

## ヒト型抗 CD4 抗体の癌免疫細胞療法への適応を目指した前臨床開発研究

研究分担者 竹田 和由  
順天堂大学大学院医学研究科 研究基盤センター 細胞機能研究室 准教授

### 研究要旨

抗CD4抗体投与により得られる抗腫瘍効果は、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性T細胞をはじめとする免疫抑制性の細胞集団除去によるものと考えられるが、一方でCD4<sup>+</sup>T細胞は抗腫瘍CTL応答の誘導、維持にも関与することが知られており、免疫学的作用機序には未解明な点が残されている。分担研究者として、担癌マウスモデルにおいて 1) 抗CD4抗体投与による抗腫瘍効果の、抗CTLA-4抗体、抗PD1/PD-L1抗体、または抗CD137抗体投与による抗腫瘍効果との比較検討に基づく、その作用機序の解明、2) 網羅的遺伝子解析法を用いた、抗CD4抗体投与による癌特異的CTLのクローンレベルでの解析、さらに3) 抗CD4抗体治療が免疫細胞療法と併用される場合に備えての、臨床の癌ワクチン療法における基礎的免疫学的解析と、TCRの網羅的遺伝子解析を目的として研究を進めている。今年度は、IFN- $\gamma$ レポーターマウスを用いた実験モデル系を確立し、抗CD4抗体の投与により、既に臨床応用が始まっている抗PD1抗体と同様に、癌組織内で IFN- $\gamma$ を産生するCD8<sup>+</sup>T細胞が増加することを見出し、抗CD4抗体の投与が癌組織内においてCD8<sup>+</sup>T細胞の癌細胞への反応を増強している可能性を示した。今後、抗CD4抗体投与による腫瘍特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の応答増強の細胞・分子機序を解析するとともに、癌特異的CTLの変化をクローンレベルで解析する予定である。

### A. 研究目的

抗 CD4 抗体投与により得られる抗腫瘍効果は、CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>制御性 T 細胞をはじめとする免疫抑制性の細胞集団除去によるものと考えられるが、一方で CD4<sup>+</sup>T 細胞は抗腫瘍 CTL 応答の誘導、維持にも関与することが知られており、免疫学的作用機序には未解明な点が残されている。本研究では、抗 CD4 抗体療法の対象疾患選択、治療プロトコルの最適化、治療応答マーカー確立の基礎を築くことを目的とし、マウス皮下腫瘍モデルを用いて抗腫瘍効果の細胞、分子機序の解析を行った。

### B. 研究方法

**マウス皮下腫瘍モデル：**IFN- $\gamma$ レポーターマウスに3LL(Lewis lung carcinoma)肺癌細胞を皮下移植し、腫瘍移植後5日目に抗CD4抗体(clone GK1.5)または、抗CTLA-4抗体(clone UC10-4F10)、抗PD1抗体(clone RMP1-14)を250  $\mu$ g/mouse腹腔内投与した。

**免疫学的解析：**抗体投与後5日目に脾臓および腫瘍からリンパ球を分離し、フローサイトメトリーによりIFN- $\gamma$ を産生する(蛍光を発している)

CD8<sup>+</sup>T細胞(CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞)、CD4<sup>+</sup>T細胞(CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞)の比率を解析した。

### [倫理面への配慮]

ヘルシンキ宣言、臨床研究に関する倫理指針、GCPなどの臨床研究に関する各指針に従って臨床研究・治験を実施する。患者の個人情報に関しては各施設の個人情報管理規定なども考慮しつつ最大限の保護を行う。必要に応じて、「ヒト(自己)由来細胞・組織加工医薬品等の品質および安全性の確保に関する指針」、「ヒト(同種)由来細胞・組織加工医薬品等の品質および安全性の確保に関する指針」、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」、「カルタヘナ法」を遵守する。動物を用いる実験においては「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を踏まえ、各施設における動物取扱の取り決めを遵守して行う。また、遺伝子改変動物の取り扱いについては「カルタヘ

ナ法」を順守し、各施設における動物倫理委員会および遺伝子組換え実験安全委員会の審査を受けて実施する。

動物を用いる実験においては「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を踏まえ、順天堂大学および東京大学における動物取扱の取り決めを遵守して行う。また、遺伝子改変動物の取り扱いについては「カルタヘナ法」を順守し、各施設における動物倫理委員会および遺伝子組換え実験安全委員会の審査を受けて実施する。

