(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年8月27日(27.08.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/171138 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
A61K 45/00 (2006.01) *C12Q 1/06* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C07K 16/34 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2020/006616

(22) 国際出願日： 2020年2月19日(19.02.2020)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2019-028502 2019年2月20日(20.02.2019) JP
特願 2019-175852 2019年9月26日(26.09.2019) JP

(71) 出願人: 学校法人 埼玉医科大学 **(SAITAMA MEDICAL UNIVERSITY)** [JP/JP]; 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷３８ Saitama (JP).

(72) 発明者: 各務 博**(KAGAMU Hiroshi)**; 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷３８ 学校法人 埼玉医科大学内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 山本 秀策, 外**(YAMAMOTO Shusaku** et al.); 〒5300011 大阪府大阪市北区大深町３－１ グランフロント大阪 タワーＣ Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：
— 国際調査報告（条約第21条(3)）

(54) **Title:** PERIPHERAL BLOOD BIOMARKER FOR EVALUATING ANTI-TUMOR IMMUNE EFFECT OF RADIATION THERAPY

(54) 発明の名称： 放射線治療による抗腫瘍免疫効果を評価する末梢血バイオマーカー

(57) **Abstract:** Provided is a peripheral blood biomarker for evaluating the anti-tumor immune effect of radiation therapy. Also provided is a method in which the composition of cell subpopulation in a sample obtained from a subject is used as an index for immune activation in the subject caused by a radiation therapy. By comparing, with a reference, the amount of $CD4^+$ T cell subpopulation that correlates with dendritic cell stimulation in an anti-tumor immune response or the amount of dendritic cell subpopulation that correlates with the dendritic cell stimulation in an anti-tumor immune response, the presence or absence of, and/or the magnitude of, immune activation occurring in the subject as a result of a radiation therapy can be determined.

(57) 要約：放射線治療による抗腫瘍免疫効果を評価する末梢血バイオマーカーを提供する。本発明は、被験体から得られたサンプルにおける細胞亜集団の組成を、被験体における放射線治療による免疫活性化の指標とする方法を提供する。抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ４$^+$Ｔ細胞亜集団、または抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量を基準と比較することにより、被験体において生じている放射線治療による免疫活性化の有無および／または程度を決定することができる。

WO 2020/171138 A1

明　細　書

発明の名称 ：

放射線治療による抗腫瘍免疫効果を評価する末梢血バイオマーカー

技術分野

[0001] 本発明は、がん治療の分野に関連する。とりわけ、がん治療における放射線治療による免疫に対する影響の評価に関する。

背景技術

[0002] がんに対して放射線治療を行った際に、照射野の外に存在するがんについても退縮させる効果が報告されており、アブスコパル効果（abscopal effect）と呼ばれている。アブスコパル効果は何らかの免疫活性化を介して生じる現象であると考えられているが、その詳細な機構については不明点が多く、生じているアブスコパル効果を定量または評価するためのバイオマーカーは見出されていない。

発明の概要

課題を解決するための手段

[0003] 本発明は、被験体から得られたサンプルにおける細胞亜集団の組成を、被験体における放射線治療による免疫活性化の指標とする方法を提供する。本明細書に記載される特定の細胞亜集団の量を基準と比較することにより、被験体において生じている放射線治療による免疫活性化の有無および／または程度を決定することができる。

[0004] 本発明において指標として用い得る細胞亜集団としては、限定されるものではないが、抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団、抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団または抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞亜集団が挙げられる。抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団は、例えば、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞集団に含まれる細胞亜集団（例えば、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団自体、またはＩＣＯＳ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ

^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団など）である。抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団は、例えば、ＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$ＣＤ１４１$^{+}$ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞亜集団などである。抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞亜集団は、例えば、ＣＤ１３７$^{+}$ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞亜集団などである。

[0005] 本発明のさらなる実施形態では、被験体において生じている放射線治療による免疫活性化が示されることによって、かかる被験体に対してがん免疫療法を施すべきか否か、またはいつがん免疫療法を施すべきかが示され得る。放射線治療による免疫活性化が生じている時点で、がんに対する免疫反応を利用するがん免疫療法を施すことは有利であると考えられるが、これまでは、放射線治療により免疫活性化が生じているかを判断するためのバイオマーカーが存在しなかった。

[0006] がん免疫療法として、好ましくは、免疫チェックポイント阻害剤の投与を含むがん免疫療法が挙げられる。免疫チェックポイント阻害剤の投与は、他の形式の治療と併用されてもよく、また、異なる薬剤（例えば、異なる免疫チェックポイント阻害剤）と併用されてもよい。

[0007] 本発明の実施形態の例が、以下の項目に示される。

（項目１）

放射線治療を受けた被験体から得られたサンプルにおける細胞亜集団の組成を、該被験体における放射線治療による免疫活性化の指標とする方法であって、

該被験体から得られた該サンプルにおける細胞亜集団の組成を分析する工程を含み、

該サンプルにおける抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団の量と基準との比較により、該被験体における免疫活性化の有無が示される、方法。

（項目２）

放射線治療を受けた被験体から得られたサンプルにおける細胞亜集団の組

成を、該被験体における放射線治療による免疫活性化の指標とする方法であって、

該被験体から得られた該サンプルにおける細胞亜集団の組成を分析する工程を含み、

該サンプルにおける抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量と基準との比較により、該被験体における免疫活性化の有無が示される、方法。

（項目３）

放射線治療を受けた被験体から得られたサンプルにおける細胞亜集団の組成を、該被験体における放射線治療による免疫活性化の指標とする方法であって、

該被験体から得られた該サンプルにおける細胞亜集団の組成を分析する工程を含み、

該サンプルにおける抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞亜集団の量と基準との比較により、該被験体における免疫活性化の有無が示される、方法。

（項目４）

前記サンプルにおける抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団の量、抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量および抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞亜集団の量からなる群から選択される少なくとも２つの量と基準との比較により該被験体における免疫活性化の有無が示される、前記項目のいずれかに記載の方法。

（項目５）

前記抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団が、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞集団に含まれる細胞亜集団である、前記項目のいずれかに記載の方法。

（項目６）

前記抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団が、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団またはＣＣＲ７＋ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団である、前記項目のいずれかに記載の方法。

（項目７）

前記抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団が、ＩＣＯＳ＋ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＬＡＧ３＋ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＰＤ－１＋ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団またはＣＤ２８＋ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団である、前記項目のいずれかに記載の方法。

（項目８）

前記抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団が、ＨＬＡ－ＤＲ＋ＣＤ１４１＋ＣＤ１１ｃ＋細胞亜集団である、前記項目のいずれかに記載の方法。

（項目９）

前記抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するＣＤ８＋Ｔ細胞亜集団が、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ８＋Ｔ細胞集団に含まれる細胞亜集団である、前記項目のいずれかに記載の方法。

（項目１０）

前記抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するＣＤ８＋Ｔ細胞亜集団が、ＣＤ１３７＋ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ８＋Ｔ細胞亜集団である、前記項目のいずれかに記載の方法。

（項目１１）

前記サンプルが、末梢血サンプルである、前記項目のいずれかに記載の方法。

（項目１２）

前記基準が、前記放射線治療前の前記被験体のサンプルにおける前記細胞亜集団の量である、前記項目のいずれかに記載の方法。

（項目１３）

前記サンプルにおける前記細胞亜集団の量が、前記基準より増加していることは、前記被験体において放射線治療による免疫活性化が生じていることを示す、前記項目のいずれかに記載の方法。

（項目１４）

前記サンプルにおける前記細胞亜集団の量が、前記基準より増加していないことは、前記被験体において放射線治療による免疫活性化が生じていないことを示す、前記項目のいずれかに記載の方法。

（項目１５）

前記放射線治療が、腫瘍を含む照射範囲になされているものである、前記項目のいずれかに記載の方法。

（項目１６）

前記被験体において放射線治療による免疫活性化が生じていることにより、その時点で該被験体に免疫チェックポイント阻害剤を含むがん免疫療法を施すべきことがさらに示される、前記項目のいずれかに記載の方法。

（項目１７）

前記被験体において放射線治療による免疫活性化が生じていないことにより、該被験体に再度放射線治療を施すべきことがさらに示される、前記項目のいずれかに記載の方法。

（項目１８）

被験体から複数の時点で得られたサンプルにおける細胞亜集団の組成を、該被験体における放射線治療による免疫活性化をモニタリングするための指標とする方法としてさらに規定される、前記項目のいずれかに記載の方法であって、該被験体から複数の時点で得られたサンプルにおける細胞亜集団の組成を分析する工程を含む、方法。

（項目１９）

被験体におけるがんを処置するための免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物であって、

該組成物は、放射線治療を受けた被験体であって、前記項目のいずれかに

記載の方法によって該被験体において免疫活性化が生じていることが示されている被験体に投与されることを特徴とする、組成物。

（項目２０）

前記免疫チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－１阻害剤および／またはＰＤ－Ｌ１阻害剤である、前記項目に記載の組成物。

（項目２１）

１または複数のさらなる薬剤と組み合わせて投与されることをさらに特徴とする、前記項目のいずれかに記載の組成物。

（項目２２）

前記さらなる薬剤が、第２の免疫チェックポイント阻害剤を含む、前記項目のいずれかに記載の組成物。

（項目２３）

前記項目のいずれかに記載の組成物と、前記組成物が放射線治療と併用されることが記載された添付文書と、を含む製品。

（項目２４）

被験体において放射線治療による免疫活性化が生じているかを判定するためのキットであって、

（Ａ）ＣＤ４およびＣＤ６２Ｌ；

（Ｂ）（ｉ）ＩＣＯＳ、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３およびＣＤ２８から選択されるマーカー、（ｉｉ）ＣＤ４、ならびに（ｉｉｉ）ＣＤ６２Ｌ；

（Ｃ）ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１４１およびＨＬＡ－ＤＲ；

（Ｄ）ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１２３およびＨＬＡ－ＤＲ；あるいは

（Ｅ）ＣＤ８、ＣＤ６２ＬおよびＣＤ１３７

に対する検出剤を含む、キット。

（項目２５）

がんを処置するための免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物であって、放射線治療を受けた被験体に対して投与されることを特徴とし、該被験体は、放射線治療を受ける前に、がん免疫療法に対して応答性ではない免疫細

胞組成を有していた、組成物。

（項目２６）

前記がん免疫療法に対して応答性ではない免疫細胞組成は、閾値よりも低いＣＤ４$^{+}$ＣＤ６２Ｌ^{low}細胞亜集団の量または割合である、前記項目に記載の組成物。

（項目２７）

前記免疫チェックポイント阻害剤が、抗ＰＤ－１抗体および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体を含む、前記項目のいずれかに記載の組成物。

発明の効果

[0008] 本発明により、放射線治療による免疫活性化を定量または評価することができる。これにより、放射線治療により生じたプライミング相活性化及びエフェクターＴ細胞増加効果を経時的にモニタリングすることができる。さらに、本発明によって、放射線治療後どのタイミングで免疫チェックポイント（例えば、ＰＤ－１）阻害治療を行うべきか判断することができる。また、本発明のバイオマーカーは、Ｔ細胞プライミング効果を狙った放射線疑似ワクチン療法により免疫チェックポイント阻害薬無効型から有効型に変容させる治療の効果を評価するバイオマーカー、およびそのような変容のための処置が必要とされる患者を選択するための指標となり得る。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図１は、胸部放射線治療前と胸部放射線治療完了時との末梢血Ｔ細胞組成の変化を示す図である。左は、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞集団中のＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団の割合を示す。中は、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞集団中のＦＯＸＰ３$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団の割合を示す。右は、Ｔ細胞集団中のＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞亜集団の割合を示す。ＣＤ４$^{+}$細胞集団におけるＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団の割合が有意に増加していることが理解される。

[図2]図２は、胸部放射線治療前後での末梢血ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞組成の変化を示す図である。左上はＴ細胞集団中のＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団の割合を示す。右上はＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞集団中のＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団の割合を示す。

左下はＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞集団中のＩＣＯＳ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団の割合を示す。右下はＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞集団中のＦＯＸＰ３$^{+}$ＣＤ２５$^{+}$ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団の割合を示す。ＣＤ４$^{+}$細胞集団におけるＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団の割合、およびＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団におけるＩＣＯＳ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団の割合が有意に増加していることが理解される。

[図3]図３は、いくつかの治療種別ごとのＣＤ４$^{+}$細胞集団におけるＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団の割合の変化を示す図である。いずれの治療種別においても、放射線治療によってＣＤ４$^{+}$細胞集団におけるＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団の割合が増加傾向にあることが理解される。curative　TRT：治療目的胸部放射線治療、curative　CRT：治療目的化学療法併用放射線治療、palliative　TRT：緩和目的胸部放射線治療。

[図4]図４は、胸部放射線治療前後での末梢血ｍｙｅｌｏｉｄ系ＤＣ細胞組成の変化を示す図である。左はＣＤ１４１$^{+}$ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞集団中のＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$ＣＤ１４１$^{+}$ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞亜集団の割合を示す。右はＰＢＭＣ細胞集団中のＣＤ１４１$^{+}$ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞亜集団の割合を示す。ＣＤ１４１$^{+}$ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞集団におけるＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$ＣＤ１４１$^{+}$ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞亜集団の割合が有意に増加していることが理解される。

[図5]図５は、ＣＤ４$^{+}$細胞集団におけるＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団の割合およびＣＤ１４１$^{+}$ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞集団におけるＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$ＣＤ１４１$^{+}$ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞亜集団の割合の、放射線治療後約１ヶ月の時点までの変化を含めた図である。一時的に増加したＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団の割合およびＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$ＣＤ１４１$^{+}$ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞亜集団の割合が、放射線治療前の水準へと戻る傾向があった。

[図6]図６は、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞中のＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の割合と、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞中のエフェクターメモリー細胞（ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$）ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の割合との関係を示す図である。これらの細胞亜集団の量は強い相関関係にあることが理解される。

[図7]図７は、放射線治療前と放射線治療完了時との末梢血Ｔ細胞組成の変化を示す図である。図７ａは、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞集団中のＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団の割合の変化を示す（Ｐ＜０．０００１、対応有りのｔ検定）。図７ｂは、ＨＬＡ－ＤＲ^{high}ＣＤ１１ｃ$^{+}$ＣＤ１２３$^{-}$ｍＤＣ亜集団の割合の変化を示す（Ｐ＝０．０００８、対応有りのｔ検定）。図７ｃは、デュルバルマブ併用療法を受けなかった患者における、治療前の％ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞とＴＲＴまたはＣＲＴ後のＰＦＳとの相関を示す（ｎ＝３４）。

[図8]図８は、放射線治療前と放射線治療完了時とのＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞上の免疫チェックポイント分子の発現の変化を示す図である（対応有りのｔ検定）。

[図9]図９は、放射線治療前と放射線治療完了時との、ＣＣＲ７およびＣＤ４５ＲＡでゲーティングしたＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞に基づくＴ細胞亜集団の変化を示す図である。ｎａｉｖｅ：ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$、ＣＭ：ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$、ＥＭ：ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$（対応有りのｔ検定）。

[図10]図１０は、放射線治療前、放射線治療完了時および放射線治療約１ヶ月後までの、％ｍＤＣ、％ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞および免疫チェックポイント分子発現の動態を示す図である（Tukey　post-hoc分析を伴う一元配置ＡＮＯＶＡ）。

[図11]図１１は、放射線治療前と放射線治療完了時との、ＣＣＲ７およびＣＤ４５ＲＡでゲーティングしたＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞に基づくＴ細胞亜集団の変化を示す図である。ｎａｉｖｅ：ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$、ＣＭ：ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$、ＥＭ：ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$、ＥＭＲＡ：ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$（対応有りのｔ検定）。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本発明を最良の形態を示しながら説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「ａ」、「ａｎ」、「ｔｈｅ」など）は、特に言及しない限り、その複数形の

概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用される全ての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

[0011] 以下に本明細書において特に使用される用語の定義および／または基本的技術内容を適宜説明する。

[0012] （定義）

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

[0013] 本明細書において「がん」または「癌」は、互換可能に用いられ、異型性が強く、増殖が正常細胞より速く、周囲組織に破壊性に浸潤し得あるいは転移をおこし得る悪性腫瘍またはそのような悪性腫瘍が存在する状態をいう。本発明においては、がんは固形がんおよび造血器腫瘍を含むがそれらに限定されない。

[0014] 本明細書において、「がん免疫療法」とは、生物の有する免疫機構などの生体防御機構を用いてがんを治療する方法をいう。

[0015] 本明細書において、「抗腫瘍免疫応答」とは、生体内の腫瘍に対する任意の免疫応答をいう。

[0016] 本明細書において、「抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激」とは生体内の腫瘍に対する免疫応答の過程で発生する、樹状細胞を活性化する任意の刺激をいう。この刺激は、直接的ないし間接的に抗腫瘍免疫応答を生じる要因の一つとなり得る。限定されることはないが、代表的には、抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激は、ＣＤ４$^+$Ｔ細胞（例えば、エフェクターＴ細胞）による樹状細胞の活性化であり得、これによって活性化された樹状細胞がＣＤ８$^+$Ｔ細胞に刺激を与え、刺激を受けたＣＤ８$^+$Ｔ細胞が抗腫瘍効果を発揮す

る。

[0017] 本明細書において、「相関」するとは、２つの事象が統計学的に有意な相関関係を有することをいう。例えば、「Ａと相関するＢの相対量」とは、事象Ａが発生した場合に、Ｂの相対量が統計学的に有意に影響を受ける（例えば、増加ないし減少すること）ことをいう。

