害の 発症機序解明と重症化関連因子に関する研究

2 0 2 5

横井 茉里

目 次

緒 言	1
第I章 ICI-ILD の検出契機となる自覚症状および重症度との関連に関する研究	3
I-1 方法	3
I-2 結果	5
I-2-1 患者背景	5
I-2-2 ICI-ILD の発症頻度および重症度	6
I-2-3 ICI-ILD 患者の臨床的特徴	6
I-2-4 ICI-ILD の診断契機としての自覚症状の頻度および重症度との関連	7
I-2-5 自覚症状の経時的変化	8
I-2-6 各自覚症状と ICI-ILD 重症度との関連	8
I-3 考察	9
第II章 血清による ICI 関連肺障害の重症度関連バイオマーカー探索研究	11
II-1 方法	12
II-2 結果	14
II-2-1 患者背景	14
II-2-2 肺障害発症時における血清プロテオミクス解析	15
II-2-3 肺障害発症時における患者背景・臨床検査値	17
II-2-4 プロテオミクス由来候補因子と既存臨床指標の相関関係	18
II-3 考察	20
II-4 補足資料	22
第III章 モデルマウスを用いた ICI-ILD の発症機序解明およびヒトへの外挿可能性の検討	26
III-1 方法	26
III-2 結果	32
III-2-1 担癌老齢マウスにおける抗 PD-1 療法誘導性 CD4 ⁺ T 細胞依存的肺障害	32
III-2-2 CD4 ⁺ T 細胞を介した肺病態関与する胚中心 (GC) B 細胞分化の促進	35
III-2-3 ICOS 発現エフェクターCD4 ⁺ T 細胞の抗 PD-1 抗体投与老齢マウス障害肺への集積	38
III-2-4 ICOS-ICOSL 相互作用の抗 PD-1 療法誘発性肺傷害への寄与	41
III-2-5 ICOS 依存的 IL-21 誘導の抗 PD-1 療法誘発性肺障害における必須性	44
III-2-6 末梢血 ICOS ⁺ CD4 ⁺ T 細胞割合とがん患者における irAE 発症との関連	47

III-3 考察	51
III-4 補足資料	55
結 論	71
謝 辞	72
論 文 目 録	73
引 用 文 献	74

緒言

免疫チェックポイント阻害薬 (immune checkpoint inhibitor: ICI) は、がん免疫療法の中核を成す治療法として、悪性黒色腫、非小細胞肺癌、腎細胞癌、胃癌、食道癌など多くのがん種において標準治療として確立されている。抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 CTLA-4 抗体を中心としたこれらの薬剤は、腫瘍に対する免疫抑制機構を解除し、持続的な抗腫瘍免疫応答を誘導し、従来の細胞障害性抗がん薬、分子標的薬、放射線療法との併用により著しい治療成績の向上をもたらしてきた¹。一方で、PD-1-PD-L1 シグナルの遮断による免疫調節機構の解除は腫瘍のみならず正常組織に対する免疫応答の亢進を引き起こし、免疫関連有害事象 (immune-related adverse events: irAE) として全身の臓器で自己免疫疾患様病態を惹起する²。間質性肺疾患 (interstitial lung disease: ILD) は、irAE の中でも最も頻度の高い致死的副作用の一つであり³、抗 PD-1 抗体であるニボルマブで治療された非小細胞肺癌 (non-small cell lung cancer: NSCLC) 患者を対象とした日本の多施設共同研究では、10.4%の患者が ICI 誘発性間質性肺疾患 (ICI-induced ILD: ICI-ILD) を発症し、そのうち 41.5%が Grade 3 以上の重症 ILD であったと報告されている⁴。ICI-ILD の発症は、ICI を含む抗がん薬治療の継続を困難にし、患者の予後にも悪影響を及ぼす⁵⁻⁷。ICI-ILD の予後不良因子としては、びまん性肺胞障害様の画像パターン、ニボルマブ初回投与から 60 日以内の ICI-ILD 発症、ニボルマブ治療開始前の胸水の存在、腫瘍対側または両側に分布する異常陰影、ならびに C 反応性蛋白 (C-reactive protein: CRP) の上昇が同定されている⁸。また、重症 irAE の予測因子として、年齢 65 歳以上、ICI 治療前後における derived neutrophil-to-lymphocyte ratio (dNLR) の変化率が 0.2 以上、lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR) の変化率が-0.25 未満、ならびに進行肺癌炎症指数が 17 以上であることが報告されている⁹。重症 irAE は、軽症から中等症の irAE と比較して、免疫調節薬による治療介入がより早期に行われていることも示されており¹⁰、これらの知見は、ICI-ILD において早期発見および早期治療が予後改善に重要であることを示唆している。しかしながら、ILD の早期検出に有用であることが確立された臨床指標は、現在のところ存在しない。

これまでに、ICI-ILD の発症に T 細胞の活性化や炎症性サイトカインの産生が関与することが報告されているものの¹¹、機能解析は行われておらず ICI-ILD の詳細な免疫学的発症機序は未解明であり、発症そのものや重症化を規定する直接的な因子も同定されていない。また、既存の臨床的リスク因子や炎症マーカーは主として全身性炎症の反映に留まり、ICI 特異的な免疫反応を反映する指標としては不十分である。また、現在承認されている ICI-ILD の治療薬は免疫抑制薬であるグルココルチコイドのみであり、高用量のグルココルチコイド

を含む免疫抑制薬が、ICI の治療効果を減弱させる可能性も指摘されていることから^{12,13}、抗腫瘍免疫の増強と irAE の発症抑制を両立させる、より個別化された irAE マネジメント戦略の構築が求められている。このため、ICI-ILD の疫学的病態・機序解明が ICI-ILD の予測や鑑別診断、さらには新たな治療法の確立に重要である。

以上の背景のもと、筆者は、ICI-ILD の発症機序解明と重症化関連因子の同定を目的とし、以下の臨床研究並びにマウスモデルを用いた基礎研究を遂行した。第I章では、ICI 投与症例を対象とした後方視的観察研究を実施した。ICI-ILD の検出契機要因に着目し、自覚症状に基づき ICI-ILD と診断された患者は、検査により診断された患者に比べ、重症 ILD を発症する割合が高く、自覚症状の変化のみでは ICI-ILD の重症化を予測することが困難な実態を明らかにした。第II章では、ICI 投与後の肺障害患者を対象とし、肺障害発症時における血清プロテオーム解析により、血清 monocyte chemoattractant protein-3 (MCP-3)、interleukin-6 (IL-6)、mucin-16 (MUC-16)、TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) が重症化関連バイオマーカーとして同定された。第III章では、ICI-ILD を発症する irAE モデルマウスを用いた ICI-ILD の発症機序解明として、ICOS⁺ CD4 T 細胞が ICI-ILD 発症に寄与することを明らかにし、ヒトにおいても末梢血中の ICOS⁺ CD4 T 細胞が ICI-ILD の発症予測マーカーとなる可能性を示した。

以下、本研究によって得られた結果を論述する。

第I章 ICI-ILD の検出契機となる自覚症状および重症度との関連に関する研究

ICI 投与に伴う irAE の発症時期は幅広く、長期にわたる多職種連携によるフォローアップが必要とされている¹⁰。ICI 治療では、遅発性の用量制限毒性が臨床上的課題であり、十分な期間にわたる免疫関連毒性のモニタリングが重要である¹⁴。臨床現場では、ILD は主に検査値、経皮的動脈血酸素飽和度 (peripheral oxygen saturation: SpO₂)、乾性咳嗽や呼吸困難などの自覚症状を契機に疑われ、高分解能 CT (high-resolution computed tomography: HRCT) によって診断されることが多い。ICI 治療は主として外来で施行され、投与間隔は最大 6 週間に及ぶことから、患者自身が評価可能な自覚症状は、ILD 発症を疑う上で重要な因子と考えられている。これまでに、自覚症状に関する質問票が ICI-ILD の検出に有用であることが報告されているが¹⁵、自覚症状が ILD 診断の契機となる頻度や、自覚症状と疾患重症度との関連については十分に明らかにされていない。

第I章では、ICI 投与症例を対象として、ICI-ILD の検出契機としての自覚症状の意義を明らかにするとともに、検出契機と重症度との関連について評価を行った。

I-1 方法

I-1-1 対象および研究デザイン

本研究は、後方視的観察研究である。2014 年 9 月から 2021 年 4 月の期間に、京都大学医学部附属病院において抗PD-1 抗体または抗PD-L1 抗体 (ニボルマブ、ペムブロリズマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブのいずれか) の投与を受けた患者を対象とした。電子カルテより、ICI-ILD が疑われた症例を抽出した。ICI-ILD の重症度は、米国国立がん研究所 Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 5.0 の「肺臓炎」に基づき、呼吸器内科医 1 名が後方視的に再評価した。死亡例は Grade 5 と定義した。また、本研究はヘルシンキ宣言およびその改訂に準拠して実施され、京都大学医学研究科・医学部及び医学部附属病院の医の倫理委員会にて承認を得て実施した (承認番号: R0545)。

I-1-2 評価項目およびデータ収集

ICI-ILD の発症時期は HRCT 画像により同定した。以下の臨床情報を電子カルテより収集した: 抗 PD-1/PD-L1 抗体初回投与時の年齢、性別、がん種、使用薬剤および併用療法、ICI-ILD の発症状況、ならびに ICI-ILD 発症時の検査値 (呼吸器症状、CRP、NLR、dNLR、LMR)。検査値は、ICI-ILD 診断に用いられた HRCT 撮像日から±6 日以内の最も近いデー

タを使用し、この範囲を超えるデータは除外した。

I-1-3 自覚症状の評価および検出契機の分類

外来で抗 PD-1/PD-L1 抗体投与を受ける患者は、毎回の投与日に自覚症状に関する質問票に記入し、医療スタッフがその内容を電子カルテに記録した。医師、薬剤師、看護師の問診記録も併せて自覚症状の有無および変化を評価した。また、ICI-ILD 発症症例は、発見の契機に基づき以下の 2 群に分類した。

「自覚症状群」：自覚症状により ICI-ILD が疑われた症例。

「定期検査群」：SpO₂、血液検査、胸部 X 線、治療効果判定の HRCT などの定期検査所見を契機として ICI-ILD が疑われた症例。

定期受診時または入院中に、まず検査所見から ICI-ILD が疑われ、その後に自覚症状の有無が確認された場合は、「定期検査群」に分類した。これは、自覚症状による ICI-ILD 疑いの頻度を検討するための分類である。

I-1-4 自覚症状の経時的評価

ICI-ILD と診断された受診日を「Visit 0」とし、直前の受診日を「Visit -1」、さらにその前を「Visit -2」と定義した。Visit -2 から Visit -1 における自覚症状の変化を、「無症状」「変化なし」「症状悪化」「新規症状」に分類して評価した。

I-1-5 マッチド・ケース・コントロール解析

ケースは後方視的研究で ICI-ILD と診断された全症例とし、コントロールは ICI-ILD を発症していない患者から、年齢 (±10 歳)、性別、がん種、抗がん治療レジメン、抗 PD-1/PD-L1 抗体投与期間 (各ケースの発症時点より長い期間) で 1 対 1 にマッチングして無作為に選択した。自覚症状の有無は、ケースでは ICI-ILD 診断時の新規または増悪した呼吸器症状 (呼吸困難、咳嗽、発熱) の有無で定義し、コントロールでは、各ケースにおける初回投与から ICI-ILD 診断までの期間に相当する期間内に新規または増悪した呼吸器症状があった場合を「症状あり」と定義した。結果はオッズ比 (odds ratio: OR) および 95%信頼区間 (confidence interval: CI) として示した。

I-1-6 統計解析

ICI-ILD の発症頻度はカイ二乗検定、重症度との関連は Fisher の正確確率検定および Mann-Whitney U 検定により評価した。自覚症状と ICI-ILD 検出または重症度との関連は

Fisher の正確確率検定を用い、多重比較には Bonferroni 補正を適用した。統計学的有意水準は両側 $P < 0.05$ とし、すべての解析は GraphPad Prism v9.5.1 (GraphPad Software, Inc., La. Jolla, CA, U.S.A) を用いて実施した。

I-2 結果

I-2-1 患者背景

抗 PD-1 抗体または抗 PD-L1 抗体の投与を受けた 926 例のうち、51 例 (5.5%) が免疫チェックポイント阻害薬誘発性間質性肺疾患 (ICI-ILD) を発症した。Table I-1 に示すとおり、使用頻度が最も高かった抗 PD-1/PD-L1 抗体はニボルマブであり、次いでペムブロリズマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブの順であった。205 例 (22.1%) は、抗 PD-1/PD-L1 抗体とイピリムマブの併用または化学療法との併用療法を受けていた。抗 PD-1/PD-L1 抗体投与患者のうち、458 例 (49.5%) は肺癌であった。

Table I-1. Clinical Features of 926 patients who received anti-PD-1/PD-L1 antibody.

		Total (n=926)
Age, n (%)	≥ 65	641 (69.2)
	< 65	285 (30.8)
Sex, n (%)	Male	624 (67.4)
	Female	302 (32.6)
Anti-PD-1/PD-L1 antibody, n (%)	Nivolumab	526 (56.8)
	Pembrolizumab	234 (25.3)
	Atezolizumab	213 (23.0)
	Durvalumab	39 (4.2)
	Avelumab	4 (0.4)
Combination, n (%)	Ipilimumab	40 (4.3)
	Chemotherapy	165 (17.8)
Cancer type, n (%)	Lung cancer	458 (49.5)
	Malignant melanoma	101 (10.9)
	Gastric cancer	68 (7.3)
	Bladder cancer	57 (6.2)
	Kidney cancer	55 (5.9)
	Head and neck cancer	40 (4.3)
	Esophageal cancer	39 (4.2)
	Other	108 (11.7)

I-2-2 ICI-ILD の発症頻度および重症度

抗 PD-1 抗体または抗 PD-L1 抗体を投与された 926 例のうち、51 例 (5.5%) が ICI-ILD を発症した。内訳は、肺癌症例が 37 例、その他のがん種が 14 例であった。肺癌患者における ICI-ILD の発症率は 8.1%であり、その他のがん種の 3.3%と比較して有意に高値であった ($P < 0.001$)。

ICI-ILD の重症度については、Grade 3-5 の ILD が 21 例 (41.2%) に認められ、そのうち 7 例 (13.7%) が Grade 5 であった。Table I-2 に示すとおり、Grade 3-5 の割合は肺癌症例とその他のがん種症例との間で有意差は認められなかった (43.2% vs. 35.7%, $P = 0.754$)。

Table I-2. Severity of ICI-ILD

	Grade 1-2 (n=30)	Grade 3-5 (n=21)	<i>P</i> value
Lung cancer patients	21 (56.8)	16 (43.2)	0.754
Other cancer patients	9 (64.3)	5 (35.7)	

Fisher's exact test was used. ICI-ILD, immune checkpoint inhibitor -induced interstitial lung disease; ILD, interstitial lung disease.

I-2-3 ICI-ILD 患者の臨床的特徴

ILD 重症度別に患者背景を比較した結果を Table I-3 に示す。患者年齢は抗 PD-1/PD-L1 抗体初回投与時の年齢とし、検査値は ICI-ILD 発症時の値を用いた。重症群 (Grade 3-5) では軽症群 (Grade 1-2) と比較して、ICI-ILD 発症時の CRP 値、NLR 値、dNLR 値が有意に高値であった ($P = 0.004$, 0.002 , 0.002)。一方、年齢および抗 PD-1/PD-L1 抗体投与開始から ILD 発症までの治療期間には有意差を認めなかった ($P = 0.196$, 0.147)。

Table I-3. Comparison of the Clinical Characteristics According to the ILD Severity

		Grade 1-2 (n = 30)	Grade 3-5 (n = 21)	<i>P</i> value
Age, n	≥ 65	25	14	0.196
	< 65	5	7	
Sex, n	Male	28	19	1.000
	Female	2	2	
Anti-PD-1/PD-L1 antibody, n	Nivolumab	19	9	0.148
	Pembrolizumab	7	8	0.351
	Atezolizumab	1	3	0.293
	Durvalumab	3	1	0.635
Combination, n	Chemotherapy	2	2	1.000
Anti-PD-1/PD-L1 antibody duration until ILD onset (cycles), median (range)		4.5 (1-71)	3.0 (1-13)	0.147
Cancer type, n	Lung cancer	21	16	0.754
	Other cancer	9	5	
	Malignant melanoma	3	1	-
	Gastric cancer	1	0	-
	Bladder cancer	0	3	-
	Kidney cancer	1	0	-
	Head and neck cancer	2	1	-
	Esophageal cancer	2	0	-
Laboratory test, median (range)	Onset CRP	2.50 (0.10-22.00)	8.50 (1.10-23.10)	0.004
	Onset NLR	5.45 (1.21-24.57)	11.09 (3.35-99.00)	0.002
	Onset dNLR	2.91 (0.73-9.99)	5.07 (2.03-99.00)	0.002
	Onset LMR	1.63 (0.40-5.56)	1.36 (0.25-7.00)	0.276

Fisher's exact test and the Mann-Whitney *U* test were used. ICI-ILD, immune checkpoint inhibitor-induced interstitial lung disease; ILD, interstitial lung disease; CRP, C-reactive protein; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; dNLR, derived NLR; LMR, lymphocyte-to-monocyte ratio.

I-2-4 ICI-ILD の診断契機としての自覚症状の頻度および重症度との関連

自覚症状と ILD 発症との関連を検討するため、ICI-ILD を発症していない患者の中で ILD 発症者と患者背景を 1 対 1 でマッチングさせたマッチド・ケース・コントロール研究を実施した。その結果、新規発症または増悪した自覚症状は、全 Grade の ICI-ILD 発症リスクを増加させる傾向を示したが、有意ではなかった (OR: 2.21, 95% CI: 1.00–4.73、Table I-4)。

そこで、各 Grade の ICI-ILD 患者における診断契機を検討した。ICI-ILD を発症した 51

例のうち、36 例 (70.6%) は自覚症状に関する質問票を使用しており、全症例において自覚症状に関する診療録の記載が存在した。ICI-ILD 発症例のうち 27 例 (52.9%) は「自覚症状群」に分類された。Table I-5 に示すとおり、「自覚症状群」では「定期検査群」と比較して Grade 3-5 の重症例の割合が有意に高かった ($P = 0.010$)。Grade 5 の患者 7 例のうち 6 例が「自覚症状群」に属していた。また、Grade 5 の割合は「自覚症状群」で高い傾向を示した (22.2% vs. 4.2%, $P = 0.103$)。

Table I-4. Relationship between subjective symptoms and the detection of ILD.

		Non-ICI-ILD (n = 51)	ICI-ILD (n = 51)	OR	95% CI	P value
Subjective symptoms, n	Yes	20	30	2.21	1.00-4.73	0.07
	No	31	21			

Fisher's exact test was used. ICI-ILD, immune checkpoint inhibitor-induced interstitial lung disease; ILD, interstitial lung disease; CI, confidence interval; OR, odds ratio.

I-2-5 自覚症状の経時的変化

自覚症状を契機として ICI-ILD が疑われた患者に対して、呼吸器症状の推移を解析した。Visit -1 の中央値は Visit 0 の 14 日前 (範囲: 4-26 日) であった。Visit -1 時点では、21 例 (77.8%) が無症状または症状の変化なしであり、6 例 (22.2%) が新規症状または症状の増悪を呈していた。

I-2-6 各自覚症状と ICI-ILD 重症度との関連

ICI-ILD 重症度別の自覚症状の頻度を Table I-5 に示す。呼吸困難の出現率は、軽症群と比較して重症群 (Grade 3-5) で有意に高かった ($P < 0.001$)。Grade 5 の全症例において呼吸困難が認められた。

肺癌症例では、Grade 1-2 の 21 例中 3 例 (14.3%) に対し、Grade 3-5 の 16 例中 11 例 (68.8%) で呼吸困難が認められ ($P = 0.002$)、その他のがん種症例では、Grade 1-2 の 9 例中 1 例に対し、Grade 3-5 の 5 例すべてに呼吸困難が認められた ($P = 0.003$)。

Table I-5. Relationship between subjective symptoms and the severity of ILD.

		Grade 1-2 (n = 30)	Grade 3-5 (n = 21)	P value ^a
Factors in the Detection of ICI-ILD, n (%)	Subjective symptoms	11 (36.7) [G1:0, G2:11]	16 (76.2) [G3:6, G4:4, G5:6]	0.010
	Routine examinations	19 (63.3) [G1:10, G2:9]	5 (23.8) [G3:2, G4:2, G5:1]	
Subjective symptoms, n (%)	Dyspnea	4 (13.3) [G1:0, G2:4]	16 (76.2) [G3:5, G4:4, G5:7]	< 0.001
	Cough	8 (26.7) [G1:0, G2:8]	7 (33.3) [G3:5, G4:0, G5:2]	0.757
	Fever	6 (20.0) [G1:0, G2:6]	6 (28.6) [G3:3, G4:2, G5:1]	0.518

Fisher's exact test was used. ^aBonferroni-Corrected test was used as a multiple comparison test for subjective symptoms. Statistical significance was defined as a two-sided *P* value of < 0.017. ICI-ILD, immune checkpoint inhibitor-induced interstitial lung disease; ILD, interstitial lung disease.

I-3 考察

ILD は、乾性咳嗽や呼吸困難などの自覚症状を呈する致死的な irAE である^{3,16}。ICI 治療において、治療判断のフローチャートにおける最初の基準は「新規の呼吸器症状の出現」であるが¹⁷、医師がどのような因子に基づいて ICI-ILD を疑うに至るのかは明確ではない。本研究では、抗 PD-1/PD-L1 抗体投与患者において ICI-ILD を疑う契機となる因子を検討し、新規または増悪した自覚症状が全 Grade の ICI-ILD 発症リスクを増加させる傾向を示すものの、有意ではないことを明らかにした。さらに、自覚症状と ICI-ILD 重症度との関連を検討した結果、ICI-ILD と診断された患者の半数以上が自覚症状を契機に疑われており、特に Grade 3-5 または致死的な ICI-ILD は、Grade 1-2 の ICI-ILD よりも自覚症状を契機として発見される頻度が高かった。質問票における息切れや呼吸困難は、ICI-ILD 発症の検出に有用であると報告されている¹⁵。本研究の結果は、呼吸困難を契機として診断される ILD は、Grade 3-5 の ICI-ILD を検出する可能性が高く、より早期段階で ILD を診断することの重要性を示唆している。

興味深いことに、多くの患者では、ILD 診断の契機となった受診日の直前の受診日において、呼吸器症状を認めない、あるいは症状の変化が認められなかった。抗 PD-1/PD-L1 抗体は通常 2-4 週ごとに投与され、多くの患者は薬剤投与のために通院している。本研究の結果から、入院を要した Grade 3-5 の ICI-ILD 患者において、呼吸器症状出現から受診までの日数の中央値は 4 日 (0-14 日) であった。さらに、患者以外の第三者からの報告を契機とした予定外受診が全体の 80%を占めるとの報告もある¹⁸。また、irAE の発症時期は幅広いこと

が知られている¹⁰。これらの要因から、急速に進行する ICI-ILD の早期発見は容易ではないことが示される。irAE 管理における標準治療はグルココルチコイドであるが、高用量のメチルプレドニゾロン・パルス療法を受けた患者のみが無増悪生存期間および全生存期間の短縮を示し、低用量から高用量のグルココルチコイド治療を受けた患者の生存は、グルココルチコイドを使用しなかった患者と同等であると報告されている⁷。したがって、早期診断およびグルココルチコイド治療の早期導入により、予後不良と関連するパルス療法を回避できる可能性がある。近年、ICI の皮下注射製剤が開発されており¹⁹、定期外来受診間隔の延長による ILD 検出の遅れが懸念される。また、irAE を患者自身が確認できるウェブアプリケーションも開発されている²⁰。患者には、症状別の対応フローチャートやウェブアプリケーションなどの情報を提供し、いつでも緊急症状を判断できる環境を整えることが重要である。外来患者においては、自身の症状を自己管理し、症状出現時には速やかに医療機関へ連絡する体制の構築が求められる。

自覚症状は ICI-ILD 発症を疑う上で有用であるが、発症前の予測あるいはより軽症段階での検出が重要である。ICI-ILD の予後不良因子として、CRP 値の異常変動、ICI 治療前後における dNLR の変化率が 0.2 以上、LMR の変化率が -0.25 未満であることが報告されている^{8,9}。これらの予後マーカーは同定されているものの、ICI-ILD 発症の早期検出に有用であることが確認されたマーカーは存在しない。したがって、ICI-ILD 発症を予測し得る客観的指標の探索が今後の重要な研究課題である。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、本研究は電子カルテデータベースを用いた後方視的研究であるため、患者が訴えなかった自覚症状は記録されておらず、常に電子カルテに記載されていたとは限らない。しかしながら、医師は抗がん薬に伴う自覚症状に日常的に注意を払っており、診療録に記載している。共通の ICI 用問診票は毎回の受診で必ずしも確認されておらず、欠測データが避けられなかった。今後は前向きデータ収集やウェブアプリケーションの活用が必要である。第二に、ICI-ILD を発症しなかった患者における自覚症状の検討ができなかった点である。自覚症状は他の呼吸器疾患との鑑別にも用いられるため、自覚症状を有する患者のうちどの程度が ICI-ILD であったのかは不明である。第三に、本研究では併用療法症例の割合が少なかった。これは 2021 年 5 月以降に日本で承認されたレジメンが含まれていないためである。今後、多くの併用療法が承認されることにより、ICI-ILD の発症頻度および重症度はさらに増加すると予想され、継続的な検討と対策の見直しが必要である。

第II章 血清による ICI 関連肺障害の重症度関連バイオマーカー探索研究

第1章において、本研究は、ICI-ILD の診断契機として自覚症状が重要な役割を果たし、とくに呼吸困難などの症状に基づいて検出された症例では重症化しやすい傾向があることを示唆した。一方で、自覚症状は主観的評価に依存する側面が大きく、また症状出現時にはすでに肺障害が進行している場合も少なくないことから、発症前あるいは軽症段階において重症化リスクを客観的に評価し得る指標については十分に検討できていないという課題が残された。その臨床的重要性にもかかわらず、ICI-ILD の病態生理は依然として十分に解明されておらず、ICI-ILD の重症度を予測または評価可能なバイオマーカーも確立されていない。近年の知見から、サイトカインおよびケモカイン応答が irAEs の発症のみならず、その重症度にも関与することが示唆されている。ICI-ILD 患者においては、血清 IL-6 濃度がベースラインから経時的に上昇し、Grade 3-4 の重症 ILD でより高値を示した²¹。さらに、ICI-ILD 患者の気管支肺泡洗浄および血清を解析した研究では、IL-6 を含む複数の炎症性サイトカインの顕著な上昇が認められており、過剰なサイトカイン放出と ILD の重症度との関連が示されている²²。ICI-ILD に特化したサイトカイン・ケモカインプロファイルに関するエビデンスは依然として限られているものの、より広範な irAEs を対象とした複数の研究では、臨床的に意義のある有害事象 (Grade ≥ 2) が、C-X-C motif chemokine ligand 9 (CXCL9)、CXCL10、CXCL11 といった IFN- γ 誘導性ケモカインの顕著な上昇、ならびに CXCL13 濃度の増加を伴うことが示されている²³。加えて、腎細胞癌を対象とした最近の研究では、ICI 治療開始前および治療初期における末梢血中 CXCL10 濃度の高値が、Grade ≥ 2 の irAEs 発症と有意に関連することが報告されており²⁴、C-X-C motif chemokine receptor 3 (CXCR3)/CXCR5 軸に関連するケモカイン経路の過剰な活性化が、ICI-ILD を含むさまざまな irAE 表現型に共通する、より強い全身性免疫毒性を反映している可能性が示唆されている。しかしながら、ICI-ILD の重症度と特異的に関連する循環血中タンパク質のプロファイルについてはいまだ包括的な解析がなされていない。重症 ILD は、緊急の治療中断を要することが多く、短期間で生命を脅かす呼吸不全へと進展し得ることから、その重症度に関連する免疫学的特徴をより精密に理解することが強く求められている。しかし、ICI-ILD は治療中に予測困難なタイミングで発症することが多く、発症時点での生体試料を適切に採取することは困難であり、病態解明の進展を制限する要因となっていた。したがって、重症 ILD と軽症 ILD を識別し得る末梢血中タンパク質のプロファイルを明らかにすることは、多様な病態を示す ILD の免疫学的な病態への理解を深めるのみならず、早期の予後リスク評価や臨床マネジメント戦略の構築にも貢献すると考えられる。以上の背景を踏まえ、本研究では、ICI 投与後に肺障害を発症し、感染性肺炎を併発しているものの ICI-ILD を除外できなかった症例も含めて対象とし、の ICI 投与後の肺障害の重症度と

関連する末梢血免疫プロファイルを明らかにすることを目的とし、その基盤となる病態機序の理解に資する知見を得ることを目指した。

II-1 方法

II-1-1 対象および研究デザイン

本研究は後ろ向き観察研究である。2021 年 4 月から 2025 年 1 月までの期間に、京都大学医学部附属病院において、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、またはアベルマブのいずれかの抗 PD-1/PD-L1 抗体投与後に肺障害を発症した患者を対象とした。肺障害の初期診断は、がん治療を担当する主治医または呼吸器内科医により、臨床症状および画像所見に基づいて行われた。肺障害の重症度は、発症時における CTCAE version 5.0 に基づいて評価した。

電子カルテより、年齢、性別、身長、体重、がん種、ICI レジメン、喫煙歴、SpO₂、および臨床検査値 (好中球数、リンパ球数、血小板数 (platelet count: PLT)、CRP、乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase: LDH)、albumin (ALB) を収集した。さらに、肺障害関連バイオマーカーとして Krebs von den Lungen-6 (KL-6) および surfactant protein D (SP-D)を含めた。本研究はヘルシンキ宣言に則り、京都大学医学研究科・医学部及び医学部附属病院の倫理委員会の承認のもと行った (承認番号: R1386)。参加可能な全ての患者について、参加前に文書によるインフォームド・コンセントを得た。

II-1-2 プロテオミクス解析

肺障害発症時採取した血清検体を用いて、探索的プロテオミクス解析を行った。全例肺障害治療としてのグルココルチコイド治療前の検体であった。免疫関連 92 因子を測定可能な Olink Target 96 Immuno-Oncology Panel (Olink Proteomics, Uppsala, Sweden) を用い、近接伸長アッセイ (Proximity Extension Assay: PEA) 法によりタンパク質発現を定量した²⁵。解析結果は log₂スケールの正規化蛋白発現量 (Normalized Protein Expression: NPX) として算出され、品質管理および正規化はメーカー標準プロトコールに従って実施された。

II-1-3 統計解析

連続変数は中央値および四分位範囲、カテゴリ変数は人数および割合で示した。軽症 (CTCAE grade 1-2) と重症 (grade 3-4) の比較には、Olink プロテオミクスデータは Welch の t 検定を用いた。候補因子探索は仮説生成を目的とした解析であり、事前に臨床的意義を考慮して選定した限られた因子を対象としたため、多重検定補正は適用せず、未補正の

P 値を用いて評価した。ただし、解析の透明性を確保する目的で、Benjamini–Hochberg 法による false discovery rate (FDR) 補正後の P 値を参考情報として算出し、補足資料に示した。臨床検査値は Wilcoxon の順位和検定を用い、位置差の推定には Hodges–Lehmann 推定量およびその 95% CI を算出した。

探索的解析として、Olink プロテオミクスデータおよび通常の臨床検査値について単変量解析を行った。さらに、肺障害重症度との関連因子を同定するため、直交部分最小二乗判別分析 (Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis: OPLS-DA)²⁶ を SIMCA software (version 18.0; Sartorius stedim biotech, Goettingen, Germany) を用いて行った。解析には、Olink データ、臨床検査値データについてそれぞれ行った。OPLS-DA において、回帰係数 (pq) の絶対値が 0.15 以上の因子を、重症度判別に強く寄与する候補因子とした。候補因子については、Grade 別の重症度および候補因子間の関係性を評価するため、Spearman の順位相関係数を用いた。その他の統計解析は R v.4.3.3 (The R Foundation for Statistical Computing) および JMP Pro v18.1.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC, U.S.A) を用いて実施し、全ての解析において有意水準は両側 $P < 0.05$ とした。

II-2 結果

II-2-1 患者背景

ICI 投与後肺障害を発症した 27 例を本研究に組み入れた。その内訳は、軽症例 (CTCAE grade 1-2) が 17 例、重症例 (grade 3-4) が 10 例であった。両群の患者背景は Table II-1 に示す。平均年齢は軽症群および重症群でそれぞれ 72.1 歳および 74.2 歳と、両群間で大きな差は認められなかった。多くの症例において、現喫煙または既喫煙の喫煙歴を有し、ILD 既往歴は重症群で軽症群より高割合であった。

ICI 治療レジメンに関しては、抗 PD-(L)1 抗体単剤療法および抗 PD-(L)1 抗体と化学療法の併用療法が、両群において最も頻度の高い治療であり、抗 CTLA-4 抗体を含む併用療法は比較的少数であった。がん種としては非小細胞肺癌が最も多く、次いで腎細胞癌、肝細胞癌、食道癌、胃癌、悪性黒色腫、子宮癌の順であった。ICI 投与開始から肺障害発症までの期間の中央値は、軽症群で 128 日、重症群で 104 日と、両群間で同程度であった。

Table II-1. Clinical features of 27 pneumonitis patients who received anti-PD-1/PD-L1 antibody.