### C. 研究結果

IFN- $\gamma$ レポーターマウスの確認 IFN- $\gamma$ レポーターマウスの脾臓より、IFN- $\gamma$ を産生する Th1 細胞と IL-4 を産生する Th2 細胞を誘導し、それらの細胞の蛍光を確認したところ、IFN- $\gamma$ 産生細胞に特異的に蛍光の確認ができた(図1)。また、CD8T 細胞を単離し、in vitro で抗原刺激をしたところ、刺激から約 10 日後まで、蛍光の発現が確認された。従って、このマウスを使用することにより、sacrifice した日から遡って 10 日以内に IFN- $\gamma$ を産生した細胞を検出でき、また時間的な変化を追うことで、その間に IFN- $\gamma$ を産生した細胞の増加を観察することが可能であることが示された。

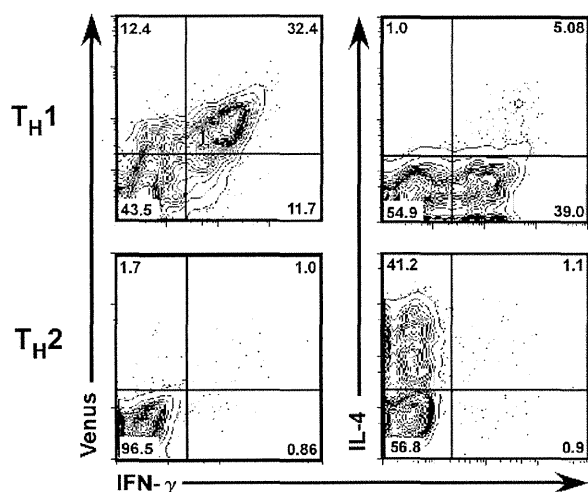


図1 IFN- $\gamma$ レポーターマウスにおける蛍光の発現：IFN- $\gamma$ レポーターマウスから Th1 細胞または Th2 細胞を誘導したところ、IFN- $\gamma$ を産生する Th1 細胞特異的に蛍光の発現が確認できた。

抗体治療による IFN- $\gamma$ 産生細胞の変化：IFN- $\gamma$ レポーターマウスに 3LL 肺癌細胞を皮下移植し、5 日後に抗 CTLA-4 抗体、抗 PD1 抗体、抗 CD4 抗体を 250  $\mu$ g 腹腔内投与し、5 日後に脾臓と癌組織を取り出し単核球を分離後、CD8T 細胞 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) と CD4T 細胞 (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) での IFN- $\gamma$ 産生をフローサイトメトリーを用いた蛍光の解析により調べた。