[0018] 本明細書において「フローサイトメトリー」とは、液体中に懸濁する細胞、個体およびその他の生物粒子の粒子数、個々の物理的・化学的・生物学的性状を計測する技術をいう。

[0019] 本明細書において、「免疫活性化」とは、免疫機能の体内における異物を排除する機能が増大することを指し、免疫機能において正に作用する任意の因子（例えば、免疫細胞またはサイトカイン）の量の増大によって示され得る。

[0020] 本明細書において、「細胞亜集団」とは、多様な特性の細胞を含む細胞集団中の、何らかの共通する特徴を有する任意の細胞の集合を指す。特定の名称が当技術分野で知られているものについては、かかる用語を用いて特定の細胞亜集団に言及することもでき、任意の性質（例えば、細胞表面マーカーの発現）を記載して特定の細胞亜集団に言及することもできる。

[0021] 本明細書において、ある細胞亜集団の「量」とは、ある細胞の絶対数と、細胞集団における割合の相対量とを包含する。例えば、本明細書において、「ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団の量」とは、ＣＤ４＋細胞の量に対する相対量であってもよい。また本明細書において、「細胞比率」とは、その細胞亜集団の量を意味し、例えば「ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞比率」とは、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団の量を意味する。

[0022] 本明細書において、細胞に関する用語「相対量」は、「割合」と互換可能に使用される。代表的には、用語「相対量」および「割合」は、特定の細胞集団（例えば、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞集団）を形成する細胞の数に対する、所期の細胞亜集団（例えば、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団）を形成する細胞の数を意味する。

[0023] 本明細書において、「基準」とは、本明細書に記載されるマーカーの量の増減を決定するための比較対象となる量を指す。ある処置（例えば、放射線治療）の前後でのある量の増減を決定する場合、例えば、「基準」としては処置の前における当該量や、当技術分野で一般的に目安とされる値が挙げられる。

[0024] 本明細書において数値を修飾して用いられる場合、「約」は、記載される数値の±１０％までの範囲を含むことを意味して用いられる。

[0025] 本明細書において、「放射線」とは、波の形または粒子による空間または物質中でのエネルギーの伝播を指す。

[0026] 本明細書において、「放射線治療」とは、放射線照射を用いる任意の治療法を指す。

[0027] （マーカー）

本発明の実施形態において、放射線治療を受けた被験体における細胞亜集団の組成を、被験体における放射線治療による免疫活性化の指標とする方法が提供される。方法は、サンプルにおける細胞亜集団の組成を分析する工程を含み得る。細胞亜集団の組成の分析は、本明細書に記載されるか、または当業者にとって公知である任意の方法によって行うことが可能である。方法は、インビトロまたはインシリコのものであってもよい。本発明の１つの実施形態において、細胞亜集団の量と適切な基準との比較により、被験体における免疫活性化の有無が示される。特に、細胞亜集団は、抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関する細胞亜集団を用いることができる。

[0028] １つの実施形態においては、指標となる細胞亜集団は、抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団である。例えば、本明細書の実施例においては、放射線治療前後で、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団量の増大が観察されている。ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は、抗腫瘍免疫において樹状細胞の活性化を担っている。抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団は、同様に、放射線治療による免疫活性化の指標として利用可能であると考えられる。

[0029] 抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団としては、例えば、二次リンパ臓器へのホーミング分子の発現が低下したＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、エフェクター型Ｔ細胞にプライミングされたＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、抗原認識によるプライミングを受けたＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、および、制御性Ｔ細胞亜集団が挙げられるがこれらに限定されない。

[0030] 樹状細胞刺激と相関するＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団の例として、例えば、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＬＡＧ－３＋ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＩＣＯＳ＋ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＣＣＲ４＋ＣＤ２５＋ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＣＤ４５ＲＯ＋ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＣＤ２８＋ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＣＤ６２Ｌ^{high}ＣＤ２５＋ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＣＤ１２７＋ＣＤ２５＋ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$Ｆｏｘｐ３＋ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、およびＦｏｘｐ３＋ＣＤ２５＋ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0031] 抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団は、例えば、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞集団に含まれる細胞亜集団であってよい。抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団としては、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団（すなわち、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞集団それ自体）、ＩＣＯＳ＋ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＩＣＯＳ＋ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＰＤ－１＋ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＰＤ－１＋ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＬＡＧ－３＋ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＬＡＧ－３＋ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＣＤ２８＋ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団およびＣＤ２８＋ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0032] １つの実施形態において、抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団（好ましくは、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞集団に含まれる細胞亜集団）は、無増悪生存（Ｐｒｏｇｒｅｓｓｉｏｎ　Ｆｒｅｅ　Ｓｕｒｖｉｖａｌ；ＰＦＳ）の指標になり得る。

[0033] 上記の細胞亜集団について、細胞亜集団の量を指標として用いることに換えてもしくは加えて、適切な細胞における適切な表面マーカー分子の発現量を指標として用いてもよい。例えば、ＣＤ４＋Ｔ細胞に発現するＩＣＯＳ、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、およびＣＤ２８等の発現量を指標として用いてもよい。より好ましくは、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４＋Ｔ細胞に発現するＩＣＯＳ、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３、およびＣＤ２８等の発現量を指標として用いてもよい。

[0034] １つの実施形態においては、指標となる細胞亜集団は、抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団である。例えば、本明細書の実施例においては、放射線治療前後で、ＨＬＡ－ＤＲ＋ＣＤ１４１＋ＣＤ１１ｃ＋細胞亜集団の増大が観察されている。ＨＬＡ－ＤＲは、ＣＤ４＋Ｔ細胞による樹状細胞の活性化を媒介する。抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団は、同様に、放射線治療による免疫活性化の指標として利用可能であると考えられる。ＣＤ１１ｃ＋ＣＤ１４１＋ＣＤ１２３－の細胞集団が、一般に機能的にＴｈ１誘導能の高い骨髄性樹状細胞（ｍＤＣ、抗腫瘍免疫に重要なＤＣ）とされるが、ＣＤ１４１とＣＤ１２３とは一般に排他的に発現されるため、本明細書においては、ＣＤ１４１＋ＣＤ１１ｃ＋としても、ＣＤ１２３－ＣＤ１１ｃ＋としても同じ細胞集団を特定することに留意されたい。

[0035] 抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団としては、例えば、ＣＤ４＋Ｔ細胞集団におけるホーミング分子の発現が低下した細胞亜集団の増加に起因して増加する樹状細胞亜集団、ＣＤ４＋Ｔ細胞集団におけるエフェクター型Ｔ細胞にプライミングされたＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団の増加に起因して増加する樹状細胞亜集団、および、ＣＤ４＋Ｔ細胞集団における抗原認識によるプライミングを受けたＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団の増加に起因して増加する樹状細胞亜集団が挙げられるがこれらに限定されない。また、樹状細胞亜集団としては、例えば、ＨＬＡ－ＤＲ＋樹状細胞亜集団、ＣＤ８０＋樹状細胞亜集団、ＣＤ８６＋樹状細胞亜集団、およびＰＤ－Ｌ１＋樹状細胞亜集団が挙げられるがこれらに限定されない。樹状細胞としては、例えば、骨髄樹状細胞（ｍＤＣ、ＣＤ１４１＋ＣＤ１１ｃ＋樹状細胞）および形質細胞様樹状細

胞（ｐＤＣ、ＣＤ１２３$^+$ＣＤ１１ｃ$^+$樹状細胞）が挙げられるがこれらに限定されない。

[0036] 抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団としては、ＨＬＡ－ＤＲ$^+$ＣＤ１４１$^+$ＣＤ１１ｃ$^+$細胞亜集団が挙げられる。上記の細胞亜集団について、細胞亜集団の量を指標として用いることに換えてもしくは加えて、適切な細胞における適切な表面マーカー分子の発現量を指標として用いてもよい。例えば、ＣＤ１４１$^+$ＣＤ１１ｃ$^+$細胞に発現するＨＬＡ－ＤＲ等の発現量を指標として用いてもよい。

[0037] １つの実施形態においては、指標となる細胞亜集団は、抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するＣＤ８$^+$Ｔ細胞亜集団である。例えば、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ８$^+$Ｔ細胞上に発現するＣＤ１３７について、放射線治療の前後で有意差をもって変化している（表４）。ＣＤ４$^+$Ｔ細胞による活性化を受けた樹状細胞は、ＣＤ８$^+$Ｔ細胞を刺激し、刺激を受けたＣＤ８$^+$Ｔ細胞が最終的に抗腫瘍活性を発揮する。ＣＤ８$^+$Ｔ細胞上のＣＤ１３７は、樹状細胞によるＣＤ８$^+$Ｔ細胞の刺激を媒介している。抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ８$^+$Ｔ細胞亜集団は、同様に、放射線治療による免疫活性化の指標として利用可能であると考えられる。

[0038] 抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ８$^+$Ｔ細胞亜集団としては、例えば、ＣＤ４$^+$Ｔ細胞集団におけるホーミング分子の発現が低下した細胞亜集団の増加に起因して増加するＣＤ８$^+$Ｔ細胞亜集団、ＣＤ４$^+$Ｔ細胞集団におけるエフェクター型Ｔ細胞にプライミングされたＣＤ４$^+$Ｔ細胞亜集団の増加に起因して増加するＣＤ８$^+$Ｔ細胞亜集団、ＣＤ４$^+$Ｔ細胞集団における抗原認識によるプライミングを受けたＣＤ４$^+$Ｔ細胞亜集団の増加に起因して増加するＣＤ８$^+$Ｔ細胞亜集団、樹状細胞集団におけるＨＬＡ－ＤＲ$^+$樹状細胞亜集団の増加に起因して増加するＣＤ８$^+$Ｔ細胞亜集団、樹状細胞集団におけるＣＤ８０$^+$樹状細胞亜集団の増加に起因して増加するＣＤ８$^+$Ｔ細胞亜集団、樹状細胞集団におけるＰＤ－Ｌ１$^+$樹状細胞亜集団の増加に起因して増加するＣＤ８$^+$Ｔ細胞亜集団が挙げられるがこれらに限定されない。さらに

、抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ８＋Ｔ細胞亜集団としては、例えば、ＣＤ６２Ｌｌｏｗ ＣＤ８＋Ｔ細胞亜集団、ＣＤ１３７＋ＣＤ８＋Ｔ細胞亜集団、およびＣＤ２８＋ＣＤ６２Ｌｌｏｗ ＣＤ８＋Ｔ細胞亜集団が挙げられるがこれらに限定されない。

[0039] 抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するＣＤ８＋Ｔ細胞亜集団としては、ＣＤ１３７＋ＣＤ６２Ｌｌｏｗ ＣＤ８＋Ｔ細胞亜集団が挙げられる。上記の細胞亜集団について、細胞亜集団の量を指標として用いることに換えてもしくは加えて、適切な細胞における適切な表面マーカー分子の発現量を指標として用いてもよい。例えば、ＣＤ６２Ｌｌｏｗ ＣＤ８＋Ｔ細胞に発現するＣＤ１３７、ＰＤ－１、またはＣＤ２８等の発現量を指標として用いてもよい。

[0040] 骨髄由来免疫抑制細胞（ＭＤＳＣ、ＣＤ３３＋ＣＤ１４＋ＨＬＡ－ＤＲ－細胞集団）は、放射線治療前後での有意な変化が観察されており、かかる細胞集団の割合も指標となり得る。

[0041] 本明細書に記載される細胞亜集団の量は、複数の量を組み合わせて指標として使用することが可能である。指標を組み合わせることは、応答性の予測をより正確なものとすることができる。１つの実施形態では、サンプルにおける抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団の量、抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量および抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するＣＤ８＋Ｔ細胞亜集団の量からなる群から選択される少なくとも２つの量と基準との比較により被験体における免疫活性化の有無が示され得る。例えば、１つの実施形態では、サンプル中のＣＤ４＋Ｔ細胞におけるＣＤ６２Ｌｌｏｗ細胞の割合（Ｘ）と、ＣＤ４＋Ｔ細胞におけるＣＤ２５＋ＦｏｘＰ３＋の割合（Ｙ）とを組み合わせた、X^2／Ｙとの指数を用いることができる。これらの指標に換えて、または加えて、放射線治療による免疫活性化を示し得るさらなる指標をさらに用い得ることは当業者に理解される。なお、本発明においては、所期の細胞亜集団の量に代えて、あるいは、所期の細胞亜集団の量に加えて、その所期の細胞亜集団に含まれる細胞亜集団の量を使用してもよい。

[0042] 例えば、本明細書の実施例に示される結果から、以下のような因子がマーカーとして用いられ得る。なお、本明細書において、％〇〇／〇〇の形で細胞亜集団の割合を表現する場合に、例えば、ＣＤ６２Ｌ^{low}／ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞に対するＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の割合を意味し、分子に記載された細胞は分母に記載された細胞の特徴をすべて備えている。細胞亜集団に対する分母が明記されない場合、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞集団またはＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞集団などの、当該細胞亜集団を含む任意の細胞集団に対する割合が包含され得る。

[0043] 放射線治療（ＲＴ）により有意に変化しＴ細胞免疫ブーストに関連していると考えられる因子の中で、ＲＴ終了直後に増加する因子としては、

・％ＣＤ６２Ｌ^{low}／ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞に対するＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の割合）；

・％ＬＡＧ３$^{+}$／ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（ＬＡＧ３$^{+}$／エフェクターメモリー（ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$）ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞でもよい）；

・％ＩＣＯＳ$^{+}$／ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（％ＩＣＯＳ$^{+}$／エフェクターメモリー（ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$）ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞でもよい）；

・％ＣＤ２８$^{+}$／ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（％ＣＤ２８$^{+}$／エフェクターメモリー（ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$）ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞でもよい）；および

・％ＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$／ＣＤ１１ｃ$^{+}$ＣＤ１４１$^{+}$細胞（ＨＬＡ－ＤＲ^{high}ＣＤ１１ｃ$^{+}$ＣＤ１２３$^{-}$ｍＤＣ、％ｍＤＣ／ＣＤ３$^{-}$ＣＤ１４$^{-}$ＣＤ１９$^{-}$細胞でもよい）

・％ＰＤ－１$^{+}$／ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞

・％ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$／ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＤ４$^{+}$細胞でもよい）

・％ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞

・％ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞（ＥＭ　ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）

・％ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞（ＣＭ　ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）

が挙げられる。ＲＴ終了直後に減少する因子としては、

・％ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＤ４$^{+}$細胞（ナイーブＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞）

・％ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞（ＥＭＲＡ　ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）

が挙げられる。

[0044] また、ＲＴ終了後１ヶ月後までに増加する因子としては、

・％ＰＤ－１$^{+}$／ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（％ＰＤ－１$^{+}$／エフェクターメモリー（ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$）ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞でもよい）；

・％ＣＤ１３７$^{+}$／ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（％ＣＤ１３７$^{+}$／エフェクターメモリー（ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$）ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞でもよい）；

・％ＰＤ－１$^{+}$／ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞（％ＰＤ－１$^{+}$／エフェクター（ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$）ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、％ＰＤ－１$^{+}$／エフェクターメモリー（ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$）ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞でもよい）；および

・％ＣＤ１３７$^{+}$／ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞（％ＣＤ１３７$^{+}$／エフェクター（ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$）ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、％ＣＤ１３７$^{+}$／エフェクターメモリー（ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$）ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞でもよい）

が挙げられる。

[0045] さらに、放射線治療により有意に増加しＴ細胞免疫抑制に関連していると考えられる因子としては、

％ＣＤ２５$^{+}$ＦｏｘＰ３$^{+}$／ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（制御性Ｔ細胞）；および

％ＣＤ３３$^{+}$ＣＤ１４$^{+}$ＨＬＡ－ＤＲ^{low}細胞（Ｍｙｅｌｏｉｄ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ（ＭＤＳＣ））

が挙げられる。理論に拘束されることを望むものではないが、これらは、活性化した細胞性免疫を抑制するネガティブフィードバックと考えられる。放射線治療後の免疫状態を評価する因子として有用であると考えられる。

[0046] 本発明において、細胞亜集団量を適切な基準と比較し、比較によって被験体における免疫活性化の有無を決定することができる。サンプルにおける細胞亜集団の量が、基準より増加していることは、被験体において放射線治療による免疫活性化が生じていることを示し得る。あるいは、サンプルにおける細胞亜集団の量が、基準より増加していないことは、被験体において放射

線治療による免疫活性化が生じていないことを示し得る。

[0047] 基準としては、例えば、放射線治療前の被験体のサンプルにおける対応する細胞亜集団の量が挙げられるが、これに限定されるものではない。このほか、基準としては、放射線治療を受けていない被験体のサンプルから実験的に算出した値などを用いることも可能である。基準としては、例えば、複数例の被験体のサンプルから得られたデータに基づき、回帰分析などによって統計的に算出した値を用いてもよい。被験体から得られたデータから、機械学習または人工知能などによって基準を算出してもよい。

[0048] 基準と比べて増加していることは、放射線治療後の細胞亜集団量が、基準を超える量であるか、基準の１、２、３、４、５、１０、１５、２０、３０％を超えて増加しているか、あるいは基準の１．５倍、２倍、３倍、５倍を超えて増加していることによって示され得る。典型的には、基準の値を超えていれば、基準と比べて増加していると考えられる。基準が実験的に算出されている場合、基準値から見て適切な誤差を超える増加が観察された場合に、基準と比べて増加しているとすることができる。適切な誤差としては、例えば、１標準偏差、２標準偏差、３標準偏差、またはそれら超が挙げられる。