		Mild (n = 17)	Severe (n = 10)
Age, mean (SD)		72.1 (10.1)	74.2 (6.3)
Sex, n (%)	Male	12 (70.6)	8 (80.0)
	Female	5 (29.4)	2 (20.0)
Smoking history, n (%)	Current or Former	14 (82.3)	9 (90.0)
	Never	3 (17.6)	1 (10.0)
ILD history, n (%)	Yes	2 (11.8)	3 (30.0)
ICI regimens, n (%)	Anti-PD-(L)1	6 (35.3)	4 (40.0)
	Anti-PD-1+CTLA-4	3 (17.6)	0 (0.0)
	Anti-PD-(L)1+chemotherapy	7 (41.2)	6 (60.0)
	Anti-PD-1+CTLA4+chemotherapy	1 (5.9)	0 (0.0)
Cancer type, n (%)	Non-small cell lung cancer	5 (35.7)	6 (46.2)
	Renal cell carcinoma	4 (21.4)	0 (0.0)
	Esophageal cancer	1 (5.9)	1 (10.0)
	Gastric cancer	2 (11.8)	0 (0.0)
	Hepatocellular carcinoma	3 (17.6)	1 (10.0)
	Malignant melanoma	2 (11.8)	1 (10.0)
	Uterine cancer	0 (0.0)	1 (10.0)
Days from ICI initiation to pneumonitis onset, median (95% CI)		128 (93.4 – 327.6)	104 (62.4 – 406.2)

CI, confidence interval; ICI, immune checkpoint inhibitor; ILD, interstitial lung disease; SD, Standard deviation.

II-2-2 肺障害発症時における血清プロテオミクス解析

肺障害発症時の血清タンパク質プロファイルから重症度と関連する免疫学的特徴を探索するため、Olink Immuno-Oncology Panel を用いた解析を行った。単変量解析では、重症群において MCP-3、IL-6、MUC-16 が高値を示し、一方で軽症群では TRAIL、carbonic anhydrase IX (CAIX)、CD244 が相対的に高値を示した (Fig. II-1A)。その他の多くの因子では、両群間で明確な差は認められなかった。92 因子すべての平均値、群間差および Benjamini-Hochberg 法による FDR 補正前後の *P* 値の一覧は Supplementary Table II-1 に示す。

さらに、多変量解析として OPLS-DA を実施したところ、軽症群と重症群は明確に分離

された (Fig. II-1B)。回帰係数 (pq) の絶対値が 0.15 以上の因子を重症度判別への寄与が高い因子として抽出した結果、MCP-3、IL-6、MUC-16 が重症群に対する正の寄与因子として同定された。一方、TRAIL は重症群に対する負の寄与因子として抽出された (Fig. II-1C)。

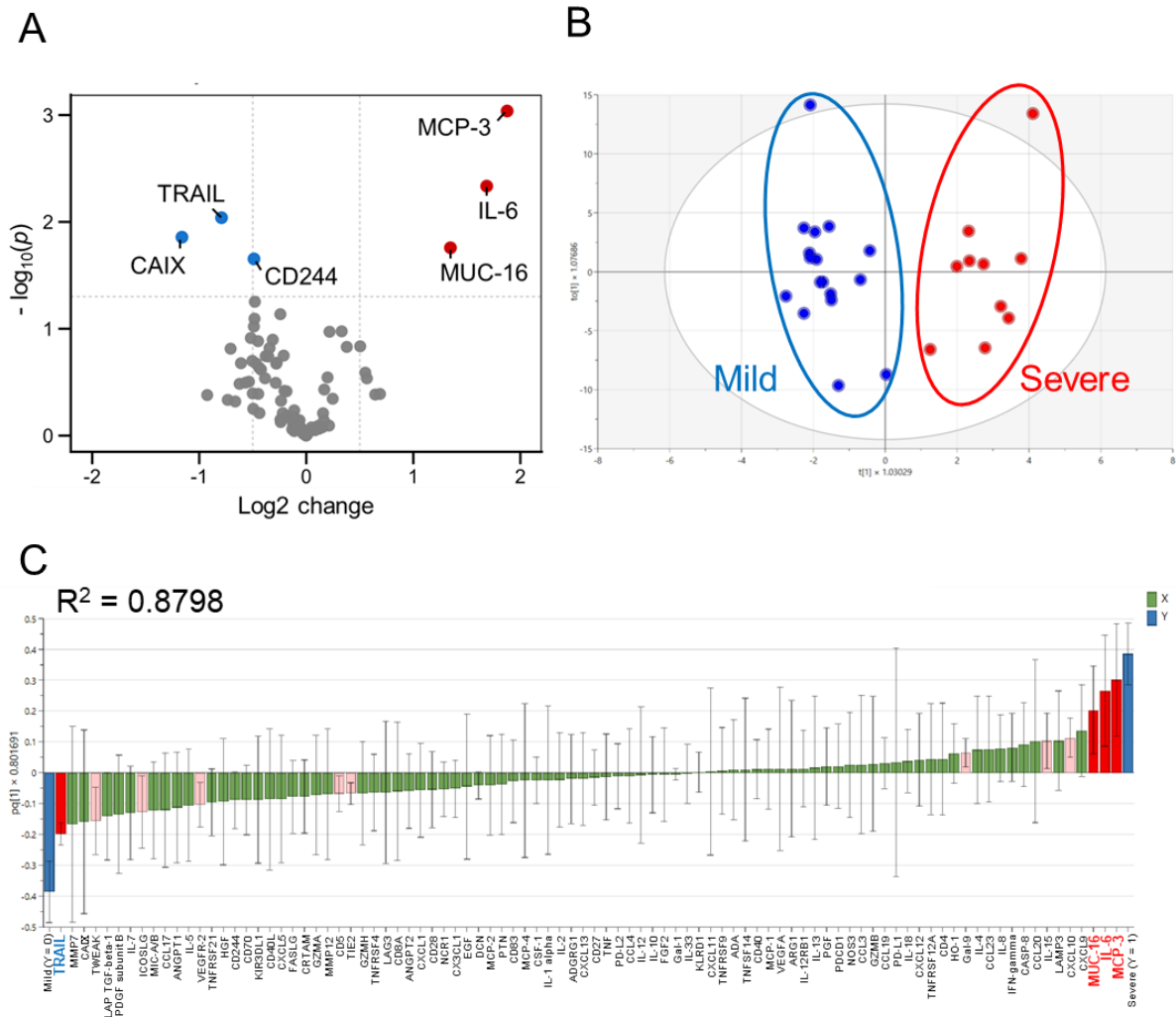


Fig. II-1. Proteomic profiling at pneumonitis onset.

(A) Volcano plot showing differences in serum protein expression between mild (grade 1–2) and severe (grade 3–4) ICI-related pneumonitis at onset, measured using the Olink Immuno-Oncology panel. (B) OPLS-DA score plot based on Olink proteomic data, demonstrating separation between mild (blue) and severe (red) pneumonitis. (C) Coefficient loading plot of the OPLS-DA model. Proteins with an absolute regression coefficient ($|pq|$) ≥ 0.15 were highlighted in red, indicating strong contribution to severity discrimination. Proteins with $|pq| < 0.15$ but significant in univariate analysis ($P < 0.05$) are shown in pink.

II-2-3 肺障害発症時における患者背景・臨床検査値

ICI 投与後肺障害の重症度と通常診療で得られる患者背景・臨床検査値との関連を評価するため、発症時の患者背景・臨床検査値を比較した。Wilcoxon 順位和検定による単変量解析の結果、重症群では軽症群と比較して CRP、LDH、KL-6、および SP-D は有意に高値を示し、SpO₂ は有意に低値を示した (Fig. II-2A)。一方、その他の臨床検査項目については有意な差は認められなかった (Supplementary Table II-2)。次に、複数の臨床検査値を同時に考慮した場合の重症度判別能を評価するため、臨床検査値のみを用いて OPLS-DA を実施した。スコアプロットでは、軽症群と重症群の分離が認められた (Fig. II-2B)。回帰係数 (pq) の絶対値が 0.15 以上の因子を重症度判別への寄与が高い因子として抽出した結果、CRP および SP-D が重症群に対する正の寄与を示し、SpO₂ および抗 CTLA-4 抗体の投与が重症群に対する負の寄与を示した (Fig. II-2C)。

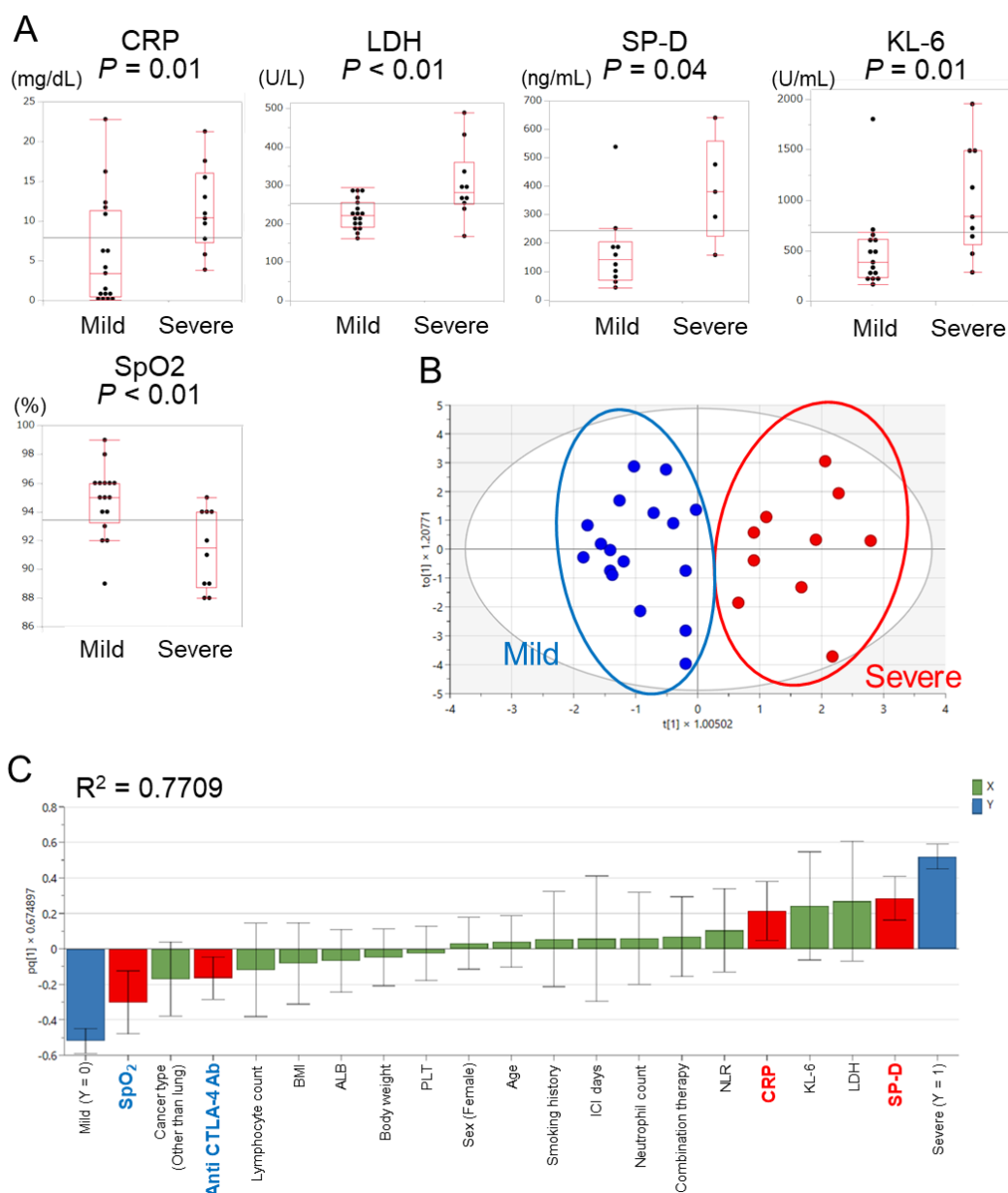


Fig. II-2. Routine clinical laboratory findings at pneumonitis onset.

(A) Univariate comparison of routine clinical laboratory parameters between patients with mild (grade 1–2) and severe (grade 3–4) pneumonitis at onset. Only parameters showing statistically significant differences by Wilcoxon rank-sum test are shown. (B) OPLS-DA constructed using routine clinical laboratory variables, demonstrating separation between mild (blue) and severe (red) pneumonitis. (C) Coefficient loading plot of the OPLS-DA model. Variables with absolute regression coefficient loadings ($|pq|$) ≥ 0.15 were highlighted in red, indicating strong contribution to severity discrimination.

II-2-4 プロテオミクス由来候補因子と既存臨床指標の相関関係

以上の結果を踏まえ、次に Olink プロテオミクス解析により同定された候補因子が、肺障害の重症度および既存の臨床指標とどのような関係性を示すかを評価するため、

Spearman の順位相関係数を用いた相関解析を実施した (Fig. II-3)。その結果、MCP-3、IL-6、および MUC-16 は肺障害の Grade 別の重症度と中等度から強い正の相関を示し、TRAIL は重症度と有意な負の相関を示した。一方、これらのプロテオミクス由来候補因子と既存の臨床指標である CRP、SP-D、SpO₂との間には中等度の相関が認められたが、それらの相関は一様ではなく、肺障害の重症度との関連性は因子ごとに異なる傾向を示した。抗 CTLA-4 抗体の併用有無については肺障害の Grade と中等度の負の相関がみられたが、他の因子との相関は認められなかった。

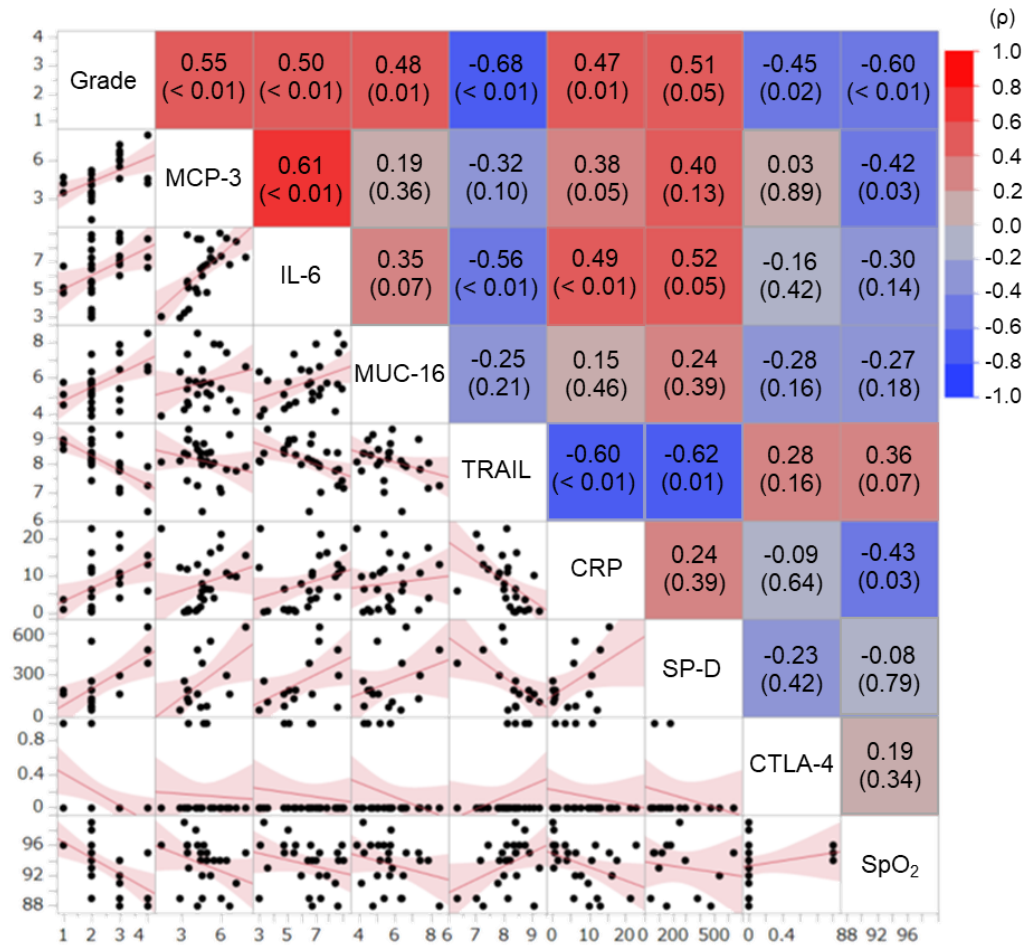


Fig. II-3. Spearman correlation analysis between pneumonitis severity and candidate biomarkers.

Heatmap and scatter plots showing Spearman's rank correlation between pneumonitis severity (Grade) and selected candidate biomarkers, including MCP-3, IL-6, MUC-16, TRAIL, CRP, SP-D, CTLA-4 exposure, and SpO₂. Correlation coefficients (ρ) are shown in each cell, with corresponding p values indicated in parentheses. Red and blue colors represent positive and negative correlations, respectively, with color intensity reflecting the strength of the correlation. Scatter plots in the lower panels illustrate the relationships between variables, with locally estimated smoothing curves overlaid.

II-3 考察

ICI-ILD の重症化機序はいまだ十分に解明されていない。本研究では、ICI 投与後の肺障害発症時の血清を用いた網羅的プロテオミクス解析により肺障害の重症度と関連する末梢血免疫プロファイルの特徴を明らかにすることを目的とした。Olink Immuno-Oncology Panel を用いた網羅的プロテオーム解析により、重症群では軽症群に比べ MCP-3、IL-6、MUC-16 が高値を示し、TRAIL は低値を示した。これらの因子は単変量解析のみならず、多変量解析においても重症度判別への寄与が高い因子として抽出されており、ICI-ILD では、炎症反応の増強および炎症制御機構の破綻により重症化を引き起こしている可能性が示唆された。

IL-6 はこれまでに ICI-ILD の発症および重症度と正の相関を示すことが報告されている炎症性サイトカインであり²²、本研究の結果は既報と合致する。加えて、本研究では新たに MCP-3、MUC-16、TRAIL が重症度と関連する因子として同定された。MCP-3 は、単球・マクロファージを中心とした免疫細胞の遊走に関与するケモカインであり²⁷、これまで、血中 MCP-3 濃度は特発性肺線維症や COVID-19 感染症において重症度と正の相関があることが報告されている²⁸⁻³⁰。ICI-ILD においても同様に、肺局所における単球の遊走と組織障害の進展に関与すると考えられている。また、ICI を投与された NSCLC 患者において、ICI-ILD を含む Grade 3 以上の irAE 発症者が irAE 非発症を含む Grade 2 以下の irAE 発症者に比べて ICI 初回投与前の血漿 MCP-3 が高値であるという報告もあり³¹、MCP-3 は ICI-ILD の発症後のみならず、重症化の素地となる免疫状態を反映する因子である可能性が示唆される。

TRAIL は、TNF スーパーファミリーに属する膜貫通タンパク質であり、ナチュラルキラー細胞および T 細胞、マクロファージ、および樹状細胞の表面に発現する。一部は可溶性タンパク質として放出され、細胞膜上、可溶性共にアポトーシスを誘導できるため、TRAIL は自然免疫の調節とメモリー T 細胞の恒常性維持に重要である³²。肺炎やウイルス感染モデルにおいては、TRAIL の欠損やシグナル低下が、炎症の遷延および肺組織障害の増悪と関連することが報告されている³³。本研究では、TRAIL は重症群で低下し、肺障害の重症度と負の相関を示した。TRAIL が炎症性サイトカインである IL-6、肺胞Ⅱ型上皮細胞の損傷マーカーである SP-D と負の相関が強いことから本研究で観察された重症群における TRAIL の低下は、免疫チェックポイント阻害によって誘導された過剰な免疫活性に対する制御機構が破綻し、過剰な炎症や組織障害が持続している可能性が考えられる。

MUC-16 は、膜結合型のムチンであり、気道上皮細胞に発現し、細胞内シグナル伝達経路の活性化、炎症および感染性物質に対する免疫応答の制御、ならびに細胞分化および増殖の調節に関与している³⁴。COVID-19 感染症では発症群で上昇することが報告されており³⁵、本研究において重症群で MUC-16 が上昇していたことは、免疫炎症に加えて、上皮細胞傷害お

よび再生過程が重症化に関与している可能性を示唆する。一方で、MUC-16 は CA-125 として 卵巣癌等腫瘍細胞にも発現しており、腺癌に対する腫瘍マーカーにもなっている³⁶。そのため、本研究において MUC-16 と SP-D の相関が弱かったことは、ICI-ILD の肺の傷害部位が多様であることを反映している可能性や MUC-16 が腫瘍細胞の影響を受けている可能性があり、今後大規模コホート研究にてがん種別の解析や、腫瘍量、同一患者における経時的変化の検討が必要である。

抗 CTLA-4 抗体の併用については、多変量解析において重症度に対する負の寄与が示された。抗 PD-1/PD-L1 抗体と抗 CTLA-4 抗体の併用療法は、抗 PD-1/PD-L1 抗体療法に比べ、irAE の発症頻度および重症度を高めることが報告されており³⁷、本結果は既報と一見矛盾する。しかし、本研究は後方視的観察研究であり、肺障害発症リスクを考慮して CTLA-4 併用の有無が選択された可能性があり、レジメン選択に伴うバイアスが重症度に影響した可能性は否定できない。この点については、今後、より大規模コホート研究にて背景因子を調整した解析が必要である。

本研究にはいくつかの限界がある。第一に、血清バイオマーカーは肺障害発症時の単一時点で測定されており、発症前から増悪、治療反応に至るまでの時間的推移を評価できていない。第二に、症例数が限られているため、因子間の相関や共線性の影響により、多変量解析において一部の因子が残らなかった可能性がある。第三に、ICI-ILD は本質的に肺局所の免疫病態であるにもかかわらず、本研究は血清解析に限定されている。今後は、血清プロテオミクスで同定された候補因子を起点として、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF)、末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cell: PBMC)、肺組織病理との関連を統合的に解析することで、重症化機序のより詳細な解明につながると考えられる。

II-4 補足資料

Supplementary Table II-1. Univariate analysis of serum proteomic profiles at pneumonitis onset according to severity (Welch's t-test).

Protein	Mild Mean (NPX)	Severe Mean (NPX)	log ₂ FC	<i>P</i> value	-log ₁₀ (<i>P</i> value)	FDR
MCP-3	4.043	5.920	1.877	0.001	3.038	0.084
IL-6	5.915	7.601	1.686	0.005	2.335	0.213
TRAIL	8.431	7.639	-0.792	0.009	2.039	0.280
CAIX	5.235	4.073	-1.162	0.014	1.857	0.320
MUC-16	5.227	6.574	1.347	0.017	1.758	0.321
CD244	6.540	6.051	-0.489	0.022	1.654	0.340
CD5	6.208	5.727	-0.480	0.056	1.253	0.722
TIE2	7.387	7.144	-0.242	0.073	1.136	0.722
ICOSLG	6.366	5.882	-0.484	0.081	1.094	0.722
TWEAK	9.163	8.673	-0.490	0.095	1.021	0.722
IL-15	5.594	5.924	0.331	0.106	0.976	0.722
HO-1	13.475	13.692	0.217	0.107	0.972	0.722
CD70	5.658	5.140	-0.518	0.122	0.913	0.722
CD28	1.622	1.308	-0.314	0.127	0.898	0.722
CRTAM	6.447	5.996	-0.451	0.131	0.884	0.722
CXCL10	10.861	11.365	0.504	0.146	0.836	0.722
LAMP3	6.339	6.717	0.378	0.148	0.830	0.722
VEGFR-2	8.787	8.443	-0.344	0.152	0.819	0.722
LAP TGF-beta-1	9.440	8.733	-0.707	0.154	0.814	0.722
DCN	4.981	4.769	-0.212	0.178	0.749	0.722
NCR1	4.098	3.719	-0.379	0.180	0.745	0.722
FASLG	7.544	7.189	-0.355	0.182	0.741	0.722
LAG3	6.057	5.551	-0.505	0.200	0.700	0.722
TNFRSF21	11.503	11.227	-0.276	0.208	0.683	0.722
CD8A	9.718	9.107	-0.610	0.210	0.677	0.722
IL-5	1.030	0.561	-0.469	0.211	0.675	0.722
ANGPT2	6.330	6.049	-0.280	0.212	0.674	0.722
KIR3DL1	3.211	2.772	-0.439	0.232	0.635	0.761
GZMH	5.647	5.224	-0.424	0.241	0.619	0.764
CXCL9	9.514	10.066	0.551	0.257	0.589	0.789
Gal-9	9.132	9.331	0.199	0.285	0.545	0.811
TNFRSF4	8.649	8.264	-0.385	0.290	0.537	0.811
CASP-8	6.610	7.176	0.566	0.291	0.536	0.811
MMP12	8.763	8.227	-0.536	0.313	0.505	0.814
PDGF subunit B	10.893	10.325	-0.567	0.319	0.496	0.814
CD83	3.495	3.210	-0.285	0.321	0.494	0.814
IL-7	5.257	4.634	-0.623	0.328	0.485	0.814
CXCL12	1.639	1.807	0.168	0.370	0.431	0.853
CX3CL1	4.905	4.701	-0.204	0.381	0.419	0.853
CD27	9.868	9.683	-0.185	0.385	0.415	0.853

Supplementary Table II-1. (Continued)

Protein	Mild Mean (NPX)	Severe Mean (NPX)	log₂FC	<i>P</i> value	-log₁₀ (<i>P</i> value)	FDR
ANGPT1	7.259	6.759	-0.500	0.403	0.394	0.853
HGF	10.629	10.180	-0.449	0.407	0.391	0.853
IFN-gamma	8.458	9.146	0.689	0.408	0.390	0.853
IL-8	8.022	8.666	0.644	0.413	0.385	0.853
MMP7	13.239	12.314	-0.926	0.417	0.380	0.853
IL-4	0.534	0.781	0.247	0.452	0.345	0.899
MIC-A/B	5.737	5.004	-0.733	0.463	0.334	0.899
PTN	1.948	1.711	-0.236	0.472	0.326	0.899
CCL17	10.699	10.035	-0.664	0.479	0.320	0.899
CXCL5	8.826	8.331	-0.495	0.561	0.251	0.999
PD-L2	3.817	3.705	-0.113	0.580	0.236	0.999
CD40L	7.238	6.800	-0.438	0.615	0.211	0.999
ADGRG1	2.371	2.152	-0.219	0.616	0.211	0.999
CCL23	12.511	12.668	0.157	0.618	0.209	0.999
TNFRSF9	6.403	6.224	-0.178	0.656	0.183	0.999
TNF	4.798	4.636	-0.162	0.665	0.177	0.999
IL-2	0.187	0.044	-0.142	0.668	0.175	0.999
IL-12RB1	3.179	3.065	-0.114	0.675	0.171	0.999
IL-12	7.124	6.883	-0.241	0.707	0.150	0.999
CSF-1	10.730	10.667	-0.063	0.718	0.144	0.999
ARG1	5.271	5.435	0.165	0.722	0.142	0.999
KLRD1	7.483	7.403	-0.080	0.732	0.136	0.999
CXCL1	9.487	9.248	-0.239	0.747	0.127	0.999
GZMA	6.989	6.863	-0.126	0.760	0.119	0.999
CXCL13	9.573	9.471	-0.102	0.763	0.117	0.999
CXCL11	10.362	10.575	0.212	0.806	0.094	0.999
MCP-1	12.920	13.032	0.112	0.810	0.092	0.999
CCL4	7.635	7.548	-0.087	0.812	0.090	0.999
CCL20	8.225	8.375	0.150	0.835	0.078	0.999
IL-18	9.617	9.667	0.050	0.835	0.078	0.999
NOS3	2.174	2.116	-0.057	0.843	0.074	0.999
VEGFA	10.898	11.021	0.123	0.846	0.073	0.999
IL-13	0.668	0.599	-0.069	0.847	0.072	0.999
ADA	6.337	6.289	-0.048	0.848	0.072	0.999
PD-L1	7.882	8.003	0.121	0.854	0.069	0.999
TNFSF14	6.243	6.361	0.118	0.862	0.065	0.999
MCP-4	11.229	11.097	-0.131	0.871	0.060	0.999
IL-10	4.525	4.475	-0.049	0.875	0.058	0.999
CCL3	7.889	7.972	0.082	0.890	0.051	0.999
TNFRSF12A	8.666	8.707	0.042	0.900	0.046	0.999
EGF	8.848	8.736	-0.112	0.907	0.042	0.999
PGF	9.758	9.732	-0.026	0.925	0.034	0.999

Supplementary Table II-1. (Continued)

Protein	Mild Mean (NPX)	Severe Mean (NPX)	log₂FC	<i>P</i> value	-log₁₀ (<i>P</i> value)	FDR
IL-33	0.431	0.418	-0.012	0.925	0.034	0.999
FGF2	0.782	0.756	-0.026	0.930	0.032	0.999
Gal-1	8.057	8.048	-0.009	0.945	0.025	0.999
CCL19	12.116	12.087	-0.028	0.958	0.019	0.999
GZMB	5.753	5.738	-0.015	0.973	0.012	0.999
CD4	4.043	4.049	0.007	0.980	0.009	0.999
CD40	12.031	12.024	-0.007	0.983	0.008	0.999
MCP-2	8.770	8.761	-0.008	0.990	0.004	0.999
IL-1 alpha	0.722	0.719	-0.003	0.994	0.003	0.999
PDCD1	8.589	8.589	0.000	0.999	0.000	0.999

Protein expression levels are presented as NPX values. Group comparisons were performed using Welch's t test. Log₂FC represents the difference in mean NPX values between the Severe and mild groups (Severe – Mild). Multiple testing correction was conducted using the Benjamini–Hochberg method, and FDRs are reported. FC, fold change; FDR, false discovery rate; NPX, normalized protein expression.