その結果、脾臓の CD4T 細胞に関しては、全ての抗体治療において有意な IFN- $\gamma$ 産生細胞(蛍光陽

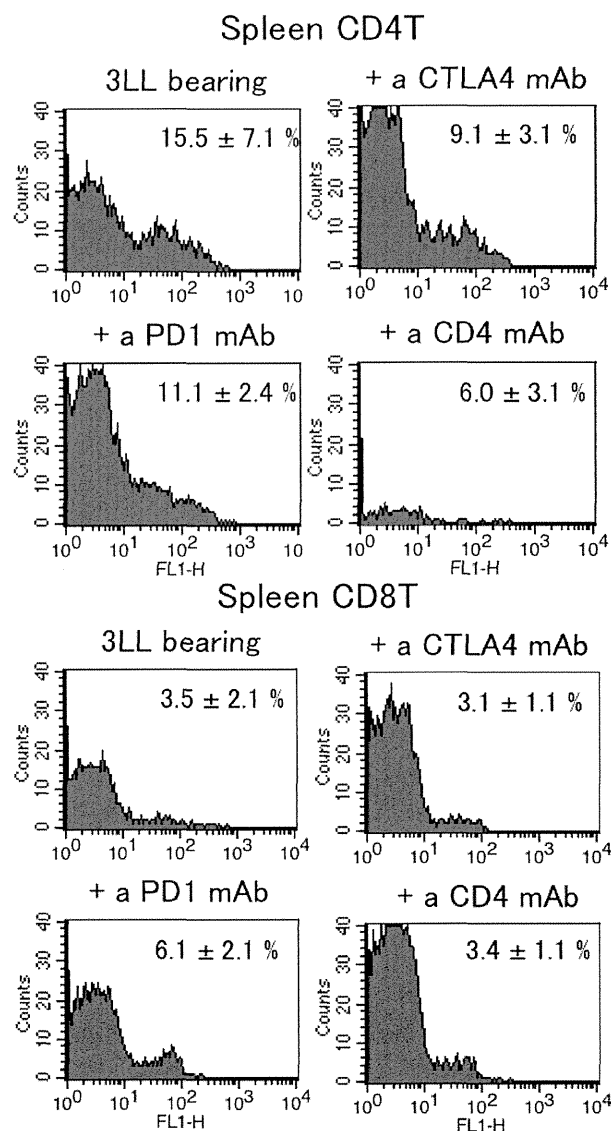


図2 担癌マウスの脾臓における IFN- $\gamma$ 産生細胞：3LL 肺癌細胞を皮下移植した 5 日後に各抗体の投与を行い、その 5 日後に脾臓を摘出し IFN- $\gamma$ を産生している(蛍光を発現している)CD8T および CD4T 細胞をフローサイトメトリーにて解析した。

性細胞)の増加は見られなかったが、CD8T細胞では、抗PD1抗体の投与により、有意差が無いもののIFN- $\gamma$ 産生細胞の増加傾向が認められた(図2)。

癌組織内の解析では、CD4T細胞に関しては全ての抗体治療において有意なIFN- $\gamma$ 産生細胞の増加は見られなかった。これに対して、CD8T細胞においては、抗PD1抗体および抗CD4抗体の投与により有意なIFN- $\gamma$ 産生細胞の増加が見られた(図3)。

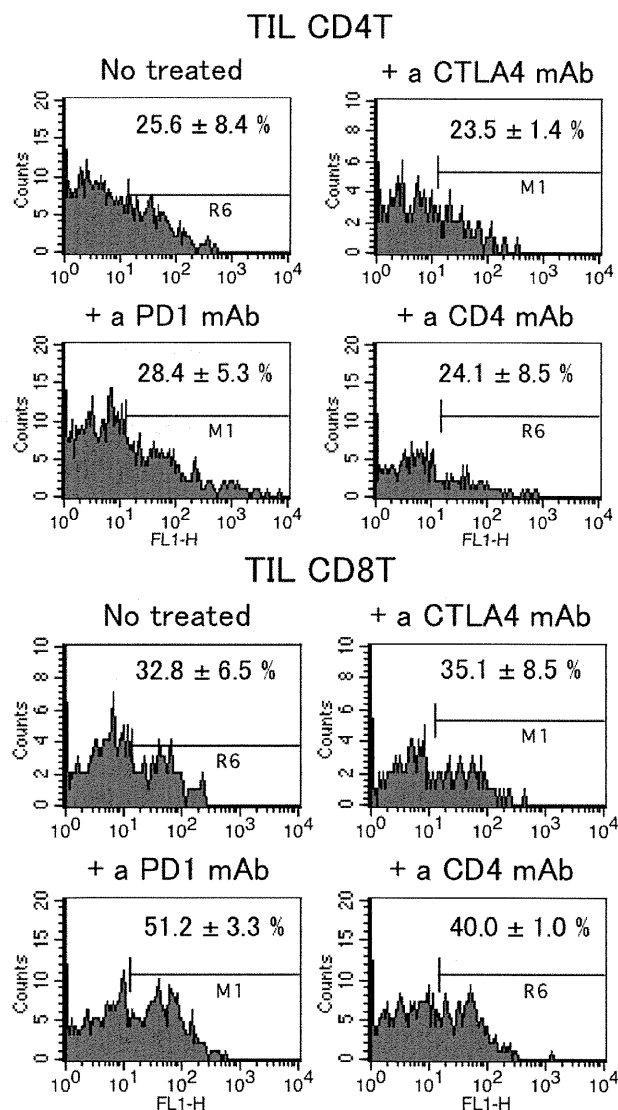


図3 癌組織内におけるIFN- $\gamma$ 産生細胞：3LL肺癌細胞を皮下移植した5日後に各抗体の投与を行い、その5日後に脾臓を摘出しIFN- $\gamma$ を産生している(蛍光を発現している)CD8TおよびCD4T細胞をフローサイトメトリにて解析した。