[0049] （細胞の分画・分離）

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

[0050] 被験体のサンプル中のＴ細胞の組成は、当業者が常法によって測定することができる。通常には、サンプル中の目的とする細胞亜集団を規定するマーカー（例えば、ＣＤ４）について、陽性である細胞の数を、フローサイトメトリーなどを用いて測定することが可能である。細胞集団の組成の測定は、フローサイトメトリーを用いることが一般的であるが、その他にも、細胞を含むサンプルに対する免疫染色、抗体アレイを用いる方法、細胞を含むサン

プル中でのタンパク質発現分析（例えば、ウエスタンブロット、質量分析、ＨＰＬＣなど）、細胞を含むサンプル中でのｍＲＮＡ発現分析（例えば、マイクロアレイ、次世代シークエンシングなど）などを用いて行ってもよい。

[0051] ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団等の細胞亜集団のそれぞれの細胞数を計測するには、全体の細胞からそれぞれの細胞の亜集団以外の細胞を実験的に除いておいて求めてもよい。それを実現するキットがある。例えば、CD4+ Effector Memory T cellアイソレーションキット、ヒト（Militenyi Biotech社）を用いると、CD4抗体とCD62L抗体を用いずに、末梢血からCD4+CD62Llow T細胞亜集団に相当する細胞を分離することができる。全体の生細胞数を数えて記録しておき、またこのキットを用いて得られた細胞の数を数え記録すればよい。

[0052] また、抗体を用いなくてもよい。抗体は、個々の細胞に発現している分子を特異的に認識して結合できるものであって、さらに抗体が細胞表面上、または細胞内で発現している分子に結合しているときに発色できるようにして検出し、発色している細胞の数を計測する。ここで、それらの細胞表面上、または細胞内で発現している分子はタンパク質であるので、そのタンパク質を発現している場合にはそれをコードしているmRNAも細胞内にできている。すなわち、個々の細胞内のmRNAを調べて、注目しているタンパク質分子をコードしているmRNAの有無を調べればよい。これを可能にしているのが、シングル・セルの遺伝子発現解析、つまり１細胞レベルのmRNA解析である。単細胞の遺伝子発現解析としては、たとえば、1)Quartz-Seqにより次世代シーケンシングを行う方法、2)Fluidigm C1 SystemやICELL8 SIngle-Cell Systemを用いて細胞を単離してSMART-Seq v4でライブラリー調製する方法、3)セルソーターで細胞を分離し、Ambion Single Cell-to-CTキットを用い定量PCRで計測する方法、4)CyTOF SYSTEM（Helios社）などが挙げられる。

[0053] 血液を取得し、生細胞数を数え、セルソーター等で細胞を分離し、分離した個々の細胞に対し、例えば、Ambion Single Cell-to-CTキットを用い、特定の遺伝子について発現量を定量PCR法の装置で計測することができる。そ

の結果に基づいて、個々の細胞がＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団等のどの亜集団に該当するかを調べて、それぞれの亜集団に該当した細胞の数を数える。発現を調べる遺伝子の候補としては、αβTCR、CD3、CD4、CD25、CTLA4、GITR、FoxP3、STAT5、FoxO1、FoxO3、IL-10、TGFbeta、IL-35、SMAD2、SMAD3、SMAD4、CD62Llow、CD44、IL-7R(CD127)、IL-15R、CCR7low、BLIMP1、などがある。

[0054] 例えば、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞において、ＣＤ６２Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞よりも発現が亢進している遺伝子として、ＡＵＲＡＫＡ、ＣＣＬ１７、ＣＤ１０１、ＣＤ２４、ＦＯＸＦ１、ＧＺＭＡ、ＧＺＭＨ、ＩＬ１８ＲＡＰ、ＩＬ２１、ＩＬ５ＲＡ、ＮＤ２、ＳＭＡＤ５、ＳＭＡＤ７、およびＶＥＧＦＡが挙げられる（ＷＯ２０１８／１４７２９１、当該出願は、本明細書においてその全体が全ての目的のために参考として援用される）。これらの遺伝子の発現を調べることによって、取得したＴ細胞がいずれのＴ細胞亜集団に属するかを判定し、細胞亜集団の量および／または割合を測定してもよい。

[0055] また、ＣＤ６２Ｌ^{high}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞において、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞よりも発現が亢進している遺伝子としては、ＢＡＣＨ２、ＣＣＬ２８、ＣＣＲ７、ＣＤ２７、ＣＤ２８、ＣＤ６２Ｌ、ＣＳＮＫ１Ｄ、ＦＯＸＰ１、ＦＯＸＰ３、ＩＧＦ１Ｒ、ＩＬ１６、ＩＬ２７ＲＡ、ＩＬ６Ｒ、ＬＥＦ１、ＭＡＬ、およびＴＣＦ７が挙げられる（ＷＯ２０１８／１４７２９１）。これらの遺伝子の発現を調べることによって、取得したＴ細胞がいずれのＴ細胞亜集団に属するかを判定し、細胞亜集団の量および／または割合を測定してもよい。

[0056] 本発明における、細胞亜集団の割合の測定、または閾値との比較は、規定されたシグナルを有する標準サンプルを用いて行ってもよい。所定の細胞亜集団に対応する蛍光シグナルを生じるように調製された標準（例えば、蛍光色素を付着させた粒子）と、細胞集団を含むサンプルとの間でのシグナルを比較し、標準との比較によって、サンプル中の細胞亜集団の量または割合を

測定することができる。また、所定の閾値に対応する蛍光シグナルを生じるように調製された標準（例えば、蛍光色素を付着させた粒子）と、細胞集団を含むサンプルとの間でのシグナルを比較し、標準との比較によって、サンプル中のＴ細胞組成における本発明のマーカーの有無もしくは量を判定することが可能である。

[0057] 本発明において、特定のマーカーについて、ｈｉｇｈ（高発現）またはｌｏｗ（低発現）を判定する場合、当業者は、当技術分野で一般的に用いられている発現強度の分類基準を用いて行うことができる。例えば、ＣＤ６２Ｌについて、ＰＥ標識抗ヒトＣＤ６２Ｌ抗体を用いた場合の１０Ｅ２のシグナルに対応するシグナル強度を境界として、ＣＤ６２Ｌ^{low}とＣＤ６２Ｌ^{high}とを明瞭に分割することが可能である（ＷＯ２０１８／１４７２９１）。

[0058] （放射線治療）

本発明の実施形態においては、放射線治療による免疫活性化の指標が提供される。放射線治療においては、放射線を照射することにより、がん細胞のＤＮＡやＲＮＡを破壊して細胞分裂を抑止し、および／またはアポトーシス（細胞死）を誘導することにより、がん細胞を減少させることができる。一般的には、正常細胞の許容線量の限界（約５０～６０Ｇｙ）までの線量を分割（１日約２Ｇｙ）して組織に照射する。正常細胞は遺伝子の破壊を修復して生き残るが、自己修復作用が正常細胞より遅いがん細胞は破壊された遺伝子を修復する以前に再度照射を受けて遺伝子を修復できないために細胞死が誘導される。これにより、照射野において腫瘍退縮を実現させる。

[0059] 放射線治療においては、照射野における腫瘍退縮に加えて、照射野の外での腫瘍退縮が生じることが報告されており、アブスコパル効果と呼ばれている。照射野の外での腫瘍退縮は、上述の放射線によるがん細胞の増殖抑制・細胞死によっては説明できず、何らかの免疫系の活性化を介した作用であると考えられていたが、詳細なメカニズムについては不明な点が多い。放射線治療による免疫系の活性化により、抗腫瘍免疫を利用するがん免疫療法の有効性を高めることが可能であると考えられるが、放射線治療を受けた被験体

においてアブスコパル効果が生じているかどうかを確認するためのバイオマーカーは見いだされていなかった。本明細書においては、放射線治療を受けた被験体における照射野の外に影響する免疫活性化（アブスコパル効果）を示すバイオマーカーが提供される。

[0060] 放射線は、電磁波と粒子線の２種類に大きく分けられる。電磁波には、Ｘ線、γ線などが含まれる。粒子線は、高い運動エネルギーをもって流れる物質粒子であり、α線、β線、中性子線、陽子線、重イオン線、中間子線などが挙げられる。

[0061] 放射線治療における放射線の照射方法としては、体の外から放射線をあてる「外部照射」と、体の内側からがんやその周辺に放射線をあてる「内部照射」とに分けられる。外部照射と内部照射とを組み合わせて行うことも可能である。

[0062] 外部照射では、体の外から皮膚を通して放射線を照射する。高エネルギーのＸ線を照射する方法が最も一般的である。外部照射として、様々な様式が挙げられ、例えば、リニアック（直線加速器）によるＸ線照射、三次元原体照射（３Ｄ－ＣＲＴ）、強度変調放射線治療（ＩＭＲＴ）、定位放射線治療（ＳＲＴ）、粒子線治療（陽子線治療・重粒子線治療）、画像誘導放射線治療（ＩＧＲＴ）などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0063] 内部照射の様式としては、例えば、密封小線源治療（組織内照射、腔内照射）、または非密封の放射線同位元素を用いた治療（内用療法）などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0064] 本発明で対象となり得る放射線治療は、免疫活性化を生じさせ得る態様での照射であれば、その態様は限定されない。例えば、放射線治療における照射野は、腫瘍組織を含む照射範囲であり得る。理論に拘束されることを望むものではないが、放射線治療を受けた腫瘍細胞が免疫原性細胞死を生じる事が、抗腫瘍エフェクターＴ細胞増加に重要であると考えられる。例えば、放射線治療は、胸部放射線照射、骨転移部位への放射線照射、リンパ節転移への放射線照射、副腎転移への放射線照射、肝転移への放射線照射、脳転移へ

の放射線照射などが挙げられる。

[0065] 本発明のバイオマーカーは、免疫活性化を生じさせることを企図する放射線治療のスケジュールを検討するのに利用可能である。例えば、被験体において放射線治療による免疫活性化が生じていないことにより、被験体に再度放射線治療を施すべきことが示され得る。あるいは、被験体において放射線治療による免疫活性化が生じていることにより、放射線治療を終了すべきことが示され得る。

[0066] 放射線治療は、１回あたり約１～３Ｇｙの線量の照射を、１日あたり約１～２回、３週間～８週間にわたって行われ得る。しかしながら、小線量の多数回の照射は、がん免疫療法との併用を検討する場合には、免疫細胞（例えば、Ｔ細胞）にも影響し得ることから、寡分割照射法（例えば、少数回の大線量を１～２週間で照射する）が好ましくあり得る。

[0067] 放射線治療において副作用が生じる可能性を低減するため、免疫活性化が生じていることが示された時点でさらなる放射線治療を行わないものとすることができる。特に、一回あたりの線量を大きくする場合、不必要な照射を行わずに免疫活性化を生じさせることは有利である。従来は、いつ免疫活性化を生じたかをモニターすることができず、予め経験的に決定したスケジュールに従って、放射線治療を行っていたが、本発明のバイオマーカーによって、放射線治療を終了する適切なタイミングを決定することができる。

[0068] （がん免疫療法）

がん免疫療法とは、生物の有する生体防御機構を用いてがんを治療する方法である。がん免疫療法には、大きく分けて、がんに対する免疫機能を強化することによるがん免疫療法と、がんの免疫回避機能を阻害することによるがん免疫療法が存在する。さらに、がん免疫療法には、体内での免疫機能を賦活化する能動免疫療法と、体外で免疫機能を賦活化させた、または増殖させた免疫細胞を体内に戻すことによる受動免疫療法とがある。本発明のバイオマーカーによって、放射線治療による免疫活性化が示されることにより、免疫機能を利用するがん免疫療法を行う好適なタイミングを知ることが可能

である。

[0069] がん免疫療法の例としては、非特異的免疫賦活薬、サイトカイン療法、がんワクチン療法、樹状細胞療法、養子免疫療法、非特異的リンパ球療法、がん抗原特異的Ｔ細胞療法、抗体療法、免疫チェックポイント阻害療法などが挙げられる。

[0070] 免疫チェックポイント阻害剤の代表的な例は、ＰＤ－１阻害剤である。ＰＤ－１阻害剤としては、抗ＰＤ－１抗体であるニボルマブ（Ｎｉｖｏｌｕｍａｂ；オブジーボ™として販売されている）、ペムブロリズマブ（Ｐｅｍｂｒｏｌｉｚｕｍａｂ）、スパルタリズマブ（Ｓｐａｒｔａｌｉｚｕｍａｂ）およびセミプリマブ（Ｃｅｍｉｐｌｉｍａｂ）が挙げられるがこれらに限定されない。１つの好ましい実施形態では、ニボルマブが対象として選択され得る。

[0071] 本発明においては、ＰＤ－Ｌ１阻害剤もまたＰＤ－１阻害剤と同様に使用することが可能である。抗ＰＤ－１抗体は、ＰＤ－１シグナルによるＴ細胞活性化の抑制を解除することによって抗がん効果を奏するものと考えられている。抗ＰＤ－Ｌ１抗体もまた、ＰＤ－１シグナルによるＴ細胞活性化の抑制を解除することによって抗がん効果を奏するものと考えられている。ＰＤ－１がＴ細胞機能を阻害するメカニズムは完全には解明されていないものの、ＰＤ－１（ｐｒｏｇｒａｍｍｅｄ ｄｅａｔｈ １）とＰＤ－Ｌ１あるいはＰＤ－Ｌ２とが相互作用すると、ＰＤ－１の細胞質ドメインにチロシン脱リン酸化酵素の一種であるＳＨＰ－１，２がリクルートされ，Ｔ細胞受容体シグナル伝達タンパク質であるＺＡＰ７０を不活性化させることにより、Ｔ細胞の活性化が抑制されると考えられている（Ｏｋａｚａｋｉ， Ｔ．，Ｃｈｉｋｕｍａ， Ｓ．， Ｉｗａｉ， Ｙ． ｅｔ ａｌ．： Ａ ｒｈｅｏｓｔａｔ ｆｏｒ ｉｍｍｕｎｅ ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ： ｔｈｅ ｕｎｉｑｕｅ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｏｆ ＰＤ－１ ａｎｄ ｔｈｅｉｒ ａｄｖａｎｔａｇｅｓ ｆｏｒ ｃｌｉｎｉｃａｌ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ． Ｎａｔ． Ｉｍｍｕｎｏｌ．， １４， １２１２－１２１８ （

２０１３））。これは、ＩＴＳＭモチーフという部分にＳＨＰ－１，２がリクルートされ、近傍のＴ　ｃｅｌｌ　ｒｅｃｅｐｔｏｒのｐｒｏｘｉｍａｌ　ｓｉｇｎａｌｉｎｇ　ｋｉｎａｓｅを脱リン酸化することによると考えられ、換言すると、抗原刺激を受けたＴ細胞からこの「抗原刺激を受けた」という記憶を消してしまうとも言うことができる。

[0072] ＰＤ－１は、がん組織に浸潤しているキラーＴ細胞およびナチュラルキラー細胞において高レベルで発現している。また、腫瘍上のＰＤ－Ｌ１によって、ＰＤ－１によるＰＤ－１シグナルを介する免疫応答が減弱していると考えられている。ＰＤ－Ｌ１によって、このＰＤ－１シグナルを介する免疫応答が減弱するが、抗ＰＤ－１抗体によってＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１との相互作用および／または相互作用によって生じるシグナル伝達を阻害すると、抗腫瘍免疫応答の増強効果が得られる。

[0073] 免疫チェックポイント阻害剤の他の例としては、ＰＤ－Ｌ１阻害剤（例えば、抗ＰＤ－Ｌ１抗体であるアベルマブ、デュルバルマブまたはアテゾリズマブ）が挙げられる。

[0074] ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、上記のＰＤ－１経路をＰＤ－Ｌ１の側に結合して阻害し、ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１との相互作用および／または相互作用によって生じるシグナル伝達を阻害し、抗腫瘍免疫応答を生じさせる。

[0075] 免疫チェックポイント阻害剤の他の例としては、ＣＴＬＡ－４阻害剤（例えば、抗ＣＴＬＡ－４抗体であるイピリムマブまたはトレメリルマブ）が挙げられる。ＣＴＬＡ－４阻害剤は、Ｔ細胞を活性化し、抗腫瘍免疫応答を生じさせる。Ｔ細胞は、表面のＣＤ２８が、ＣＤ８０またはＣＤ８６と相互作用することによって活性化される。しかしながら、一旦活性化されたＴ細胞であっても、表面に発現したＣＴＬＡ－４（ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ　Ｔ－ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ－ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ　ａｎｔｉｇｅｎ　４）が、ＣＤ８０またはＣＤ８６と、ＣＤ２０よりも高い親和性で優先的に相互作用し、それによって活性化が抑制されると考えられている。ＣＴＬＡ－４阻害剤は、ＣＴＬＡ－４を阻害することによって、ＣＤ２０とＣＤ８０またはＣＤ８

６との相互作用が阻害されることを防ぐことによって、抗腫瘍免疫応答を生じさせる。

[0076] さらなる実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、ＴＩＭ－３（Ｔ－ｃｅｌｌ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ ａｎｄ ｍｕｃｉｎ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ－３）、ＬＡＧ－３（ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｇｅｎｅ－３）、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、Ｂ７－Ｈ５（ＶＩＳＴＡ）、またはＴＩＧＩＴ（Ｔ ｃｅｌｌ ｉｍｍｕｎｏ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｗｉｔｈ Ｉｇ ａｎｄ ＩＴＩＭ ｄｏｍａｉｎ）などの免疫チェックポイントタンパク質を標的としてもよい。

