

・ 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
(総合)分担研究報告書

がん免疫逃避機構を標的にした次世代型免疫治療の
臨床応用と新規バイオマーカーの探索に関する研究

研究分担者 清水 章

京都大学 臨床研究総合センター 開発企画部 教授

研究要旨

抗 PD1 抗体の投与によりがん細胞の免疫逃避を阻止する次世代型免疫治療を実用化することを目指し、治療効果の判定、治療効果の予測に有用な新規バイオマーカーを探索した。プラチナ抵抗性の再発卵巣がんを対象に、遺伝子発現を含む免疫反応の指標となる多数のマーカーを検索し、抗 PD1 抗体を投与された被験者と投与を受けていない患者のおける差、予後および治療効果との相関など検討することで新規バイオマーカーの探索を試みた。このような解析の前提となる抗 PD1 抗体を投与された被験者を抗 PD1 抗体製剤の早期第2相治験を医師主導で行うことにより得た。

A. 研究目的

がん細胞が、免疫反応を抑制する PD1-PDL1 信号を生成して免疫逃避することを標的とし、抗 PD1 抗体の投与により免疫逃避を解除する、次世代型の免疫治療を実用化することを目指し、このために必須な治療効果の判定、治療効果の予測に有用な新規バイオマーカーを探索する。

B. 研究方法

免疫反応は高度に生物種特異的であるので、抗 PD1 抗体を投与された被験者と一般的化学療法を受けた患者にける差を検索することで、はじめて臨床的に有用な、ヒトにおけるマーカーの探索が可能となる。解析の前提となる抗 PD1 抗体を投与された被験者を得るために、抗 PD1 抗体製剤の早期第2相治験を医師主導で実施し、一般的化学療法を受けた患者からの試料とともに解析に資する。このために必要な臨床試験への支援を行い、解析

に必要な患者由来試料を蓄積、保管する。

(倫理面への配慮)

必要な倫理委審査 (IRB 審査) などを経て治験届を PMDA に提出し、受理されている。目標患者数を達成するための試験期間延長と、他がん種を対象に我が国ならびに米国において実施されている臨床試験からの情報等をもとに臨床試験計画書等の改訂を行い、計画変更届等必要な手続きを行った。治験参加者と一般的化学療法を受けた患者からの試料を解析する研究について、別途倫理審査を受け承認を得ている。

C. 研究結果

抗 PD1 抗体を投与する医師主導治験は保の順調に実施され、抗 PD1 抗体を投与された被験者および一般的化学療法を受けた患者からのマーカー探索用試料が収集された。抗 PD1 抗体を投与する医師主導治験において、

低用量群への被験者登録を完了し、安全性を確認した上で高用量群への移行をおこなった。試験期間を延長し、目標症例数の登録を完了した。

D. 考察

抗 PD1 抗体製剤の早期第2相治験を医師主導で実施するため、多岐にわたる臨床試験支援が的確に行われ、目標症例数の被験者登録を完了、試料の収集が順調に行われている。

E. 結論

高度に生物種特異的なバイオマーカーの探索にはヒトを対象とした研究が必須である。その前提となる早期第2相治験を医師主導で実施するためには、多岐にわたる臨床試験支援を、時機を逃さず的確に行うことが不可欠かつ、極めて重要な位置を占める。本研究では、このような支援により、治験の完遂が間近であり、収集した試料の解析による、予後および治療効果に関する新規バイオマーカーの探索を可能にした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

J. Immunol. 186 巻, 6515-6520 (2011)

Exp. Hematol. 39 巻, 424-433 (2011)

J. Transl. Med. 巻, 55 (2011)

Am. J. Transl. Res. 4 巻, 52-59 (2011)

Scientific Reports 2 巻, 642 (2012)

Bone 50 巻, 69-78 (2012)

Annal. Surg. Oncol. 20 巻, 2213-2218 (2013)

Biochem. Biophys. Acta-General Sub. 1830 巻,

4046-4052 (2013)

Tissue Engineer. Part A 19 巻, 17-18, (2013)

2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

第18回臨床薬理講習会(平成23年12月、於浜松)「臨床研究の信頼性確保」:臨床研究の
プロトコール立案(臨床薬理 43 巻3号・
2012)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