Supplementary Table II-2. Univariate analysis of routine clinical laboratory findings at pneumonitis onset according to severity (Wilcoxon rank-sum test).

variable	Mild (n)	Severe (n)	HL estimator (Severe – mild)	95% CI		<i>P</i> value
SpO ₂	16	10	-3.477E+00	-6.000E+00	-1.000E+00	0.005
LDH	17	10	6.700E+01	1.600E+01	1.220E+02	0.008
KL-6	15	9	4.620E+02	1.070E+02	9.610E+02	0.010
CRP	17	10	6.579E+00	1.440E+00	1.039E+01	0.029
SP-D	10	5	2.228E+02	3.300E+01	4.322E+02	0.043
anti CTLA-4 Ab	17	10	0.000E+00	-6.789E-05	0.000E+00	0.112
Cancer type (Lung/Other)	17	10	4.974E-05	-2.359E-05	1.000E+00	0.133
Lymphocyte	17	10	-1.600E+02	-6.000E+02	9.000E+01	0.209
NLR	17	10	2.027E+00	-2.776E+00	5.938E+00	0.303
BMI	17	10	-1.039E+00	-3.999E+00	1.335E+00	0.467
Age	17	10	3.000E+00	-5.000E+00	1.000E+01	0.481
Chemotherapy combination	17	10	6.734E-05	-2.802E-05	9.999E-01	0.543
PLT	17	10	-1.528E+01	-7.200E+01	6.000E+01	0.598
Sex	17	10	4.545E-05	-3.466E-05	3.366E-05	0.620
Smoking history	17	10	1.928E-05	-2.915E-05	4.379E-05	0.625
ALB	17	10	-1.000E-01	-5.000E-01	4.000E-01	0.632
ICI treatment days	17	10	1.006E+01	-8.600E+01	2.030E+02	0.744
Neutrophil	17	10	2.821E+02	-1.970E+03	2.270E+03	0.763
Body weight	17	10	-1.000E+00	-1.300E+01	9.000E+00	0.782

Values indicate the number of patients in each group (n). Group comparisons were performed using the Wilcoxon rank-sum test. The Hodges–Lehmann estimator represents the location shift between groups (Severe – Mild) with the corresponding 95% confidence interval. *P* values are unadjusted. ALB, albumin; BMI, body mass index; CRP, C-reactive protein; HL, Hodges–Lehmann estimator; ICI, immune checkpoint inhibitor; KL-6, Krebs von den Lungen-6; LDH, lactate dehydrogenase; NLR, neutrophil-to-lymphocyte ratio; PLT, platelet count; SP-D, surfactant protein D; SpO₂, peripheral oxygen saturation.

第III章 モデルマウスを用いた ICI-ILD の発症機序解明およびヒトへの外挿可能性の検討

第II章では、ICI-ILD 発症時血清を用いた網羅的プロテオミクス解析および臨床検査値解析により、MCP-3、IL-6、MUC-16 の上昇および TRAIL の低下といった、重症例を特徴づける末梢血免疫プロファイルを同定した。これらの因子は、重症 ICI-ILD の病態把握の一助になるものの、他の重症肺障害においても変動しうる非特異的なマーカーであり、ICI 特異的に誘導される免疫応答をとらえている可能性は不明である。さらに、経時的な臨床検体の確保が困難であったことから、肺病態を直接解析可能な ICI-ILD モデルマウスを用いた発症機序解明および機能解析が必要である。

irAE の多様な臨床像および病理学的所見から、ICI 関連組織障害の背景には複数の免疫応答が想定されており、その原因となる免疫反応は、細胞性免疫あるいは液性免疫など、irAE の種類によって異なると考えられている³⁸。多くの irAE の病態には自己臓器に対する抗体が関与している可能性が高く^{39,40}、特定の T 細胞サブセットがどのようなシグナルを介して抗体依存性自己免疫応答を誘導するのか、またそれらのシグナルがどこで提供されるのかを明らかにすることは、irAE 管理における新たな標的治療戦略の開発につながる。近年、B 細胞遊走因子である CXCL13 が irAE 発症の引き金となり、免疫細胞の異所性集積や三次リンパ様構造 (tertiary lymphoid structure: TLS) の形成を促進することで臓器特異性を規定する可能性が示されている^{24,41,42}。irAE 罹患臓器に形成される TLS は自己抗体産生に深く関与しており、CXCL9、CXCL10、CXCL13 などの TLS 関連ケモカインは ICI 誘発性 irAE の予測因子としての有用性も報告されている^{24,41,42}。これまでに、老齢マウスにおいて B 細胞除去が抗 PD-1 療法誘発性肺障害を軽減することを示してきたが⁴¹、irAE において B 細胞からの自己抗体産生に至る局所病態形成に寄与する T 細胞サブセットの詳細な機能については、依然として不明な点が多い。

第III章では、担癌老齢マウスモデルを用いて、加齢が抗 PD-(L)1 療法誘発性肺障害の病態形成に及ぼす影響と、それに関与する免疫応答を明らかにすることを目的とし、特に肺局所および末梢における T 細胞・B 細胞応答の解析を行い、さらにヒトへの外挿可能性の検討を行った。

III-1 方法

III-1-1 生物学的変数としての性差

雄マウスと雌マウスのいずれから本質的に同様のデータが得られる。しかし、老齢雄マウスでより顕著な表現型が認められたため、以降の実験では雄を用いた。ヒトコホート

では、研究デザインおよび解析の両方において性差を生物学的変数として考慮し、適切な場合には性差に基づく差異を評価した。

III-1-2 マウス

2 か月齢の若齢雄性野生型 (WT) C57BL/6J マウスおよび BALB/c マウスを、それぞれ Japan SLC, Inc. および CLEA Japan より購入した。TCR β 欠損 B6.129P2-Tcrb^{tm1Mom}/J マウスおよび IL-21 欠損マウスは、それぞれ The Jackson Laboratory および Lexicon より入手した。これらを C57BL/6J マウスとバッククロスし、京都大学動物実験施設において 16-24 か月間飼育して老齢マウスとして使用した。若齢または老齢の TCR β 欠損マウスは、Lympholyte-M (Cedarlane Laboratories) および EasySep Release Mouse Positive Selection Kit (STEMCELL Technologies) を用いて老齢マウスの肺から分離した CD4⁺ T 細胞 1×10^6 個を養子移入することにより再構成した。

III-1-3 腫瘍移植および抗体投与

MC38 (Kerafast) または CT26 (ATCC) 細胞を、それぞれ C57BL/6J または BALB/c マウスに皮下移植した (4×10^5 個)。腫瘍増殖は、腫瘍サイズ (長径 $\times$ 短径) が 400 mm^2 を超えるまで、4 日または 5 日ごとに互いに直交する最大 2 軸を測定してモニタリングし、腫瘍サイズは (長径 $\times$ 短径) の平方根である腫瘍指数として表した⁴³。抗 PD-1 抗体 (クローン 29F.1A12, BioXCell)、抗 PD-L1 抗体 (クローン 10F.9G2, BioXCell)、抗 ICOSL 抗体 (クローン UC10-4F10-11, BioXCell) および/または対照ラット IgG2a または IgG2b 抗体 (BioXCell) を、腫瘍移植後 4、8、12、16 日目に $200 \mu\text{g}$ ずつ腹腔内投与した。一部の実験では、抗体投与 1 日後に、recombinant mouse IL-21 (20 ng, R&D Systems) を麻酔下で経鼻投与した。CD4⁺T 細胞除去のため、抗 CD4 抗体 (クローン GK1.5, BioXCell) $200 \mu\text{g}$ を腫瘍移植 10 日前および 3 日後に投与した。B 細胞除去のため、抗 CD19 抗体 (クローン 1D3, BioXCell)、抗 CD22 抗体 (クローン Cy34.1, BioXCell)、抗 B220 抗体 (クローン RA3.3A1, BioXCell) 各 $150 \mu\text{g}$ の混合液を腫瘍移植 1 日前および 7 日後に腹腔内投与した。各投与の 2 日後に抗ラット Igk 抗体 (クローン MAR 18.5, BioXCell) を投与した⁴⁴。

III-1-4 サイトカインおよび血清学的臨床マーカーの測定

特記がない限り、血清または BALF は腫瘍移植 15 日後に採取した。BALF 採取のため、PBS $500 \mu\text{L}$ を肺内に注入し、30 秒間平衡化させた後に回収し、 $4^\circ\text{C} \cdot 800\text{g}$ で 5 分間遠心して細胞成分と液性成分を分離した。マウス SP-D、CXCL13、IL-21、またはヒト血漿 CXCL13

および IL-6 の濃度は ELISA (R&D Systems) により定量した。その他の血清学的臨床マーカーは JCA-BM6050 ハイ スループット 生化学分析装置 (Japan Electron Optics Laboratories) を用いて定量した。

III-1-5 フローサイトメトリー解析

血中循環免疫細胞と肺浸潤細胞を識別するため、組織回収 3 分前に APC-Cy7 標識抗 CD45 抗体 (クローン 30-F11、BioLegend; 3 µg/マウス) をマウスに静脈内投与した。組織を回収し、カミソリで細切した後、mRNA 発現解析に用いるか、あるいはコラゲナーゼ D (2.5 mg/mL, Roche) および DNase I (10 µg/mL, Sigma-Aldrich) で 30 分間酵素消化した。組織浸潤細胞または血中循環 PBMC は、以下のタンパク質に対する抗体で染色した: mouse CD4 (クローン GK1.5)、CD8 (クローン 53-6.7)、B220 (クローン RA3-6B2)、CD19 (クローン 6D5)、CXCR5 (クローン L138D7)、ICOS (クローン 7E.17G9)、PD-1 (クローン 29F.1A12)、GL7 (クローン GL7)、CD95 (クローン SA367H8)、CD153 (クローン RM153)、IgD (クローン 11-26c2a)、IgG (クローン poly4053)(以上すべて BioLegend)、またはマウス試料については抗 TCRβ 抗体 (クローン H57-597、Cytex)。患者試料の解析では、human CD3 (クローン UCHT1)、CD4 (クローン RPA-T4)、CD8 (クローン RPA-T8)、ICOS (クローン C398.4A)、CXCR5 (クローン J252D4)、CCR5 (クローン J418F1)、CX3CR1 (クローン 2A9-1)(以上すべて BioLegend) に対する抗体を用いた。細胞内サイトカイン染色のため、細胞を brefeldin A 存在下で PMA/イオノマイシン (いずれも Sigma-Aldrich) により刺激し、その後、抗 IL-17A 抗体 (クローン TC11-18H10.1、BioLegend) または IL-21R-Fc キメラタンパク質 (R&D Systems)、あるいは抗 Bcl-6 抗体 (クローン IG191E/A8、BioLegend)、抗 Foxp3 抗体 (クローン MF23、BD Bioscience) で、BD Cytofix/Cytoperm Buffer または Transcription Factor Buffer (BD Biosciences) を用いて染色した⁴³。多色免疫蛍光画像は Fortessa (BD Biosciences) を用いて取得し、データは FlowJo (Tree Star) で解析した。

III-1-6 RNA 抽出、リアルタイム定量PCR、および単一細胞RNA シーケンス (scRNA-seq)

全 RNA は TRI-Reagent (Molecular Research Center) を用いて抽出し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) により精製した。cDNA は ReverTra Ace (TOYOBO) を用いて逆転写により合成した。リアルタイム定量 PCR は One-Step Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用い、mouse *Ifng* (Mm.PT.58.41769240)、*Il4* (Mm.PT.58.7882098)、*Il21* (Mm.PT.58.7853071)、*Cxcl13* (Mm.PT.58.31389616)、*Cxcr5* (Mm.PT.58.45859964)、*Pdcd1* (Mm.PT.58.29141957)、*Rora* (Mm.PT.58.32675621)、*Maf* (Mm.PT.58.42145949.g)、*Bcl6* (Mm.PT.58.32669842)、*Actb*

(Mm.PT.39a.22214843.g)(いずれも IDT) の特異的プローブを用いて実施した。代替として、SYBR qPCR Mix (TOYOBO) および Supplementary Table 6 に記載のプライマーを用いた。各遺伝子の発現量は、比較 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法により *Gapdh* または *Actb* の発現量で正規化した。

scRNA-seq は、PBS 灌流後の若齢および老齢マウスの肺組織から、Lympholyte-M による密度勾配遠心分離、EasySep Release Mouse Biotin Positive Selection Kit (STEMCELL Technologies)、および Dead Cell Remover (Miltenyi Biotec) を用いて遺伝子発現変動の大きい CD45⁺ 免疫細胞を濃縮した後に実施した。単一細胞 3'RNA-seq ライブラリは Chromium Controller および Chromium Single Cell v3 Reagent Kit (10× Genomics) を用いて作製した。ライブラリは Agilent 2100 を用いて品質評価を行い、NovaSeq 6000 (Illumina) によりシーケンスした。初期データ処理 (デマルチプレックス、ゲノムアラインメント、バーコードカウント、UMI カウント) は Cell Ranger v7 (10× Genomics) を用いて行い、リードはマウスゲノム mm10 にマッピングした。下流解析 (品質管理、正規化、次元削減、クラスタリング、raw count matrix の可視化) は Seurat パッケージ (v.4.3.0, <https://satijalab.org/seurat/>) を用いて実施した。最終的に、若齢マウス由来 8,666 細胞、老齢マウス由来 6,034 細胞を解析対象とした。特徴次元数を減らすために主成分分析を行い、分解能 0.5 で最初の 20 主成分を用いてクラスター同定を行った。次元削減は uniform manifold approximation and projection (UMAP) により実施した。CD4⁺ T 細胞系譜のクラスターを抽出し、次元削減および再クラスタリングを行って差次的クラスターを同定した。肺全組織から抽出した RNA を用いた RNA-seq 解析は既報のとおり実施されており⁴¹、選択した遺伝子の相対発現を示すヒートマップは、サンプル間の各中央値 TPM 値を z スコア正規化して算出した (NCBI GEO GSE184000)。

III-1-7 肺機能評価

マウスにペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg; Somnopentyl, Kyoritsu) およびキシラジン (2.0 mg/kg; Seractal, Bayer) を腹腔内投与して麻酔し、気管切開後、コンピュータ制御小動物用人工呼吸器 (flexiVent, SCIREQ) に接続した。肺機能パラメータは、100%吸入酸素下で、換気数 150 回/分、1 回換気量 10 mL/kg、呼気終末陽圧 3 cmH₂O に設定した機械換気条件で測定した。各パラメータについて、決定係数 0.95 を測定受理の下限とした。肺胞の線形切片長を評価するため、H&E 染色肺組織について葉あたりランダムに 8 視野を選択し、気道および血管構造を除いた画像上にランダムにテストラインを引いた⁴⁵。テストラインに沿って肺胞切片長を測定し、その平均値を算出した。

III-1-8 組織学的評価および免疫組織化学染色 (IHC)

マウス組織は4% (w/v) パラホルムアルデヒドで固定し、通常どおりパラフィン包埋、切片作製を行い、H&E 染色または既報の方法に従って IHC を実施した⁴¹。概略として、切片を脱パラフィン後、0.3% H₂O₂ で処理した。クエン酸緩衝液 (pH 6) を用いた抗原賦活化を、圧力鍋 (DAKO) または電子レンジで行った後、ヤギ抗 mouse IgG 抗体 (1:1000 希釈; BioLegend, カタログ 405301) または抗 mouse CD138 抗体 (1:500 希釈; BD Pharmingen, カタログ 553712) で染色し、続いて HRP 結合抗ヤギ Ig 抗体を反応させ、DAB 溶液 (Nichirei) で可視化した。IHC 画像における関心領域内の染色強度の積分値および染色細胞の割合、または TLS 凝集体の割合を、BZ-X800 All-in-One 蛍光顕微鏡 (Keyence) と Multi-stack Module および Hybrid Cell Count Software を用いて半定量的に解析した。

III-1-9 *in situ* RNA ハイブリダイゼーション

スライド上の組織切片を RNAscope プローブ (RNA) ハイブリダイゼーション用に調製し、一般的手法で脱パラフィンした後、室温で H₂O₂ に 10 分間静置し、続いて 1× Target Retrieval 試薬 (Advanced Cell Diagnostics) を用いて 98°C で 15 分間処理した。Target Retrieval 終了後、切片を 67°C で 30 分間加温処理した。次いで、RNAscope Protease Plus (Advanced Cell Diagnostics) を 40°C で 30 分間反応させた。組織中の標的 mRNA は、*Icos* (Advanced Cell Diagnostics, 552451)、*Cd4* (Advanced Cell Diagnostics, 406841-C2)、*Cd19* (Advanced Cell Diagnostics, 314711-C3) に対する RNAscope buffered Z プローブを用い、40°C で 2 時間静置しハイブリダイゼーションを行った。シグナルは RNAscope Multiplex Fluorescent Detection Reagents v2 (Advanced Cell Diagnostics) により増幅した。

III-1-10 *in vitro* T 細胞刺激

マウスの血中循環細胞は、ビオチン結合抗 CD45 抗体の静脈内投与により標識し、肺を回収して DNase I およびコラゲナーゼ D で酵素消化した。Lympholyte-M による密度勾配分離でリンパ球を濃縮した後、抗 CD45 抗体で染色された血中循環細胞を、抗ビオチン抗体コート磁気ビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて除去した。肺浸潤 CD4⁺ T 細胞は、さらに CD4 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて分離し、抗 CD3/抗 CD28 抗体コートビーズ (Thermo Fisher Scientific) により、プレートコートした抗 ICOS 作動性抗体 (5 µg/mL; クローン 398.4A, BioXCell) または抗 CD153 作動性抗体 (5 µg/mL; クローン RM153, eBioscience) の有無下で 30 時間刺激し、RNA 抽出を行った。

III-1-11 患者およびヒト実験の承認

京都大学医学部附属病院において、化学療法または抗 CTLA-4 抗体との併用の有無にかかわらず抗 PD-(L)1 抗体で治療され、かつ治療前/治療中 (初回投与 4 週後) の検体が利用可能な進行・転移性 NSCLC 患者を同定し、20 歳以上の患者を研究に組み入れた (NSCLC; n = 44-49)。本コホートは偏りのない包括的な患者登録に基づいており、関節リウマチ患者 2 例および乾癬患者 1 例を含み、いずれもステロイド治療を受けていた。その他の患者には自己免疫疾患の既往はなく、治療歴も利用可能であった。Ficoll 分離した PBMC および血漿は解析まで凍結保存した。検体は 2020 年 9 月から 2022 年 10 月に収集した。患者情報は Supplementary Table III-1 に示す。

無増悪生存期間 (Progression-Free Survival: PFS) および全生存期間 (Overall Survival: OS) は、それぞれ ICI 治療開始から、担当呼吸器内科医の臨床判断に基づく画像所見および/または臨床観察によって病勢進行が判定されるまで、または臨床記録により確認されたあらゆる原因による死亡までの期間として定義した。連続血液検体が利用可能な患者において、PFS および OS は 2023 年 12 月まで評価した。治療反応は RECIST 1.1 基準に従って判定した。CTCAE v5.0 を用い、irAE の発症および標準的検査値・臨床診察に基づく毒性は、初回抗 PD-1 治療から最終投与後 12 か月または 2023 年 12 月のいずれか早い時点まで追跡した。抗 PD-(L)1 療法を受けた患者である限り、併用療法に関連する有害事象も irAE として含めた。

III-1-12 統計解析

2 群比較には Wilcoxon の符号付順位検定または Mann-Whitney の U 検定を用いた。多群比較には 1 要因分散分析 (ANOVA) を用い、Tukey-Kramer 法による事後検定を行った。一部の試験では Kruskal-Wallis 検定により差を判定した。PFS、OS、ならびに irAE の累積発生率は Kaplan-Meier 法および log-rank 検定により推定した。これらのアウトカムに対する共変量の影響を評価するため、単変量および多変量 Cox 比例ハザード解析も実施した。ヒト試料では、変数 (CD4⁺ T 細胞サブセット頻度の変化、CXCL13、IL-6) の正規性を Shapiro-Wilk 検定で評価した。患者年齢、喫煙歴、パフォーマンスステータス、PD-L1 発現などを含む免疫学的・臨床的パラメータ間の相関評価には、Spearman の偏相関検定を用いた。irAE 発症予測因子としての免疫学的因子の有用性評価には、単変量および多変量 ROC 解析を用いた。単変量解析で 95% AUC が 50%を超える因子を多変量解析に含め、多変量解析では第三の変数の影響に基づいて 2 変数間の相関を検証した。2 因子間の Bray-Curtis 距離の差は Adonis 検定により評価した。統計解析は Prism 7 (GraphPad Software, Inc., La. Jolla,

CA, U.S.A)、JMP Pro v16.1.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC, U.S.A)、R v.4.3.3 (The R Foundation for Statistical Computing) を用いて実施した。有意差は $P < 0.05$ とした。

III-1-13 研究承認

すべての動物実験は京都大学動物実験委員会の承認 (MedKyo 22069、23055、24084) を得て実施し、承認されたガイドラインに従って行った。また、本研究はヘルシンキ宣言およびその改訂に準拠して実施され、京都大学医学研究科・医学部及び医学部附属病院の医の倫理委員会にて承認を得て実施した (承認番号: G1012)。対象患者全員から文書によるインフォームド・コンセントを取得した。

III-1-14 データの利用可能性

本研究で記載した scRNA-seq および全 RNA-seq データは NCBI (GEO) に登録されている (それぞれ GSE267557 および GSE184000)。本研究で生成または解析されたすべてのデータは本論文に含まれている。すべてのグラフの数値は補足の Supporting Data Values ファイルに提供されている。

III-2 結果

III-2-1 担癌老齢マウスにおける抗 PD-1 療法誘導性 CD4⁺ T 細胞依存的肺障害

抗 PD-(L)1 療法により、担癌老齢マウスでは、肺を含む複数の臓器に傷害が惹起される。一方、若齢マウスではこれらの傷害は認められない⁴¹。そこで本研究では、老齢マウスにおける抗 PD-(L)1 療法誘発性肺病態に対する T 細胞および B 細胞の関与を明らかにすることを目的とした。若齢マウスの場合とは対照的に、担癌老齢マウスの BALF では、B220⁺ B 細胞ならびに CD8⁺ および CD4⁺ T 細胞の著明な増加が検出され、特に抗 PD-L1 療法を施行した場合に顕著であった (Fig. III-1, A および B)。老齢マウスの BAL CD4⁺ T 細胞では、抗 PD-L1 療法により PD-1 発現の上昇が誘導されたが、T_{fh} マーカーである CXCR5 の上昇は認められなかった (Fig. III-1A)。老齢マウスにおいて CD4⁺ T 細胞を除去すると、抗 PD-L1 抗体を投与した場合であっても B 細胞の集積は阻害された (Fig. III-1B)。

これと一致して、CD4⁺ T 細胞の除去は、老齢マウスにおける抗 PD-L1 抗体誘発性の肺異常を改善した。すなわち、肺障害を反映する指標である、傷害肺から循環血中への SP-D の漏出増加 (Fig. III-1C) および、抗 PD-1 療法を受けたマウスの肺組織における異常な IgG 沈着 (Fig. III-1D) が改善した。さらに、T 細胞を含む免疫細胞が老齢マウス肺内に異所性に集簇していることが確認された (Supplementary Fig. III-1A)。このような集簇は、TLS の特徴を

有することが示されている⁴¹。

B細胞の本肺病態への関与は、TLS形成の不全 (Supplementary Fig. III-1A)⁴¹ および、B細胞除去時に肺内 CD4⁺ T細胞の集積が低下したこと (Supplementary Fig. III-1B) により確認された。一方で、B細胞除去は PD-1 遮断の抗腫瘍効果には影響を及ぼさなかった (Supplementary Fig. III-1C)。これらの結果は、B細胞と CD4⁺ T細胞の相互作用および相互活性化が、異常な IgG 沈着を介して抗 PD-(L)1 療法誘発性肺病態を引き起こすことを示唆している。免疫細胞の異所性集積および SP-D 漏出は、未治療の老齢マウスにおいても一定程度認められ、腫瘍非担持の老齢マウスにおいても抗 PD-1 療法により増悪した (Supplementary Fig. III-2A)。抗 PD-1 療法は、老齢マウスにおいて慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) 関連遺伝子およびいくつかの炎症性シグネチャーの発現を高めた (Supplementary Fig. III-2B)。これらの所見は、老齢マウスが肺障害および炎症を惹起しやすい基盤病変を本来的に有しており、抗 PD-(L)1 療法によりそれが増悪することを示唆している。

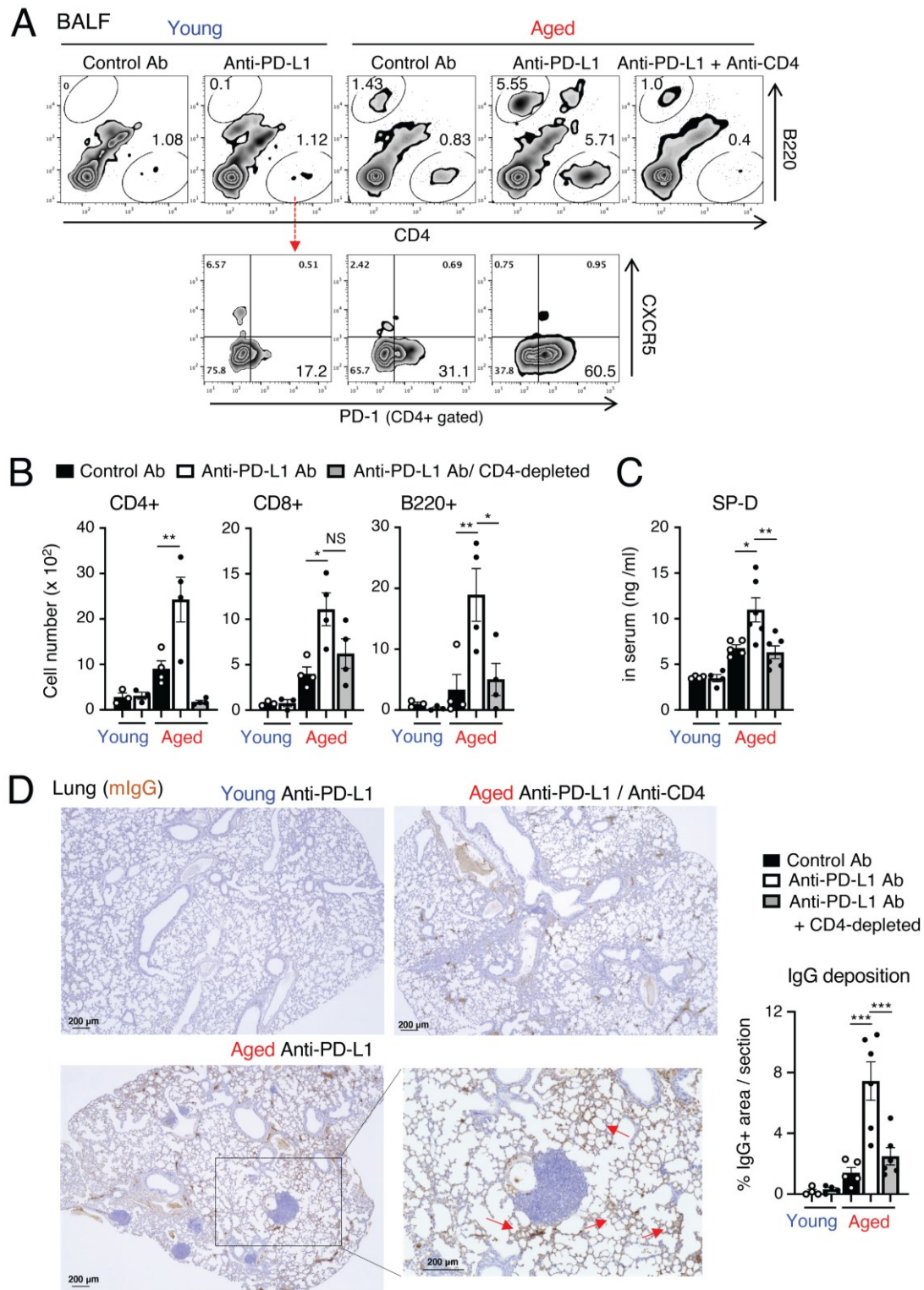


Fig. III-1. CD4⁺ T cells are necessary for the development of anti-PD-L1 therapy-induced lung damage.