[0077] 上記のような免疫チェックポイントは、自己組織への免疫応答を抑制していると考えられるが、ウイルスなどの抗原が生体内に長期間存在する場合にもＴ細胞に免疫チェックポイントが増加する。腫瘍組織についても、生体内に長期間存在する抗原となっているため、これらの免疫チェックポイントによって抗腫瘍免疫応答を回避していると考えられ、上記のような免疫チェックポイント阻害剤は、このような回避機能を無効化し、抗腫瘍効果を奏する。

[0078] 本発明において、免疫チェックポイント阻害剤は、適宜他のがん治療と組み合わせて使用してよい。他のがん治療としては、放射線治療に加えて、他のがん免疫療法（例えば、養子細胞移入）、化学療法、温熱療法、外科的手順などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。免疫チェックポイント阻害剤は、１または複数のさらなる薬剤と組み合わせて投与されてよい。１または複数のさらなる薬剤は、任意の化学療法薬であってもよく、または、第２の免疫チェックポイント阻害剤を含んでもよい。

[0079] 本発明の１つの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物が提供される。本発明の免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物は、通常、全身的または局所的に、経口または非経口の形で投与される。本発明の免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物は、本明細書に記載される方法によって、放射線治療による免疫活性化が生じていることが示される被験体に投

与されることによって、顕著な治療効果を奏することができると考えられる。

[0080] 投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、通常、例えば、成人一人あたり、１回につき、０．１ｍｇから１００ｍｇの範囲で、１日１回から数回経口投与されるか、または成人一人あたり、１回につき、０．０１ｍｇから３０ｍｇの範囲で、１日１回から数回非経口投与（好ましくは、静脈内投与）されるか、または１日１時間から２４時間の範囲で静脈内に持続投与される。もちろん、投与量は種々の条件によって変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて必要な場合もある。

[0081] 免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物は、投与にあたり、経口投与のための内服用固形剤、内服用液剤、および非経口投与のための注射剤、外用剤、坐剤等の剤形をとり得る。経口投与のための内服用固形剤には、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤等が含まれる。カプセル剤には、ハードカプセルおよびソフトカプセルが含まれる。

[0082] 本発明の組成物は、必要に応じて、１またはそれ以上の活性成分（例えば、免疫チェックポイントタンパク質に対する抗体）がそのままか、または賦形剤（ラクトース、マンニトール、グルコース、微結晶セルロース、デンプン等）、結合剤（ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、メタケイ酸アルミン酸マグネシウム等）、崩壊剤（繊維素グリコール酸カルシウム等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム等）、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸等）等と混合され、常法に従って製剤化して用いられる。また、必要によりコーティング剤（白糖、ゼラチン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート等）で被覆していてもよいし、また２以上の層で被覆していてもよい。さらにゼラチンのような吸収されうる物質のカプセルも包含される。

[0083] 本発明の組成物は、経口投与のために内服用液剤として製剤化される場合、薬学的に許容される水剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤等を

含む。このような液剤においては、ひとつまたはそれ以上の活性物質が、一般的に用いられる希釈剤（精製水、エタノールまたはそれらの混液等）に溶解、懸濁または乳化される。さらにこの液剤は、湿潤剤、懸濁化剤、乳化剤、甘味剤、風味剤、芳香剤、保存剤、緩衝剤等を含有していてもよい。

[0084] 非経口投与のための注射剤としては、溶液、懸濁液、乳濁液および用時溶剤に溶解または懸濁して用いる固形の注射剤を包含する。注射剤は、ひとつまたはそれ以上の活性物質を溶剤に溶解、懸濁または乳化させて用いられる。溶剤として、例えば注射用蒸留水、生理食塩水、植物油、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、エタノールのようなアルコール類等およびそれらの組み合わせが用いられる。さらにこの注射剤は、安定剤、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸、ポリソルベート８０（登録商標）等）、懸濁化剤、乳化剤、無痛化剤、緩衝剤、保存剤等を含んでいてもよい。これらは最終工程において滅菌するか無菌操作法によって調製される。また無菌の固形剤、例えば凍結乾燥品を製造し、その使用前に無菌化または無菌の注射用蒸留水または他の溶剤に溶解して使用することもできる。

[0085] 本発明の組成物は、放射線治療と併用されることが記載された添付文書とともに箱などに収容して製品化してもよい。添付文書には、本発明の組成物が、放射線治療後、所定期間内に投与されることが望ましいことが記載されていてもよい。添付文書には、放射線治療と併用されることが明示的に指示されていてもよく、併用の可能性について言及されているのみであってもよい。

[0086] （がん）

本発明において対象とされるがんとしては、メラノーマ（悪性黒色腫）、非小細胞肺癌、腎細胞癌、悪性リンパ腫（ホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫）、頭頸部癌、泌尿器科癌（膀胱癌、尿路上皮癌、前立腺癌）、小細胞肺癌、胸腺癌、胃癌、食道癌、胃食道接合部癌、肝癌（肝細胞癌、肝内胆管細胞癌）、原発性脳腫瘍（膠芽腫、中枢神経系原発リンパ腫）、悪性胸膜中皮腫、婦人科癌（卵巣癌、子宮頸癌、子宮体癌）、軟部肉腫、胆道癌

、多発性骨髄腫、乳癌、大腸癌などを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

[0087] （放射線治療および免疫療法を併用する治療方法）

被験体に対して放射線治療を行い、放射線治療を受けた被験体からサンプルを採取し得る。当該サンプル中の細胞亜集団の組成を分析することにより、本明細書に記載されるように、被験体における放射線治療による免疫活性化の有無を決定し得る。必要に応じて、放射線治療を受ける前の被験体からサンプルを採取しておいてもよい。当該サンプル中の細胞亜集団の組成は、比較のための基準として使用し得る。

[0088] サンプルの採取の時点は特に限定されない。放射線治療による免疫活性化が生じるか否か、およびいつまで持続するかは、被験体によって異なり、任意の時点でサンプルを採取し、その時点での免疫活性化を調べることができる。細胞亜集団における変化、例えば、樹状細胞（ＣＤ１１ｃ$^{+}$ＣＤ１４１$^{+}$細胞）のＨＬＡ－ＤＲ陽性率およびＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞のＩＣＯＳ陽性率の変化は、２～３ヶ月継続している場合がある。被験体によっては、高いＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞比率を１年以上維持する場合もある。保険適用となる化学放射線治療後Ｄｕｒｖａｌｕｍａｂ（抗ＰＤ－Ｌ１抗体）の投与可能期間は、化学放射線治療終了１日目から病勢増悪を来していない間と設定されており、このような期間内であれば、免疫活性化状態の放射線治療後の変化を検出し、がん免疫療法を行うか否かの判断を行うことが可能であると考えられる。

[0089] 樹状細胞またはＴ細胞亜集団における変化は、放射線治療終了直後がピークとなっており、その後ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞比率などの細胞亜集団割合が元に戻る傾向が示される。そのため、必須ではないが、サンプルを放射線治療の時点から一定期間経過後までの間に得ることによって、がん免疫療法を行うための、免疫活性化の検出の可能性が高くなり得る。例えば、サンプルは、放射線治療の時点から約１年後までの間、約６ヶ月後までの間、約３ヶ月後までの間、約２ヶ月後までの間、約４週間後までの間、もしくは

約１４日後までの間、または放射線治療の直後などの時点で得ることができるが、これらに限定されない。

[0090] 一定期間にわたって放射線治療を行う場合、被験体から複数の時点でサンプルを得て、被験体における放射線治療による免疫活性化をモニタリングすることができる。例えば、放射線治療による免疫活性化が生じていない場合、被験体に再度放射線治療を施してよい。放射線治療による免疫活性化が生じている場合、放射線治療を終了し、がん免疫療法を施すことができる。複数の時点としては、放射線の各照射後であってもよく、放射線照射の数回（例えば、２回、３回、４回または５回、あるいはそれら超）に１回の照射後であってもよく、照射とは独立して数日（例えば、２日、３日、４日、５日、１週間、または２週間あるいはそれら超）に１回の時点であってもよい。

[0091] 免疫活性化が生じていることが本発明のバイオマーカーによって示された場合、被験体にがん免疫療法を施し得るが、がん免疫療法を施すタイミングについては、免疫活性化状態が維持されている限り特に限定されない。放射線治療の時点から時間が経過することにより免疫活性化状態がもとに戻る可能性があるため、必須ではないが、免疫活性化が生じていることが示された場合に、放射線治療の時点から一定の期間、例えば、放射線治療の時点から約４週間後まで、または、放射線治療の時点から約１４日後までの間に被験体にがん免疫療法を施してもよい。これにより、アブスコパル効果の利益を享受する可能性を高めることができる。１つの実施形態では、被験体において放射線治療による免疫活性化が生じていることにより、その時点で被験体に免疫チェックポイント阻害剤を含むがん免疫療法を施してもよい。

[0092] １つの実施形態では、免疫抑制に働く因子をさらに用いて、がん免疫療法を施すタイミングを決定してもよい。例えば、概ね放射線治療後１ヶ月程度すると制御性Ｔ細胞やＭＤＳＣが増加してくることがあり、かかる細胞亜集団の増加の前に（すなわち、かかる細胞亜集団の割合が一定以下である場合に）被験体に免疫チェックポイント阻害剤を含むがん免疫療法を施してもよい。

[0093] 本発明者により、放射線治療によって被験体における免疫細胞に包含される特定の細胞亜集団（例えば、抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ８＋Ｔ細胞亜集団または抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団）の量または割合が変化することが見出された。このことから、本発明の１つの側面では、被験体に放射線治療を施すことによる被験体における細胞亜集団の割合の調節が提供される。とりわけ、放射線治療によって、ＣＤ４＋ＣＤ６２Ｌｌｏｗ細胞集団に含まれる細胞亜集団（例えば、ＣＤ４＋ＣＤ６２Ｌｌｏｗ細胞亜集団）の量または割合を増加させることができる。被験体における特定の細胞亜集団（例えば、ＣＤ４＋ＣＤ６２Ｌｌｏｗ細胞亜集団）は、被験体における抗腫瘍免疫を担っていると考えられ、また、そのような抗腫瘍免疫を担っている特定の細胞亜集団の量または割合を放射線治療によって変化させることができるため、放射線治療によって被験体をがん免疫療法（例えば、免疫チェックポイント阻害剤）に対して応答性の状態に変化させることができると考えられる。

[0094] 本発明の１つの実施形態において、がん免疫療法に対して応答性ではない免疫細胞組成（例えば、低いＣＤ４＋ＣＤ６２Ｌｌｏｗ細胞亜集団の量または割合）を有する被験体においてがんを処置する方法であって、被験体に放射線治療を施す工程を含む方法が提供される。この方法は、必要に応じて、被験体にがん免疫療法を施す工程を含む。また、この方法は、被験体における免疫細胞組成を測定する工程を含んでもよい。これにより、放射線治療によって、被験体ががん免疫療法に対して応答性に変化したことを確認し、がん免疫療法を施すことができる。がんを処置するための免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物であって、がん免疫療法に対して応答性ではない免疫細胞組成（例えば、低いＣＤ４＋ＣＤ６２Ｌｌｏｗ細胞亜集団の量または割合）を有していた被験体であって、放射線治療を受けた被験体に対して投与されることを特徴とする、組成物も提供される。例えば、免疫細胞組成は、末梢血中の免疫細胞組成であり得る。

[0095] がん免疫療法に対して応答性ではない（または応答性である）免疫細胞組成は、当業者がＷＯ２０１８／１４７２９１等を参照して決定することができる。例えば、免疫細胞組成は、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞におけるＣＤ６２Ｌ^{low}Ｔ細胞の割合が閾値（無効群閾値）よりも低い場合、がん免疫療法に対して応答性ではないと考えられる。閾値は、当業者が感度・特異度を考慮して適宜決定することができる。閾値の一例としては、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$比率について、１９．４％が挙げられる。また、免疫細胞組成は、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$比率と、制御性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$ＣＤ４$^{+}$細胞比率）との相対値を用いて判定してもよい。例えば、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$比率をＸ、ＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$ＣＤ４$^{+}$細胞比率をＹとして、Ｘ／ＹまたはＸ^{2}／Ｙを使用してもよい。この場合、一例として、比（Ｘ／Ｙ）について７．３５を閾値とすることができ、また、Ｘ^{2}／Ｙについて１９２を閾値とすることができる。

[0096] （キット）

本発明の１つの実施形態において、被験体において放射線治療による免疫活性化が生じているかを判定するためのキットが提供される。キットは、本明細書に記載される細胞亜集団を検出するために適切な分子に対する１または複数の検出剤を含み得る。このような検出剤の組み合わせを、被験体のＴ細胞組成の決定に用いることができる。このようなキットは、被験体における、本明細書に記載される新規なバイオマーカーとしての特定の細胞亜集団の割合の測定に用いることができる。

[0097] 本発明の１つの実施形態では、キットは、

（Ａ）ＣＤ４およびＣＤ６２Ｌ；

（Ｂ）（ｉ）ＩＣＯＳ、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３およびＣＤ２８から選択されるマーカー、（ｉｉ）ＣＤ４、ならびに（ｉｉｉ）ＣＤ６２Ｌ；

（Ｃ）ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１４１およびＨＬＡ－ＤＲ；

（Ｄ）ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１２３およびＨＬＡ－ＤＲ；あるいは

（Ｅ）ＣＤ８、ＣＤ６２ＬおよびＣＤ１３７

に対する検出剤を含み得る。１つの実施形態では、検出剤は抗体である。好ましくは、抗体は適切に標識されマーカーの検出を容易にする。

実施例

[0098] （実施例１：放射線治療による免疫活性化の指標）

（概要）

本実施例において、被験体における特定の細胞亜集団の組成が、放射線治療前後で被験体において有意に変化しているパラメータ（すなわち、バイオマーカー）であることを実証する。

[0099] （材料および方法）

［被験体］

本実施例において、以下の被験体（２０名）について、放射線治療の前後（該当する場合は後日も）に末梢血を回収し、末梢血内の細胞集団の組成を調べた。

[表1]

患者番号	線量	回数	目的	処置種別	処置前サンプリング	処置後サンプリング	処置後（後日）サンプリング
1	60	30	curative	CRT	-41	0	N/A
2	60	30	curative	CRT	-42	0	32
3	60	30	curative	CRT	-50	0	35
4	60	30	curative	CRT	-55	0	49
5	60	30	curative	CRT	-45	0	15
6	60	30	curative	CRT	-44	0	31
7	60	30	curative	CRT	-46	1	18
8	60	30	curative	TRT	-42	18	N/A
9	66	33	curative	TRT	-48	0	N/A
10	60	30	curative	TRT	-52	0	21
11	60	30	curative	TRT	-44	0	N/A
12	66	33	curative	TRT	-50	6	N/A
13	66	33	curative	TRT	-48	-2	N/A
14	50	25	curative	TRT	-40	-2	16
15	30	10	palliative	SVC	-26	0	N/A
16	30	10	palliative		-13	2	N/A
17	30	10	palliative		-16	5	N/A
18	50	5	curative	SRT	-50	9	44
19	50	5	curative	SRT	-28	0	40
20	54	3	curative	SRT	-4	13	39

サンプリング時点は、処置前については放射線治療開始時点から何日前であるか、処置後については処置終了時点から何日後であるかを示す。

CRT：化学放射線療法、TRT：胸部放射線治療（thoracic radiotherapy）、SVC：上大動脈、SRT：定位放射線治療、curative：治療目的、palliative：緩和目的

[0100] ［ＰＢＭＣ解析］

各時点でのサンプリングおよびＰＢＭＣ解析は以下のとおり行った。ＰＢＭＣ解析には単核球分離用のＢＤバキュティナＣＰＴＴＭ採血管を用いた。ＰＢＭＣについてＦＣＭ解析を行った。

[表2]

1	採血（7-8mL）	BD 社/バキュティナスピッツ（ヘパリン含有）
2	遠心分離	遠心条件：3200rpm 20 分 処理条件：室温（18-25℃） ※採血後 2 時間以内
3	血漿採取	ゲルバリア直上にある細胞成分を撹拌しないように、1 本から 2ml の血漿を採取する。クライオジェニックバイアル 2.0mL（外ネジキャップ丸底）に 2mL ずつ分注し、-80℃で保存する。
4	細胞成分採取	血漿を採取した後、ゲルバリア上層に残った血漿成分と細胞成分をピペッテイングで撹拌し回収する
5	遠心分離	遠心条件：1600rpm, 5 分間 処理条件：4℃
6	セルカウント	
7	遠心分離	遠心条件：1600rpm, 5 分間 処理条件：4℃ タカラバイオ社/セルバンカー2 500 万個/mL となるようセルバンカー2 液で細胞を懸濁する。
8	冷凍保存	クライオジェニックバイアルにセルバンカー2 液で懸濁した細胞を分注し、BiCell（programmed freezing 用容器）に入れ-80℃ディープフリーザーで凍結 １週間以内に液体窒素タンクで保存する

[0101] 解析時

１．Ｍｙｅｌｏｉｄ系細胞解析

解凍後、ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１４１、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ３３、ＣＤ１４等の抗体染色を行いフローサイトメトリー解析を行った。

２．Ｔ細胞解析

１）ＲＰＭＩ１６４０＋１０％ＦＣＳに懸濁し５％CO_2インキュベーター内３７℃で３６時間程度静置（３２－４８時間）。

２）Ｔ細胞表面マーカー用抗体染色を行いフローサイトメトリー解析を行った。

[0102] （結果）

２０名の被験体における放射線治療の前後の各細胞集団の割合について、対応ありのスチューデント両側ｔ検定によるｔ統計量を算出した。結果は以下の表３に記載する。ｔ統計量0.05以下のものを、太字・下線で示した。