いずれも該当なし。

厚生労働科学研究費補助金
(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
(総合)分担研究報告書

がん免疫逃避機構を標的にした次世代型免疫治療の
臨床応用と新規バイオマーカーの探索に関する研究

研究分担者 岡崎 拓
徳島大学 免疫・分子生物学 教授

研究要旨

がんの免疫療法は難治性がんに対する新規治療法として注目されてきたが、現在まで期待されたほどの効果は得られていない。我々は、免疫抑制受容体 PD-1 が、がんによる免疫逃避機構に強く関与していることを見出したことから、PD-1 阻害によるがん免疫の再活性化を目指した新規治療法の開発を行ってきた。本研究では、抗 PD-1 阻害抗体による治療効果を予測し得るバイオマーカーを探索することを目的とした。また、自己免疫疾患の発症制御において PD-1 と協調的に機能することを見出している免疫抑制受容体 LAG-3 の阻害剤をはじめ、抗 PD-1 阻害抗体と組み合わせることにより相乗効果を示す治療法の開発を目的とした。本研究期間内には、マイクロアレイを用いた発現解析により PD-1 と LAG-3 の抑制特性が異なることを見出した。また、PD-1 或いは LAG-3 によって発現誘導が強く抑制される遺伝子の転写調節領域を利用することにより、各々の機能をモニターできるレポーターシステムを構築した。今回得られた情報及び構築したシステムを用いることにより、PD-1 が機能している細胞を分離して解析できるようになれば、抗 PD-1 阻害抗体による治療効果の予測が可能になるとともに、より効果的な治療法の開発につながると期待される。

A. 研究目的

がんによる死亡は年々増加しており、難治性がんに対する早急な対応が求められている。免疫療法は有望な新規治療法と考えられているが、現在まで期待通りの臨床効果は得られていない。その最大の理由として、癌細胞がみずから腫瘍免疫応答を抑制し、宿主免疫から逃れる『免疫逃避機構』の存在があると考えられる。マウスを用いた実験において、免疫抑制受容体 PD-1 (Programmed cell death-1) の機能を阻害することによりがん免疫が増強され、効率的にがんが拒絶されたことから、がんによる免疫逃避機構において PD-1 が中心的な役割を果たしていると考えられる。そこで、PD-1 阻害によるがん免疫

の再活性化を目指した新規治療法の開発を行ってきた。

これまでの我々の基礎検討において、抗 PD-1 抗体による治療効果は、使用するがん細胞株の種類およびマウスの系統によって大きく異なった。そこで、抗 PD-1 抗体による治療効果を治療前或いは治療開始後早期に予測し得るバイオマーカーを探索することが重要である。これまでに、がん細胞の表面上に PD-1 リガンドが発現している場合には、抗 PD-1 阻害抗体が治療効果を示す可能性が高いことを示唆する結果が得られているが、リンパ球側のバイオマーカーについては、ほとんど解析されていない。

PD-1 阻害は、がん免疫を増強する反面、自己

免疫を惹起する可能性がある。PD-1 欠損マウスが、マウスの系統により異なる種類の自己免疫疾患を自然発症することから、PD-1 欠損による免疫応答の活性化には、PD-1 欠損以外の遺伝的要因や環境要因が大きく影響を与えと考えられる。最近我々は、LAG-3 (Lymphocyte activation gene-3) という別の免疫抑制受容体が PD-1 と協調的に自己免疫を制御していることを見出した。がん免疫における抗原は、多くの場合自己の抗原であるため、がん免疫においても PD-1 と LAG-3 が協調的に働くと考えられる。そこで、LAG-3 をはじめとした他の免疫抑制シグナルを PD-1 と同時に阻害することにより、PD-1 阻害抗体による抗腫瘍効果を増強し得ると期待される。