MC38-bearing young or aged mice were treated with anti-PD-L1 Ab 3 times. CD4⁺ T cells were depleted from aged mice by administering anti-CD4 Ab. **(A and B)** Numbers of B and T cells in

BALF and their PD-1 or CXCR5 expression were analyzed. Representative plots (A) and absolute number of indicated populations (B) are shown. NS, not significant. (C) SP-D levels in the serum from indicated mice were measured. (D) Representative lung sections stained with anti-mouse IgG Ab (mIgG) are shown. Scale bars: 200 μ m. The right panel of D indicates the percentage IgG⁺ area in lung sections. Data are representative of 3 independent experiments with similar results and presented as mean $\pm$ SEM (n = 3–6). * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 by 1-way ANOVA followed by Tukey-Kramer post hoc test.

III-2-2 CD4⁺ T 細胞を介した肺病態関与する胚中心 (GC) B 細胞分化の促進

我々は、老齢マウスにおける irAE 様症状が、CD4⁺ T 細胞による B 細胞の抗体産生促進を介して誘導されるという仮説を立てた。この仮説を検証するため、 $\alpha\beta$ T 細胞に通常発現する T 細胞受容体 β 鎖 (TCR β) を欠損し、 $\alpha\beta$ T 細胞が減少した老齢マウスを作製し、肺回収前に *in vivo* で抗 CD45 抗体を静脈内投与 (CD45 iv) して血中循環細胞を標識することにより、血中循環細胞と識別した肺浸潤リンパ球を評価した (Supplementary Fig. III-2C)。老齢野生型 (WT) マウスの場合 (Fig. III-1) とは対照的に、老齢 TCR β 欠損マウスでは、抗 PD-1 療法の有無にかかわらず、CD45 iv B 細胞の異所性浸潤は完全に消失していた (Fig. III-2, A および B)。

さらに、肺病態における CD4⁺ T 細胞の役割を検証するため、老齢マウス肺に浸潤した CD4⁺ T 細胞を若齢または老齢の TCR β 欠損マウスに移入し、肺病理を評価した。予想に反して、若齢 TCR β 欠損マウスを宿主として用いた場合、抗 PD-1 療法を行っても、B 細胞および供与由来の老齢 CD4⁺ T 細胞は肺内に効率よく浸潤または増殖しなかった (Fig. III-2, A および B)。一方、老齢 TCR β 欠損マウスでは、抗 PD-1 療法により、肺内に B 細胞および供与由来 CD4⁺ T 細胞が著明に集積した。特筆すべきことに、これら B 細胞の一部は、老齢環境においてのみ、GL7⁺ CD95⁺ の胚中心 (GC) B 細胞へと異所性に分化していた (Fig. III-2, A および B)。

抗 PD-1 療法を施行した WT 老齢マウスでは、肺における免疫細胞の異所性浸潤が、組織学的に局所リンパ球集簇として検出され、これらは TLS 様構造を呈していた (Fig. III-2C)。WT 老齢マウスと同様に、老齢 TCR β 欠損マウスにおいても、老齢肺由来 CD4⁺ T 細胞で再構成し、かつ抗 PD-1 療法を行った場合にのみ、肺に TLS 様リンパ球集簇が認められた。一方、若齢 TCR β 欠損マウスでは、老齢 CD4⁺ T 細胞を移入した場合であっても、このような TLS 様リンパ球集簇は認められず、老齢肺環境因子が異所性免疫応答を駆動する要因としても機能していることが示唆された。

さらに、抗マウス IgG 抗体を用いた肺組織の免疫組織化学染色により、老齡環境下において病原性を有する老齡 CD4⁺ T 細胞で再構成し抗 PD-1 療法を行うと、宿主肺組織において明らかな IgG 沈着が誘導され、TLS 周囲に CD138⁺ 形質細胞が同時に認められることが示された (Fig. III-2, D および E)。これらの免疫応答に伴い、抗 PD-1 療法は、CD4⁺ T 細胞で補完した老齡 TCR β 欠損マウスにおいて、若齡宿主あるいは非移入の老齡 TCR β 欠損宿主と比較して、血中 SP-D 濃度を有意に上昇させた (Fig. III-2F)。また、老齡マウスにおける定常状態での血清 SP-D 濃度は、T 細胞欠損により低下していた。

以上の結果から、PD-1-PD-L1 相互作用は、老齡肺組織に対する病原性 T 細胞依存性抗体応答の免疫寛容を維持していることが示唆された。さらに重要な点として、老齡環境下において肺局所に集積した CD4⁺ T 細胞が、抗 PD-1 療法誘発性肺病態において、B 細胞が抗体産生細胞へ分化する過程の重要な決定因子として機能していることが示された。

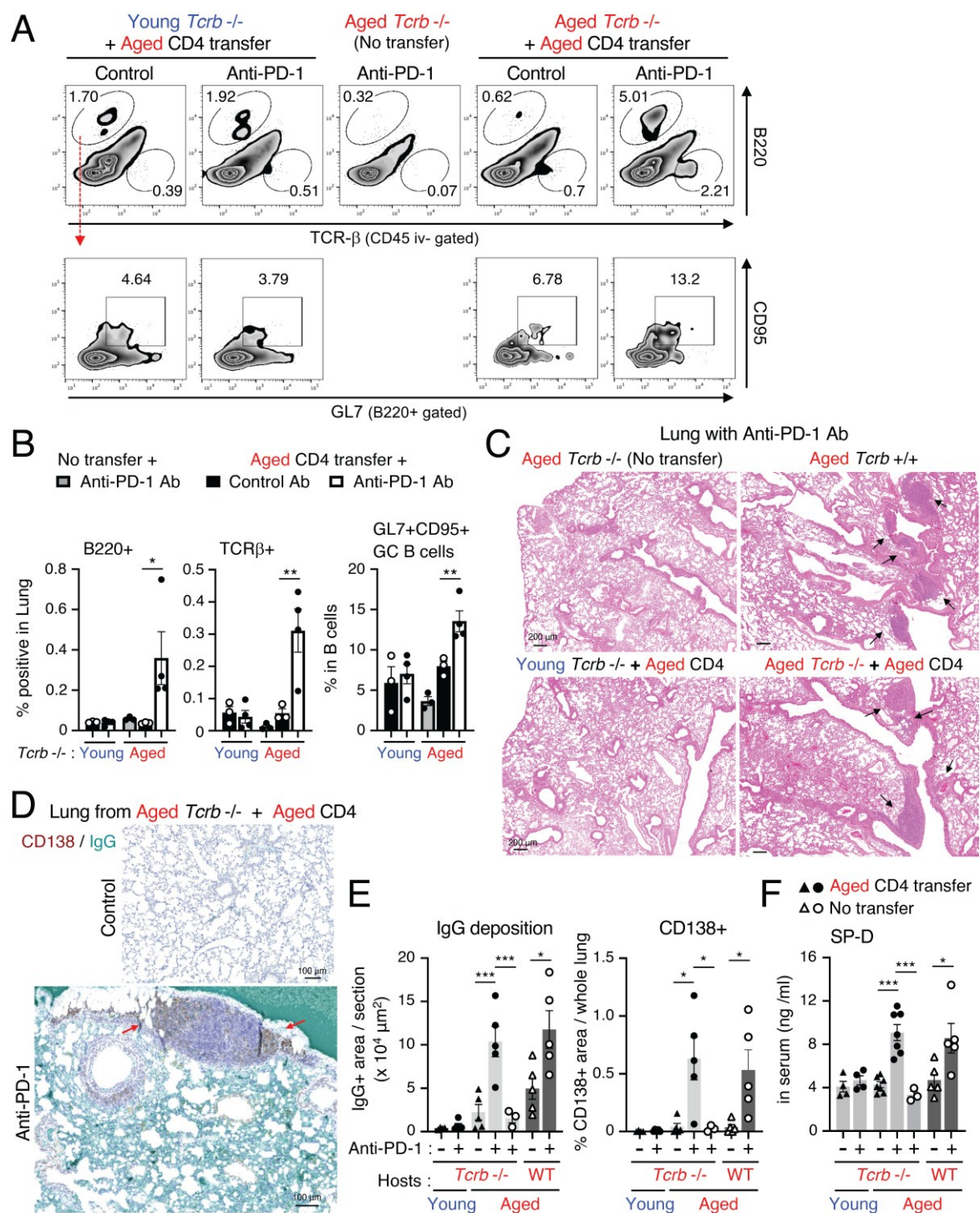


Fig. III-2. Reconstitution of pathogenic CD4 T cells induces lung damage in T-cell-deficient aged mice, but not in young mice.

CD4 T cells isolated from the lungs of anti-PD-1 therapy-treated aged mice were transferred into TCR-deficient young or aged mice, which then were treated with anti-PD1 Ab. **(A, B)** To discriminate the lung-infiltrating cells from blood-circulating cells, anti-CD45 Ab were injected intravenously before harvesting the lung cells. Lung-infiltrating CD45 iv⁺ staining negative populations

(iv-) cells were analyzed for infiltration of donor TCR-b⁺ cells and B cells, and their CD95⁺ GL7⁺ GC subset. Representative dot plots (A) and frequencies of the indicated populations (B) are shown. (C-E) Representative H&E-stained sections of lung (C) and IgG deposition (D) are shown. Scale bars indicate 200 μ m and 100 μ m, respectively. The left and right panel E indicate the % of IgG⁺ and CD138⁺ area in lung sections, respectively (F) SP-D levels in the serum from indicated mice were measured. Data are representative of more than two experiments and presented as mean $\pm$ SEM (n = 3–7). One-way ANOVA followed by Tukey post-hoc tests were used; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

III-2-3 ICOS 発現エフェクターCD4⁺ T 細胞の抗 PD-1 抗体投与老齢マウス障害肺への集積

抗 PD-(L)1 療法によって老齢マウスに誘導される肺病態に関与する CD4⁺T 細胞サブセットを明らかにするため、抗 PD-L1 療法を施行した若齢または老齢マウスの肺組織から CD45⁺ 免疫細胞を回収し、scRNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行った。肺内のリンパ球集団の多くは循環血由来であると推定されるため、若齢群と老齢群の間で免疫細胞構成に大きな差は認められなかった (Fig. III-3A)。

しかしながら、CD4⁺T 細胞集団をサブクラスターリングし、各サブ集団の遺伝子発現プロファイルを解析したところ、T peripheral helper (Tph)/Th17 様細胞から構成される *Pdcd1⁺Icos⁺Cd69⁺Cxcr5⁺Rora⁺* エフェクターCD4⁺ T 細胞クラスターが、抗 PD-L1 療法を受けた若齢マウスと比較して、老齢マウスの肺において有意に多く存在していた (Fig. III-3, A および B)。このクラスターにおける *Icos* 発現レベルは、*Foxp3⁺Lag3⁺* 制御性 T 細胞 (Treg) を含む他のクラスターと比較して、老齢肺において高値を示していた (Fig. III-3C)。

さらに、抗 PD-L1 療法を施行した老齢肺における *Icos* 発現の空間分布を *in situ* RNA ハイブリダイゼーションにより解析した結果、*Icos* を発現する CD4⁺T 細胞が、TLS 様リンパ球集簇内で *Cd19⁺* B 細胞と密接に相互作用していることが示された (Fig. III-3D および Supplementary Fig. III-3)。一方で、これらの *Icos⁺* T 細胞が制御性 T 細胞である可能性については否定できなかった。

scRNA-seq により解析した肺 CD45⁺ 細胞には循環血由来細胞の混入が疑われたため、肺浸潤 T 細胞における ICOS の細胞表面発現をフローサイトメトリーにより検証した (Fig. III-3E)。静脈内投与した抗 CD45 抗体で標識された血中循環細胞と識別可能な肺浸潤 T 細胞および B 細胞は、老齢マウスにおいて抗 PD-L1 抗体投与により増加していた。特筆すべきことに、*Foxp3⁺* 制御性 T 細胞 (Treg) は、エフェクターCD4⁺T 細胞と比較して肺への浸

潤効率が低かった (Supplementary Fig. III-4A)。一方で、腫瘍浸潤 Treg 細胞は、宿主年齢や抗 PD-L1 療法の有無にかかわらず、高レベルの ICOS 発現を示していた (Supplementary Fig. III-4B)。

トランスクリプトーム解析の結果と一致して、老齢マウスの肺浸潤 CD4⁺ T 細胞では、ICOS および PD-1 の両者の発現が有意に上昇していた (Fig. III-3, E および F)。肺浸潤 ICOS⁺CD4⁺ T 細胞の大部分は、B 細胞リンパ腫 6 (Bcl-6) を発現していた (Supplementary Fig. III-4C)。一方で、肺浸潤 CD8⁺ T 細胞 (Fig. III-3E) や、障害肺における IL-17 産生 CD4⁺ T 細胞では、ICOS 発現は認められなかった (Supplementary Fig. III-4D)。これらの所見は、抗 PD-1 療法に応答して、老齢マウスの障害肺において特異な ICOS⁺CD4⁺ エフェクター T 細胞集団が顕著に集積することを示唆しており、このことから我々は、肺病態形成における ICOS の寄与について検討を進めた。

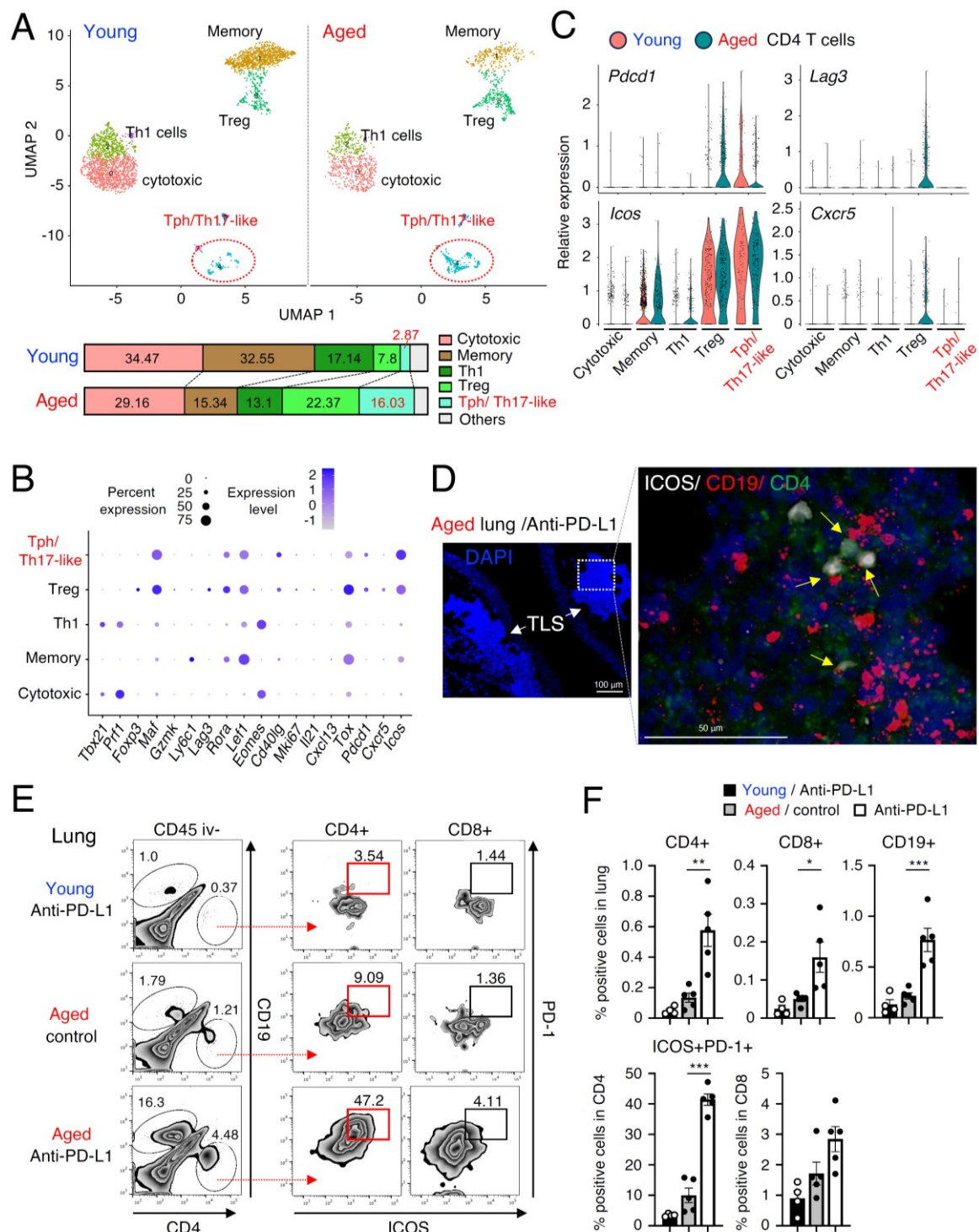


Fig. III-3. ICOS-expressing effector CD4 T cells excessively accumulate in lung tissues of aged mice.

MC38-bearing young or aged mice were treated with anti-PD-L1 Ab. (A-C) Lung-infiltrating CD4⁺ cells were isolated from MC38-bearing young or aged mice that were treated with anti-PD-L1 Ab, and then were analyzed by scRNA-seq. Cluster analysis was performed and plotted by UMAP dimensionality reduction. Sub-clustering was performed on the data from the Cd4⁺ T cell populations

in young and aged mice, and lower bar plots in (A) indicated their frequencies. Dot plots shown in (B) represent the expression of canonical marker genes across the indicated $Cd4^+$ sub-clusters. Relative expression of indicated genes across sub-clustered populations from young and aged mice are shown in (C). (D) Representative images of DAPI staining (left) and in-situ RNA hybridization (right; white: ICOS, red: CD19, green: CD4) in lung from aged mice are shown. Scale bars indicate 100 and 50 μ m, respectively. (E) Representative dot plots of CD45^{iv} cell populations among the lungs are shown. (F) Frequencies of indicated lung-infiltrating CD45^{iv} cell populations were assessed in mice treated with indicated Abs. Data are represented as mean $\pm$ SEM. One-way ANOVA followed by Tukey posthoc tests were used; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

III-2-4 ICOS-ICOSL 相互作用の抗 PD-1 療法誘発性肺傷害への寄与

次に、抗 PD-1 療法誘発性肺病態における ICOS-ICOSL 相互作用の役割を評価した。ICOS-ICOSL 相互作用を遮断する目的で、抗 PD-1 抗体と抗 ICOSL 抗体を同時投与したところ、肺浸潤 $CD4^+$ T 細胞の頻度が低下し、特に B 細胞においてその低下が顕著であった。一方、抗 ICOSL 抗体単独投与では、これらの頻度に変化は認められなかった (Fig. 4, A および B)。さらに、肺浸潤 B 細胞の GC B 細胞への分化も、抗 ICOSL 抗体の併用投与により抑制された。抗 ICOSL 抗体と抗 PD-L1 抗体の併用により、老齢マウス由来 $CD4^+$ T 細胞における PD-1 発現が低下したことは、ICOS 依存的な $CD4^+$ T 細胞活性化を示唆する所見であった (Fig. III-4, A および B)。

これらの結果は、ICOS 刺激が ICOSL との結合を介して $ICOS^+ CD4^+$ T 細胞に生存促進シグナルを与え、さらに肺内における B 細胞に対する T 細胞のヘルパー機能を誘導するうえで必須である可能性を示している。これと一致して、抗 PD-(L)1 療法を受けた老齢マウス肺において認められた TLS 形成および TLS 外に存在する $CD138^+$ 形質細胞の集積は、ICOS-ICOSL 相互作用の同時遮断により著明に抑制された (Fig. III-4, C および D、Supplementary Fig. III-5A)。さらに、ICOSL 遮断による免疫学的変化は、障害肺から血中への SP-D 漏出の低下 (Fig. III-4E) および、呼吸機能検査において肺コンプライアンスの改善として示される肺機能障害の改善 (Fig. III-4F) を伴っていた。病理学的にも、老齢マウスでは、ICOSL 遮断により抗 PD-1 療法によって増大した肺胞径が回復しており (Supplementary Fig. III-5B)、これは肺機能低下と関連する所見であることが知られている⁴⁵。これらの結果から、ICOS を介した $CD4^+$ T 細胞活性化が、ICI-ILD の発症リスク因子となる肺気腫などの肺機能障害を増悪させることが示唆された⁴⁶。

老齢 B6 マウスにおいて、GC B 細胞分化を含む B 細胞応答に対する ICOS 媒介性のヘル

パー活性と、それに続く肺病原性の増悪は、抗 PD-1 療法を施行した大腸癌担持老齢 BALB/c マウスにおいても同様の所見が得られたことから系統依存的ではないことが示された (Supplementary Fig. III-6, A および B)。ICOS-ICOSL 相互作用は、障害肺において CD4⁺ T 細胞活性化を促進し、続く B 細胞の抗体産生細胞への分化を促すことで、irAE の自己免疫応答の増悪に寄与した (Supplementary Fig. III-6C)。一方、肺病態に対する影響とは対照的に、抗 ICOSL 抗体の併用は、若齢・老齢いずれのマウスにおいても PD-(L)1 遮断により誘導される抗腫瘍効果を修飾せず (Supplementary Fig. III-6D および Supplementary Fig. III-7A)、また IFN- γ 産生 CD4⁺ および CD8⁺ T 細胞の頻度にも変化を与えなかった (Supplementary Fig. III-7B)。以上より、CD4⁺ T 細胞における ICOS と ICOSL の相互作用を遮断することは、遺伝的背景、PD-1-PD-L1 相互作用を阻害する抗体の種類、ならびに抗腫瘍効果に依存することなく、抗 PD-(L)1 療法誘発性肺病態を軽減し得ることが示唆された。

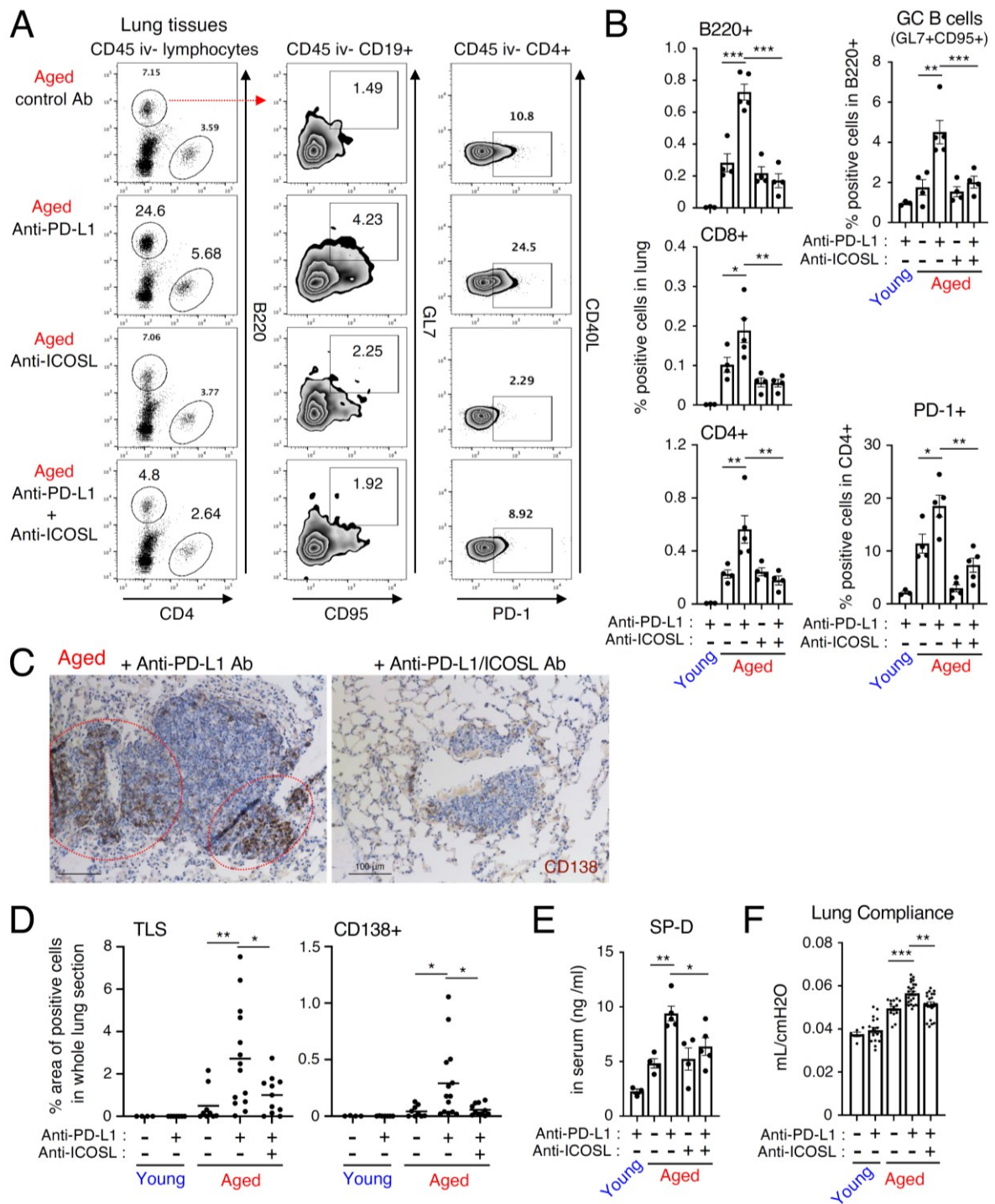


Fig. III-4. Abrogation of ICOS-ICOSL interaction with anti-ICOSL Ab attenuates the development of lung injury caused by anti-PD-(L)1 Ab in aged mice.

Tumor-bearing young or aged mice were administered with anti-PD-L1 Ab. Anti-ICOSL Ab was injected to block the ICOS-ICOSL interaction. **(A and B)** Representative dot plots of CD45 iv lung-infiltrating cell populations from MC38-bearing mice **(A)** and their frequencies **(B)** are shown. **(C and D)** Representative images of CD138 IHC in the lung of tumor-bearing aged mice **(C)**, and the

percentage area of TLS (left) and CD138⁺ plasma cells (right) in each lung section (**D**) are shown. Scale bars: 100 μ m. (**E**) The levels of SP-D in the serum are shown. (**F**) Lung dysfunction in tumor-bearing mice was assessed by mechanical ventilation system. Data are representative of 3 independent experiments with similar results and presented as mean $\pm$ SEM (n = 4–8). * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer post hoc test.