[表3]

%CD8			0.08527
CD8		%CD62L^{low}	0.45145
%CD4			0.25839
CD4		%CD62L^{low}	**0.00005**
		%CD25^{+}FoxP3^{+}	0.79704
		$X^2/Y^{※}$	**0.00684**
CD4	CD62L^{low}	%PD1^{+}	0.09589
	CD62L^{high}		0.34327
	CD62L^{low}	%LAG3^{+}	**0.00269**
	CD62L^{high}		**0.04940**
	CD62L^{low}	%ICOS^{+}	**0.00847**
	CD62L^{high}		**0.02795**
	CD62L^{low}	%CD28^{+}	0.05066
	CD62L^{high}		0.13572
	CD62L^{low}	%CD137^{+}	0.11265
	CD62L^{high}		0.45483
CD8	CD62L^{low}	%PD1^{+}	0.45717
	CD62L^{high}		0.30724
	CD62L^{low}	%CD137+	0.07432
	CD62L^{high}		0.31617
	CD62L^{low}	%CD28+	0.46535
	CD62L^{high}		0.20640
CD11c^{+}CD141^{+}	control		0.42728
	HLA-DR^{+}		**0.00031**
	CD80^{+}		0.82960
	DC		0.05845
CD33^{+}CD14^{+}	HLA-DR^{-}		**0.00026**

※XはCD4^{+}T細胞におけるCD62L^{low}細胞の割合、YはCD4^{+}T細胞におけるCD25^{+}FoxP3^{+}の割合

[0103] 一部の細胞亜集団について、放射線治療の前後の変化を図に示す。放射線治療の前後で、ＣＤ４$^{+}$細胞集団におけるＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団の割合、およびＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団におけるＩＣＯＳ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ

^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団の割合が有意に増加した（図１および図２）。ＣＤ４$^{+}$細胞集団におけるＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団の割合の増加は、放射線治療の種別のそれぞれ（curative　TRT：治療目的胸部放射線治療、curative　CRT：治療目的化学療法併用放射線治療、palliative　TRT：緩和目的胸部放射線治療）で同様に観察された（図３）。また、放射線治療前後で、ＣＤ１４１$^{+}$ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞集団におけるＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$ＣＤ１４１$^{+}$ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞亜集団の割合が有意に増加した（図４）。

[0104] ３回のサンプリングを行った被験体（ｎ＝１１）の放射線治療前、放射線治療完了時、および放射線治療後のそれぞれの時点での各細胞集団の割合の差について、対応ありのスチューデント両側ｔ検定によるｔ統計量を算出した。結果は以下の表４に記載する。ｔ統計量0.05以下のものを、太字・下線で示した。

[表4]

			1 vs 2	2 vs 3	1 vs 3
%CD8			0.27048	0.33391	0.83945
CD8		%CD62L^{low}	0.76510	0.40857	0.51159
%CD4			**0.00406**	**0.02730**	0.73208
CD4		%CD62L^{low}	**0.00309**	**0.03705**	0.05926
		%CD25^{+}FoxP3^{+}	0.60905	**0.01533**	**0.03230**
		X^2/Y	**0.03160**	**0.04496**	0.51546
CD4	CD62L^{low}	%PD1^{+}	0.11156	**0.04637**	**0.00212**
	CD62L^{high}		0.68432	0.87258	0.90077
	CD62L^{low}	%LAG3^{+}	0.11500	0.43324	0.05044
	CD62L^{high}		0.18017	0.30969	0.36390
	CD62L^{low}	%ICOS^{+}	0.09817	0.15019	**0.00096**
	CD62L^{high}		0.80340	0.66599	0.51226
	CD62L^{low}	%CD28^{+}	**0.02608**	0.38471	**0.04738**
	CD62L^{high}		0.29939	0.42312	0.38577
	CD62L^{low}	%CD137^{+}	0.36291	**0.01083**	**0.00857**
	CD62L^{high}		0.83206	0.57796	0.87942
CD8	CD62L^{low}	%PD1^{+}	0.65841	**0.00876**	**0.00600**
	CD62L^{high}		0.85194	0.36441	0.74932
	CD62L^{low}	%CD137^{+}	0.05993	0.15881	**0.01833**
	CD62L^{high}		0.90533	0.50539	0.39554
	CD62L^{low}	%CD28^{+}	0.33552	**0.04048**	0.19882
	CD62L^{high}		0.58656	0.12133	0.08773
CD11c^{+}CD141^{+}	control		0.77469	**0.02298**	0.17022
	HLA-DR^{+}		**0.00323**	0.20542	**0.00733**
	CD80^{+}		0.75819	0.50930	0.39338
	DC		0.29056	0.71302	0.38443
CD33^{+}CD14^{+}	HLA-DR^{-}		**0.00472**	0.70358	**0.00953**

※XはCD4^{+}T細胞におけるCD62L^{low}細胞の割合、YはCD4^{+}T細胞におけるCD25^{+}FoxP3^{+}の割合

1:放射線治療前、2:放射線治療完了時、3:放射線治療後

[0105] 一部の細胞亜集団について、放射線治療の前後の変化を図に示す。放射線治療の約３０日後においては、一時的に増加したＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団の割合およびＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$ＣＤ１４１$^{+}$ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞亜集団の割合が、放射線治療前の水準へと戻る傾向があった（図５）。

[0106] （考察）

ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団が強く正の相関を有するＴ細胞亜集団は、タイプ１ヘルパーＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（Ｔｈ１）、エフェクターメモリーＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞、エフェクターＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞である。これらは、細胞性免疫において殺細胞機能に重要な細胞亜集団である。一方、負の相関を有するのは、タイプ２ヘルパーＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞（Ｔｈ２）、制御性Ｔ細胞である。これらは、細胞性免疫を抑制する細胞亜集団として知られている。よって、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団の増加は、抗腫瘍細胞性免疫の活性化を示すと考えられる。また、ＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$ＣＤ１４１$^{+}$ＣＤ１１ｃ$^{+}$樹状細胞亜集団とＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団は正の相関関係を有している。これは、活性化された樹状細胞がＭＨＣ　ｃｌａｓｓＩＩ拘束性抗原を表出することで、ＭＨＣ　ｃｌａｓｓＩＩ拘束性抗原を認識するＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団の増加を来していると考えられ、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$細胞亜集団は、腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団であると考えられる。ＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$ＣＤ１４１$^{+}$ＣＤ１１ｃ$^{+}$樹状細胞亜集団は、腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団であると考えられる。また、ＬＡＧ３$^{+}$ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団、ＩＣＯＳ$^{+}$ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団、ＣＤ２８$^{+}$ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団、ＰＤ－１$^{+}$ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団、ＣＤ１３７$^{+}$ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団、ＰＤ－１$^{+}$ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞亜集団、ＣＤ１３７$^{+}$ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞亜集団も、腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＴ細胞亜集団であると考えられる（ＷＯ２０１８／１４７２９１）。

[0107] なお、放射線治療終了一ヶ月後の末梢血細胞分画の解析結果では、ＨＬＡ

－ＤＲ$^{+}$ＣＤ１４１$^{+}$ＣＤ１１ｃ$^{+}$樹状細胞亜集団の減少と共にＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団、ＣＤ２８$^{+}$ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団の減少を認める。これは、放射線治療により生じた免疫原性癌細胞死がなくなったことで樹状細胞の活性化が沈静化し、これに相関して増加していたＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団及び樹状細胞との相互作用に必要であったＣＤ２８発現が減少に転じたと理解することができる。但し、放射線治療中に樹状細胞からのがん抗原刺激を受けたＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団は、ＣＤ１３７、ＩＣＯＳを発現し、活性化した状態を保ちつつ残存する。一方、放射線治療終了一ヶ月後には、ＣＤ２５$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$ＣＤ４$^{+}$制御性Ｔ細胞亜集団及びＣＤ３３$^{+}$ＣＤ１４$^{+}$ＨＬＡ－ＤＲ$^{-}$ＭＤＳＣ細胞亜集団の増加が認められる。制御性Ｔ細胞及びＭＤＳＣがＴ細胞免疫を抑制する細胞であることはよく知られた事象であり、これは、活性化したＴ細胞亜集団を制御するためのネガティブフィードバックであると理解することができる。そもそも、ＰＤ－１阻害薬の効果を示すＴ細胞免疫状態の指標としてＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞亜集団を分子、制御性Ｔ細胞亜集団を分母として用いられることを示している。

[0108] 上記の結果から、抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＴ細胞亜集団および／または抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団を用いることによって、放射線治療による免疫活性化を評価できることが示唆される。

[0109] （実施例２：放射線治療による免疫活性化の応用）

末梢血中のＣＤ４$^{+}$ＣＤ６２Ｌ^{low}Ｔ細胞亜集団割合が一定以上の被験体に対し、免疫チェックポイント阻害剤を投与する。奏効集団において、免疫チェックポイント阻害剤の投与後にＣＤ４$^{+}$ＣＤ６２Ｌ^{low}Ｔ細胞亜集団割合が低下することがある。被験体におけるＣＤ４$^{+}$ＣＤ６２Ｌ^{low}Ｔ細胞亜集団割合をモニターすることで、被験体の免疫チェックポイント阻害剤に対する応答性をモニターする。ＣＤ４$^{+}$ＣＤ６２Ｌ^{low}Ｔ細胞亜集団の割合が低下した場合に、被験体に放射線治療を施す。放射線治療によって、ＣＤ４$^{+}$ＣＤ６２

Ｌｏｗ Ｔ細胞亜集団の割合が増加し、被験体の免疫チェックポイント阻害剤に対する応答性が回復する。

[0110] ＷＯ２０１８／１４７２９１に記載される手順により、末梢血中のＣＤ６２Ｌｏｗ ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団割合が無効群閾値未満であり、がん免疫療法に対して応答性ではないと判定された被験体に対して放射線治療を施す。その後、被験体に免疫チェックポイント阻害剤の投与を行う。放射線治療によって当該被験体の末梢血中のＣＤ６２Ｌｏｗ ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団割合が増加し、免疫チェックポイント阻害剤に対して応答性となる。

[0111] （実施例３：ＣＤ６２Ｌｏｗ ＣＤ４＋Ｔ細胞とエフェクターメモリー細胞との相関）

ｓｔａｇｅⅠ～ⅠＶの肺癌患者４２名から得た、８４検体（２０名の手術前後、２２名のＥＧＦＲ－ＴＫＩ前後）をＦｏｒｔｅｓｓａ解析し、ＣＤ４＋Ｔ細胞中のＣＤ６２Ｌｏｗ ＣＤ４＋Ｔ細胞の割合と、ＣＤ４＋Ｔ細胞中のエフェクターメモリー細胞（ＣＣＲ７－ＣＤ４５ＲＡ－）ＣＤ４＋Ｔ細胞の割合との関係を解析した。

[0112] 結果は図６に示される。ＣＤ６２Ｌｏｗ ＣＤ４＋Ｔ細胞とＣＣＲ７－ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ４＋Ｔ細胞が強い相関関係にあることが理解される。この結果から、エフェクターメモリー細胞（ＣＣＲ７－ＣＤ４５ＲＡ－）ＣＤ４＋Ｔ細胞の量をＣＤ６２Ｌｏｗ ＣＤ４＋Ｔ細胞の量の代替として使用可能であることが示唆される。

[0113] （実施例４：異なる患者集団での放射線治療による免疫活性化の指標の検討）

（概要）

実施例１における検討に加えて、異なる患者集団における特定の細胞亜集団の組成が、放射線治療前後で被験体において有意に変化しているパラメータ（すなわち、バイオマーカー）であるかどうかを検討した。

[0114] （材料および方法）

［被験体］

本実施例は、埼玉医科大学国際医療センターで、治療目的化学放射線療法（ＣＲＴ）または胸部放射線療法を受けた５６人の連続局所進行ＮＳＣＬＣ患者を対象として行われた。２２人の患者は、ＣＲＴ後にデュルバルマブの併用療法を受けた。末梢血サンプルは、放射線治療の前後と、場合により放射線治療の約１か月後に採取した。ＰＢＭＣをＬＳＲ　Ｆｏｒｔｅｓｓａ™で分析した。各時点でのサンプリングは実施例１と同様の手順に従った。

対象とした患者および施された処置の内容については以下のとおりである。

[表5]

表５．患者特性

	N=56
Age Median years (range)	**71 (51-83)**
Sex Male / Female	**42/ 14**
ECOG PS 0 / 1 /2	**36/ 18 /2**
Smoking history Yes / No	**50 / 6**
Tissue type Adeno / SQ / NOS	**26/ 18 / 12**
Clinical Stage IIIA / IIIB / IIIC / others	**24 / 21 / 2 / 9**
Gene Mutation EGFR/ ALK/ ROS-1/none	**4/ 1 / 0/ 51**

[表6]

表６．処置の詳細

Combination Chemotherapy (N=56) Yes/No	**43/13**
Radiation dose(N=56) 60Gy/30Fr 66Gy/30Fr 54Gy/27Fr 50Gy/25Fr	**49(87.5%)** **5(8.9%)** **1(1.8%)** **1(1.8%)**
Chemotherapy regimen(N=43) weekly CBDCA/PTX daily CBDCA CDDP/DTX CDDP+TS-1 biweekly CBDCA/DTX	**19(44.2%)** **15(34.9%)** **4(9.3%)** **4(9.3%)** **1(2.3%)**
Durvalumab(N=56) Yes/No	**22/34**

[0115] （結果）

結果は図７～１１に示される。図７～１１における「before RT」は、図１～６における「pre-TRT」と対応し、放射線治療（RT）の直前を示す。図７～１１における「post-RT」、図１～６の「post-TRT」、「at TRT completion」、「TRT complete」は、いずれも放射線治療（RT）終了直後である。

[0116] 実施例１における結果と一致して、胸部放射線療法後、末梢血でＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞およびＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$骨髄樹状細胞の割合の有意な増加が観察された（図７ａ、ｂ）。また、放射線治療前の％ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞と無増悪生存（ＰＦＳ）との間に有意な相関が観察された（図７ｃ）。なお、図７におけるＨＬＡ－ＤＲ^{high}ＣＤ１１ｃ$^{+}$ＣＤ１２３$^{-}$ｍＤＣ」は、実施例１における表３および４、ならびに図５のＨＬＡ－ＤＲ^{high}ＣＤ１１ｃ$^{+}$ＣＤ１４１$^{+}$ｍＤＣと対応する細胞集団である。

[0117] 図８は、放射線治療前と放射線治療完了時とのＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞上の免疫チェックポイント分子の発現の変化を示す図である（対応有りのｔ検定）。実施例１の結果（表３）と一致して、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞上のＬＡＧ－３およびＩＣＯＳの発現が有意に増加した（図８ｂおよびｃ）。加えて、本実施例においては、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞上のＰＤ－

１発現の増加にも有意差が観察された（図８ａ）。これはサンプル数の増加によるものと考えられる。

[0118] 図９は、放射線治療前と放射線治療完了時との、ＣＣＲ７およびＣＤ４５ＲＡでゲーティングしたＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞に基づくＴ細胞亜集団の変化を示す図である。ＣＣＲ７およびＣＤ４５ＲＡは、一般的に、ナイーブＴ細胞（ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$）、セントラルメモリー（ＣＭ）Ｔ細胞（ＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$）、エフェクターメモリーＴ細胞（ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$）を分画するのに用いることができる細胞表面マーカーである。

[0119] 図９ａに示されるように、放射線治療の前後で、ナイーブＣＤ４細胞が減少することが見出された。図９ｂに示されるように、セントラルメモリー細胞（ＣＭ）であるＣＣＲ７$^{+}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の有意な増加が観察された。セントラルメモリー細胞は、一旦機能した後に、攻撃する対象がなくなり休止状態となった細胞にあたるため、セントラルメモリー細胞が放射線治療後に増加しているのは本発明の論理と一致しない。そこで、実際にセントラルメモリー細胞群をさらに、ＣＤ６２Ｌ^{low}とＣＤ６２Ｌ^{high}に分けて検証したところ、本来のセントラルメモリー細胞の細胞表面マーカーの特徴であるＣＤ６２Ｌ^{high}の細胞集団ではなく、エフェクターメモリー細胞（ＥＭ）の特徴であるＣＤ６２Ｌ^{low}の細胞集団が増加していることが見出された（図９ｄおよびｅ）。すなわち、ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＣＲ７$^{+}$（図９ｅ）の集団は、一過性にＣＣＲ７を発現したことから外形上ＣＭに見えたものであり、実際に増加していた細胞集団はＥＭであり、図９ｃと９ｅから、放射線治療によってＥＭが増加することが理解される。この結果は、上記実施例３とも整合する。

[0120] 図１０は、放射線治療前、放射線治療完了時および放射線治療約１ヶ月後までの、％ｍＤＣ、％ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞および免疫チェックポイント分子発現の動態を示す図である（Tukey　post-hoc分析を伴う一元配置ＡＮＯＶＡ）。各図の一番上のP値が、ANOVA解析の結果である。また、post-hoc解析により、有意差が見出された２点間のｐ値がバーとともに示される。Ｃ