B. 研究方法

1) T 細胞株を用いた機能解析

I-Ad 拘束性にニワトリ卵白アルブミン由来ペプチドを認識する DO11.10 細胞株、I-Ek 拘束性に蛾シトクローム C 由来ペプチドを認識する 2B4.11 細胞株等の T 細胞株を用いて、抗原特異的な T リンパ球の活性化に対する PD-1 及び LAG-3 の抑制効果を評価した。具体的には、適合するハプロタイプの MHC を発現した細胞を抗原提示細胞として用い、抗原ペプチドを提示させ、各 T 細胞株を刺激した。刺激開始後、6~24 時間の時点で細胞を回収し、マイクロアレイ解析及びフローサイトメトリー解析を行った。また、培養上清を回収し、IL-2 等のサイトカインを定量した。抗原提示細胞と T 細胞の量と比率、抗原ペプチドの濃度、刺激時間等を増減させることにより刺激の強度を変えて検討した。

DO11.10 細胞株と 2B4.11 細胞株は、恒常的に PD-1 を発現していたため、抗原提示細胞に PD-1 リガンドを強制発現させることにより、PD-1 介在の有無を制御した。両細胞株とも LAG-3 は

恒常的に発現していなかったため、レトロウイルスベクターを用いて過剰発現させて、LAG-3 介在の有無を制御した。

2) マイクロアレイによる発現解析

DO11.10 細胞株を用いて、6 条件((1)無刺激、(2)PD-1 と LAG-3 の介在無しでの刺激、(3)PD-1 のみ介在下での刺激、(4)LAG-3 のみ介在下での刺激、(5)PD-1 と LAG-3 両者介在下での刺激、(6)MHC クラス II に対する阻害抗体存在下での刺激)における遺伝子発現をマイクロアレイ解析により網羅的に解析した。具体的には、刺激開始後 12 時間の時点で T 細胞のみを回収し、RNA を調製し、アジレント社のマイクロアレイを用いて全遺伝子の発現を比較した。

3) モノクローナル抗体の作製

マウス LAG-3 の細胞外領域をヒト IgG の Fc 領域と融合させたキメラタンパク質を発現するプラスミドベクターを作製し、293T 細胞に一過性に強制発現させた。培養上清からプロテイン A セファロースを用いてキメラタンパク質を回収した。得られたキメラタンパク質を LAG-3 欠損マウスに免疫した。免疫したマウスからリンパ球を回収してミエローマ細胞株 SP2/o と融合させた。LAG-3 を強制発現させた細胞株に対する反応性を指標にして、抗 LAG-3 抗体産生細胞株を得た。得られたクローンについて、LAG-3 に対する結合強度、機能阻害活性等を検討した。

4) レポーター細胞の作製

抗原受容体刺激により活性化を受けることが知られている NF-AT、NF- κ B、AP-1 等の転写因子が結合する配列を 1 個あるいは複数個重複させて EGFP、BFP、AmCyan、mCherry、tdTomato、Crimson、Dimer2、dsRed、LacZ、あるいは CRE 組換え酵素の上流に配置したプラスミドベクターを作製した。また、CRE 組換え酵

素により EGFP を発現するプラスミドベクターを作製した。各発現プラスミドベクターを DO11.10 細胞株に導入した後、特異的な抗原を用いて刺激し、蛍光タンパク質の発現頻度と強度或いは LacZ の酵素活性を定量した。

上述の転写因子結合配列に加え、PD-1 や LAG-3 により発現誘導が強く抑制される遺伝子の転写調節領域を用いて、各種レポータープラスミドを作製し、検討した。得られた結果を基に、用いる転写調節領域の長さ、重複数等を調節し、改良を試みた。

C. 研究結果

1) 抗原刺激による各種遺伝子の発現誘導に対する PD-1 と LAG-3 の抑制効果

これまでに、がん細胞の表面上に PD-1 リガンドが発現している場合には、抗 PD-1 阻害抗体が治療効果を示す可能性が高いことを示唆する結果が得られているが、リンパ球側のバイオマーカーについては、ほとんど解析されていない。そこで、リンパ球側のバイオマーカーの探索を試みた。

抗原刺激により、複数の情報伝達経路が活性化されることが知られているが、具体的に PD-1 や LAG-3 がどういった経路を、どのようなタイミングで、どれくらいの効率で抑制するかは、ほとんど分かっていない。そこで、抗原刺激による各種遺伝子の発現誘導に対する影響を指標に、各抑制受容体の機能的な違いを検討した。DO11.10 細胞株においては、抗原刺激により発現量が 2 倍以上上昇した遺伝子の数は 2,358 個であった。そのうちの 1,465 遺伝子は、PD-1 により 50% 以上、発現誘導が抑制されていた。一方、406 遺伝子は、PD-1 による抑制効果が 10% 以下であった。例えば、IL-2 遺伝子は抗原刺激により発現量が 15.3 倍に増加していたが、PD-1 介在時には 3.2 倍の増加にとどまり、約