#### D. 考察

IFN- $\gamma$ レポーターマウスを用いて、その蛍光によりIFN- $\gamma$ 産生を同定することで、試験日から遡って10日の間にIFN- $\gamma$ を産生した細胞を検出することが可能であることが示された。また、経時的に蛍光陽性の細胞の増加を調べることでIFN- $\gamma$ 産生細胞が増加していることを確認できることが示された。

このIFN- $\gamma$ レポーターマウスに3LL肺癌細胞を皮下移植した後に、抗CD4抗体、抗CTLA-4抗体、抗PD1抗体を投与し、脾臓と癌組織内でIFN- $\gamma$ を産生する(蛍光を発している)T細胞の解析を行った。抗CTLA-4抗体または抗PD1抗体の投与では、脾臓でも癌組織でもIFN- $\gamma$ を産生するCD4T細胞の増加は見られなかった。抗CD4抗体の投与では有意なCD4<sup>+</sup>T細胞の減少が見られ、抗体投与によるCD4陽性細胞の除去が確認できた。

CD8T細胞に関しては、脾臓では抗PD1抗体の投与により有意ではないものの若干のIFN- $\gamma$ 産生細胞の増加傾向が認められた。癌組織内では抗PD1抗体または抗CD4抗体の投与によって、IFN- $\gamma$ 産生細胞の増加が示された。

癌細胞に発現するPD-L1からの癌組織に浸潤した癌特異的CD8T細胞へのPD1を介した機能抑制をブロックすることが、抗PD1抗体や抗PD-L1抗体の作用機序であることが、臨床試験の結果解析により強く示唆されている。抗CD4抗体によるIFN- $\gamma$ 産生細胞の増加傾向が抗PD1/PD-L1抗体と類似していることから、抗CD4抗体の作用機序の一つとして、抗PD1抗体の様に癌組織内でのCD8T細胞への免疫抑制の解除がある可能性が示唆された。

#### E. 結論

抗CD4抗体の投与により癌組織内でIFN- $\gamma$ を産生するCD8T細胞の増加が示された。この結果は、抗CD4抗体の投与が癌組織内の免疫抑制を解除し、癌特異的なCD8T細胞の反応を回復させていることを示している。

今後、3LL以外の他の腫瘍モデルも用いて、またTCRの網羅的遺伝子解析を行うことで、癌特異的CD8T細胞の変化をクローンレベルで、より詳細

に解析する。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Iinuma H, Fukushima R, Inaba T, Tamura T, Inoue T, Horikawa M, Ogawa E, Ikeda Y, Matsutani N, Takeda K, Yoshida K, Tsunoda T, Ikeda T, Nakamura Y, Okinaga K. Phase I clinical study of multiple epitope peptide vaccine combined with chemoradiation therapy in esophageal cancer patients. *J Transl Med.* 12(1):84, 2014.
2. Ferrari de Andrade L, Ngiow SF, Stannard K, Rusakiewicz S, Kalimutho M, Khanna KK, Tey SK, Takeda K, Zitvogel L, Martinet L, Smyth MJ. Natural killer cell are essential for the ability of BRAF inhibitor to control BRAFV600E-mutant metastatic melanoma. *Cancer Res.* 74(24): 7298-7308, 2014
3. Munakata S, Tashio Y, Nishida C, Sato A, Komiyama H, Shimazu H, Dhahi D, Salama Y, Eiamboonsert S, Takeda K, Yagita H, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Sakamoto K, Heissig B, Hattori K. Inhibition of plasmin protects against colitis in mice by suppressing matrix metalloproteinase 9-mediated cytokine release from myeloid cells. *Gastroenterology.* 148(3): 565-578, 2015.
4. Hata R-I, Izukuri K, Kato Y, Sasaki S, Mukaida N, Maehata Y, Miyamoto C, Akasaka T, Yang X, Nagashima Y, Takeda K, Kiyono T, Taniguchi M. Suppressed rate of carcinogenesis and decreases in tumour volume and lung metastasis in CXCL14/BRAK transgenic mice. *Scientific Reports.* 5:9083, 2015.
5. Souza-Fonseca-Guimaraes F, Young A,

Mittal D, Martinet L, Bruedigam C, Takeda K, Andoniou CE, Degli-Esposti MA, Hill GR, Smyth MJ. NK cells require IL-28R for optimal in vivo activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 112(8): E2376 -E2384, 2015.