ＤＣＲ７およびＣＤ４５ＲＡでゲーティングしたＣＤ８＋Ｔ細胞に基づくＴ細胞亜集団の変化を示す図である。

[0122] 図１では放射線治療の前後でＣＤ８＋細胞集団の量に有意な変化がないことが示されているところ、実際にがん細胞に対する殺傷能力を有している細胞はＣＤ８＋細胞であると考えられるため、放射線治療において、ＣＤ８＋Ｔ細胞集団中の特定の亜集団に変化が存在するかを、ＣＣＲ７およびＣＤ４５ＲＡでゲーティングして分析した。上記のとおりＣＣＲ７およびＣＤ４５ＲＡは、一般的に、ナイーブＴ細胞（ＣＣＲ７＋ＣＤ４５ＲＡ＋）、セントラルメモリー（ＣＭ）Ｔ細胞（ＣＣＲ７＋ＣＤ４５ＲＡ－）、エフェクターメモリーＴ細胞（ＣＣＲ７－ＣＤ４５ＲＡ－）を分画するのに用いることができる細胞表面マーカーであり、ＣＣＲ７－ＣＤ４５ＲＡ＋の細胞は、ＥＭが老化した細胞（terminally differentiated）（ＥＭＲＡ）に該当する。

[0123] ＥＭ（図１１ｃ）とＣＭ（図１１ｄ）が増え、ＥＭＲＡ（図１１ａ）が減少するということは、若いＥＭが増えて、老化したＥＭが減少することを示し、これらの結果から、ＣＤ８陽性細胞もＲＴにより活性化されていることが理解される。

[0124] （考察）

放射線治療の際には、放射線治療で免疫が活性化されて免疫チェックポイ

ント阻害が効きやすい状態になり、時間の経過とともに、元の状態に戻る。免疫が活性化された状態においては、特定の細胞集団（ＣＤ６２Ｌ^{low}ＣＤ４$^{+}$など）に分化する細胞が増え、未分化（ナイーブ）の細胞は減少し、刺激、活性化された樹状細胞（ＨＬＡ－ＤＲ^{high}ＣＤ１１ｃ$^{+}$ＣＤ１２３$^{-}$ｍＤＣなど）が増え、ＣＤ８陽性の細胞集団における若いＥＭが増加する。これらのいずれかの細胞集団の変化を見ると、放射線治療後に免疫チェックポイント阻害が効きやすい状態かどうかを判定することができる。加えて、この効きやすい状態は時間の経過とともに自然と元に戻ることから、再度放射線治療を行って、再度免疫チェックポイント阻害が効きやすい状態にする必要があるか否かも、判定することができる。

[0125] なお、放射線治療ではなく、化学療法のみで解析を行った結果（ｎ＝６０、データ示さず）、ＣＤ４およびＣＤ８陽性いずれにおいてもエフェクターメモリー型（ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{-}$）の割合が有意に減少した。ＣＣＲ７$^{-}$ＣＤ４５ＲＡ$^{+}$ＣＤ８$^{+}$（ＥＭＲＡ）細胞分画は有意差がつかないもののやや増加した。ＣＤ６２Ｌ^{low}の割合に変化は見られなかったが、やや減少傾向であった。樹状細胞は変化が無かった。以上から、化学療法のみの場合は放射線治療後とはＴ細胞分画では逆のパターンに変化する傾向がある（抗がん剤治療のみでは若いＥＭが減少し、比率として古いエフェクターであるＥＭＲＡ分画が増加しているように見える）。

[0126] 放射線治療のみという患者群で解析した場合でも、化学放射線治療（化学療法＋放射線治療）群と同様の結果になるため、本実施例における放射線治療前後での免疫細胞組成の変化は放射線治療によるものと考えられる。

[0127] 本実施例の結果の解釈として：

放射線治療では、放射線による局所の免疫原性癌細胞死が生じ、樹状細胞が活性化され、エフェクターＴ細胞が増殖する

化学療法剤を用いる抗癌剤治療では、化学療法剤による免疫原性癌細胞死が生じ、樹状細胞が活性化するが、同時に化学療法剤及び制吐剤としてのステロイドによる樹状細胞減少効果が生じ、樹状細胞活性化によるエフェクタ

ーＴ細胞増殖が生じても、細胞周期に入ったＴ細胞は化学療法剤により細胞傷害を受けて死滅（ＥＭ分画減少効果）し、増殖能を既に失っているＥＭＲＡ集団は抗原提示を受けても細胞周期に入らず細胞傷害を受けず、抗原刺激による生存時間延長効果を受ける（ＥＭＲＡ分画の一時的増加効果）
といった機序が想定される。

[0128] したがって、化学療法剤治療を繰り返すと若いＥＭの減少効果により、terminally differentiatedエフェクター細胞であるＥＭＲＡが最終的には枯渇し、抗腫瘍Ｔ細胞免疫は消失してしまうことが予想される。例えば、胃癌の臨床試験であるＫｅｙｎｏｔｅ０６２では抗ＰＤ－１抗体と化学療法剤を併用して長期に治療すると抗ＰＤ－１抗体単剤での治療効果を下回ることが示されている。これに対して、放射線治療は若いＥＭを増加させる効果により抗腫瘍Ｔ細胞免疫をブーストできると考えられる。また、このブースト効果は上記の機序に関連するいずれかの細胞集団（例えば、ｍＤＣ、またはＣＤ６２Ｌ^{low}Ｔ細胞分画など）を観測することで数値化が可能であると考えられる。

産業上の利用可能性

[0129] 本発明はがん治療において利用することができる。本発明により、放射線治療による免疫活性化を評価することができ、放射線治療と併用するがん免疫療法（例えば、免疫チェックポイント阻害剤）に利用可能である。

[0130] （注記）

以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、この実施形態に限定して解釈されるべきものではない。本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。当業者は、本発明の具体的な好ましい実施形態の記載から、本発明の記載および技術常識に基づいて等価な範囲を実施することができることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。本願は

、日本国特許出願第２０１９－０２８５０２号（２０１９年２月２０日出願）および同第２０１９－１７５８５２号（２０１９年９月２６日出願）に対して優先権を主張するものであり、その内容の全体は、本願において参考として援用される。

請求の範囲

[請求項1] 放射線治療を受けた被験体から得られたサンプルにおける細胞亜集団の組成を、該被験体における放射線治療による免疫活性化の指標とする方法であって、

該被験体から得られた該サンプルにおける細胞亜集団の組成を分析する工程を含み、

該サンプルにおける抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ４$^+$Ｔ細胞亜集団の量と基準との比較により、該被験体における免疫活性化の有無が示される、方法。

[請求項2] 放射線治療を受けた被験体から得られたサンプルにおける細胞亜集団の組成を、該被験体における放射線治療による免疫活性化の指標とする方法であって、

該被験体から得られた該サンプルにおける細胞亜集団の組成を分析する工程を含み、

該サンプルにおける抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量と基準との比較により、該被験体における免疫活性化の有無が示される、方法。

[請求項3] 放射線治療を受けた被験体から得られたサンプルにおける細胞亜集団の組成を、該被験体における放射線治療による免疫活性化の指標とする方法であって、

該被験体から得られた該サンプルにおける細胞亜集団の組成を分析する工程を含み、

該サンプルにおける抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するＣＤ８$^+$Ｔ細胞亜集団の量と基準との比較により、該被験体における免疫活性化の有無が示される、方法。

[請求項4] 前記サンプルにおける抗腫瘍免疫応答における樹状細胞刺激と相関するＣＤ４$^+$Ｔ細胞亜集団の量、抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団の量および抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激

と相関するＣＤ８＋Ｔ細胞亜集団の量からなる群から選択される少なくとも２つの量と基準との比較により該被験体における免疫活性化の有無が示される、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項5] 前記抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団が、ＣＤ６２Ｌｌｏｗ ＣＤ４＋Ｔ細胞集団に含まれる細胞亜集団である、請求項１または４に記載の方法。

[請求項6] 前記抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団が、ＣＤ６２Ｌｌｏｗ ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団またはＣＣＲ７＋ＣＤ４５ＲＡ－ＣＤ６２Ｌｌｏｗ ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団である、請求項５に記載の方法。

[請求項7] 前記抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団が、ＩＣＯＳ＋ＣＤ６２Ｌｌｏｗ ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＬＡＧ３＋ＣＤ６２Ｌｌｏｗ ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団、ＰＤ－１＋ＣＤ６２Ｌｌｏｗ ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団またはＣＤ２８＋ＣＤ６２Ｌｌｏｗ ＣＤ４＋Ｔ細胞亜集団である、請求項５に記載の方法。

[請求項8] 前記抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関する樹状細胞亜集団が、ＨＬＡ－ＤＲ＋ＣＤ１４１＋ＣＤ１１ｃ＋細胞亜集団である、請求項２または４に記載の方法。

[請求項9] 前記抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するＣＤ８＋Ｔ細胞亜集団が、ＣＤ６２Ｌｌｏｗ ＣＤ８＋Ｔ細胞集団に含まれる細胞亜集団である、請求項３または４に記載の方法。

[請求項10] 前記抗腫瘍免疫応答での樹状細胞刺激と相関するＣＤ８＋Ｔ細胞亜集団が、ＣＤ１３７＋ＣＤ６２Ｌｌｏｗ ＣＤ８＋Ｔ細胞亜集団である、請求項９に記載の方法。

[請求項11] 前記サンプルが、末梢血サンプルである、請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。

[請求項12] 前記基準が、前記放射線治療前の前記被験体のサンプルにおける前記細胞亜集団の量である、請求項１～１１のいずれか１項に記載の方

法。

[請求項13] 前記サンプルにおける前記細胞亜集団の量が、前記基準より増加していることは、前記被験体において放射線治療による免疫活性化が生じていることを示す、請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。

[請求項14] 前記サンプルにおける前記細胞亜集団の量が、前記基準より増加していないことは、前記被験体において放射線治療による免疫活性化が生じていないことを示す、請求項１～１３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項15] 前記放射線治療が、腫瘍を含む照射範囲になされているものである、請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法。

[請求項16] 前記被験体において放射線治療による免疫活性化が生じていることにより、その時点で該被験体に免疫チェックポイント阻害剤を含むがん免疫療法を施すべきことがさらに示される、請求項１～１５のいずれか１項に記載の方法。

[請求項17] 前記被験体において放射線治療による免疫活性化が生じていないことにより、該被験体に再度放射線治療を施すべきことがさらに示される、請求項１～１５のいずれか１項に記載の方法。

[請求項18] 被験体から複数の時点で得られたサンプルにおける細胞亜集団の組成を、該被験体における放射線治療による免疫活性化をモニタリングするための指標とする方法としてさらに規定される、請求項１～１７のいずれか１項に記載の方法であって、該被験体から複数の時点で得られたサンプルにおける細胞亜集団の組成を分析する工程を含む、方法。

[請求項19] 被験体におけるがんを処置するための免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物であって、

該組成物は、放射線治療を受けた被験体であって、請求項１～１８のいずれか１項に記載の方法によって該被験体において免疫活性化が生じていることが示されている被験体に投与されることを特徴とする

、組成物。

[請求項20] 前記免疫チェックポイント阻害剤は、ＰＤ－１阻害剤および／またはＰＤ－Ｌ１阻害剤である、請求項１９に記載の組成物。

[請求項21] １または複数のさらなる薬剤と組み合わせて投与されることをさらに特徴とする、請求項１９または２０に記載の組成物。

[請求項22] 前記さらなる薬剤が、第２の免疫チェックポイント阻害剤を含む、請求項２１に記載の組成物。

[請求項23] 請求項１９～２２のいずれか１項に記載の組成物と、前記組成物が放射線治療と併用されることが記載された添付文書と、を含む製品。

[請求項24] 被験体において放射線治療による免疫活性化が生じているかを判定するためのキットであって、

（Ａ）ＣＤ４およびＣＤ６２Ｌ；

（Ｂ）（ｉ）ＩＣＯＳ、ＰＤ－１、ＬＡＧ－３およびＣＤ２８から選択されるマーカー、（ｉｉ）ＣＤ４、ならびに（ｉｉｉ）ＣＤ６２Ｌ；

（Ｃ）ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１４１およびＨＬＡ－ＤＲ；

（Ｄ）ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１２３およびＨＬＡ－ＤＲ；あるいは

（Ｅ）ＣＤ８、ＣＤ６２ＬおよびＣＤ１３７

に対する検出剤を含む、キット。

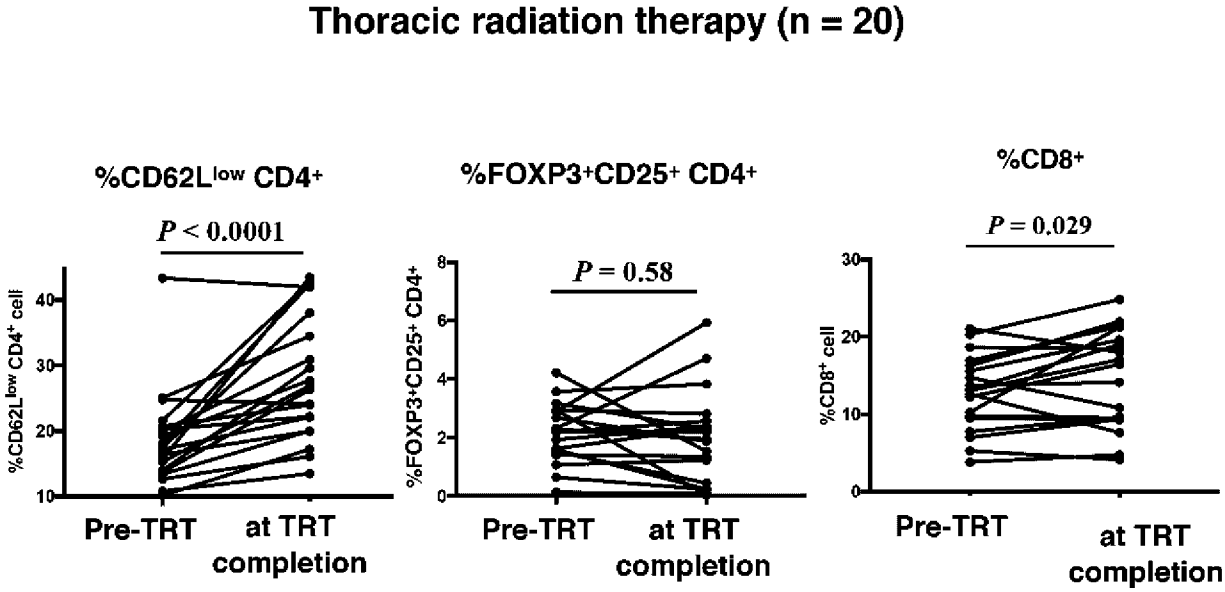
[請求項25] がんを処置するための免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物であって、放射線治療を受けた被験体に対して投与されることを特徴とし、該被験体は、放射線治療を受ける前に、がん免疫療法に対して応答性ではない免疫細胞組成を有していた、組成物。

[請求項26] 前記がん免疫療法に対して応答性ではない免疫細胞組成は、閾値よりも低いＣＤ４$^{+}$ＣＤ６２Ｌ^{low}細胞亜集団の量または割合である、請求項２５に記載の組成物。

[請求項27] 前記免疫チェックポイント阻害剤が、抗ＰＤ－１抗体および／または抗ＰＤ－Ｌ１抗体を含む、請求項２６に記載の組成物。

[図1]

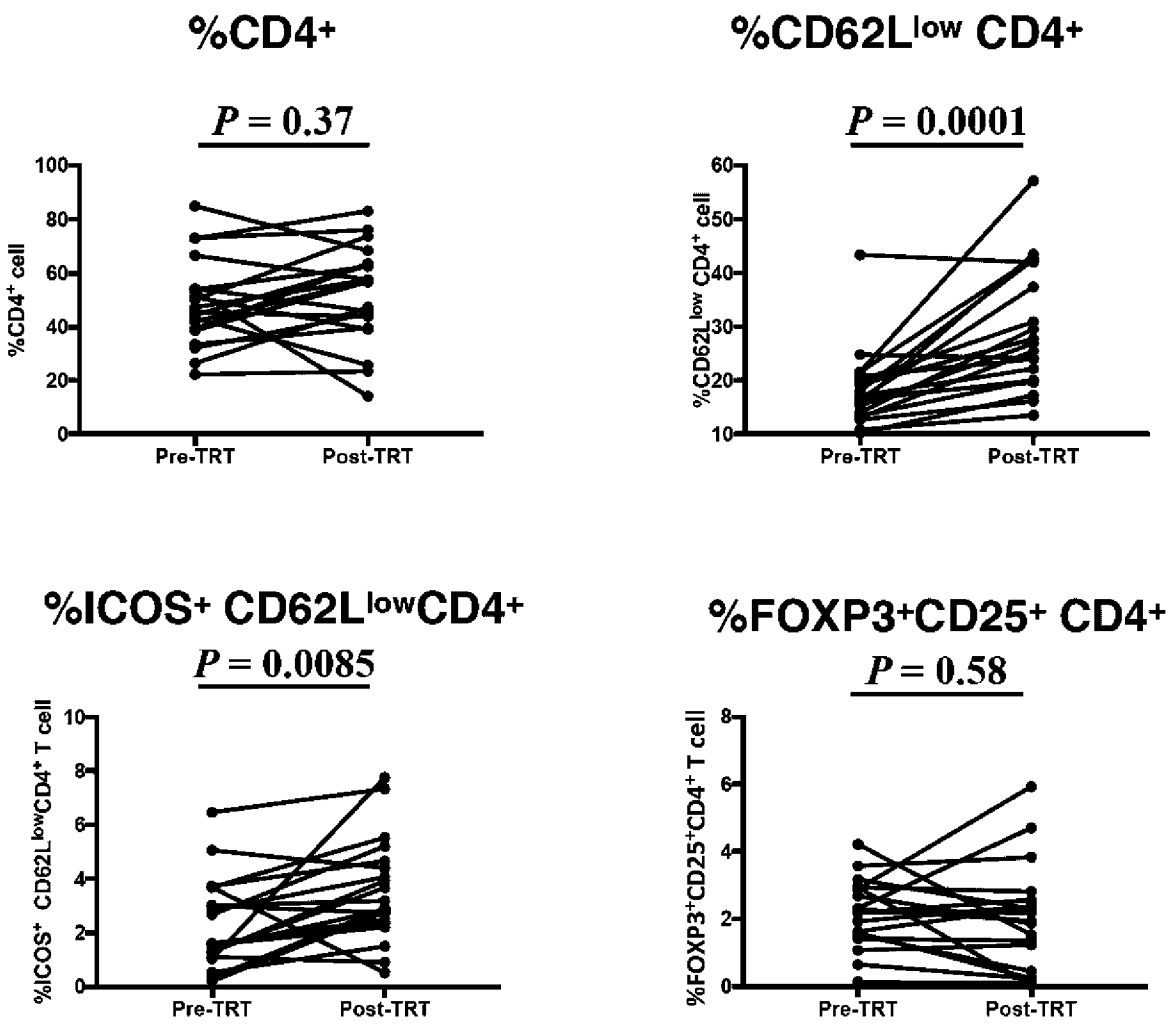
Fig. 1


Thoracic radiation therapy (n = 20)
%CD62L^low CD4+
P < 0.0001
%CD62L^low CD4+ cell
40
30
20
10
Pre-TRT
at TRT completion
%FOXP3+CD25+ CD4+
P = 0.58
%FOXP3+CD25+ CD4+
8
6
4
2
0
Pre-TRT
at TRT completion
%CD8+
P = 0.029
%CD8+ cell
30
20
10
0
Pre-TRT
at TRT completion