85% の発現誘導抑制が確認された。また、PD-1 介在時に発現量が 4 倍以上亢進する遺伝子が 613 遺伝子、認められた。

2) PD-1 による抑制効果を検知するマーカーの探索

抗原受容体刺激により活性化を受けることが知られている NF-AT、NF- κ B、AP-1 等の転写因子が結合する配列を検討したところ、刺激強度を調整することにより、活性化細胞を効率的に標識できる条件を見出したが、PD-1 による抑制効果の判定には不適であった。

上述の通り、DO11.10 細胞株において、抗原刺激により発現量が 2 倍以上上昇し、かつ、PD-1 により 50% 以上、発現誘導が抑制される遺伝子を 1,465 個、PD-1 による抑制効果が 10% 以下の遺伝子を 406 個、同定している。その中で、PD-1 による抑制効果が特に強い遺伝子及び弱い遺伝子を 4 個選別し、それらの転写調節領域をクローニングして、検討した。その結果、遺伝子 A の転写調節領域を用いたレポーター (以下レポーター A) が、PD-1 による抑制を鋭敏に検出し得ることを見出した。

LAG-3 については、抗原刺激により発現量が 2 倍以上上昇し、かつ、LAG-3 により 50% 以上、発現誘導が抑制される遺伝子を 1,431 個、LAG-3 による抑制効果が 10% 以下の遺伝子を 428 個、同定している。その中で、LAG-3 による抑制効果が特に強い 3 遺伝子、及び上述の 4 遺伝子について、各々の転写調節領域を検討した。その結果、レポーター B が、LAG-3 による抑制を鋭敏に検出し得ることを見出した。一方、レポーター C は、LAG-3 による影響をほとんど受けなかった。また、PD-1 はレポーター B を抑制したが、レポーター C は中程度にしか抑制しなかった。さらに、LAG-3 はレポーター A を抑制しなかった。

また、同時に複数の条件で解析するために、

BFP, AmCyan, mCherry, tdTomato, Crimson, Dimer2, dsRed2 等、他の蛍光タンパク質を検討したところ、EGFP, BFP, Crimson および Dimer2 の4種類の蛍光色素を同時に使用することにより、最大4種類の条件で細胞の状態を同時に評価できるようになった。

3) 抗 PD-1 阻害抗体と組み合わせることにより相乗効果を示す治療法の開発

これまでに 16 種類の抗マウス LAG-3 モノクローナル抗体を得ることに成功した。そのうち、6 種類が試験管レベルで良好な機能阻害活性を示した。そのうちの一つは、既に市販されている抗体(クローン名:C9B7W)と比較して、親和性が 10 倍以上高く、阻害活性もより高いことが確認された。

また、ヒト LAG-3 についても、これまでに 18 種類の抗ヒト LAG-3 モノクローナル抗体を得ることに成功し、複数のクローンが強い阻害活性を有していることが確認できている。

D. 考察

抗原受容体刺激によって多くの遺伝子が発現誘導を受けるが、その全てが PD-1 あるいは LAG-3 によって均一に抑制される訳ではないことが明らかとなった。また、一部の遺伝子については、発現がむしろ誘導されていた。PD-1 による発現誘導抑制効果が特に強い遺伝子、ほとんど抑制されない遺伝子、むしろ発現が誘導される遺伝子等に注目して解析することにより、PD-1 阻害抗体による T 細胞の活性化をより鋭敏かつ正確にモニターできる可能性がある。それにより、抗 PD-1 抗体による治療前及び治療中のがん患者において PD-1 が実際にどの臓器のどのような種類の細胞で、どの程度機能しているかを判定できれば、より効率的な使用方法の確立に役立つとともに、より効果的な治療法の開