III-2-5 ICOS 依存的 IL-21 誘導の抗 PD-1 療法誘発性肺障害における必須性

機序をさらに評価するため、抗 PD-1 療法を施行した老齢マウスの肺浸潤 CD4⁺ T 細胞において、*ex vivo* での ICOS 刺激の有無下で複数因子の発現を検討した (Fig. III-5A)。この解析により、ICOS 刺激が老齢肺浸潤 CD4⁺ T 細胞において *Il21* および *Pdcd1* (PD-1) の発現を有意に上昇させる内在的能力を有することが確認された。ICOS 刺激はまた、IL-21 にとって重要な転写因子である *Bcl-6*⁴⁷ の発現を上昇させたが、他のサブセット関連転写因子は上昇しなかった。*Ifng* の発現も *ex vivo* で誘導されたものの (Fig. III-5A)、その欠損は抗 PD-1 療法誘発性肺病態に影響しないことが示されており⁴¹、肺病態における IFN- γ の重要性は相対的に低いことが示唆された。

ICOS 刺激とは対照的に、老齢マウスで抗体応答を助けると報告されている CD153 に対する作動性抗体による刺激⁴⁸は、老齢肺浸潤 CD4⁺ T 細胞において CD153 が十分に発現しているにもかかわらず (Supplementary Fig. III-8, A および B)、これら遺伝子を効率よく誘導しなかった (Fig. III-5A)。以上より、抗 PD-(L)1 療法により増悪する irAE において、老齢 CD4⁺ T 細胞での IL-21、*Bcl-6*、PD-1 誘導に対して ICOS シグナルが直接的かつ重要な制御的役割を担うことが示唆された。

実際に、抗 PD-1 療法は担癌老齢マウスの BALF 中 IL-21 濃度を増加させ、これは ICOSL 遮断により抑制された (Fig. III-5B)。また、抗 PD-1 抗体投与老齢マウスの肺浸潤 ICOS⁺CD4⁺ T 細胞は IL-21 を産生し得る能力を有していた (Supplementary Fig. III-8C)。一方で、ICOSL 遮断は BALF 中 CXCL13 高値には影響しなかった (Fig. III-5B)。これらのデータは *in vitro* 結果と整合し、ICOS が T 細胞と B 細胞の相互活性化、ならびに GC 細胞の形成・維持を促進する役割を想起させるものであった。

抗 PD-(L)1 療法誘発性の irAE 様肺病態における ICOS⁺ CD4⁺ T 細胞の機序的作用をさらに明確化するため、PD-1 シグナルと ICOS シグナルを同時遮断した条件下で、WT または IL-21 欠損の老齢マウスに対し IL-21 の経鼻投与を行った。Fig. III-5, C および D に示すように、WT 老齢マウスでは、抗 PD-1 療法誘発性の B 細胞集積および GC B 細胞分化に対する ICOSL 遮断の抑制効果が、recombinant IL-21 補充により有意に逆転した。これは IL-21 欠損

老齡マウスにおいても同様であった。ICOSL 遮断は、抗 PD-1 療法を受けた老齡 WT マウスにおける IgG 発現 GC B 細胞の誘導を抑制したが、IL-21 の経鼻投与は、抗 ICOSL 抗体投与下の WT または IL-21 欠損老齡マウスにおいてこれら応答を増悪させた (Fig. III-5, C-E)。これら肺内免疫応答に伴い、抗 PD-1 療法を受けた老齡マウスで顕著にみられる、障害肺から循環血中への SP-D 漏出の増加は、ICOSL 遮断または IL-21 欠損により消失した (Fig. III-5F)。外因性 IL-21 投与は、ICOSL 遮断または IL-21 欠損による血清 SP-D 異常上昇の改善効果を打ち消した。以上より、ICOS シグナルを介した局所 IL-21 誘導が、病原性抗体産生 B 細胞への分化と、それに続く irAE 様病態の成立に責任を負うことが明らかになった。

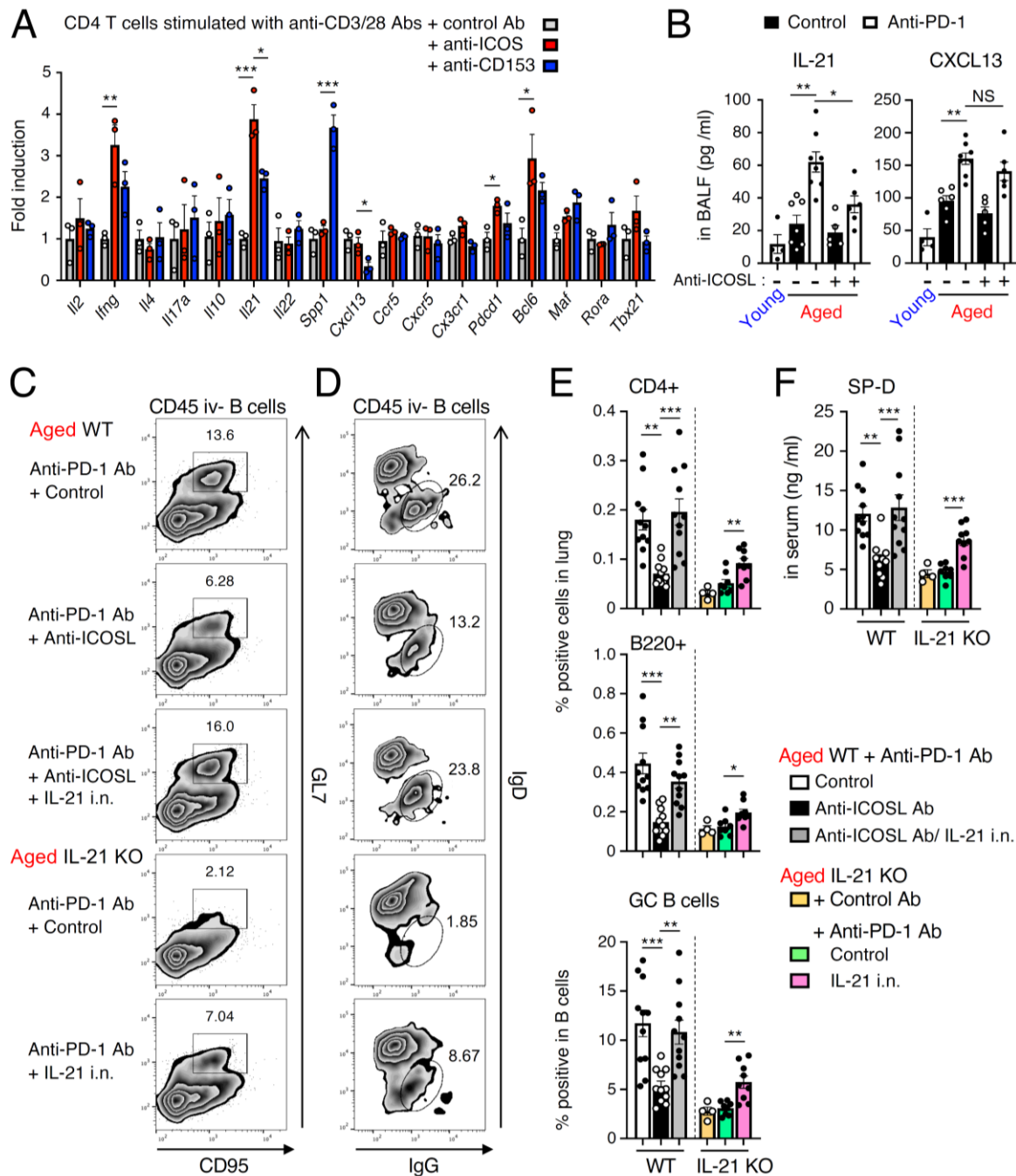


Fig. III-5. IL-21 is indispensable for ICOS stimulation-mediated exacerbation of anti-PD-1 therapy-induced lung pathology.

(A) CD4⁺ T cells were isolated from the lungs of aged mice treated anti-PD-1 therapy and then were stimulated with anti-CD3/anti-CD28 Abs together with anti-ICOS or anti-CD153 agonistic Ab ex vivo. Fold inductions of indicated mRNA expression relative to that in control Ab-stimulated cells are shown. (B) Concentration of IL-21 or CXCL13 in BALF isolated from young or aged mice with indicated treatment was measured. Data are mean $\pm$ SEM (n = 3–6). One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test was used. (C–F) WT or IL-21-deficient aged mice were treated with anti-PD-1

and anti-ICOSL Abs, and inoculated intranasally (i.n.) with recombinant IL-21. Representative plots of CD95⁺GL7⁺ cells (C) and IgG⁺ cells (D) among lung-infiltrating B cells, their frequencies (E), and serum concentrations of SP-D (F) are shown. Data are mean $\pm$ SEM, and the results from 2 independent experiments were combined (n = 4–6 per experiment). Then, One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer post hoc test was conducted for aged WT or IL-21-KO groups separately. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

III-2-6 末梢血 ICOS⁺ CD4⁺ T 細胞割合とがん患者における irAE 発症との関連

ICOS⁺ CD4⁺ T 細胞が irAE 発症に寄与することを踏まえると、これらが irAE 発症の予測因子となり得る可能性がある。しかし臨床現場では、irAE 罹患臓器の組織浸潤細胞を評価することは困難である。そこで、血中循環 CD4⁺ T 細胞における ICOS 発現と肺病態との関連を検討した。肺組織での所見と同様に、抗 PD-1 療法開始直後、老齢マウスの末梢血では若齢マウスと異なり、末梢 CD4⁺ T 細胞の ICOS 発現が上昇していた (Fig. III-6, A および B、ならびに Supplementary Fig. III-8D)。これは SP-D 上昇に先行していた。一方、Foxp3⁺ ICOS⁺ CD4⁺ Treg 細胞の割合は末梢で増加しなかった (Fig. 6C)。さらに重要なことに、血中 ICOS⁺ CD4⁺ T 細胞の頻度は、腫瘍移植 15 日後の障害肺における血清 SP-D 濃度と相関していた (Fig. III-6D)。

前臨床の老齢マウスモデルから得られた所見を検証するため、NSCLC 患者の PBMC において、抗 PD-(L)1 療法前および 4 週後の ICOS⁺ CD4⁺ T 細胞割合を評価した (Supplementary Fig. III-9A)。患者情報は Supplementary Table III-1 に示す。既報の後ろ向き研究⁴⁹と同様に、本コホートでも ICI-ILD は高頻度 (16%) に観察される irAE であった。抗 PD-(L)1 療法により CD4⁺ T 細胞および CD8⁺ T 細胞の割合自体は変化しなかった一方で (Supplementary Fig. III-9B)、末梢 CD4⁺ T 細胞における ICOS 発現は、irAE として ICI-ILD を発症した患者で有意に上昇し、irAE を発症しなかった患者では上昇しなかった (Fig. III-7, A および B)。化学療法併用 ICI を受けた患者は全例、前投薬としてデキサメタゾンの投与を受けていた。免疫抑制薬の使用は、irAE 発症 (Supplementary Tables III-1–3) および ICOS⁺CD4⁺ T 細胞頻度 (Supplementary Fig. III-9C) に目立った影響を及ぼさなかった。49 例中 31 例 (61.2%) では、ICI-ILD 症例の 85%以上を含め、抗 PD-(L)1 療法開始 4 週時点では irAE が未発症であった (Supplementary Fig. III-9E)。血中 ICOS⁺ CD4⁺ T 細胞頻度の増加は、ICI-ILD 患者に特有というだけでなく、血液系および皮膚の irAE 患者でも特徴的に認められた (Fig. III-7, B および C、ならびに Supplementary Table III-2)。ただし、治療レジメンに基づいて irAE における ICOS 発現を分類する試みは、サンプルサイズが小さいため制限された (Supplementary Fig.

III-9D)。実際、ICI+化学療法併用群ではirAE 患者においてICOS⁺CD4⁺T 細胞の有意な増加が観察されたが、ICI 単剤群では患者数が限られていたため観察されなかった可能性がある。

ICOS 発現とは対照的に、Tfh または Tph 細胞で発現すると報告されている CXCR5⁺、CX3CR1⁺、CCR5⁺CD4⁺T 細胞⁵⁰や、ICOS⁺CD8⁺T 細胞の頻度変化は、irAE の有無で同程度であった (Fig. 7B)。さらに、B 細胞遊走因子である CXCL13 は、irAE を伴わない患者の血漿ではなく、ICI-ILD 患者の血漿で増加傾向を示した (Supplementary Fig. III-9F および Supplementary Table III-2)⁴¹。また、炎症性サイトカイン IL-6 はICI-ILD に関与すると報告されている²¹。そこで、単変量および多変量ROC 解析により、ICI-ILD を含むirAE 発症予測におけるこれら因子の予測性能を検討した (Supplementary Table III-4)。ICOS⁺CD4⁺T 細胞頻度の増加は、CXCL13 または IL-6 レベルよりもICI-ILD 発症の予測因子として優れており (Fig. III-7D および Supplementary Table III-3)、ICOS⁺CD4⁺T 細胞変化とCXCL13 レベル変化を組み合わせて評価すると、後のICI-ILD 発症に対する予測性能はさらに高まった (Fig. III-7D および Supplementary Table III-5)。

この組み合わせ評価における多変量ROC 解析から得られたカットオフ値 (0.56) および各患者の傾向スコアに基づき、ICI-ILD 発症の予測式を構築した (Supplementary Table III-5)。ICI-ILD の有無に応じた患者値をこの予測式モデルに適用すると、ICI-ILD 群と非irAE 群は統計学的に異なる成分として判別可能であった (感度 75%、特異度 92%、Adonis 検定 $P < 0.01$) (Fig. 7E)。これは、CXCL13 とICOS の組み合わせ評価がICI-ILD 発症の予測に有用であることを示唆する。

一方、ICOS⁺CD4⁺T 細胞変化により層別化しても、PFS の期間 (Fig. III-7F)や全奏効 (Supplementary Fig. III-10A) で評価したICI の抗腫瘍効果に有意差は認められなかった。CXCL13 レベル変化もICI の抗腫瘍効果には影響しなかったが (Supplementary Fig. III-10B)、irAE 発症はOS の延長と関連していた (Supplementary Fig. III-10C)。

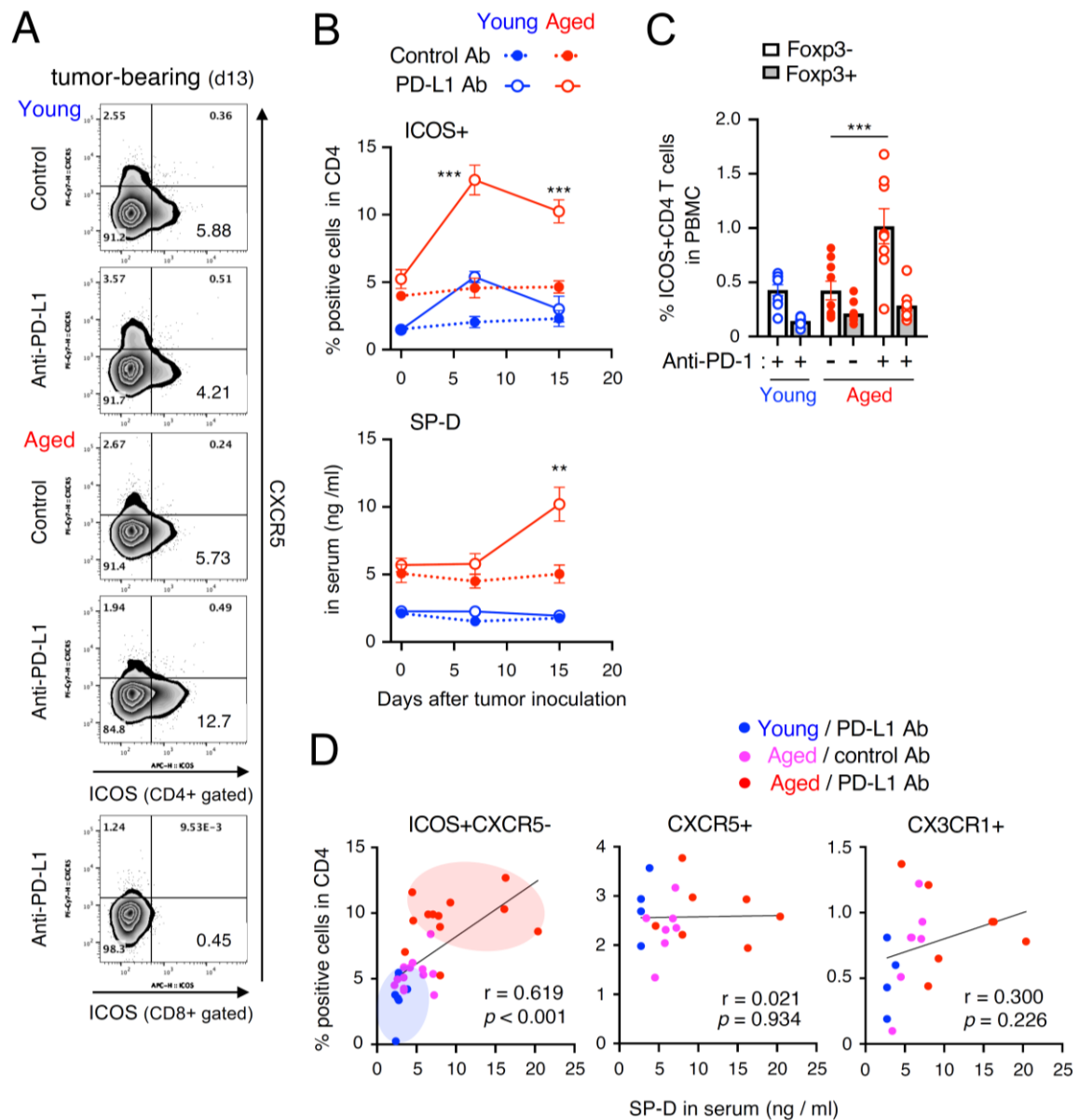


Fig. III-6. Anti-PD-L1 therapy causes ICOS⁺ CD4⁺ T cells to be retained in the periphery of MC38-bearing aged mice.

MC38-bearing young or aged mice were treated with control or anti-PD-(L)1 Ab. **(A and B)** The representative dot plots of blood-circulating CD4⁺ T cells 13 days after tumor inoculation **(A)**, and kinetic changes in frequencies of the indicated populations **(B)** are shown (n = 5–6). **(C)** Frequencies of Foxp3⁻ or Foxp3⁺ ICOS⁺ CD4⁺ T cells in the peripheral blood were analyzed (n = 8–9). ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 by One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. **(D)** Correlation between the frequencies of indicated populations and the concentration of SP-D is shown. Simple linear regression analysis was conducted. Data are mean ± SEM from more than 2 independent experiments with similar results.

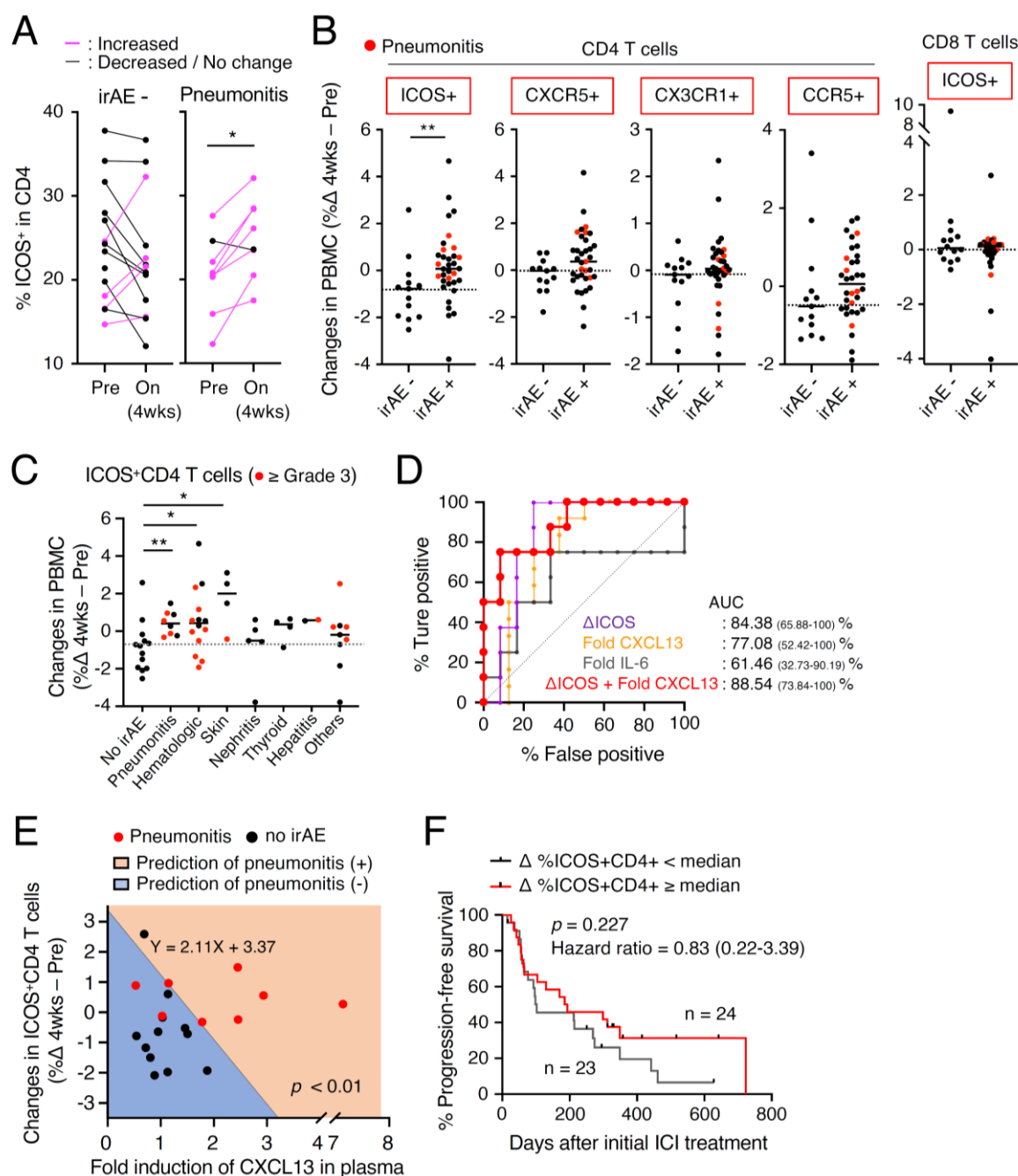


Fig. III-7. An increase in peripheral ICOS⁺ CD4⁺ T cells is associated with the incidence of anti-PD-(L)1 therapy-induced irAEs in patients with NSCLC.

(A) The frequency of ICOS⁺ cells in peripheral CD4⁺ T cells was analyzed before (Pre) and 4 weeks after initial anti-PD-(L)1 therapy (On) in patients with (n = 8) or without (n = 13) the irAE pneumonitis. * $P < 0.05$ by Wilcoxon's signed-rank test. (B) Changes in the frequencies of indicated CD4⁺ or CD8⁺ T cell subsets during 4 weeks of anti-PD-(L)1 therapy in patients with (n = 34) or without (n = 13) irAEs, were analyzed. Red dots indicate the values for patients with pneumonitis. (C) Changes in the frequency of ICOS⁺ CD4⁺ T cells in patients with indicated irAEs are shown. "Others"

includes symptoms with infusion reaction, fever, adrenal irAEs, carditis, diarrhea, hypophysitis, and neurologic irAEs. $*P < 0.05$; $**P < 0.01$ by Mann-Whitney U test. **(D)** Univariate (Δ ICOS, fold change in CXCL13 or IL-6) and multivariate (Δ ICOS plus changes in CXCL13) ROC analyses of the predictive values for pneumonitis development. **(E)** Distribution of indicated values in the combined predictive model for pneumonitis incidence in patients with pneumonitis ($n = 8$) or without ($n = 12$) irAEs. Adonis test based on the Bray-Curtis distance was used. **(F)** Kaplan-Meier plots of progression-free survival of patients with NSCLC stratified according to the median value of the change in peripheral ICOS⁺CD4⁺ T cells are shown. Log-rank (Mantel-Cox) test and univariate Cox proportional hazards analyses were performed.

III-3 考察

irAE の発症は依然として予測が困難であり、多様な疾患タイプ間での識別も十分ではない。irAE を起こしやすい患者の同定と、機序に基づく irAE の分類は、精密かつ患者個別化された治療を可能にし、がん免疫療法の恩恵を受け得る患者集団を拡大する。本研究における老齡マウスの結果および患者データベースを用いた他の研究から、暦年齡 (chronological aging) は抗 PD-(L)1 療法中の irAE 発症のリスク因子となり得ることが示唆されるが、この仮説には議論が残る⁵¹⁻⁵³。ヒト検体では、曝露される環境因子や遺伝的背景が異なるため、加齢に伴う免疫学的変化を解析することは困難である。そこで本研究では、担癌老齡マウスの実験モデルを用いることで、irAE 発症を規定する因子を抽出した。本研究の抗 PD-(L)1 療法誘発性肺毒性モデルは、我々の知る限り初めて、irAE の病態に関与すると考えられてきた B 細胞媒介性自己抗体応答³⁸⁻⁴⁰の局所組織化の基盤として、加齢に関連する ICOS⁺CD4⁺ T 細胞が果たす機序的洞察を提供した。この視点は、いくつかの自己免疫疾患において、暦年齡と自己抗体依存性組織機能障害に関連するという知見^{54,55}とも整合する。さらに、抗 PD-(L)1 療法後、若齡マウスや irAE 非発症患者ではなく、老齡マウスおよび ICI-ILD 患者の末梢で ICOS⁺CD4⁺ T 細胞が顕著に増加したことは、これらが後の肺毒性発症に対する予測的価値を有する可能性を示す。抗 PD-(L)1 療法誘発性 irAE 病態を増悪させる加齢関連因子を解明することは、irAE に対するより良い治療アプローチの必要性に応えるうえでも有用である。

irAE 発症と ICOS⁺CD4⁺ T 細胞との関連は、免疫関連肝炎および脳脊髄炎患者において末梢 ICOS⁺CD4⁺ T 細胞頻度の増加がステロイド治療により改善したことを示す先行研究により予見されていた⁵⁶。しかし、ICOS が irAE 発症における機能的前提条件であるか、また irAE 発症前の動態が予測的価値を持つかどうかは明確ではなかった。PD-(L)1 遮断は病原性 CD4⁺ T 細胞における ICOS の発現上昇を誘導した一方で、加齢に関連する PD-1 発現も ICOS シグナ

ルによって増強されていた。これらの相互調節は、抗 PD-(L)1 療法関連肺病態の増悪における ICOS⁺CD4⁺ T 細胞の中核的役割を支持する。T 細胞に対する ICOS の多様な作用のうち、CD4⁺ T 細胞における ICOS シグナルは、PI3K/Akt 経路の活性化を介して^{57,58}、肺における生存/集積を内在的に促進している可能性がある。実際、ICOS-ICOSL 相互作用の遮断は、老齢環境下で肺浸潤 B 細胞だけでなく CD4⁺ T 細胞の頻度も低下させた。機序的には、Bcl-6 が IL-21 産生の重要な制御因子であることから⁴⁷、ICOS 媒介性 Bcl-6 誘導が CD4⁺ T 細胞からの IL-21 産生の主要なトリガーである可能性が考えられる。抗 PD-(L)1 療法中に ICOSL 遮断により軽減された肺病態が局所 IL-21 投与により逆転した事実は、老齢 CD4⁺ T 細胞における ICOS 媒介性局所 IL-21 産生が、抗 PD-(L)1 療法誘発性肺病原性の支配的な駆動力である可能性を強く示唆する。これを支持して、自己抗体産生細胞への分化の増強とそれに続く肺病原性は、抗 PD-(L)1 療法を受けた老齢マウスにおいて IL-21 欠損により著明に改善した。

古典的 Tfh マーカーである CXCR5 を発現しないにもかかわらず、IL-21 産生能を有し B 細胞分化を補助するという性質を踏まえると、老齢マウスの炎症肺に集積した ICOS⁺ PD-1⁺ エフェクター CD4⁺ T 細胞は、加齢や全身性エリテマトーデス患者において集積することが報告されたヒト CXCL13⁺ CXCR5⁻ の加齢関連ヘルパー T (ThA) 細胞⁵⁹ に類似している。B 細胞ヘルパー活性が類似する一方で、irAE 誘発性肺 ICOS⁺ CD4⁺ T 細胞は、ThA 細胞の特徴である CXCL13 や *GzmK*、*Pfhl* などの細胞傷害関連因子を顕著には発現しなかった。これに対し、肺浸潤 ICOS⁺ CD4⁺ T 細胞は、CXCR5 を発現しないが PD-1 および IL-21 を発現することを特徴とする、T extrafollicular helper 細胞^{50,58} あるいはオステオポンチン産生 (*Spp1* 産生) CD153⁺ 老化関連 T 細胞⁴⁸ と類似した性質を有していた。我々の肺障害モデルは、サーファクタント機能障害、肺胞径の増大、ならびに抗 PD-1 療法を受けた老齢マウス肺における COPD 関連遺伝子シグネチャーの上昇を伴っており、抗 PD-(L)1 療法が肺障害の前病変状態を増悪させることを示唆する。しかし、自己免疫応答の詳細な病態生理や標的細胞については、なお解明が必要である。さらに、局所的かつ持続的な irAE において CD4⁺ T 細胞の組織常在性および記憶機能が注目されていることから⁶⁰、加齢関連自己反応性 ICOS⁺ CD4⁺ T 細胞の細胞起源と持続性、ならびに肺微小環境内での B 細胞との相互作用に関する追加研究が、irAE 病態の基盤機序を明確化するために必要である。

病原性老齢 CD4⁺ T 細胞に加えて、老齢肺における自己抗原による認識刺激や炎症性環境といった加齢関連環境因子が、自己反応性 T 細胞・B 細胞の局所活性化の引き金または加速因子となり、その後の抗 PD-(L)1 療法誘発性肺障害につながる可能性がある。この考えは、TCR 欠損マウスを用いた移入実験により支持され、老齢の病原性 CD4⁺ T 細胞およびそれに続く自己抗体応答に必要な認識刺激を供給しない若齢環境下では、irAE 様症状が発症しなかったこ

とが示された。CXCL13 もまた、特に老齡環境において TLS の局所形成を制御することで irAE 発症に関与し、irAE 応答部位を規定する加齢関連環境因子である可能性がある^{24,41}。担癌老齡マウス肺において、抗 PD-1 抗体と抗 ICOSL 抗体の併用は局所 CXCL13 レベルを変化させなかった。これらの現象から、我々は、(a) CXCL13 媒介性の局所免疫応答の開始と、(b) 局所組織における ICOS 媒介性の CD4⁺ T 細胞と B 細胞の相互活性化が、それぞれ独立して肺病態に寄与する一方、いずれか一方の応答のみでは irAE 発症に十分ではない可能性があるとして仮説を立てた。この見解は、ICI 治療患者において、ICOS⁺ CD4⁺ T 細胞と CXCL13 はいずれも irAE 発症と関連したにもかかわらず、両者の間に相関を認めなかったことも整合する。したがって、これら 2 つのリスク因子を組み合わせることで、irAE 患者をより正確に同定できるということは、我々のパイロット研究が示したとおり、十分合理的である。