[図2]

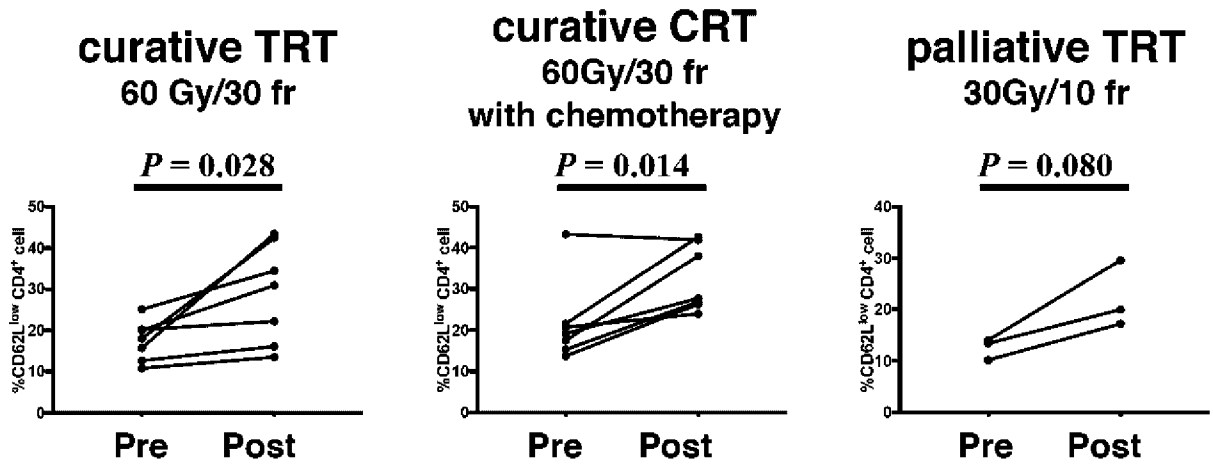
Fig. 2

胸部放射線治療が末梢血CD4+ T cellに及ぼす影響



[図3]

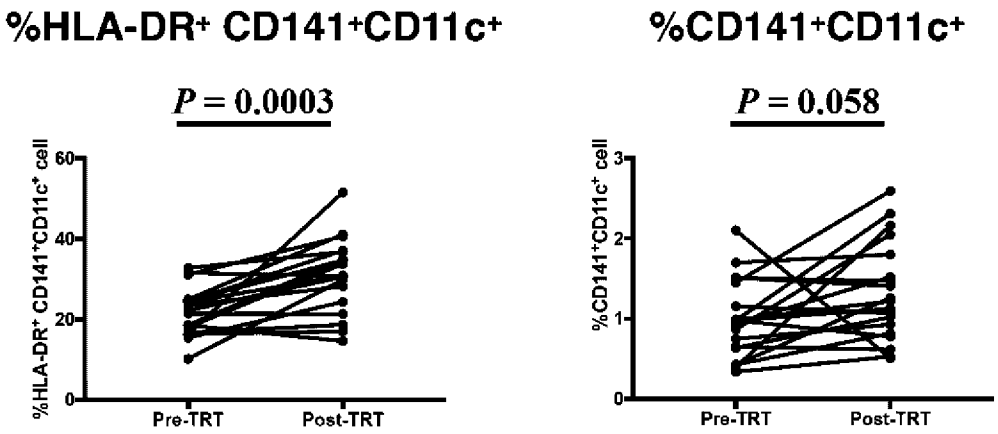
Fig. 3



[図4]

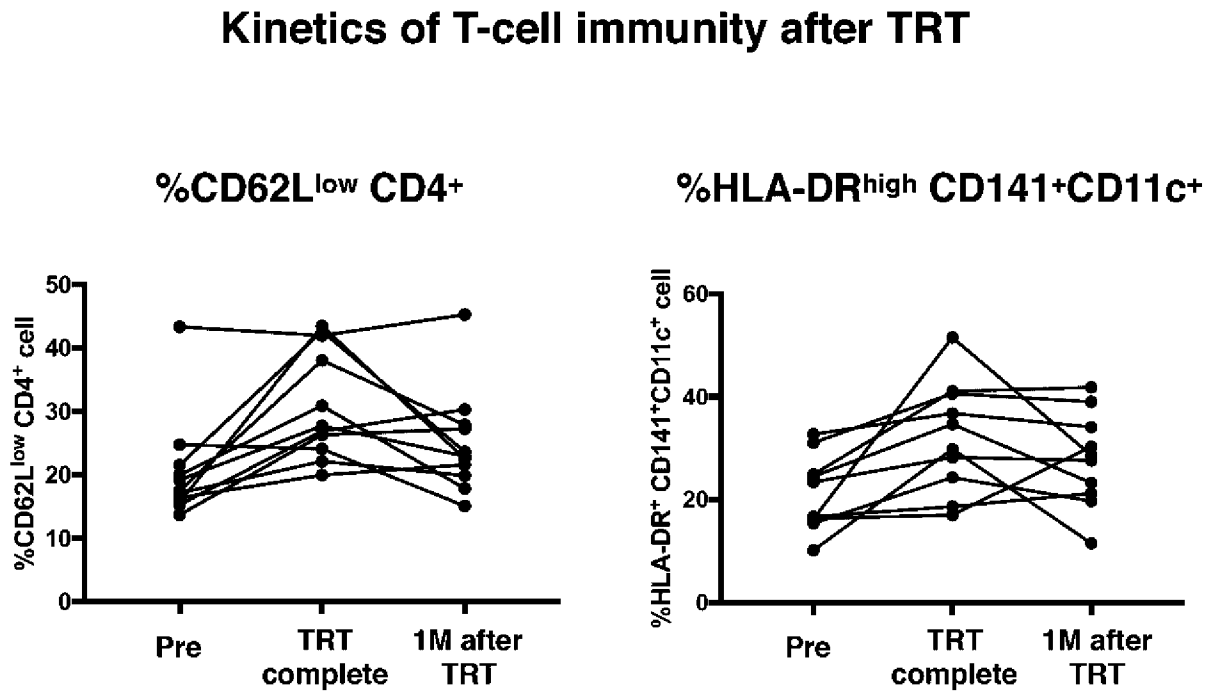
Fig. 4

胸部放射線治療が末梢血myeloid系DC細胞に及ぼす影響



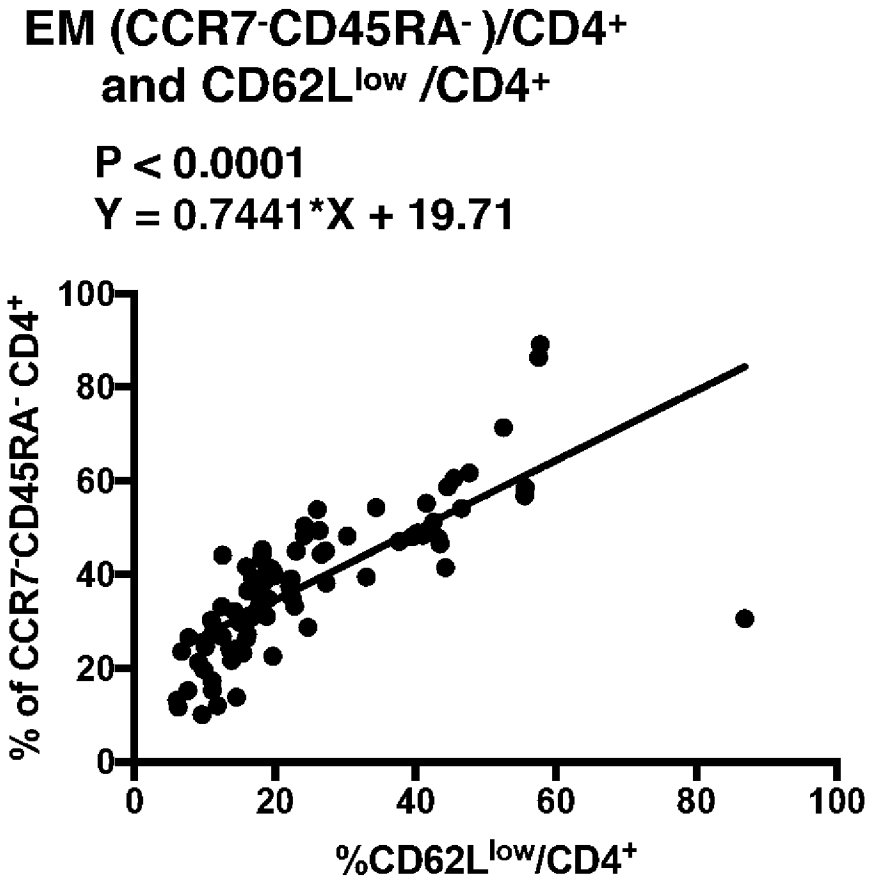
[図5]

Fig. 5


Kinetics of T-cell immunity after TRT
%CD62L^low CD4+
%CD62L^low CD4+ cell
50
40
30
20
10
0
Pre
TRT complete
1M after TRT
%HLA-DR^high CD141+CD11c+
%HLA-DR+ CD141+CD11c+ cell
60
40
20
0
Pre
TRT complete
1M after TRT

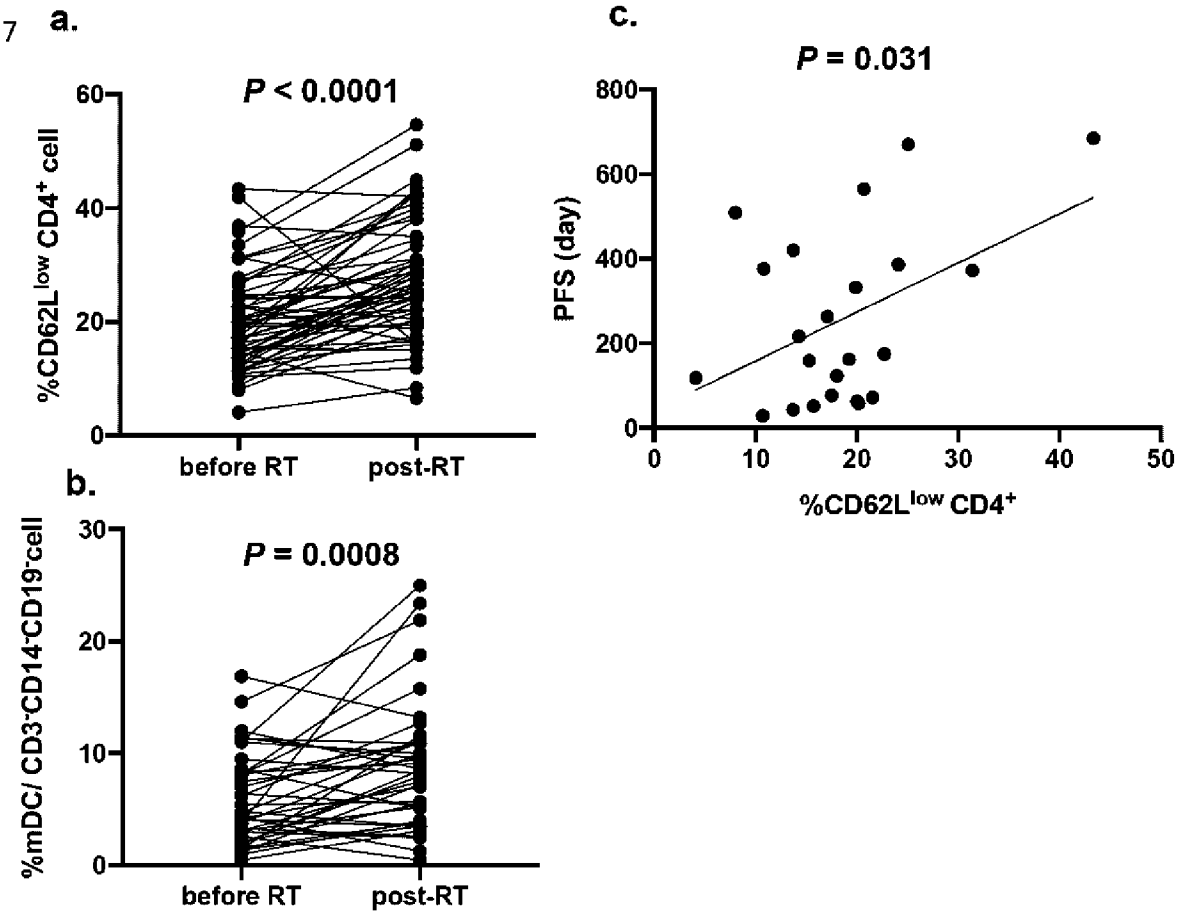
[図6]

Fig. 6


EM (CCR7-CD45RA-)/CD4+
and CD62Llow /CD4+
P < 0.0001
Y = 0.7441*X + 19.71
% of CCR7-CD45RA- CD4+
%CD62Llow/CD4+
0
20
40
60
80
100

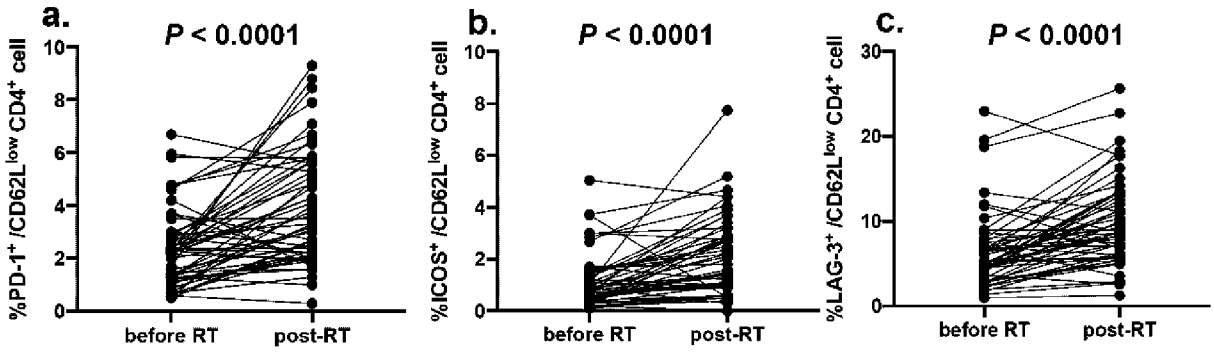
[図7]