発につながるものと期待される。

抗原受容体刺激により活性化を受けることが知られている転写因子のモデル認識配列を用いてレポーターの作製を試みていたが、特に標識率が高い条件では、PD-1 存在下でもレポーター遺伝子の弱い発現が確認され、PD-1 による抑制を受けた細胞を明確に分離することが困難であった。そこで、マイクロアレイを用いた網羅的発現解析の結果を基に、PD-1 により発現誘導が強力に抑制される遺伝子の転写調節領域を用いたところ、PD-1 による抑制を受けた細胞と受けていない細胞を、より明確に分離できるようになった。

また、PD-1 と LAG-3 が発現誘導を抑制する遺伝子の種類が異なることを利用し、PD-1 及び LAG-3 による抑制を判別できるシステムの構築を試みた。遺伝子 A、B、C の転写調節領域、及び異なる色の蛍光色素を用いることにより、PD-1 によって抑制を受けている T リンパ球 (A_{low}, B_{low}, C_{int})、LAG-3 によって抑制を受けている T リンパ球 (A_{high}, B_{low}, C_{high})、両者による抑制を受けていない T リンパ球 (A_{high}, B_{high}, C_{high})、及び全く抗原刺激を受けていない T リンパ球 (A_{low}, B_{low}, C_{low}) を分離することが可能となった。現時点では、レポーター C の標識率はほぼ 100% であるが、それ以外のは標識率が低いため、判定の精度が条件によっては必ずしも高く無い。今後、実際にマウス生体内等で利用するには、縦列化等により標識高率を向上させる必要があると思われる。また、上述の組み合わせでは、PD-1 と LAG-3 の両者によって抑制を受けている細胞を判別することができないため、今後、別の遺伝子の転写調節領域も検討する予定である。

E. 結論

抗 PD-1 阻害抗体は、がんの治療に対して革

新的な変化を与えると期待される。しかし、抗 PD-1 抗体による治療効果は、使用するがん細胞株の種類およびマウスの系統によって大きく異なることから、抗 PD-1 阻害抗体による T 細胞の活性化レベルを鋭敏かつ正確にモニターし、治療効果を予測する方法を開発するとともに、抗 PD-1 阻害抗体の効果をより高める治療法を開発することが重要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugino Yoshio, Nishikawa Nobuyuki, Yoshimura Koji, Kuno Sadako, Hayashi Yukio, Yoshimura Naoki, Okazaki Taku, Kanematsu Akihiro, Ogawa Osamu. BALB/c-Fcgr2bPdc1 mouse expressing anti-urothelial antibody is a novel model of autoimmune cystitis. *Sci Rep.* 2012;2:317.
2. Iwamoto Satoru, Kido Masahiro, Aoki Nobuhiro, Nishiura Hisayo, Maruoka Ryutaro, Ikeda Aki, Okazaki Taku, Chiba Tsutomu, Watanabe Norihiko. IFN- γ is reciprocally involved in the concurrent development of organ-specific autoimmunity in the liver and stomach. *Autoimmunity.* 2012 Mar;45(2):186-198.
3. Hisako, Ueda Yoshiyasu, Sawa Yukihiisa, Jeon Seong Gyu, Ma Ji Su, Okumura Ryu, Kubo Atsuko, Ishii Masaru, Okazaki Taku, Murakami Masaaki, Yamamoto Masahiro, Yagita Hideo, Takeda Kiyoshi. Intestinal CX3C chemokine receptor 1high

(CX3CR1high) myeloid cells prevent T-cell-dependent colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Mar ;109(13):5010-5015.

4. Satoru Iwamoto, Masahiro Kido, Nobuhiro Aoki, Hisayo Nishiura, Ryutaro Maruoka, Aki Ikeda, Taku Okazaki, Tsutomu Chiba, Norihiko Watanabe, “TNF- α is essential in the induction of fatal autoimmune hepatitis in mice through upregulation of hepatic CCL20 expression”, *Clin Immunol*, vol. 146, No. 1, pp.15-25, 2013
 5. Taku Okazaki, Shunsuke Chikuma, Yoshiko Iwai, Sidonia Fagarasan, Tasuku Honjo., A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application., *Nat. Immunol.* 14(12):1212-1218, 2013
- ##### 2. 学会発表
1. 岡崎 拓、自己免疫疾患のゲノム解析、第8回宮崎サイエンスキャンプ、宮崎、2012年2月17日
 2. Taku Okazaki、Regulation of autoimmunity by immuno-inhibitory receptors、New horizons in immune system、Tokushima、February 9th、2012
 3. 岡崎 拓、*aida* マウスを用いた自己免疫疾患発症制御機構の解析、第7回自己免疫疾患研究会、東京、2012年7月7日
 4. Taku Okazaki、Immuno-inhibitory receptors in the regulation of autoimmunity、2013 SKKU International Symposium on Molecular Medicine、Suwon、Korea、