6. Guillerey C, Chow MT, Miles K, Olver S, Sceneay J, Takeda K, Moller A, Smyth MJ. Toll-Like Receptor 3 regulates NK cell responses to cytokines and controls experimental metastasis. *OncoImmunology.* in press, 2015.

### 2. 学会発表

1. Carcinoma-associated fibroblasts convert barely metastatic human breast cancer cells to highly metastatic cancer cells. 癌内線維芽細胞は弱転移性ヒト乳癌細胞を強転移性の乳癌細胞に変換する. 松村優子、伊藤恭彦、Nadila Wali、折榊薫、寺尾泰久、竹田省、奥村康、竹田和由、樋野興夫、折茂彰. 第73回日本癌学会学術総会(横浜). 2014年9月25-27日.
2. Immune activation by the exopolysaccharide in yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* OLL1073R-1. Seiya Makino, Hiroshi Kano, Yukio Asami, Kazuyoshi Takeda, Ko Okumura, Hiroyuki Itoh. 第43回日本免疫学会学術総会(京都). 2014年12月10-12日.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

マウスモデルを用いた抗 CD4 抗体併用によるペプチドワクチンの増強効果の検討

研究分担者 中面哲也 国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 免疫療法開発分野 分野長  
研究協力者 藤浪紀洋 国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 免疫療法開発分野 特任研究補助員

**研究要旨**

これまでのがんワクチン療法単独での腫瘍縮小効果、いわゆる奏効率は数%程度しかなく、その臨床効果は不十分であると言わざるを得ない。マウスでは、抗 CD4 抗体は担癌時の免疫抑制に関わる Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>T 細胞) や CD4<sup>+</sup> plasmacytoid DCs (pDCs) を同時に除去でき、さらに、ヒトでは CD4<sup>+</sup> 単球由来 MDSC も除去できることが期待されている。マウスの系で、抗 CD4 抗体と OVA 由来ペプチドワクチンを併用することでペプチドワクチン療法の増強効果が得られるかを検討した。その結果、ペプチドワクチン単独群に比べて、抗 CD4 抗体とペプチドワクチン併用群において、前年度までにも得られていた IFN- $\gamma$  を産生するペプチド特異的 CTL (細胞傷害性 T 細胞) の増加に加え、パーフォリン、グランザイム B を分泌する CD107a<sup>+</sup> 細胞も増加すること、ならびに、それらのペプチド反応性 CTL により、IL-2, TNF- $\alpha$  も産生されることを確認した。今後は肝転移、肺転移モデルを用いて移植腫瘍による予防実験を行い、抗 CD4 抗体とペプチドワクチンの併用による抗腫瘍効果の増強を検討すると同時に、免疫染色により、腫瘍内の CTL の浸潤の程度や、Treg や MDSC の局在などを解析する。

**A. 研究目的**

現在のがんペプチドワクチン療法単独での腫瘍縮小効果、いわゆる奏効率は数%程度しかなく、その臨床効果は不十分であると言わざるを得ない。抗 CD4 抗体をマウスに投与すると、担癌時の免疫抑制に関わる Treg (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>T 細胞) や CD4<sup>+</sup> plasmacytoid DCs (pDCs) を同時に除去でき、さらに、ヒトでは CD4<sup>+</sup> 単球由来 MDSC も除去できることが期待されている。それ故がんペプチドワクチン療法によるペプチド特異的 CTL 誘導効果を増強できる可能性がある。本研究ではモデル抗原として OVA ペプチドを用いて、マウスモデルにおいて、ペプチドワクチン療法に抗 CD4 抗体を併用することにより、ペプチドワクチン療法の増強効果が見られるかどうかを検討することを目的とした。

**B. 研究方法**

・抗 CD4 抗体とペプチドワクチン併用によるペプチド特異的 CTL の増強の検討  
ペプチドワクチン単独群と抗 CD4 抗体とペプチド

ドワクチン併用群にマウスを分け、処置後の脾細胞中のペプチド特異的 CTL の頻度の比較を IFN- $\gamma$  ELISPOT により解析する。

・CD107a assay

未治療群、ペプチドワクチン単独群、抗 CD4 抗体単独群、抗 CD4 抗体とペプチドワクチン併用群で CD8<sup>+</sup>T 細胞中のパーフォリン、グランザイム B を分泌する CD107a<sup>+</sup> 細胞の割合を比較する。