CXCL13 は irAE 管理の標的候補となり得る^{41,42}。しかし、腫瘍組織における CXCL13 高値は抗 PD-(L)1 療法への良好な反応と関連する可能性が示唆されており⁶¹、抗腫瘍免疫を減弱させるリスクのため、CXCL13 標的化戦略の irAE 管理への適用には限界があるかもしれない。この点において、irAE 発症の「第二のヒット」として機能した ICOS シグナルを標的とすることは、CXCL13 機能を維持し得る代替管理戦略となり得る。この戦略を実現するためには、最適な転帰を得るうえで、抗腫瘍効果とも関連し得る ICOS⁺エフェクター CD4⁺ T 細胞^{62,63}を含め、ICOS⁺ CD4⁺ T 細胞が抗腫瘍免疫応答に及ぼす影響を十分に考慮する必要がある。本研究では、ICOSL 遮断が肺毒性を軽減した一方で、老齡マウスおよびがん患者のいずれにおいても、ICOS の発現上昇と抗腫瘍効果との関連は乏しかった。これらの所見は、ICI 治療の初期段階における ICOS⁺ CD4⁺ T 細胞の早期活性化が、irAE 予測マーカーとなり、抗腫瘍免疫よりも irAE とより強く関連する可能性を示唆する。

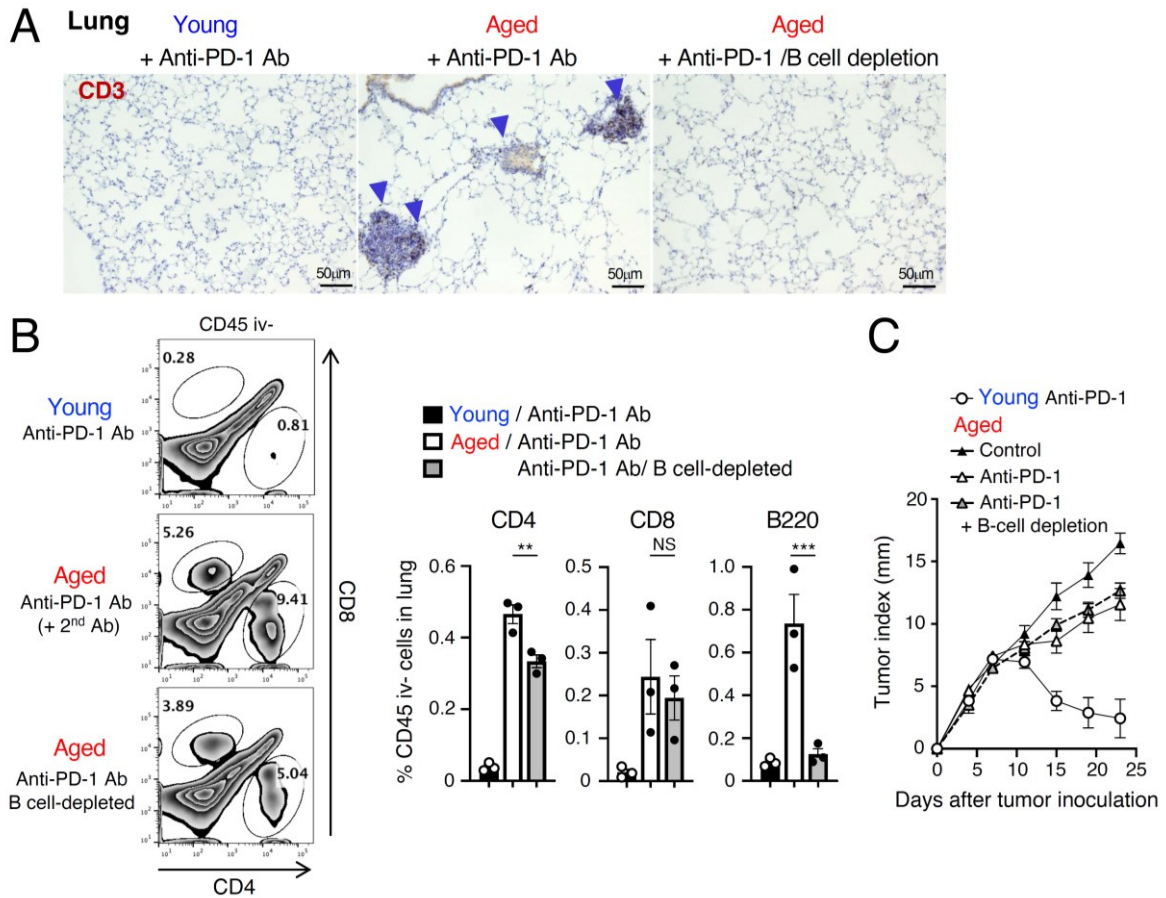
このような ICOS シグナルの irAE 発症または抗腫瘍免疫に対する選択的効果は、irAE 臓器と腫瘍組織の双方において、どの細胞種が ICOS を発現しているかに依存する可能性がある。ICOS-ICOSL 相互作用は、エフェクター T 細胞に作用して活性化を促進する一方で、Treg に作用して免疫抑制活性を維持するという二重の役割を持つためである⁶⁴。このことは、抗 ICOS 作動性抗体との併用療法を評価した一部臨床試験で、抗 CTLA-4 療法では有益な抗腫瘍効果が認められたものの⁶⁵、複数の固形癌において抗 PD-(L)1 療法では認められなかった^{66,67}にもかかわらず、複数タイプの irAE 発症率が増加した理由の説明にもなり得る。がん種や自己臓器によって Treg/エフェクター T 細胞比が異なることを考えると、作動性 ICOS 刺激が Treg に及ぼす効果も、がん種や自己臓器の種類によって異なる可能性が高い^{68,69}。これらの解釈に基づけば、irAE 病態と抗腫瘍免疫の双方に対する ICOS 依存性を、特に腫瘍局所および irAE 罹患組織への Treg および CD4⁺ T 細胞浸潤とその ICOS 発現の観点から明らかにすることが必要

である。

本研究のコホートは後ろ向きであり患者数も少ないため、皮膚障害や消化管障害など患者が訴えない限り軽微な毒性が見落とされるというバイアスが存在する。一方、ICI-ILD および腎障害は、他の後ろ向き研究で報告されているとおり^{49,70,71}、本コホートでも高頻度に認められた。これら疾患タイプは、NSCLC 以外のがん種を含む他コホートにおける irAE の最も一般的なスペクトラムとは一致しない場合があるが⁷⁰、本 NSCLC コホートでは ICI と化学療法の併用例が多かったことが、ICI-ILD および血液毒性の高頻度に寄与した可能性がある⁷¹。本コホートの規模が小さいため、Spearman 順位相関係数解析とは異なり、多変量解析では ICOS⁺ CD4⁺ T 細胞の変化も CXCL13 の変化も、irAE または ICI-ILD の独立したリスク因子として同定されなかった。したがって、多様な irAE、がん種、レジメンを横断する大規模コホート研究により、irAE 発症における ICOS⁺ CD4⁺ T 細胞および CXCL13 の重要性を検証する必要がある。

結論として、本研究が示した ICOS⁺CD4⁺T 細胞の関連性に関する洞察は、皮膚障害を含む肺毒性以外の irAE 病態の理解にも潜在的に有意義である。しかし、ICOS/IL-21/自己抗体媒介性の臓器毒性は、大腸炎などのすべての irAE 病態に必ずしも当てはまらない点には留意が必要である⁷²。したがって、複数の免疫学的観点から irAE を分類することが必要である。

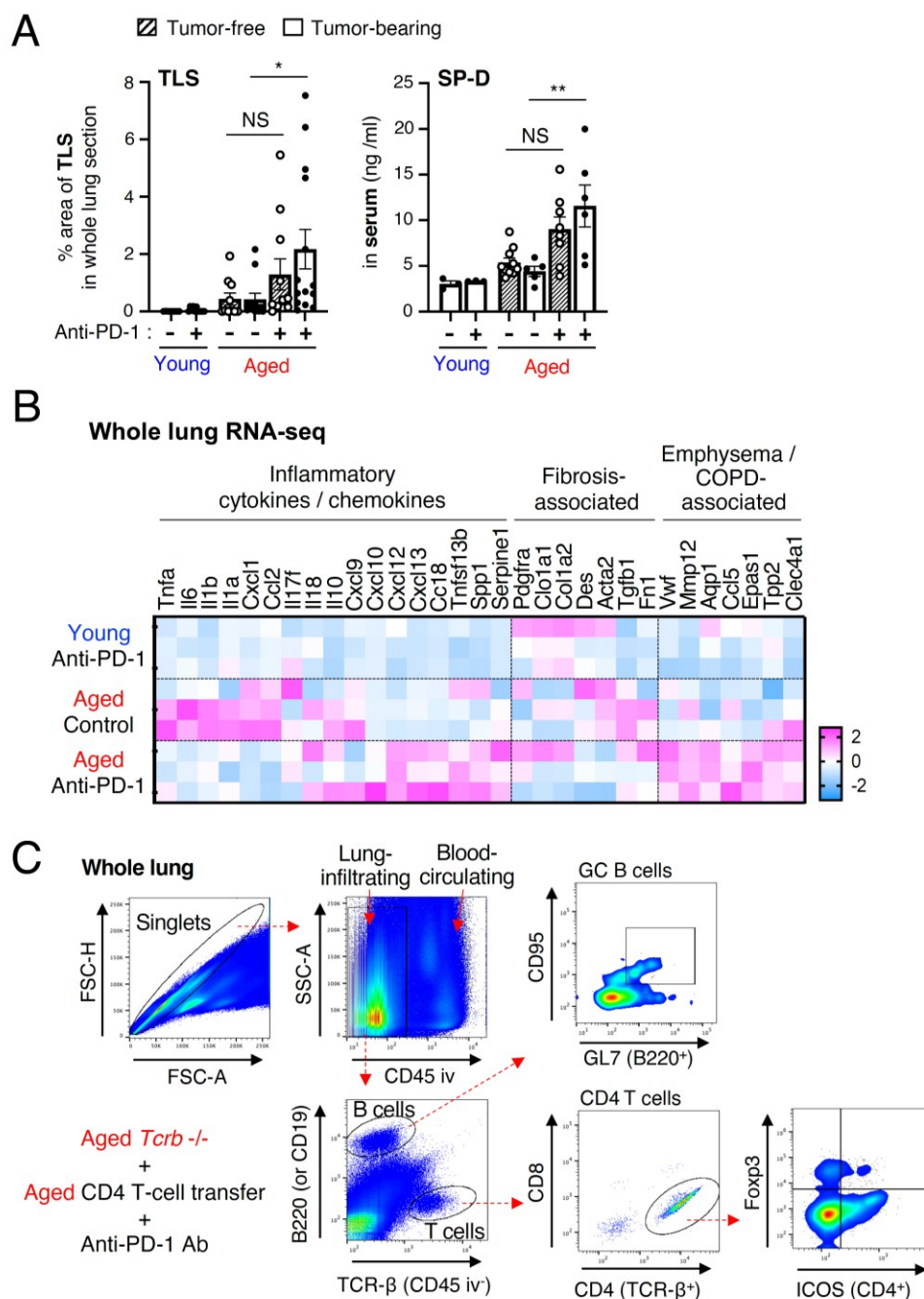
III-4 補足資料



Supplementary Fig. III-1. The B-cell response is indispensable for anti-PD-1 therapy-induced lung pathogenesis but does not affect the anti-tumor effect.

After B-cell depletion, anti-PD-1 Ab were injected in MC38-bearing aged mice. **(A)** Five days after the last treatment, lymphocytic aggregates in the lung were subjected to IHC stained with anti-CD3 Ab (brown). Scale bars indicate 50 μ m. **(B)** Anti-CD45 Ab were intravenously (iv) injected before harvesting the lungs. Representative dot plots (left panels) and the frequencies (right graphs) of CD45 iv staining-negative lung-infiltrating T and B cells are shown ($n = 5$). **(C)** Outgrowth of MC38 in young or aged mice were monitored over time ($n = 6$) and tumor sizes were expressed as tumor index (square root (length $\times$ width)). Data are mean $\pm$ SEM of at least two independent experiments with similar results.

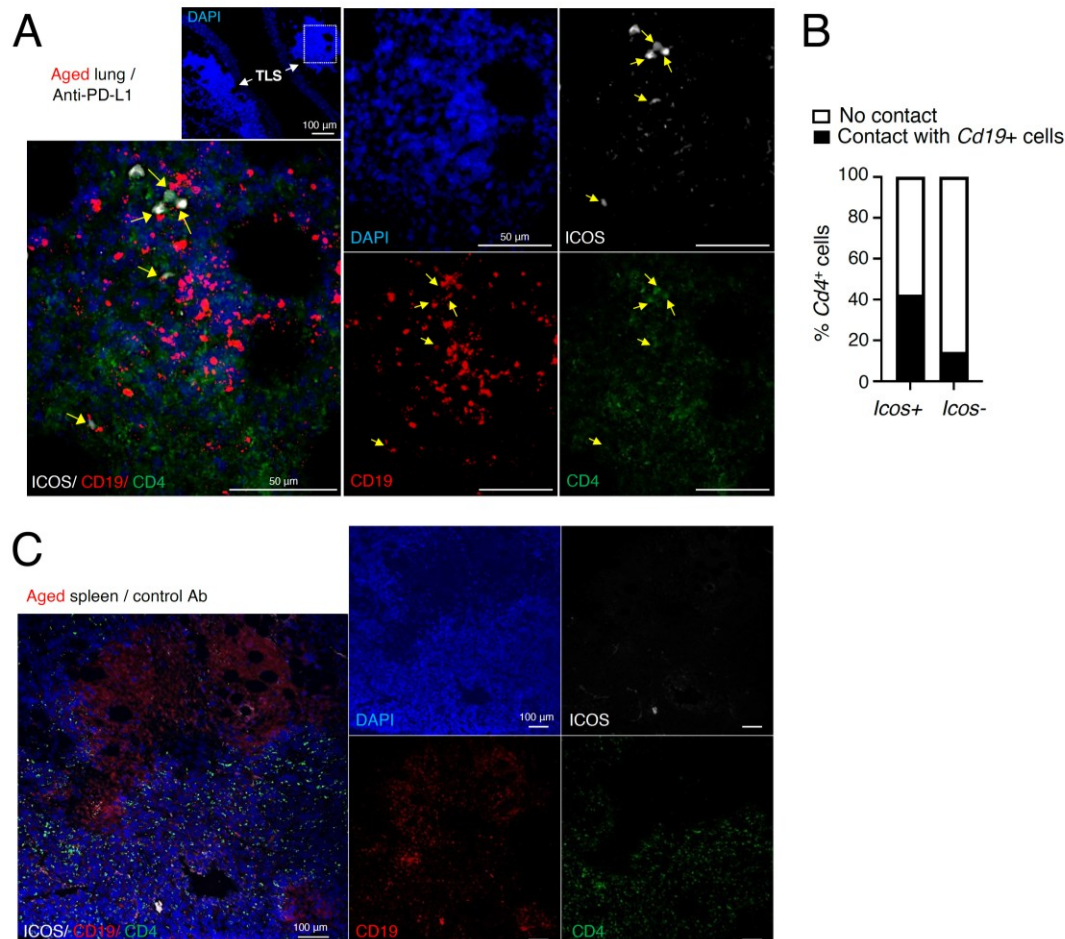
** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.



Supplementary Fig. III-2. Characterization of anti-PD-1 therapy-induced lung pathogenesis in tumor-bearing aged mice

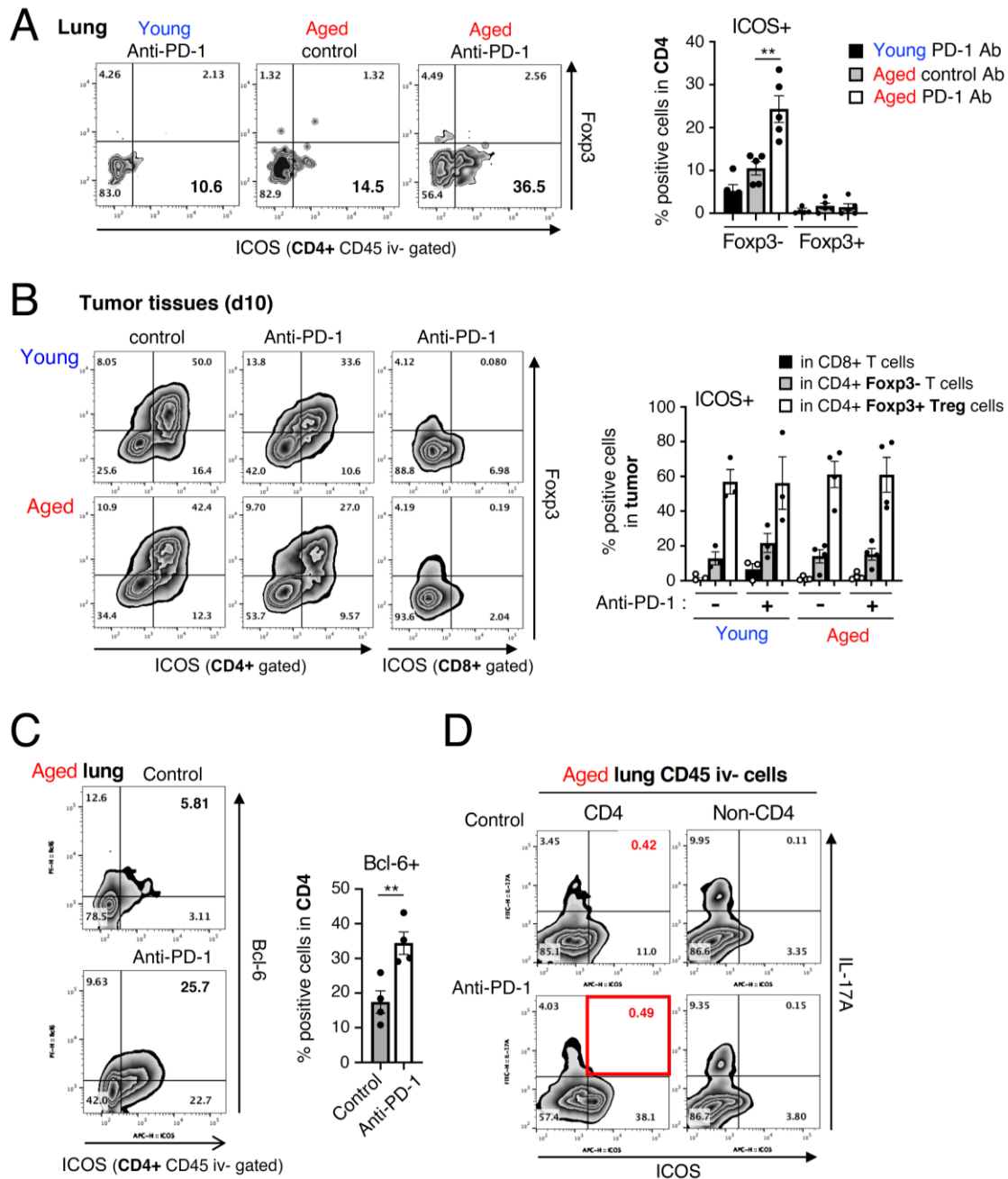
(A) Tumor-free or MC38-bearing mice were treated with control or anti-PD-1 Ab. Area of ectopic immune cell aggregates (TLS) in lung sections and serum SP-D levels were evaluated by H&E staining and ELISA, respectively. Data are mean ± SEM of at least two independent experiments with similar results. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. **(B)** Heatmap shows the relative expression levels of inflammatory genes, fibrosis-associated genes, and emphysema/COPD-associated genes in total RNA sequencing analysis of whole lung tissues from tumor-bearing mice. **(C)** Aged WT CD4 T cells were transferred into aged

TCR β -deficient mice, and then anti-PD-1 Ab was injected. Gating strategy for lung-infiltrating B cells and T cells (defined by CD45 ivB220⁺ or CD19⁺, and CD45 ivTCR- β ⁺ CD4⁺ or CD8⁺, respectively). GC B cells were defined by B220⁺ CD95⁺ GL7⁺ cells.



Supplementary Fig. III-3. Histological analysis of lymphocytic aggregation in lung from anti-PD-1 Ab-treated aged mice.

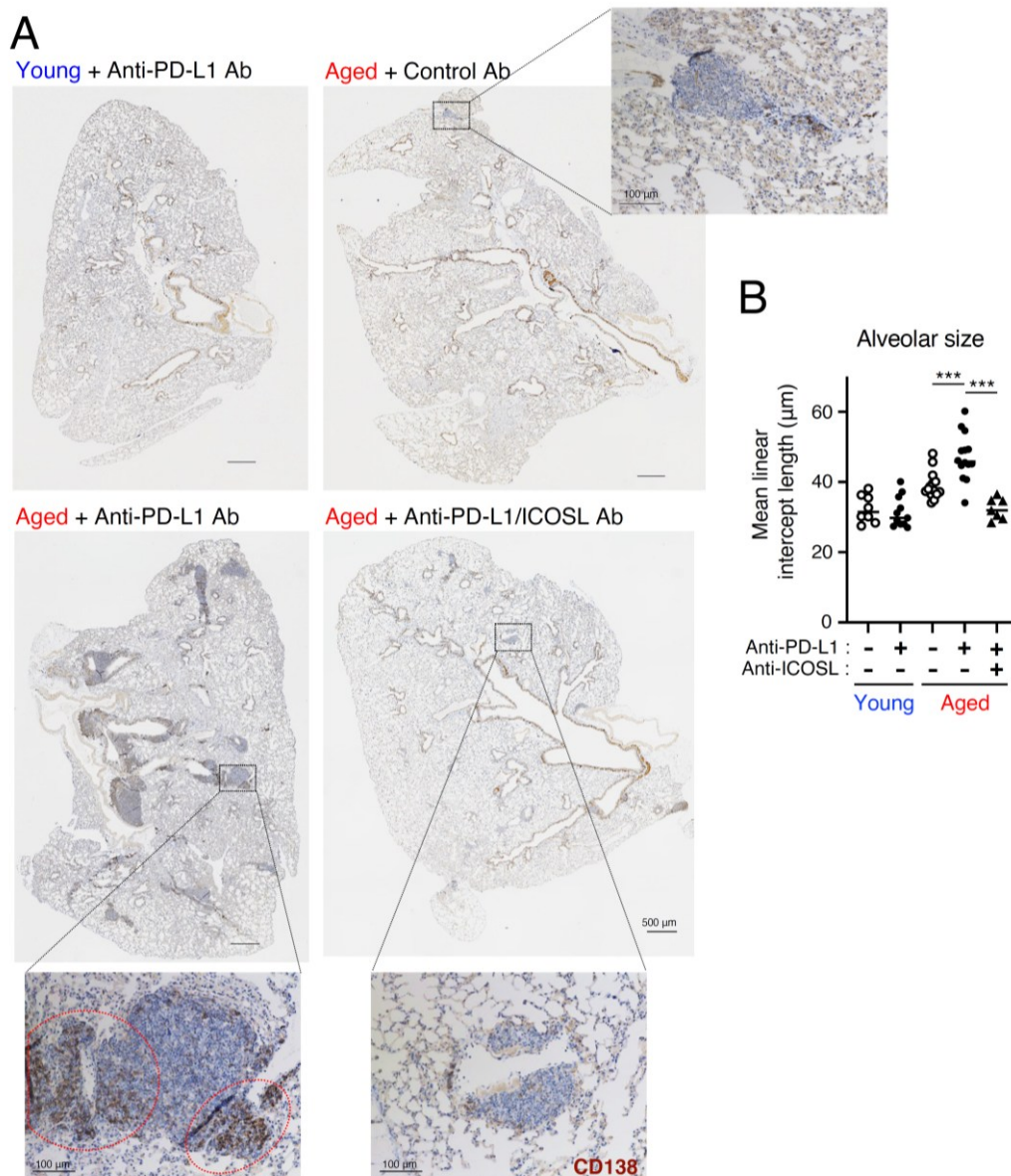
MC38-bearing aged mice were treated with anti-PD-1 Ab (**A and B**) or control Ab (**C**) 3 times. Seven days after the last treatment, lungs (**A and B**) or spleen (**C**) were analyzed. (**A and C**) Representative images of DAPI staining, in-situ RNA hybridization (white: ICOS, red: CD19, green: CD4), and merged images of aged lung of spleen are shown. Spleen from control Ab-treated aged mice were utilized as a negative control for ICOS staining. Scale bars indicate 100 or 50 μ m. Yellow arrows indicate the boundaries where *Icos*-expressing *Cd4*⁺ cells interact with *Cd19*⁺ cells. (**B**) Percentage of *Icos*⁺ *Cd4*⁺ cells or *Icos*⁻ *Cd4*⁺ cells that interacted with *Cd19*⁺ cells within the TLS are indicated in black color. Each bar graph includes *Cd4*⁺ cells that did not interact with *Cd19*⁺ cells (white), and the total cells are shown as 100 % in each fraction.



Supplementary Fig. III-4. Phenotypic characterization of ICOS⁺ CD4 T cells from tumor-bearing aged mice.

MC38-bearing young or aged mice were treated with anti-PD-1 Ab 3 times. Two days after the last treatment, lung- or tumor infiltrating ICOS⁺CD4 T cells were analyzed. **(A)** Representative dot plots (upper panels) and the frequencies (lower graphs) of CD45 iv staining-negative lung-infiltrating Foxp3⁻ or Foxp3⁺ ICOS⁺CD4 T cells (n = 5). **(B)** Representative dot plots (left panels) and the frequencies (right graphs) of tumor-infiltrating Foxp3⁻ or Foxp3⁺ ICOS⁺CD4 T cells (n = 3–4). **(C)** Representative dot plots of lung-infiltrating Bcl6⁺ ICOS⁺ cells (left panels) and the frequency of Bcl6⁺ cells in CD4 T cells

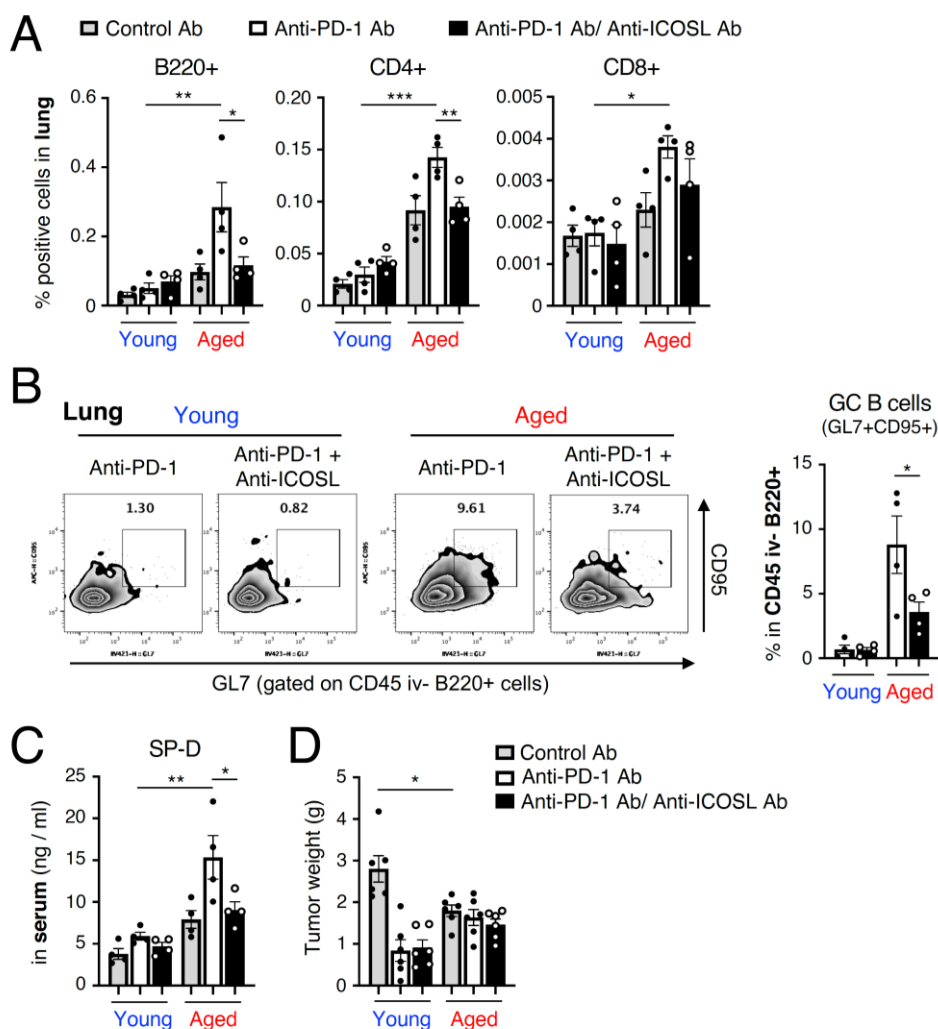
(right graph) are shown. **(D)** IL-17-producing cells were analyzed by intracellular cytokine staining of lung CD4 T cells or CD4 negative cells from aged mice with or without antiPD-1 Ab treatment. Data are representative of at least three independent experiments with similar results (mean $\pm$ SEM). $**P < 0.01$.



Supplementary Fig. III-5. Representative images of whole lung section with TLS and CD138⁺ cells.