- February 28th, 2013
5. 岡崎一美、杉浦大祐、高橋涼香、梶原雄、岡崎 拓、PD-1 欠損マウスを用いた自己免疫疾患のゲノム解析、第11回四国免疫フォーラム、高知県南国市 2012 年 6 月 9 日
 6. 岡崎 拓、免疫抑制受容体による免疫応答の制御、第4回 東京編・徳島大学研究者との集い、東京、2012 年 7 月 27 日
 7. Il-mi Okazaki and Taku Okazaki, Genetic reconstitution of autoimmunity in mice, The Second Immunology Symposium at the University of Tokushima, Tokushima, January 25th, 2013
 8. Taku Okazaki, Immuno-inhibitory receptors in the regulation of autoimmunity, The Second Immunology Symposium at the University of Tokushima, Tokushima, January 25th, 2013
 9. Il-mi Okazaki, Daisuke Sugiura, Suzuka Takahashi, Takeo Kajihara, Taku Okazaki, Identification of new therapeutic targets by genetic dissection and reconstitution of autoimmune diseases in mice, JST-CREST International Symposium, Tokyo, February 12-13th, 2013
 10. Taku Okazaki. Regulation of autoimmunity by immuno-inhibitory receptors., The 3rd Bizan immunology symposium, Tokushima, February 14th, 2014
 11. Daisuke Sugiura, Il-mi Okazaki, Taku Okazaki. Molecular analyses of an inhibitory co-receptor, LAG-3., The 3rd Bizan immunology symposium, Tokushima, , February 14th, 2014
 12. 杉浦大祐、免疫抑制受容体 LAG-3 による T 細胞活性化制御機構の解析、第 12 回四国免疫フォーラム、香川県さぬき市、2013 年 6 月 22 日
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
1. 特許取得 なし
 2. 実用新案登録 なし
 3. その他 なし

(難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業)
(総合)分担研究報告書

PD-1 欠損マウスを用いた、バイオマーカー探索の基礎的検討

研究分担者 竹馬 俊介 京都大学 免疫ゲノム医学 助教
研究協力者 RUI YUXIANG 京都大学 博士課程大学院生

研究要旨

ヒト型 PD-1 抗体療法は、がんに対する有効な免疫増強治療法として国内外で精力的に開発が進められている。この治療法の副作用として起こり得る、アレルギーや自己免疫様症状の、環境危険因子や早期検出を可能にするバイオマーカーを検討するため、PD-1 欠損マウスに既知の自己抗原を投与し、同時投与でT細胞反応に影響するような因子を検討した。その結果、結核菌抗原を投与した PD-1 欠損マウス由来のマクロファージが、炎症性サイトカインである interleukin(IL)-6 を大量に産生し、これが T 細胞に作用して IL-17 を産生する自己反応性 T 細胞への分化を起しやすくなる事がわかった。結核の不顕性感染や、それに類する(マイコバクテリア属)微生物学的因子が疑われるがん患者においては、思わぬ副作用としてのT細胞性自己免疫症状が起こり易い可能性があり、このような患者へのPD-1阻害薬投与は、より慎重に行う必要があること、自己免疫の兆候をいち早く察知するマーカーとして、免疫細胞から産生される IL-6 の定量が有用である可能性が示唆された。

A. 研究目的

ヒト型 PD-1 抗体療法は、がんに対する有効な免疫増強治療法として国内外で精力的に開発が進められている。PD-1 阻害による免疫増強の副作用として、一部の患者には、アレルギーや自己免疫様症状が現れることが予測され、投与初期に自己免疫疾患の兆候をとらえるバイオマーカーを得ることが出来れば有用であると考えられる。また、自己免疫疾患の危険因子として、患者の先天性因子だけでなく、基礎疾患や不顕性感染といった環境因子が考えられる。当研究では、不顕性感染の代表である、結核菌の菌体抗原が危険性因子となる可能性を、PD-1 欠損マウスを用いて検討した。