Fig. 7



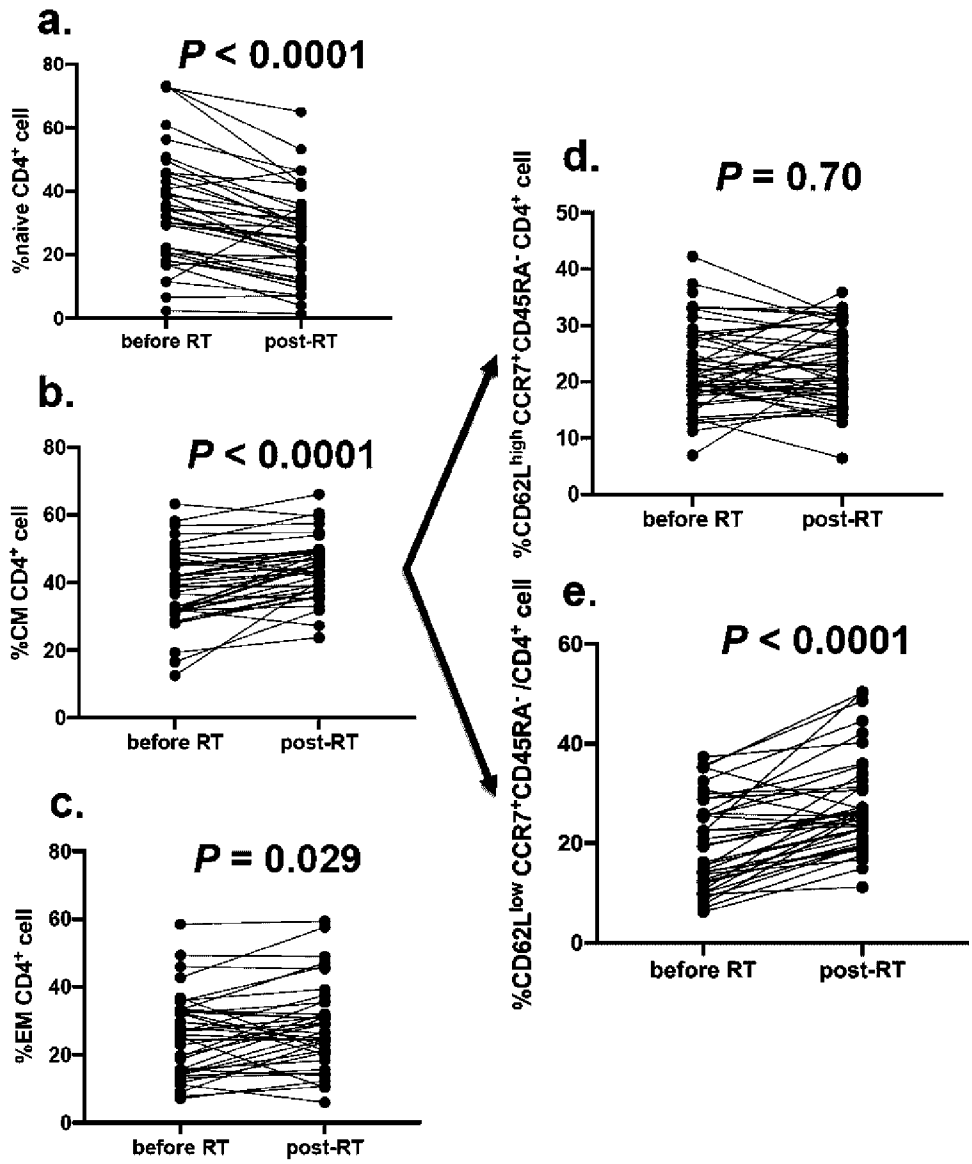
[図8]

Fig. 8 **Immune checkpoint molecule expression on CD62L^{low}CD4$^+$ T cell**
(paired t-test analysis)



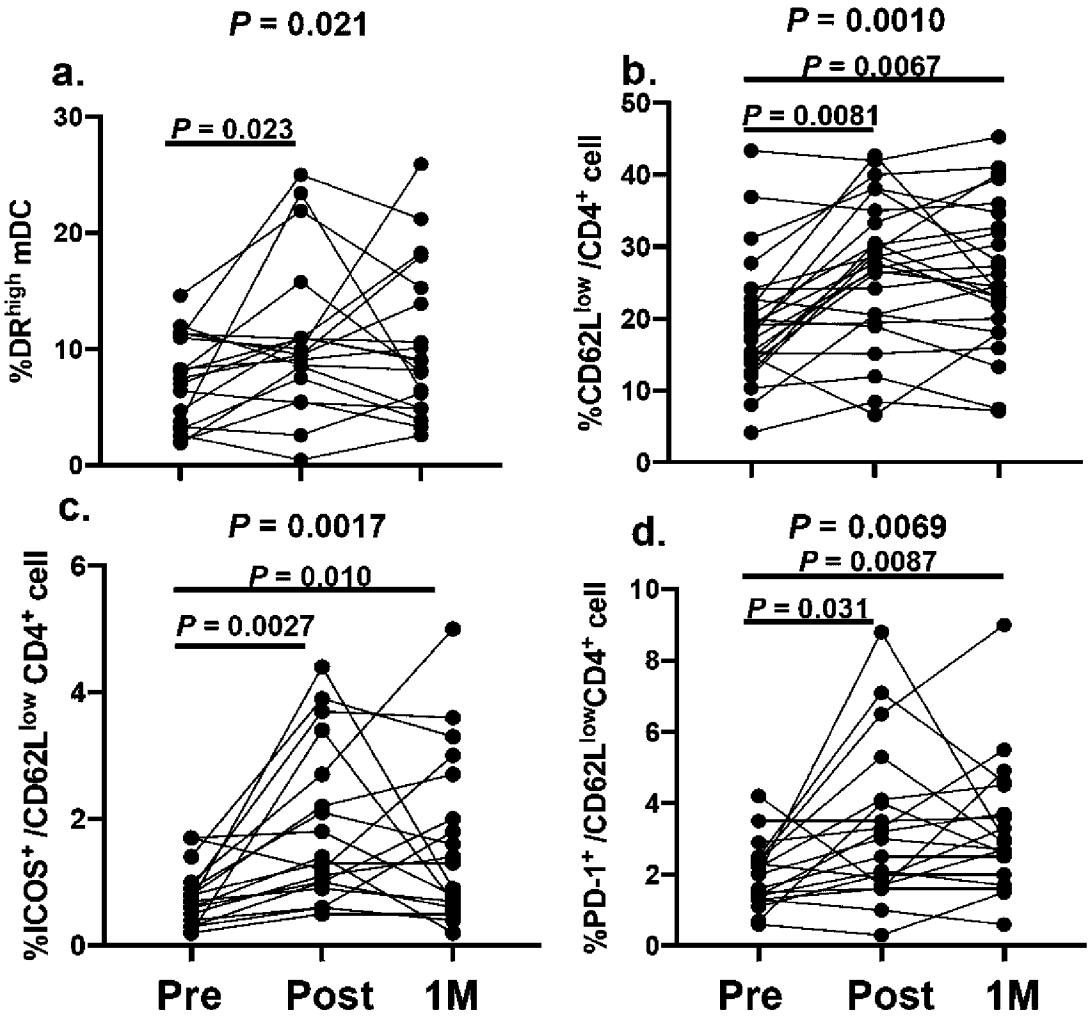
[図9]

Fig. 9


a.
P < 0.0001
%naive CD4+ cell
before RT
post-RT
b.
P < 0.0001
%CM CD4+ cell
c.
P = 0.029
%EM CD4+ cell
d.
P = 0.70
%CD62Lhigh CCR7+CD45RA- CD4+ cell
e.
P < 0.0001
%CD62Llow CCR7+CD45RA- /CD4+ cell

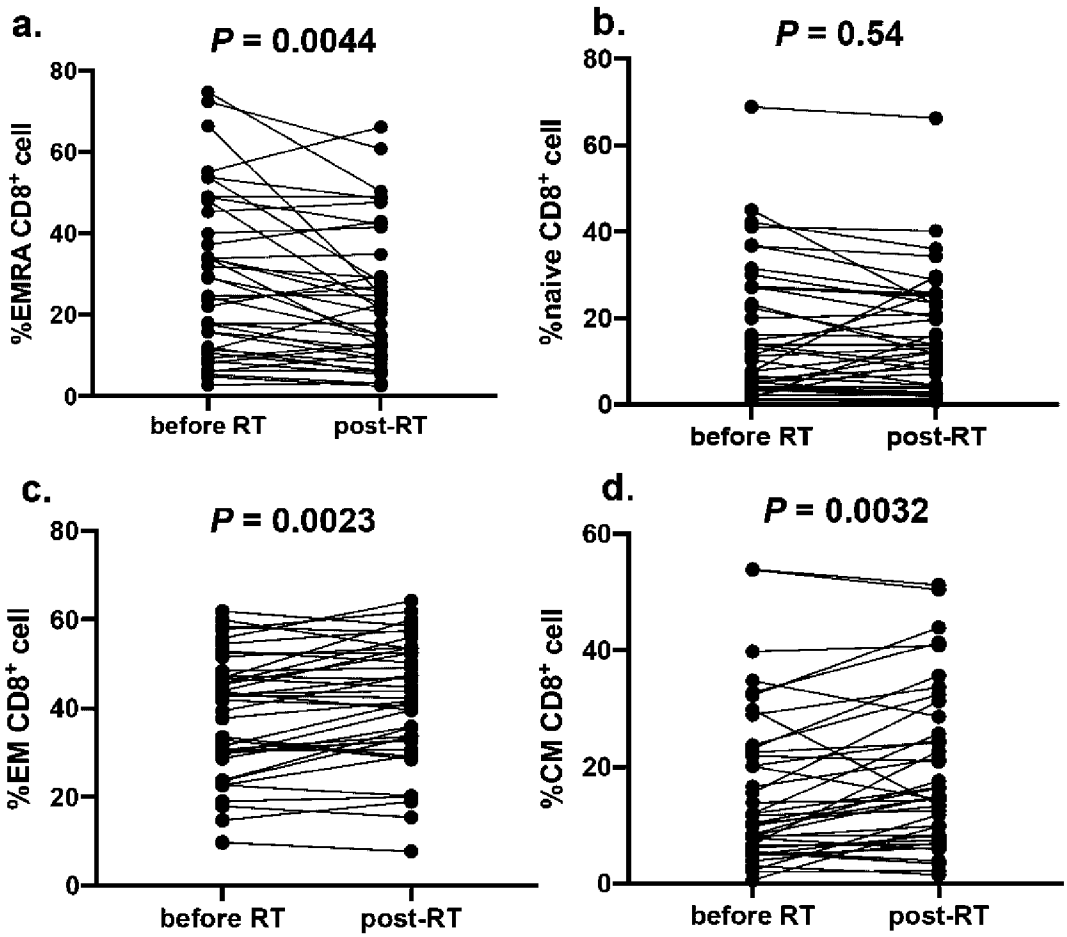
[図10]

Fig. 10


a.
P = 0.021
P = 0.023
%DRhigh mDC
b.
P = 0.0010
P = 0.0067
P = 0.0081
%CD62Llow /CD4+ cell
c.
P = 0.0017
P = 0.010
P = 0.0027
%ICOS+ /CD62Llow CD4+ cell
d.
P = 0.0069
P = 0.0087
P = 0.031
%PD-1+ /CD62LlowCD4+ cell
Pre
Post
1M

[図11]

Fig. 11


a.
P = 0.0044
%EMRA CD8+ cell
80
60
40
20
0
before RT
post-RT
b.
P = 0.54
%naive CD8+ cell
80
60
40
20
0
before RT
post-RT
c.
P = 0.0023
%EM CD8+ cell
80
60
40
20
0
before RT
post-RT
d.
P = 0.0032
%CM CD8+ cell
60
40
20
0
before RT
post-RT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/006616

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K 39/395(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07K 16/34(2006.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i; C12Q 1/06(2006.01)i; G01N 33/48(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i
FI: G01N33/574 A; G01N33/48 M; C12N5/0783; C12Q1/06; C07K16/34; A61K45/00; A61P43/00 121; A61P43/00 111; A61P35/00; A61K39/395 U; A61K39/395 G; G01N33/53 D
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K39/395; A61K45/00; A61P35/00; A61P43/00; C07K16/34; C12N5/0783; C12Q1/06; G01N33/48; G01N33/53; G01N33/574

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020
Registered utility model specifications of Japan 1996-2020
Published registered utility model applications of Japan 1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JD reamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	吉本由哉、鈴木義行，特集 免疫療法の新しい展開 免疫療法を含む併用療法 免疫療法と放射線療法の併用，がん分子標的治療，24 July 2017, vol. 15, no. 2, pp. 164-168, entire text, all drawings, in particular, see introduction - Antitumor immunity activation by irradiation, etc., non-official translation (YOSHIMOTO, Yuya, SUZUKI, Yoshiyuki, "Special issue, New development of immunotherapy, Combination therapy including immunotherapy, Combination of immunotherapy and radiation therapy", Journal of Molecular Targeted Therapy for Cancer)	1-27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 May 2020 (13.05.2020)	26 May 2020 (26.05.2020)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2020/006616

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2018/147291 A1 (SAITAMA MEDICAL UNIVERSITY) 16.08.2018 (2018-08-16) entire text, all drawings, in particular, see claims, etc.	1-27
A	JM, Qian et al., "Timing and type of immune checkpoint therapy affect the early radiographic response of melanoma brain metastases to stereotactic radiosurgery", Cancer, 10 June 2016, vol. 122, no. 19, pp. 3051-3058, https://doi.org/10.1002/cncr.30138, see entire text, all drawings, etc.	1-27
A	MARCISCANO, AE et al., "Elective Nodal Irradiation Attenuates the Combinatorial Efficacy of Stereotactic Radiation Therapy and Immunotherapy.", Clin Cancer Res., 15 October 2018, vol. 24, no. 20, pp. 5058-5071, Clin Cancer Res., 2018 Oct 15;24(20):5058-5071. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3427. Epub 2018 Jun 13, see entire text, all drawings, etc.	1-27
A	SHETAL, AP et al., "Combination Cancer Therapy With Immune Checkpoint Blockade: Mechanisms and Strategies", Immunity, 20 March 2018, vol. 48, no. 3, pp. 417-433, DOI: 10.1016/j_immuni.2018.03.007, see entire text, all drawings, etc., see entire text, all drawings, etc.	1-27
A	JP 2018-532414 A (LIFE TECHNOLOGIES AS) 08.11.2018 (2018-11-08) entire text, all drawings, in particular, see claims, etc.	1-27
A	村田憲治、外２名，がん免疫療法と免疫記憶，日本臨床免疫学会会誌，2016，vol. 39，no. 1，pp. 18-22，see entire text, all drawings, etc., (MURATA, Kenji et al., "Cancer immunotherapy and immunological memory", Japanese Journal of Clinical Immunology)	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/006616

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2018/147291 A1	16 Aug. 2018	JP 6664684 B1 entire text, all drawings, in particular, see claims, etc. EP 3580569 A1 entire text, all drawings, in particular, see claims, etc. CN 110446928 A KR 10-2019-0112027 A	
JP 2018-532414 A	08 Nov. 2018	US 2019/0062706 A1 entire text, all drawings, in particular, see claims, etc. WO 2017/072251 A1 entire text, all drawings, in particular, see claims, etc. EP 3368659 A1 entire text, all drawings, in particular, see claims, etc.	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2020/006616

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K 39/395(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C07K 16/34(2006.01)i; C12N 5/0783(2010.01)i; C12Q 1/06(2006.01)i; G01N 33/48(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i

FI: G01N33/574 A; G01N33/48 M; C12N5/0783; C12Q1/06; C07K16/34; A61K45/00; A61P43/00 121; A61P43/00 111; A61P35/00; A61K39/395 U; A61K39/395 G; G01N33/53 D

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K39/395; A61K45/00; A61P35/00; A61P43/00; C07K16/34; C12N5/0783; C12Q1/06; G01N33/48; G01N33/53; G01N33/574

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２０年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	吉本由哉、鈴木義行，特集　免疫療法の新しい展開　免疫療法を含む併用療法　免疫療法と放射線療法の併用，がん分子標的治療，2017.07.24，Vol.15,No.2，Page.164-168 全文・全図、特に、はじめに～放射線照射による抗腫瘍免疫の活性等参照	1-27
Y	WO 2018/147291 A1 (SAITAMA MEDICAL UNIVERSITY) 16.08.2018 (2018-08-16) 全文・全図、特に、特許請求の範囲等参照	1-27
A	JM Qian、外３名，Timing and type of immune checkpoint therapy affect the early radiographic response of melanoma brain metastases to stereotactic radiosurgery，Cancer，2016.06.10，Vol.122,No.19，Page.3051-3058，https://doi.org/10.1002/cncr.30138 全文・全図等参照	1-27

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
13.05.2020	26.05.2020

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
草川　貴史 2J 4075
電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	MARCISCANO AE、他２０名, Elective Nodal Irradiation Attenuates the Combinatorial Efficacy of Stereotactic Radiation Therapy and Immunotherapy., Clin Cancer Res, 2018.10.15, Vol.24,No.20, Page.5058-5071, Clin Cancer Res. 2018 Oct 15;24(20):5058-5071. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-17-3427. Epub 2018 Jun 13. 全文・全図等参照	1-27
A	SHETAL AP、他１名, Combination Cancer Therapy With Immune Checkpoint Blockade: Mechanisms and Strategies, Immunity, 2018.03.20, Vol.48,No3, Page.417-433, DOI: 10.1016/j.immuni.2018.03.007, 全文・全図等参照 全文・全図等参照	1-27
A	JP 2018-532414 A (ライフ テクノロジーズ エーエス) 08.11.2018 (2018-11-08) 全文・全図、特に、［特許請求の範囲］等参照	1-27
A	村田憲治、外２名, がん免疫療法と免疫記憶, 日本臨床免疫学会会誌, 2016, Vol.39,No.1, Page.18-22 全文・全図等参照	1-27

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2020/006616

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2018/147291 A1	16.08.2018	JP 6664684 B1 全文・全図、特に、特許請求の範囲等参照 EP 3580569 A1 全文・全図、特に、特許請求の範囲等参照 CN 110446928 A KR 10-2019-0112027 A	
JP 2018-532414 A	08.11.2018	US 2019/0062706 A1 全文・全図、特に、［特許請求の範囲］等参照 WO 2017/072251 A1 全文・全図、特に、［特許請求の範囲］等参照 EP 3368659 A1 全文・全図、特に、［特許請求の範囲］等参照	