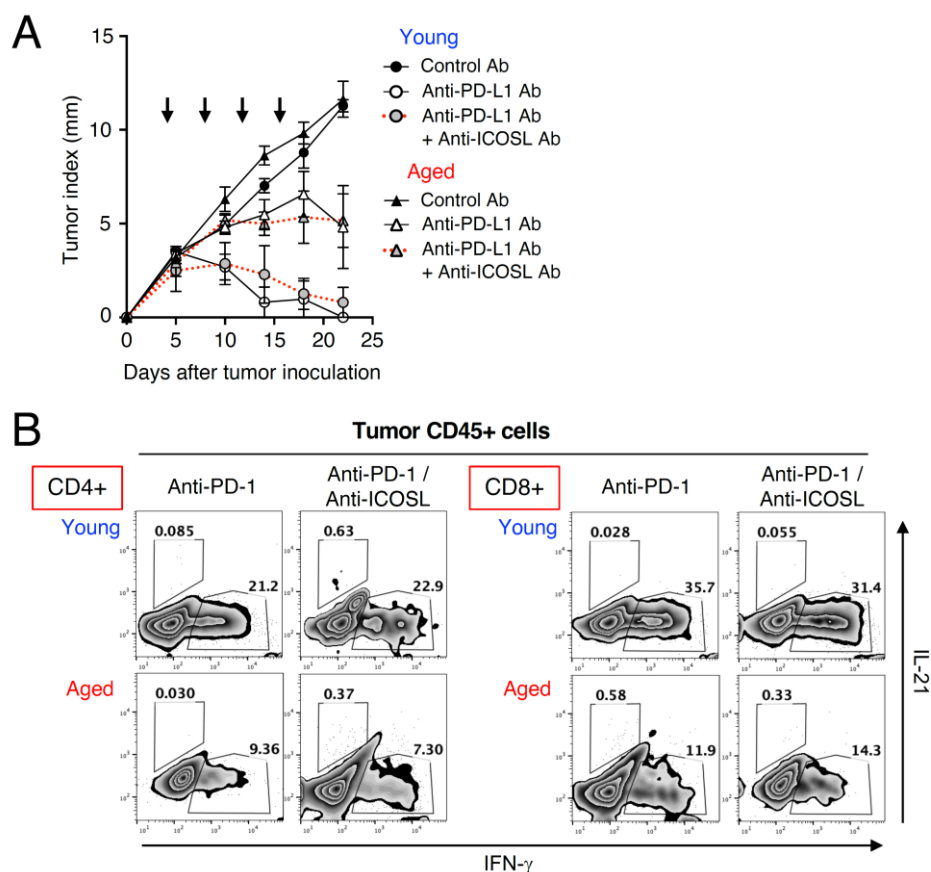
(A and B) MC38- bearing young or aged mice were treated with anti-PD-1 Ab in combination with or without anti-ICOSL. Ten days after the last treatment, lungs were harvested and stained with anti-CD138 Ab. Scale bars indicate 500 μm or 100 μm . The regions of interest (ROIs), including TLS and CD138⁺ cells (brown), are enlarged in the other panels **(A)**. For the measurement of mean linear intercept length of alveolar, eight fields were randomly selected per one lobe of H&E-stained lung

tissues, and test lines were randomly drawn on images except airway and vascular structures. Calculated mean linear intercept lengths from indicated mice are shown (**B**). Values represent mean $\pm$ SEM of independent experiments. *** $P < 0.001$.



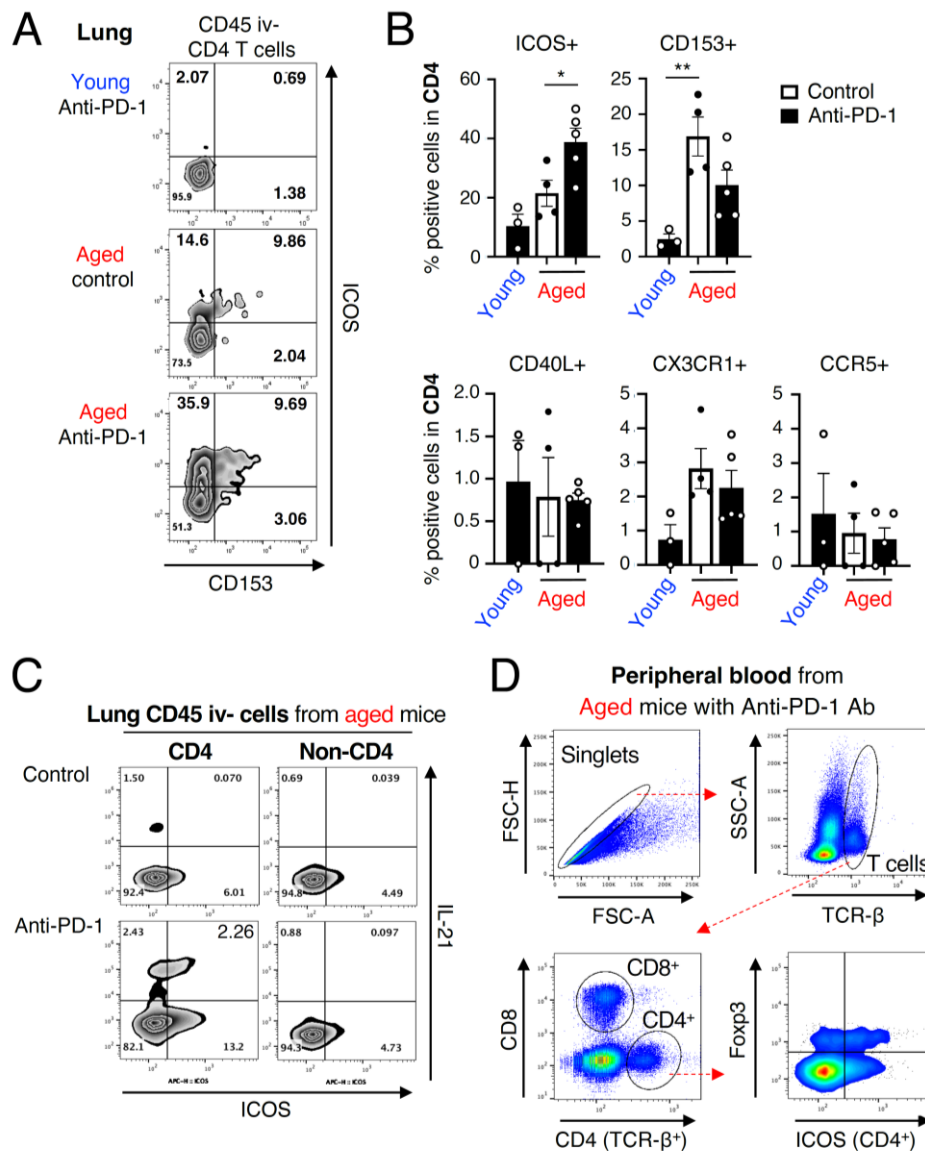
Supplementary Fig. III-6. Anti-PD-1 therapy-induced lung pathogenesis was attenuated by ICOSL blockade in aged mice.

CT26-bearing young or aged Balb/c mice were treated with anti-PD-1 Ab combined with or without anti-ICOSL Ab. (**A and B**) Frequencies of CD45 iv staining-negative lung-infiltrating B cells and T cells (**A**), representative dot plots of GC B cells (**B, left**), and their frequency (**B, right**) are shown. (**C and D**) The levels of SP-D in the serum (**C**) and weight of tumor tissues (**D**) in indicated groups were measured 21 days after tumor inoculation. Data are mean $\pm$ SEM from two independent experiments with similar results. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.



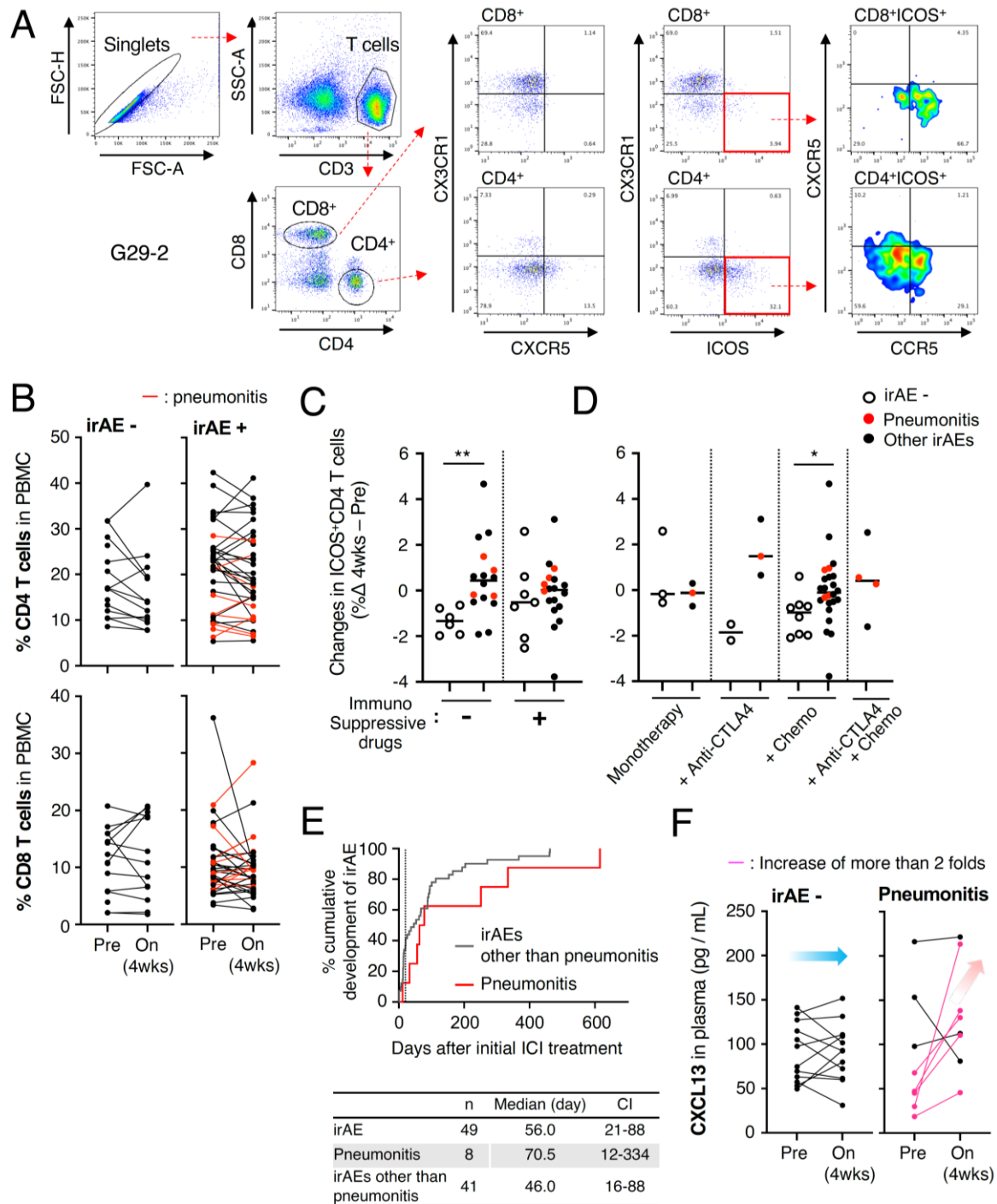
Supplementary Fig. III-7. ICOSL blockade does not impair anti-tumor effect of anti-PD-1 therapy.

MC38-bearing young or aged mice were treated with anti-PD-L1 and anti-ICOSL Abs. **(A)** Tumor progression was monitored over time ($n = 6$), and tumor size was expressed as the tumor index (square root (length $\times$ width)). The data represent mean $\pm$ SEM. **(B)** Two days after the second treatment, tumor-infiltrating CD8 or CD4 T cells were analyzed for production of IFN- γ and IL-21 using intracellular cytokine staining. Data are representative of at least two independent experiments with similar results.



Supplementary Fig. III-8. Characterization of lung-infiltrating cells in aged mice.

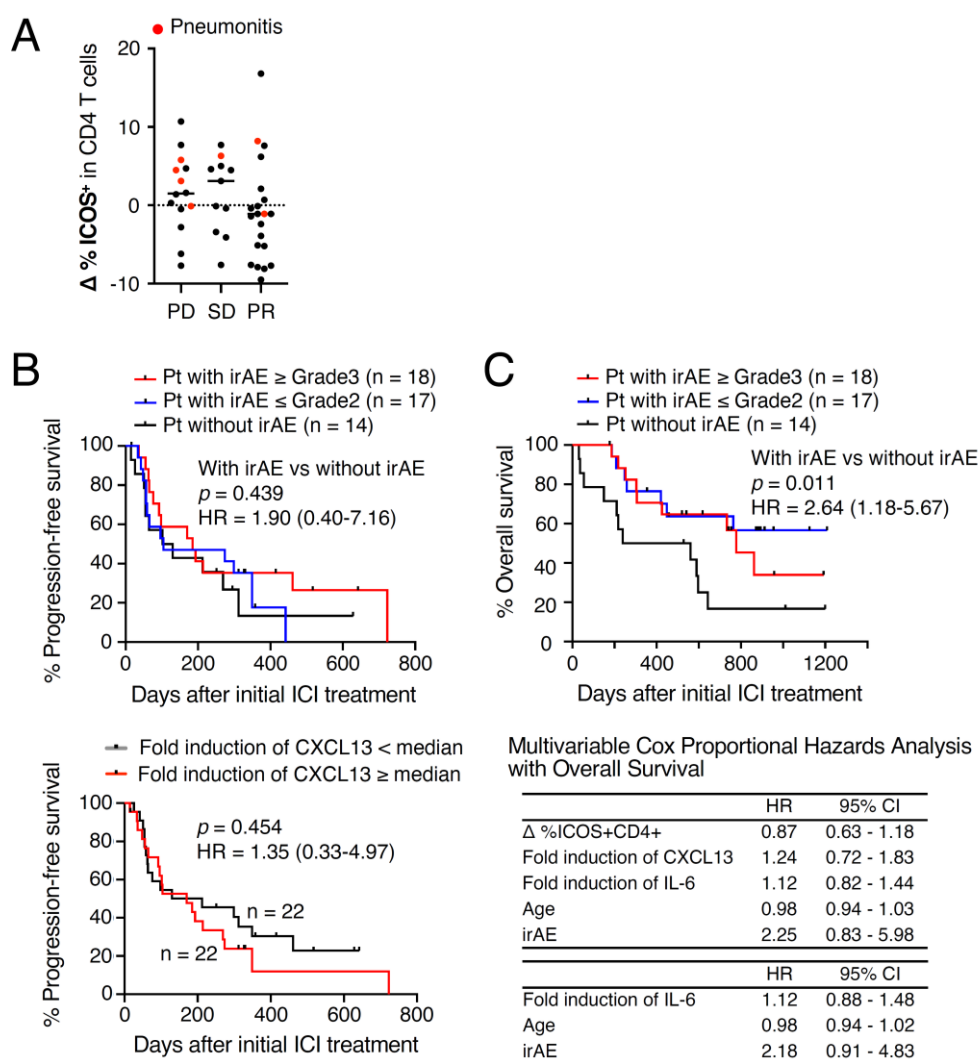
MC38-bearing young or aged mice were treated with anti-PD-1 Ab. **(A and B)** Representative plots showing the expression of ICOS and/or CD153 **(A)** and the frequencies of indicated molecule-expressing cells **(B)** in CD45 iv staining-negative lung-infiltrating CD4 T cells are shown (mean $\pm$ SEM; $n = 3-5$). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$. **(C)** Lung-infiltrating CD4 T cells or CD4-negative cell populations were harvested from MC38-bearing aged mice 2 days after the last Ab treatment and were analyzed for IL-21-producing ability. Data are representative of two independent experiments with similar results. **(D)** Gating strategy for peripheral CD4 T cells in the blood and their ICOS expression.



Supplementary Fig. III-9. Analyses of peripheral T subsets in patients with NSCLC and irAE.

(A) Gating strategy for ICOS⁺ T cells in PBMCs from patients with non-small cell lung carcinoma (NSCLC). (B) The frequencies of CD4 (upper panels) and CD8 (lower panels) T cells in PBMC were analyzed before (Pre) and 4 weeks after initial anti-PD(L)1 therapy (On) in patients with irAE (n = 34) or without irAEs (n = 14). The red lines indicate the kinetics in the patients with pneumonitis. (C and D) Anti-PD-1 therapy-treated patients were stratified by the usage of immunosuppressive drugs (C), or the

combination regimens **(D)**, and their changes in the frequency of ICOS⁺CD4 T cells in PBMCs are shown. The Mann-Whitney test was used for comparisons within each subgroup. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. **(E)** Kaplan Meier curve for the incidence of irAE or pneumonitis in patients with NSCLC treated with anti-PD-(L)1 therapy. **(F)** CXCL13 levels in plasma were analyzed before (Pre) and 4 weeks after initial anti-PD-(L)1 therapy (On) in patients with pneumonitis ($n = 8$) or without irAEs ($n = 12$). The red lines indicate the patients with > 2 folds increase of CXCL13 levels.



Supplementary Fig. III-10. Relationship between patient prognosis incidence of anti-PD-(L)1 therapy-induced irAEs.

(A) Change in the ratio of ICOS⁺CD4 T cells were plotted based on the best overall response. Red dots indicated patients with irAE pneumonitis. PD, progressive disease; SD, stable disease; PR, partial response. (B and C) Kaplan Meier curves of progression-free survival of NSCLC patients with ($\geq$ Grade 3 or $\leq$ Grade 2) or without irAEs (B, upper panel), and with or without increased levels of CXCL13 during anti-PD-(L)1 therapy (B, lower panel). Kaplan Meier curves of overall survival of NSCLC patients with ($\geq$ Grade 3 or $\leq$ Grade 2) or without irAEs (C, upper panel), and Multivariable Cox proportional hazards analysis for overall survival. The analysis includes %ICOS+CD4 T cells, fold induction of CXCL13, fold induction of IL-6, age, and the presence of irAEs as covariates (C, lower panel). Due to multicollinearity among %ICOS⁺CD4 T cells, fold induction of CXCL13, and irAEs, results excluding values of ICOS and CXCL13 are also presented in the lower. HR, Hazard ratio; CI, confidence interval.

Supplementary Table III-1.

Clinical characteristics of NSCLC patients who received anti-PD-1/PD-L1 therapy.

		Non-irAE patients (n = 14)	irAE patients (n = 35)
Aged, mean (SD)		68.6 (11.7)	65.9 (10.9)
Sex, n (%)	Male	10 (26.3)	28 (73.7)
	Female	4 (36.4)	7 (63.6)
Smoking history, n (%)	Current or Former	12 (27.3)	32 (72.7)
	Never	2 (40.0)	3 (60.0)
PS, n (%)	0-2	11 (23.9)	35 (76.1)
	3-4	3 (100.0)	0 (0.0)
PD-L1 tumor proportion score	≥50%	2 (22.2)	7 (77.8)
	1-49%	5 (31.3)	11 (68.8)
	<1%	2 (18.2)	9 (81.8)
	unknown	5 (38.5)	8 (61.5)
ICI, n (%)	Anti-PD-1	4 (33.3)	8 (66.7)
	Anti-PD-L1	8 (28.6)	20 (71.4)
	Anti-PD-1+CTLA4	2 (22.2)	7 (77.8)
Chemotherapy (+DEX) ^a , n (%)	Yes	8 (22.2)	28 (77.8)
	No	6 (46.2)	7 (53.8)
Use of immunosuppressants (IS) ^b , n (%)	Yes ^c	8 (22.2)	19 (70.3)
	No	6 (27.3)	16 (72.7)
irAE, n	Hematologic		14
	Pneumonitis		8
	Nephritis		5
	Skin		5
	Thyroid		4
	Hepatitis		2
	Other ^d		10

DEX, dexamethasone; irAE, immune-related adverse event; IS, immunosuppressants; PS, performance status; PSL, prednisolone; SD, standard deviation. ^a All the patients who received ICIs combined with chemotherapy were treated with DEX as premedication. ^b IS include orally administered steroids (n=11), tacrolimus (n=1), inhaled steroids (n=3), as well as topical steroids. ^c IS-treated patients are defined as those who received IS in the period from one month before to one month after initial ICI administration. ^d Other includes the irAE of infusion reaction (n=3), fever (n=2), adrenal (n=1), cardiac (n=1), diarrhea (n=1), hypophysitis (n=1), neurologic (n=1).

Supplementary Table III-2

Spearman's rank correlation matrix and the significance of relevant variables in the patients with NSCLC.

	Age	Sex (male)	Smokin g	PS	Chemotherapy	Use of IS	irAE	Pre % ICOS+ CD4+ T cells in PBMC	4wks % ICOS+ CD4+ T cells in PBMC	Δ % ICOS+ CD4+ T cells in PBMC	Fold induction of CXCL13 in plasma	Fold induction of IL-6 In plasma
Age												
Sex (male)	-0.20 (0.21)											
Smoking	-0.13 (0.39)	0.58 (<0.01*)										
PS ^a	0.09 (0.56)	0.07 (0.66)	-0.08 (0.60)									
Chemotherapy	-0.18 (0.24)	-0.01 (0.97)	0.04 (0.82)	-0.31 (0.04*)								
Use of IS	0.10 (0.54)	0.05 (0.75)	0.35 (0.02*)	-0.01 (0.97)	-0.12 (0.43)							
irAE	-0.12 (0.44)	0.15 (0.32)	0.16 (0.30)	-0.07 (0.65)	0.20 (0.20)	0.06 (0.72)						
Pre % ICOS+ CD4+ T cells in PBMC	-0.20 (0.19)	-0.21 (0.16)	-0.31 (0.04*)	-0.13 (0.39)	0.13 (0.41)	-0.19 (0.22)	-0.08 (0.60)					
4wks % ICOS+ CD4+ T cells in PBMC	-0.17 (0.28)	-0.13 (0.41)	-0.10 (0.52)	-0.22 (0.15)	-0.03 (0.83)	-0.20 (0.19)	0.23 (0.13)	0.74 (<0.01*)				
Δ % ICOS+ CD4+ T cells in PBMC	0.10 (0.50)	0.17 (0.27)	0.20 (0.20)	-0.08 (0.61)	-0.15 (0.32)	0.01 (0.93)	0.37 (0.01*)	-0.25 (0.10)	0.38 (0.01*)			
Fold induction of CXCL13 in plasma	-0.10 (0.52)	0.02 (0.91)	0.04 (0.81)	0.09 (0.55)	0.12 (0.43)	0.02 (0.91)	0.34 (0.03*)	-0.03 (0.84)	0.04 (0.82)	0.14 (0.36)		
Fold induction of IL-6 In plasma	-0.02 (0.88)	-0.15 (0.33)	0.03 (0.87)	0.32 (0.04*)	-0.13 (0.41)	0.03 (0.84)	-0.27 (0.08)	0.15 (0.33)	<0.01 (0.98)	-0.23 (0.13)	0.25 (0.10)	

irAE, immune-related adverse event; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; IS, immunosuppressants. The values given in parentheses indicate p-value. ^a

PS: performance status (0-3). * Statistically significant.

Supplementary Table III-3

Spearman's rank correlation matrix and the significance of relevant variables in the NSCLC patients with irAE pneumonitis and non-irAE.

	Age	Sex (male)	Smoking	PS	Chemotherapy	Use of IS	irAE pneumonitis	Pre % ICOS+ CD4+ T cells in PBMC	4wks % ICOS+ CD4+ T cells in PBMC	Δ % ICOS+ CD4+ T cells in PBMC	Fold induction of CXCL13 in plasma	Fold induction of IL-6 In plasma
Age												
Sex (male)	0.06 (0.80)											
Smoking	0.18 (0.44)	0.73 (<0.01*)										
PS ^a	0.09 (0.71)	0.12 (0.61)	-0.10 (0.69)									
Chemotherapy	-0.27 (0.26)	-0.13 (0.60)	0.03 (0.90)	-0.61 (<0.01*)								
Use of IS	0.13 (0.58)	0.35 (0.14)	0.42 (0.34)	-0.05 (0.84)	-0.22 (0.36)							
irAE pneumonitis	0.10 (0.68)	0.24 (0.32)	0.06 (0.81)	0.13 (0.59)	0.09 (0.71)	0.00 (1.00)						
Pre % ICOS+ CD4+ T cells in PBMC	-0.15 (0.52)	-0.45 (0.05)	-0.47 (0.04*)	-0.20 (0.40)	-0.10 (0.69)	-0.40 (0.08)	-0.41 (0.08)					
4wks % ICOS+ CD4+ T cells in PBMC	0.08 (0.75)	-0.33 (0.16)	-0.38 (0.10)	-0.31 (0.18)	-0.02 (0.94)	-0.33 (0.16)	-0.02 (0.94)	0.78 (<0.01*)				
Δ % ICOS+ CD4+ T cells in PBMC	0.41 (0.08)	0.27 (0.25)	0.11 (0.65)	-0.05 (0.83)	-0.27 (0.26)	0.35 (0.13)	0.58 (<0.01*)	-0.32 (0.17)	0.15 (0.54)			
Fold induction of CXCL13 in plasma	-0.23 (0.34)	0.11 (0.64)	0.06 (0.80)	0.24 (0.30)	0.15 (0.52)	0.17 (0.47)	0.46 (0.04*)	-0.34 (0.15)	-0.38 (0.10)	0.16 (0.49)		
Fold induction of IL-6 In plasma	0.05 (0.85)	0.01 (0.97)	0.26 (0.28)	0.40 (0.08)	0.00 (1.00)	-0.05 (0.83)	-0.20 (0.41)	-0.02 (0.94)	-0.26 (0.27)	-0.40 (0.08)	0.31 (0.18)	

irAE, immune-related adverse event; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; IS, immunosuppressants. The values given in parentheses indicate p-value. a

PS: performance status (0-3). * Statistically significant

Supplementary Table III-4

Multivariate analysis association between irAE development and clinical variables in NSCLC patients.

Variable	Coefficient	Odds ratio (95% CI)	<i>P</i> value
Δ % ICOS+CD4+ T cells in PBMC	0.61	1.83 (0.93-3.59)	0.08
Fold induction of CXCL13 in plasma	1.42	4.15 (1.08-15.95)	0.04
Constant	-0.69	0.50	0.04

CI, confidence interval.

Supplementary Table III-5

Multivariate analysis association between development of irAE pneumonitis and clinical variables in NSCLC patients.

Variable	Coefficient	Odds ratio (95% CI)	<i>P</i> value
Δ % ICOS+CD4+ T cells in PBMC	1.09	2.97 (0.89-9.91)	0.08
Fold induction of CXCL13 in plasma	2.29	9.88 (0.66-147.16)	0.10
Constant	-3.44	0.03	0.06

Propensity score = $1 / (1 + \text{Exp} (3.44 - 2.29 \times \text{Fold induction of CXCL13 in plasma} - 1.09 \times \Delta \% \text{ ICOS+CD4+ T cells in PBMC}))$.

CI, confidence interval.

Supplementary Table III-6.**The sequence of primers for quantitative real-time PCR in this study**

Gene name	Primer sequence forward (5'-3')	reverse
Mouse <i>Il2</i>	GCGGCATGTTCTGGATTTGACTC	CCACCACAGTTGCTGACTCATC
Mouse <i>Il17a</i>	CTCAAAGCTCAGCGTGTCCAAACA	TATCAGGGTCTTCATTGCGGTGGA
Mouse <i>Il10</i>	GCTCTTACTGACTGGCATGAG	CGCAGCTCTAGGAGCATGTG
Mouse <i>Il22</i>	TGCTTCTCATTGCCCTGTG	TGGATGTTCTGGTCGTCACC
Mouse <i>Spp1</i>	AGCAAGAACTCTTCCAAGCAA	GTGAGATTTCGTCAGATTCATCCG
Mouse <i>Ccr5</i>	TGCACAAAGAGACTTGAGGCA	AGTGGTTCTTCCCTGTTGGCA
Mouse <i>Cx3cr1</i>	TGTCCACCTCCTTCCCTGAA	TCGCCCAAATAACAGGCC

結 論

以上、三章にわたり、筆者は ICI-ILD の発症機序の解明および重症化関連因子の同定を目的とし、以下の結論を得た。

第I章 ICI-ILD の検出契機となる自覚症状および重症度との関連に関する研究

ICI 投与患者を対象とした後方視的観察研究により、ICI-ILD の検出契機としての自覚症状と ILD 重症度との関連を検討した。その結果、呼吸器症状は ICI-ILD の検出契機として一定の役割を果たすものの、症状の有無や程度のみから重症化を正確に予測することは困難である実態を明らかにした。

第II章 血清による ICI 関連肺障害の重症度関連バイオマーカー探索研究

ICI 投与後肺障害発症患者を対象とした血清プロテオーム解析により、ILD 重症群で軽症群に比べ血清 MCP-3、IL-6、MUC-16 の上昇および TRAIL の低下が認められ、ICI-ILD における新たな免疫学的指標の可能性を見出した。

第III章 モデルマウスを用いた ICI-ILD の発症機序解明およびヒトへの外挿可能性の検討

ICI-ILD モデルマウスによる免疫学的な症機序解明により、ICOS⁺CD4 T 細胞が ICI-ILD 発症に寄与することを明らかにした。さらに、非小細胞肺癌患者の血液検体を用いたヒトへの外挿可能性の検討により、ICOS⁺CD4 T 細胞が ICI-ILD の発症予測マーカーとなる可能性を示した。

以上より、筆者は ICI-ILD において、臨床学的特徴、血清バイオマーカーを用いた重症化関連因子探索により、検出契機に対する実態把握および ILD の重症度に対する免疫学的病態の差異を明らかにした。さらに、ICI-ILD の発症機序について、動物モデルおよびヒト検体を用いた統合研究により、ICOS⁺CD4 T 細胞を介した免疫学的病態基盤を解明し、本疾患の病態理解を深化させることに成功した。本研究成果は、ICI-ILD の早期発見および重症化予測に資する指標の確立に貢献するのみならず、発症機序に基づく新たな診断法および治療戦略の構築に向けた重要な基盤になりうると考える。

謝 辞

終わりに鑑み、本研究に際して終始御懇篤なる御指導、ご鞭撻を賜りました京都大学医学部附属病院薬剤部 寺田 智祐 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。また、研究遂行や論文執筆にあたり直接ご指導を賜り、平素より有益な御助言を戴きました慶應義塾大学薬学部 米澤 淳 教授、京都大学大学院医学研究科附属 がん免疫総合研究センター がん免疫治療臨床免疫学部門 村上 孝作 特定准教授、塚本 博丈 特定准教授、ならびに京都大学大学院薬学研究科 臨床薬学教育分野 平 大樹 准教授に心から感謝申し上げます。多くの有益な御助言と御指導を戴きました京都大学医学部附属病院薬剤部 中川 俊作 准教授、重面 雄紀 助教、今吉 菜月 助教、勝部 友里恵 特定助教、幾田 慧子 特定助教、梅村 圭祐 特定助教、京都大学医学部附属病院 免疫・膠原病内科 白柏 魅怜 特定病院助教に深く感謝いたします。多大な御助言と御指導を戴きました京都大学医学部附属病院 中川 貴之 准教授（現 和歌山県立医科大学薬学部 教授）、今井 哲司 講師（現 和歌山県立医科大学薬学部 教授）、國津 侑貴 助教（現 厚生労働省）、京都大学大学院薬学研究科 臨床薬学教育分野 津田 真弘 准教授（現 福井大学医学部附属病院薬剤部 教授）に感謝の意を表します。また、本研究の実施にあたり多大なる御協力を賜りました京都大学医学部附属病院 呼吸器内科 小笹 裕晃 講師、吉田 博徳 助教、糸谷 涼 医員（現 厚生労働省）、京都大学大学院医学研究科 呼吸不全先進医療講座 半田 知宏 特定准教授、京都大学医学部附属病院 腫瘍内科 武藤 学 教授、京都大学大学院医学研究科 頭頸部腫瘍先進治療学講座 野村 基雄 特定講師に心からの感謝とお礼を申し上げます。

本研究の遂行にあたり、圓東 寛基 氏、榊原 一考 氏、荻堂 亮甫 氏、長谷部 依央 氏、畠添 咲希子 氏、小島 勇人 氏、長縄 華子 氏をはじめとする京都大学医学部附属病院薬剤部研究室、吉田 亜希子 氏、吉田 常恭 氏、佐藤 勇樹 氏をはじめとする京都大学大学院医学研究科附属 がん免疫総合研究センター がん免疫治療臨床免疫学部門ならびに京都大学大学院医学研究科附属 がん免疫総合研究センター、京都大学医学部附属病院 irAE ユニットの諸氏に日々の感謝を申し上げます。

本研究は日本学術振興会 科学研究費助成事業 22H04297、25KJ1590、JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2110 の支援を受けたものです。日本学術振興会および京都大学大学院教育支援機構の皆様に謹んで御礼申し上げます。

最後に、本研究に専念できる環境を整え、いかなる時も温かく見守り励まし続けてくれた両親をはじめとする家族、ならびにこれまで支えてくださったすべての大切な方々に、心より深く感謝申し上げます。

論文目録

本研究の内容は、以下の論文に発表した。

Yokoi M., Yonezawa A., Hira D., Handa T., Tanizawa K., Nakagawa S., Tsuda M., Ikemi Y., Itotani R., Yoshida H., Nomura M., Matsubara J., Murakami K., Ozasa H., Muto M. & Terada T. Subjective symptoms are triggers for the detection of immune checkpoint inhibitor-induced interstitial lung disease and associate with disease severity: a single-center retrospective study. *J Pharm Health Care Sci* 10, 52, (2024).