B. 研究方法

(環境因子による自己免疫反応の検討)

PD-1 欠損マウスに、結核死菌単独、あるいは結核死菌と、マウス脳ミエリタンパク由来)自己ペプチド(MOG35-55)を投与し、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の発症を 30 日間観察した。病勢を観察し、定法によって点数化し、評価した。また、投与後、8 日後、30 日後のマウスよりT細胞を調整し、このT細胞を同系マウスの脾臓細胞、および MOG35-55 で再刺激した。培養上清を採集し、BD 社の cytometric bead array 法を用いて、抗原特異的なサイトカイン産生を測定した。また、野生型マウスに、PD-1 欠損 RAG2 欠損マウスの骨髓および野生型 CD4 陽性 T 細胞を移植し、非リンパ球でのみ PD-1 を欠損するマウスを複製、ここに結核死菌と MOG35-55 を投与して、実験的 EAE を誘導した。

(炎症性 T 細胞産生能の評価とメカニズム解析)

PD-1 欠損マウスおよび野生型マウスに結核死菌を投与して、7~8 日後に脾臓細胞を調整し、これを抗原提示細胞として用い、OTH TCRトランスジェニックマウスマウスの T 細胞を特異的抗原 (OVA323-339) にて刺激した。3 日間培養後、T 細胞を Phorbol 12-Myristate 13-acetate および ionomycin で 6 時間刺激し、蛍光標識 CD4 および TCR V α 2 抗体で表面染色を施した。この細胞を、4%パラホルムアルデヒド固定後、0.1%サポニンを含む FACS 緩衝液で洗浄、細胞内に産生された IL-17 を、特異的抗体で染色し、結核菌を経験した細胞の T 細胞分化に与える影響を検討した。いくつかの実験では、結核菌を投与しないマウスから、脾臓細胞を調整し、マクロファージの表面抗原である CD11b を認識する磁気ビーズで標識、ミルテニ社の AUTO MACS で分離した。分離したマクロファージには、試験管内で結核菌を投与し、前述の T 細胞との共培養に用いた。また、培養中に、抗 IL-6 レセプター抗体を添加し、IL-6 の作用を中和した状態で、Th17 分化に与える影響を評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、京都大学医学研究科の定める動物実験実施要綱、および京都大学動物実験指針を遵守して行った。また、PD-1 欠損マウスは、組み換え DNA 技術を用いて作出されているため、事前に京都大学組み換え DNA 実験委員会の承認を得たうえで行った。

C. 研究結果

PD-1 欠損マウスに結核死菌(250 \square g/マウス)を投与すると、同時に投与した自己抗原である、MOG35-55 に対して、強い反応が惹起

され、野生型マウスに起こる EAE と比較して早期発症、重症化が見られることがわかった。野生型マウスでは、低用量の結核死菌(50 \square g/マウス)では EAE が起らなかったが、PD-1 欠損マウスでは半数以上が発症した。試験管内の再刺激実験において、PD-1 欠損マウスでは MOG35-55 に対する IL-17 の産生が更新しており、PD-1 欠損マウスでは結核菌に対する 17 型ヘルパー T 細胞(Th-17)型の免疫反応が更新していることが示唆された。

次に、PD-1 欠損マウスを結核死菌単独で免疫したマウスより 8 日後に脾臓細胞を分離し、これを抗原提示細胞として、抗原特異的ナイーブ T 細胞を分化させる実験を行った。結果、結核死菌を経験した PD-1 欠損マウスの抗原提示細胞、特に、CD11b を表現するマクロファージは、野生型に比べ、有意に多くの Th-17 を分化させる事が明らかとなった。試験管内で、PD-1 欠損マウス由来のマクロファージを結核死菌により刺激すると、野生型マクロファージに比べ、高濃度の IL-6 を放出することがわかった。この IL-6 と Th17 分化亢進の関係を調べるため、PD-1 欠損脾臓細胞を用いて抗原特異的 T 細胞を分化させる培養系において、IL-6 と、そのレセプターの結合を阻害する抗体を作用させた。この処置は、Th17 分化を阻害抗体の濃度依存性に抑制したため、PD-1 欠損マクロファージからの IL-6 産生が Th-17 分化亢進に直接かかわっていることが明らかになった。また、骨髄移植法によって、マクロファージなど、非リンパ球系細胞でのみ PD-1 を欠損するマウスを作製した。このようなマウスでは、PD-1 を発現するコントロールマウスと比較して、Th-17 型反応の亢進を伴う、実験的脳脊髄炎の早期発症および重症化が観察された。