・サイトカイン測定

ビーズを用いたフローサイトメトリーによるサイトカイン測定によって T 細胞培養上清中の IL-2, TNF- $\alpha$  の産生を確認する。

・皮下移植腫瘍モデルでの抗 CD4 抗体とペプチドワクチン併用による抗腫瘍効果の検討

マウスに OVA を発現する腫瘍細胞株 EG7 あるいは M04 を皮下移植後に、抗 CD4 抗体とペプチドワクチンで治療を行う。または、抗 CD4 抗体とペプチドワクチンを投与した後に、マウスの皮下に腫瘍細胞を移植する。未治療群、ペプチドワクチン単独群、抗 CD4 抗体単独群、抗 CD4 抗体とペプチドワクチン併用群にマウスを分け、腫瘍の成長を比

較する。

・肝転移モデルでの抗 CD4 抗体とペプチドワクチン併用による抗腫瘍効果の検討

マウスに抗 CD4 抗体とペプチドワクチンを投与した後に、マウス脾臓に腫瘍細胞を移植する。未治療群、ペプチドワクチン単独群、抗 CD4 抗体単独群、抗 CD4 抗体とペプチドワクチン併用群にマウスを分け、脾臓の腫瘍および、肝臓への腫瘍の転移を比較検討する。

・肺転移モデルでの抗 CD4 抗体とペプチドワクチン併用による抗腫瘍効果の検討

マウスに抗 CD4 抗体とペプチドワクチンを投与した後に、マウス尾静脈に腫瘍細胞を移植する。未治療群、ペプチドワクチン単独群、抗 CD4 抗体単独群、抗 CD4 抗体とペプチドワクチン併用群にマウスを分け、肺への腫瘍の転移を比較検討する。

・抗 CD4 抗体とペプチドワクチン併用による抗腫瘍

効果の作用機序の検討

抗 CD4 抗体とペプチドワクチンによる治療後の CTL の腫瘍内への浸潤や腫瘍微小環境における Treg や MDSC の局在を免疫染色により解析する。

(倫理面への配慮)

動物を用いる実験においては「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を踏まえ、国立がん研究センターにおける動物取扱の取り決めを遵守して、事前に動物実験委員会承認を得た後に行う。本施設では、教育研究に関わる生命倫理ならびに安全管理に関する問題を審議して、これらが適切に遂行されるように、倫理審査委員会が設置され規則が整備されている。

## C. 研究結果

IFN- $\gamma$  ELISPOT assay において、ペプチドワクチン単独群と比較して、抗 CD4 抗体とペプチドワクチン併用群で、明らかな OVA 特異的 CTL の頻度の増加を確認した。併用群で誘導された CTL は、IFN- $\gamma$  だけでなく、TNF- $\alpha$ 、IL-2 も抗原特異的に産生し、OVA 発現がん細胞株である EG7 や MO4 に対しても反応した。また、CD107a assay においては、抗 CD4 抗体と OVA ペプチドワクチン併用

群で CD8<sup>+</sup>T 細胞中のパーフォリン、グランザイム B を分泌する CD107a<sup>+</sup>細胞の割合が増加した。そして、その割合は脾臓よりも末梢血の方が高かった。さらに、サイトカイン測定では、併用群で IL-2 と TNF- $\alpha$  の産生も確認された。しかし、*in vivo* の皮下移植腫瘍モデルの予防実験や治療実験においては抗腫瘍効果を示すことができなかった。

## D. 考察

IFN- $\gamma$  ELISPOT の結果から抗 CD4 抗体とペプチドワクチンの併用による特異的 CTL の頻度の増加を確認した。それにも関わらず、*in vivo* の皮下移植腫瘍モデルでは抗腫瘍効果を確認できなかった。そのため、腫瘍の移植法やワクチン投与方法を再検討する必要がある。抗 CD4 抗体と OVA ペプチドワクチン併用群では、特に末梢血中に活性化 CTL の割合が増加していることが CD107a assay により確認されたので、今後は肝転移や肺転移モデルで抗 CD4 抗体とペプチドワクチンの併用による抗腫瘍効果における有効性を検討する。