Yokoi M., Murakami K., Yaguchi T., Chamoto K., Ozasa H., Yoshida H., Shirakashi M., Ito K., Komohara Y., Fujiwara Y., Yano H., Ogimoto T., Hira D., Terada T., Hirai T. & Tsukamoto H. ICOS+CD4 T cells define a high susceptibility to anti-PD-1 therapy-induced lung pathogenesis. *JCI Insight*, e186483, (2025).

引用文献

1. Yu, J.X., Hodge, J.P., Oliva, C., Neftelinov, S.T., Hubbard-Lucey, V.M., and Tang, J. (2020). Trends in clinical development for PD-1/PD-L1 inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery* 19, 163-164. 10.1038/d41573-019-00182-w.
2. Suijkerbuijk, K.P.M., van Eijs, M.J.M., van Wijk, F., and Eggermont, A.M.M. (2024). Clinical and translational attributes of immune-related adverse events. *Nature Cancer*. 10.1038/s43018-024-00730-3.
3. Wang, D.Y., Salem, J.E., Cohen, J.V., Chandra, S., Menzer, C., Ye, F., Zhao, S., Das, S., Beckermann, K.E., Ha, L., et al. (2018). Fatal Toxic Effects Associated With Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol* 4, 1721-1728. 10.1001/jamaoncol.2018.3923.
4. Morita, R., Okishio, K., Shimizu, J., Saito, H., Sakai, H., Kim, Y.H., Hataji, O., Yomota, M., Nishio, M., Aoe, K., et al. (2020). Real-world effectiveness and safety of nivolumab in patients with non-small cell lung cancer: A multicenter retrospective observational study in Japan. *Lung Cancer* 140, 8-18. 10.1016/j.lungcan.2019.11.014.
5. Da, L.J., Teng, Y.J., Wang, N., Zaguirre, K., Liu, Y.T., Qi, Y.L., and Song, F.X. (2020). Organ-Specific Immune-Related Adverse Events Associated With Immune Checkpoint Inhibitor Monotherapy Versus Combination Therapy in Cancer: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Front Pharmacol* 10. ARTN 1671. 10.3389/fphar.2019.01671.
6. Nebhan, C.A., Cortellini, A., Ma, W.J., Ganta, T., Song, H.C., Ye, F., Irlmeier, R., Debnath, N., Saeed, A., Radford, M., et al. (2021). Clinical Outcomes and Toxic Effects of Single-Agent Immune Checkpoint Inhibitors Among Patients Aged 80 Years or Older With Cancer A Multicenter International Cohort Study. *Jama Oncology* 7, 1856-1861. 10.1001/jamaoncol.2021.4960.
7. Matsukane, R., Suetsugu, K., Hata, K., Matsuda, K., Nakao, S., Minami, H., Watanabe, H., Hirota, T., Egashira, N., and Ieiri, I. (2023). Systematic surveillance of immune-related adverse events in clinical practice and impact of subsequent steroid medication on survival outcomes. *Int J Clin Oncol* 28, 860-871. 10.1007/s10147-023-02349-3.
8. Saito, Y., Sasaki, S., Oikado, K., Tominaga, J., Sata, M., Sakai, F., Kato, T., Iwasawa, T., Kenmotsu, H., Kusumoto, M., et al. (2021). Radiographic features and poor prognostic factors

- of interstitial lung disease with nivolumab for non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 112, 1495-1505. 10.1111/cas.14710.
9. Lin, X., Chen, X., Long, X., Zeng, C., Zhang, Z., Fang, W., and Xu, P. (2023). New biomarkers exploration and nomogram construction of prognostic and immune-related adverse events of advanced non-small cell lung cancer patients receiving immune checkpoint inhibitors. *Respir Res* 24, 64. 10.1186/s12931-023-02370-0.
 10. Tang, S.Q., Tang, L.L., Mao, Y.P., Li, W.F., Chen, L., Zhang, Y., Guo, Y., Liu, Q., Sun, Y., Xu, C., and Ma, J. (2021). The Pattern of Time to Onset and Resolution of Immune-Related Adverse Events Caused by Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer: A Pooled Analysis of 23 Clinical Trials and 8,436 Patients. *Cancer Res Treat* 53, 339-354. 10.4143/crt.2020.790.
 11. Zhai, X., Zhang, J., Tian, Y., Li, J., Jing, W., Guo, H., and Zhu, H. (2020). The mechanism and risk factors for immune checkpoint inhibitor pneumonitis in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Biol Med* 17, 599-611. 10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0102.
 12. Bai, X., Hu, J.N., Warner, A.B., Quach, H.T., Cann, C.G., Zhang, M.Z., Si, L., Tang, B.X., Cui, C.L., Yang, X.L., et al. (2021). Early Use of High-Dose Glucocorticoid for the Management of irAE Is Associated with Poorer Survival in Patients with Advanced Melanoma Treated with Anti-PD-1 Monotherapy. *Clinical Cancer Research* 27, 5993-6000. 10.1158/1078-0432.Ccr-21-1283.
 13. Arbour, K.C., Mezquita, L., Long, N., Rizvi, H., Auclin, E., Ni, A., Martínez-Bernal, G., Ferrara, R., Lai, W.V., Hendriks, L.E.L., et al. (2018). Impact of Baseline Steroids on Efficacy of Programmed Cell Death-1 and Programmed Death-Ligand 1 Blockade in Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology* 36, 2872-+. 10.1200/Jco.2018.79.0006.
 14. Kanjanapan, Y., Day, D., Butler, M.O., Wang, L., Joshua, A.M., Hogg, D., Leighl, N.B., Razak, A.R.A., Hansen, A.R., Boujos, S., et al. (2019). Delayed immune-related adverse events in assessment for dose-limiting toxicity in early phase immunotherapy trials. *Eur J Cancer* 107, 1-7. 10.1016/j.ejca.2018.10.017.
 15. Griewing, L.M., Schweizer, C., Schubert, P., Rutzner, S., Eckstein, M., Frey, B., Haderlein, M., Weissmann, T., Semrau, S., Gostian, A.O., et al. (2021). Questionnaire-based detection of immune-related adverse events in cancer patients treated with PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors. *BMC Cancer* 21, 314. 10.1186/s12885-021-08006-0.
 16. Cadranel, J., Canellas, A., Matton, L., Darrason, M., Parrot, A., Naccache, J.M., Lavole, A.,

- Ruppert, A.M., and Fallet, V. (2019). Pulmonary complications of immune checkpoint inhibitors in patients with nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir Rev* 28. 10.1183/16000617.0058-2019.
17. Delaunay, M., Prevot, G., Collot, S., Guilleminault, L., Didier, A., and Mazieres, J. (2019). Management of pulmonary toxicity associated with immune checkpoint inhibitors. *Eur Respir Rev* 28. 10.1183/16000617.0012-2019.
 18. Aso, S., Kawamura, N., Yanagida, H., Nakajima, K., Ishikawa, H., Omori, S., Murakami, H., Takahashi, T., and Naito, T. (2022). Exploring the educational needs for severe immune-related adverse events of PD-1/PD-L1 inhibitors in advanced lung cancer: A single-center observational study. *Asia Pac J Oncol Nurs* 9, 100076. 10.1016/j.apjon.2022.100076.
 19. Burotto, M., Zvirbulė, Z., Mochalova, A., Runglodvatana, Y., Herraéz-Baranda, L., Liu, S.N., Chan, P., Shearer-Kang, E., Liu, X., Tosti, N., et al. (2023). IMscin001 Part 2: a randomised phase III, open-label, multicentre study examining the pharmacokinetics, efficacy, immunogenicity, and safety of atezolizumab subcutaneous versus intravenous administration in previously treated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer and pharmacokinetics comparison with other approved indications. *Ann Oncol* 34, 693-702. 10.1016/j.annonc.2023.05.009.
 20. ONO PHARMACEUTICAL CO., L.
<https://www.ono-oncology.jp/medical/medical-support/fukusapo>.
 21. Lin, X., Deng, H., Yang, Y., Wu, J., Qiu, G., Li, S., Xie, X., Liu, M., Xie, Z., Qin, Y., et al. (2021). Peripheral Blood Biomarkers for Early Diagnosis, Severity, and Prognosis of Checkpoint Inhibitor-Related Pneumonitis in Patients With Lung Cancer. *Front Oncol* 11, 698832. 10.3389/fonc.2021.698832.
 22. Kowalski, B., Valaperti, A., Bezel, P., Steiner, U.C., Scholtze, D., Wieser, S., Vonow-Eisenring, M., Widmer, A., Kohler, M., and Franzen, D. (2022). Analysis of cytokines in serum and bronchoalveolar lavage fluid in patients with immune-checkpoint inhibitor-associated pneumonitis: a cross-sectional case-control study. *J Cancer Res Clin Oncol* 148, 1711-1720. 10.1007/s00432-021-03750-z.
 23. Khan, S., Khan, S.A., Luo, X., Fattah, F.J., Saltarski, J., Gloria-McCutchen, Y., Lu, R., Xie, Y., Li, Q., Wakeland, E., and Gerber, D.E. (2019). Immune dysregulation in cancer patients developing immune-related adverse events. *Br J Cancer* 120, 63-68. 10.1038/s41416-018-0155-1.

24. Miura, Y., Motoshima, T., Anami, T., Yano, H., Mito, R., Pan, C., Urakami, S., Kinowaki, K., Tsukamoto, H., Kurahashi, R., et al. (2023). Predictive value of CXCL10 for the occurrence of immune-related adverse events in patient with renal cell carcinoma. *Microbiol Immunol* 67, 345-354. 10.1111/1348-0421.13067.
25. Assarsson, E., Lundberg, M., Holmquist, G., Bjorkesten, J., Thorsen, S.B., Ekman, D., Eriksson, A., Rennel Dickens, E., Ohlsson, S., Edfeldt, G., et al. (2014). Homogenous 96-plex PEA immunoassay exhibiting high sensitivity, specificity, and excellent scalability. *PLoS One* 9, e95192. 10.1371/journal.pone.0095192.
26. Wiklund, S., Johansson, E., Sjostrom, L., Mellerowicz, E.J., Edlund, U., Shockcor, J.P., Gottfries, J., Moritz, T., and Trygg, J. (2008). Visualization of GC/TOF-MS-based metabolomics data for identification of biochemically interesting compounds using OPLS class models. *Anal Chem* 80, 115-122. 10.1021/ac0713510.
27. Griffith, J.W., Sokol, C.L., and Luster, A.D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* 32, 659-702. 10.1146/annurev-immunol-032713-120145.
28. Kalafatis, D., Loef Dahl, A., Naesman, P., Dellgren, G., Wheelock, A.M., Rendin, L.E., Skoeld, M., and Westergren-Thorsson, G. (2021). Distal Lung Microenvironment Triggers Release of Mediators Recognized as Potential Systemic Biomarkers for Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *International Journal of Molecular Sciences* 22. ARTN 13421. 10.3390/ijms222413421.
29. Svobodova, B., Lofdahl, A., Nybom, A., Wigen, J., Hirdman, G., Olm, F., Brunnstrom, H., Lindstedt, S., Westergren-Thorsson, G., and Elowsson, L. (2024). Overlapping Systemic Proteins in COVID-19 and Lung Fibrosis Associated with Tissue Remodeling and Inflammation. *Biomedicines* 12. 10.3390/biomedicines12122893.
30. Yang, Y., Shen, C., Li, J., Yuan, J., Wei, J., Huang, F., Wang, F., Li, G., Li, Y., Xing, L., et al. (2020). Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. *J Allergy Clin Immunol* 146, 119-127 e114. 10.1016/j.jaci.2020.04.027.
31. Costantini, A., Takam Kamga, P., Julie, C., Corjon, A., Dumenil, C., Dumoulin, J., Ouaknine, J., Giraud, V., Chinet, T., Rottman, M., et al. (2020). Plasma Biomarkers Screening by Multiplex ELISA Assay in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancers (Basel)* 13. 10.3390/cancers13010097.

32. Thorburn, A. (2007). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) pathway signaling. *J Thorac Oncol* 2, 461-465. 10.1097/JTO.0b013e31805fea64.
33. Gyurkovska, V., and Ivanovska, N. (2016). Distinct roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in viral and bacterial infections: from pathogenesis to pathogen clearance. *Inflamm Res* 65, 427-437. 10.1007/s00011-016-0934-1.
34. Lillehoj, E.P., Kato, K., Lu, W., and Kim, K.C. (2013). Cellular and molecular biology of airway mucins. *Int Rev Cell Mol Biol* 303, 139-202. 10.1016/B978-0-12-407697-6.00004-0.
35. Hammoudeh, S.M., Hammoudeh, A.M., Bhamidimarri, P.M., Al Safar, H., Mahboub, B., Kunstner, A., Busch, H., Halwani, R., Hamid, Q., Rahmani, M., and Hamoudi, R. (2021). Systems Immunology Analysis Reveals the Contribution of Pulmonary and Extrapulmonary Tissues to the Immunopathogenesis of Severe COVID-19 Patients. *Front Immunol* 12, 595150. 10.3389/fimmu.2021.595150.
36. Hollingsworth, M.A., and Swanson, B.J. (2004). Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 4, 45-60. 10.1038/nrc1251.
37. Murata, D., Azuma, K., Murotani, K., Ito, K., Nomizo, T., Yamada, K., Imabayashi, T., Iwanaga, K., Chibana, K., Ota, T., et al. (2025). Immune checkpoint inhibitor-induced interstitial lung disease with and without CTLA-4 regimen in non-small cell lung cancer patients and PD-L1 < 1 %: A multicenter, retrospective study. *Lung Cancer* 209, 108772. 10.1016/j.lungcan.2025.108772.
38. Suijkerbuijk, K.P.M., van Eijs, M.J.M., van Wijk, F., and Eggermont, A.M.M. (2024). Clinical and translational attributes of immune-related adverse events. *Nat Cancer* 5, 557-571. 10.1038/s43018-024-00730-3.
39. de Moel, E.C., Rozeman, E.A., Kapiteijn, E.H., Verdegaal, E.M.E., Grummels, A., Bakker, J.A., Huizinga, T.W.J., Haanen, J.B., Toes, R.E.M., and van der Woude, D. (2019). Autoantibody Development under Treatment with Immune-Checkpoint Inhibitors. *Cancer Immunol Res* 7, 6-11. 10.1158/2326-6066.Cir-18-0245.
40. Flores-Chávez, A., Brito-Zerón, P., Retamozo, S., Bitoun, S., Fisher, B.A., Liew, D., Suijkerbuijk, K., Chatzidionysiou, K., Suárez-Almazor, J.M., Lambotte, O., et al. (2022). Using Autoantibodies to Diagnose Systemic Autoimmune Diseases Triggered by Immune Checkpoint Inhibitors: A Clinical Perspective. *Crit Rev Immunol* 42, 21-36. 10.1615/CritRevImmunol.2023047272.
41. Tsukamoto, H., Komohara, Y., Tomita, Y., Miura, Y., Motoshima, T., Imamura, K., Kimura,

- T., Ikeda, T., Fujiwara, Y., Yano, H., et al. (2022). Aging-associated and CD4 T-cell-dependent ectopic CXCL13 activation predisposes to anti-PD-1 therapy-induced adverse events. *Proc Natl Acad Sci U S A* *119*, e2205378119. 10.1073/pnas.2205378119.
42. Singh, S., Long, J.P., Tchakarov, A., Dong, Y., Yee, C., and Lin, J.S. (2022). Tertiary lymphoid structure signatures are associated with immune checkpoint inhibitor related acute interstitial nephritis. *JCI Insight*. 10.1172/jci.insight.165108.
 43. Tsukamoto, H., Senju, S., Matsumura, K., Swain, S.L., and Nishimura, Y. (2015). IL-6-mediated environmental conditioning of defective Th1 differentiation dampens antitumour immune responses in old age. *Nature Communications* *6*. ARTN 6702. 10.1038/ncomms7702.
 44. Keren, Z., Naor, S., Nussbaum, S., Golan, K., Itkin, T., Sasaki, Y., Schmidt-Suprian, M., Lapidot, T., and Melamed, D. (2011). B-cell depletion reactivates B lymphopoiesis in the BM and rejuvenates the B lineage in aging. *Blood* *117*, 3104-3112. 10.1182/blood-2010-09-307983.
 45. Knudsen, L., Weibel, E.R., Gundersen, H.J.G., Weinstein, F.V., and Ochs, M. (2010). Assessment of air space size characteristics by intercept (chord) measurement: an accurate and efficient stereological approach. *J Appl Physiol* *108*, 412-421. 10.1152/japplphysiol.01100.2009.
 46. Stahlbaum, D., Jablonski, R., Strek, M.E., Bestvina, C.M., Polley, M.Y., and Reid, P. (2023). Abnormalities on baseline chest imaging are risk factors for immune checkpoint inhibitor associated pneumonitis. *Resp Med* *217*. ARTN 107330. 10.1016/j.rmed.2023.107330.
 47. Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.H., and Dong, C. (2009). Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells. *Science* *325*, 1001-1005. 10.1126/science.1176676.
 48. Fukushima, Y., Sakamoto, K., Matsuda, M., Yoshikai, Y., Yagita, H., Kitamura, D., Chihara, M., Minato, N., and Hattori, M. (2022). interaction of CD153 with TCR/CD3 is crucial for the pathogenic activation of senescence-associated T cells. *Cell Reports* *40*. ARTN 111373. 10.1016/j.celrep.2022.111373.
 49. Shankar, B., Zhang, J.J., Naqash, A.R., Forde, P.M., Feliciano, J.L., Marrone, K.A., Ettinger, D.S., Hann, C.L., Brahmer, J.R., Ricciuti, B., et al. (2020). Multisystem Immune-Related Adverse Events Associated With Immune Checkpoint Inhibitors for Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Jama Oncology* *6*, 1952-1956. 10.1001/jamaoncol.2020.5012.

50. Rao, D.A., Gurish, M.F., Marshall, J.L., Slowikowski, K., Fonseka, C.Y., Liu, Y., Donlin, L.T., Henderson, L.A., Wei, K., Mizoguchi, F., et al. (2017). Pathologically expanded peripheral T helper cell subset drives B cells in rheumatoid arthritis. *Nature* 542, 110-114. 10.1038/nature20810.
51. Huang, X., Tian, T., Zhang, Y., Zhou, S., Hu, P., and Zhang, J. (2021). Age-Associated Changes in Adverse Events Arising From Anti-PD-(L)1 Therapy. *Front Oncol* 11, 619385. 10.3389/fonc.2021.619385.
52. Baldini, C., Romano, P.M., Voisin, A.L., Danlos, F.X., Champiat, S., Laghouati, S., Kfoury, M., Vincent, H., Postel-Vinay, S., Varga, A., et al. (2020). Impact of aging on immune-related adverse events generated by anti-programmed death (ligand)PD-(L)1 therapies. *European Journal of Cancer* 129, 71-79. 10.1016/j.ejca.2020.01.013.
53. Cook, S.L., Al Amin, M., Bari, S., Poonnen, P.J., Khasraw, M., and Johnson, M.O. (2024). Immune Checkpoint Inhibitors in Geriatric Oncology. *Curr Oncol Rep* 26, 562-572. 10.1007/s11912-024-01528-3.
54. Yu, L.X., Wan, Q.F., Liu, Q.M., Fan, Y., Zhou, Q.Z., Skowronski, A.A., Wang, S.M., Shao, Z.P., Liao, C.Y., Ding, L., et al. (2024). IgG is an aging factor that drives adipose tissue fibrosis and metabolic decline. *Cell Metab* 36. 10.1016/j.cmet.2024.01.015.
55. Ramos-Casals, M., Brito-Zerón, P., López-Soto, A., and Font, J. (2004). Systemic autoimmune diseases in elderly patients: Atypical presentation and association with neoplasia. *Autoimmun Rev* 3, 376-382. 10.1016/j.autrev.2003.12.002.
56. Bjursten, S., Pandita, A., Zhao, Z., Fröjd, C., Ny, L., Jensen, C., Ullerstam, T., Jespersen, H., Borén, J., Levin, M., et al. (2021). Early rise in brain damage markers and high ICOS expression in CD4+and CD8+T cells during checkpoint inhibitor-induced encephalomyelitis. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 9. ARTN e002732. 10.1136/jitc-2021-002732.
57. Simpson, T.R., Quezada, S.A., and Allison, J.P. (2010). Regulation of CD4 T cell activation and effector function by inducible costimulator (ICOS). *Curr Opin Immunol* 22, 326-332. 10.1016/j.coi.2010.01.001.
58. Odegard, J.M., Marks, B.R., DiPlacido, L.D., Poholek, A.C., Kono, D.H., Dong, C., Flavell, R.A., and Craft, J. (2008). ICOS-dependent extrafollicular helper T cells elicit IgG production via IL-21 in systemic autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine* 205, 2873-U2102. 10.1084/jem.20080840.
59. Goto, M., Takahashi, H., Yoshida, R., Itamiya, T., Nakano, M., Nagafuchi, Y., Harada, H.,

- Shimizu, T., Maeda, M., Kubota, A., et al. (2024). Age-associated CD4(+) T cells with B cell-promoting functions are regulated by ZEB2 in autoimmunity. *Sci Immunol* 9, eadk1643. 10.1126/sciimmunol.adk1643.
60. Lozano, A.X., Chaudhuri, A.A., Nene, A., Bacchiocchi, A., Earland, N., Vesely, M.D., Usmani, A., Turner, B.E., Steen, C.B., Luca, B.A., et al. (2022). T cell characteristics associated with toxicity to immune checkpoint blockade in patients with melanoma. *Nat Med* 28, 353-+. 10.1038/s41591-021-01623-z.
 61. Cabrita, R., Lauss, M., Sanna, A., Donia, M., Larsen, M.S., Mitra, S., Johansson, I., Phung, B., Harbst, K., Vallon-Christersson, J., et al. (2020). Tertiary lymphoid structures improve immunotherapy and survival in melanoma (vol 577, pg 561, 2020). *Nature* 580, E1-E1. 10.1038/s41586-020-2155-6.
 62. Xiao, Z.Y., Mayer, A.T., Nobashi, T.W., and Gambhir, S.S. (2020). ICOS Is an Indicator of T-cell-Mediated Response to Cancer Immunotherapy. *Cancer Res* 80, 3023-3032. 10.1158/0008-5472.Can-19-3265.
 63. Duhen, R., Fesneau, O., Samson, K.A., Frye, A.K., Beymer, M., Rajamanickam, V., Ross, D., Tran, E., Bernard, B., Weinberg, A.D., and Duhen, T. (2022). PD-1 and ICOS coexpression identifies tumor-reactive CD4 T cells in human solid tumors. *Journal of Clinical Investigation* 132. ARTN e156821. 10.1172/JCI156821.
 64. Martin-Orozco, N., Li, Y.F., Wang, Y.J., Liu, S.J., Hwu, P., Liu, Y.J., Dong, C., and Radvanyi, L. (2010). Melanoma Cells Express ICOS Ligand to Promote the Activation and Expansion of T-Regulatory Cells. *Cancer Res* 70, 9581-9590. 10.1158/0008-5472.Can-10-1379.
 65. Liakou, C.I., Kamat, A., Tang, D.N., Chen, H., Sun, J.J., Troncoso, P., Logothetis, C., and Sharma, P. (2008). CTLA-4 blockade increases IFN γ -producing CD4 ICOS cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients. *P Natl Acad Sci USA* 105, 14987-14992. 10.1073/pnas.0806075105.
 66. Yap, T.A., Gainor, J.F., Callahan, M.K., Falchook, G.S., Pachynski, R.K., LoRusso, P., Kummar, S., Gibney, G.T., Burris, H.A., Tykodi, S.S., et al. (2022). First-in-Human Phase I/II ICONIC Trial of the ICOS Agonist Vopratelimab Alone and with Nivolumab: ICOS-High CD4 T-Cell Populations and Predictors of Response. *Clin Cancer Res* 28, 3695-3708. 10.1158/1078-0432.CCR-21-4256.
 67. Hilton, J.F., Ott, P.A., Hansen, A.R., Li, Z., Mathew, M., Messina, C.H., Dave, V., Ji, X., Karpnich, N.O., Hirschfeld, S., et al. (2024). INDUCE-2: A Phase I/II, open-label, two-part

- study of feladilimab in combination with tremelimumab in patients with advanced solid tumors. *Cancer Immunol Immunother* 73, 44. 10.1007/s00262-023-03623-z.
68. Nagase, H., Takeoka, T., Urakawa, S., Morimoto-Okazawa, A., Kawashima, A., Iwahori, K., Takiguchi, S., Nishikawa, H., Sato, E., Sakaguchi, S., et al. (2017). ICOS(+) Foxp3(+) TILs in gastric cancer are prognostic markers and effector regulatory T cells associated with *Helicobacter pylori*. *Int J Cancer* 140, 686-695. 10.1002/ijc.30475.
 69. Sainson, R.C.A., Thotakura, A.K., Kosmac, M., Borhis, G., Parveen, N., Kimber, R., Carvalho, J., Henderson, S.J., Pryke, K.L., Okell, T., et al. (2020). An Antibody Targeting ICOS Increases Intratumoral Cytotoxic to Regulatory T-cell Ratio and Induces Tumor Regression. *Cancer Immunol Res* 8, 1568-1582. 10.1158/2326-6066.CIR-20-0034.
 70. Gougis, P., Jochum, F., Abbar, B., Dumas, E., Bihan, K., Lebrun-Vignes, B., Moslehi, J., Spano, J.P., Laas, E., Hotton, J., et al. (2024). Clinical spectrum and evolution of immune-checkpoint inhibitors toxicities over a decade-a worldwide perspective. *EClinicalMedicine* 70, 102536. 10.1016/j.eclinm.2024.102536.
 71. Tanaka, H., Makiguchi, T., Tozuka, T., Kawashima, Y., Oba, T., Tsugitomi, R., Koyama, J., Tambo, Y., Ogusu, S., Saiki, M., et al. (2024). Comparison of immune checkpoint inhibitor plus chemotherapy or ipilimumab plus nivolumab-based therapy for NSCLC patients with PD-L1 TPS (1-49 %): TOPGAN2023-01. *Eur J Cancer* 213, 115117. 10.1016/j.ejca.2024.115117.
 72. van Eijs, M.J.M., ter Linde, J.J.M., Baars, M.J.D., Amini, M., Lacle, M.M., Brand, E.C., Delemarre, E.M., Drylewicz, J., Nierkens, S., Verheijden, R.J., et al. (2023). Highly multiplexed spatial analysis identifies tissue-resident memory T cells as drivers of ulcerative and immune checkpoint inhibitor colitis. *Iscience* 26. ARTN 107891. 10.1016/j.isci.2023.107891.