D. 考察

PD-1 欠損下では、マクロファージから通常より多くの IL-6 産生が起こり、自己反応性 T 細胞に作用して Th-17 細胞を分化させる可能性が示唆された。IL-6 は、PD-1 欠損マウスと野生型マウスで結核菌刺激後初期に差が見られた唯一のサイトカインであり、PD-1 抗体治療開始時の血清 IL-6 を測定すれば、免疫増強療法の副作用としての自己免疫疾患発症を予測できる可能性がある。

E. 結論

結核菌など、トル様受容体を刺激して、抗原提示細胞からの IL-6 を誘導する活性をもつ病原体、およびカビなどの環境因子は、潜在的に自己反応性 Th-17 の分化も起こす可能性を持っている。ここに PD-1 阻害を行うと、自己反応性 Th-17 の活性化を誘導し、思わぬ自己免疫病を発症する可能性がある。よって、患者における、不顕性感染などの微生物学的因子は、PD-1 抗体療法の際に慎重にモニタリングされる必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

竹馬 俊介 本庶 佑 PD-1の機能が
がん分子標的治療 2014 12(1) 51-56

Okazaki T, **Chikuma S**, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol*. 2013 Dec;14(12):1212-8

Stumpf M, Zhou X, **Chikuma S**, Bluestone JA Tyrosine 201 of the cytoplasmic tail of CTLA-4 critically affects T regulatory cell suppressive function. *Eur. J. Immunol*. 2014 Mar 20. [Epub ahead of print]

Nguyen T, Xu J, **Chikuma S**, Hiai H, Kinoshita K, Moriya K, Koike K, Marcuzzi GP, Pfister H, Honjo T, Kobayashi M Activation-induced cytidine deaminase is dispensable for virus-mediated liver and skin tumor development in mouse models. *Int. Immunol*. 2014 Mar 15. [Epub ahead of print]

Rui Y, Honjo T, **Chikuma S** Programmed cell death 1 inhibits inflammatory helper T-cell development through controlling the innate immune response. *P.N.A.S.* 2013 Oct 1;110(40):16073-8.

竹馬 俊介 TRIM28による自己炎症性 T細胞の制御 **医学のあゆみ** 2013 245(8):665-6 2013

Hara-Chikuma M, **Chikuma S**, Sugiyama Y, Kabashima K, Verkman AS, Inoue S, Miyachi Y. Chemokine-dependent T cell migration requires aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide uptake. *J Exp Med*. 2012 Sep 24;209(10):1743-52

Chikuma S, Suita N, Okazaki IM, Shibayama S, Honjo T. TRIM28 prevents autoinflammatory T cell development *in vivo*. *Nat. Immunol*. 13 : 596-603, 2012.

Qin H, Suzuki K, Nakata M, **Chikuma S** et

al. “Activation-induced cytidine deaminase expression in CD4+ T cells is associated with a unique IL-10-producing subset and increase with age.” PLoS One vol.6, online publication (e29141), 2011.

2. 学会発表

Rui Y, Honjo T, **Chikuma S**. PD-1 inhibits inflammatory helper T cell development through controlling the innate immune response. 日本免疫学会・学術集会 2013年12月11-13日

竹馬 俊介「抗PD-1抗体によるがん治療法」日台癌のトランスレーショナル研究シンポジウム. 神戸 2012年11月21日.

竹馬 俊介「核内因子 TRIM28 による自己炎症性 T 細胞の制御」北海道大学獣医学部 学術交流資金群講演会「自己免疫疾患研究の最先端」札幌 2012年11月1日.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