## E. 結論

IFN- $\gamma$  ELISPOT や CD107a assay、サイトカイン測定の結果から抗 CD4 抗体とペプチドワクチンの併用による CTL の効果増強の可能性を示すことができた。今後は肝転移モデルや肺転移モデルを用いて移植腫瘍による予防実験で、抗 CD4 抗体とペプチドワクチンの併用による抗腫瘍効果の増強を検討する。それと同時に免疫染色により、腫瘍内の CTL の浸潤の程度や、Treg や MDSC の局在などを解析する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Yoshimura M, Tada Y, Ofuzi K, Yamamoto M, Nakatsura T. Identification of a novel HLA-A\* 02:01-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope derived from the EML4-ALK fusion gene. *Oncol Rep.* 32(1): 33-39, 2014.
2. Ofuji K, Saito K, Yoshikawa T, Nakatsura T. Critical analysis of the potential of targeting GPC3 in hepatocellular carcinoma. *Journal of*

Hepatocellular Carcinoma. 1: 35-42, 2014.

3. Yoshikawa T, Takahara M, Tomiyama M, Nieda M, Maekawa R, Nakatsura T. Large-scale expansion of  $\gamma\delta$  T cells and peptide-specific cytotoxic T cells using zoledronate for adoptive immunotherapy. *Int J Oncol.* 45: 1847-1856, 2014.
  4. Sawada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Iwama T, Endo I, Nakatsura T. Programmed death-1 blockade enhances the antitumor effects of peptide vaccine-induced peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int J Oncol.* 46: 28-36, 2015.
  5. Ofuji K, Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Yoshimura M, Saito K, Nakamoto Y, Nakatsura T. A peptide antigen derived from EGFR T790M is immunogenic in non-small cell lung cancer. *Int J Oncol.* 46: 497-504, 2015.
2. 学会発表
1. がん免疫療法の開発. 中面哲也. プラクティカルセッション〜明日から役立つ個別化医療. 第18回国際個別化医療学会学術集会(札幌). 2014年6月14日.
  2. がんワクチン開発の現状と課題. 中面哲也. 教育講演「がんワクチン開発の現状と課題」. 第41回日本毒性学会学術年会(神戸). 2014年7月2-4日.
  3. がんに対する免疫療法の基本. 中面哲也. 教育セミナー「がん専門 CRC のためのアドバンスセミナー」. 第12回日本臨床腫瘍学会学術集会(福岡). 2014年7月17-19日.
  4. Glypican-3(GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的 CTL の解析. 吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、高橋真理、吉原宏樹、上野浩生、真部淳、細野亜古、植村靖史、中面哲也. 第18回日本がん免疫学会総会(松山). 2014年7月30日-8月1日.
  5. Glypican-3 由来エピトープペプチド結合リポソームの CTL 誘導能の評価. 岩間達章、内田哲也、下村真菜美、吉川聡明、中面哲也. 第18回日本がん免疫学会総会(松山). 2014年7月30日-8月1日.
  6. Analysis of glypican-3 specific CTLs in the tumor tissue and vaccination site after administration of GPC3 peptide. (Glypican-3(GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的 CTL の解析). 吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、植村靖史、中面哲也. 第73回日本癌学会学術総会(横浜). 2014年9月25-27日.
  7. Evaluation of peptide-specific CTL-inducibility of glypican-3-derived peptide-coupled liposome vaccine. (Glypican-3 由来ペプチドを結合したリポソームワクチンのペプチド特異的 CTL 誘導能評価). 岩間達章、内田哲也、下村真菜美、吉川聡明、中面哲也. 第73回日本癌学会学術総会(横浜). 2014年9月25-27日.
  8. The enhancement of the CTL induction by peptide vaccine therapy in combination with anti-CD4 antibody. (抗CD4抗体の併用投与は抗腫瘍ペプチドワクチン療法の CTL プライミング効率を高める). 藤浪紀洋、吉川聡明、澤田雄、下村真菜美、岩間達章、植村靖史、中面哲也. 第73回日本癌学会学術総会(横浜). 2014年9月25-27日.
  9. EGFR T790M mutation-derived antigen provides the immunogenicity in NSCLC patients. (非小細胞肺癌における EGFR T790M 変異由来抗原は免疫原性を与える). 大藤和也、吉川聡明、多田好孝、吉村麻友子、下村真菜美、中本安成、中面哲也. 第73回日本癌学会学術総会(横浜). 2014年9月25-27日.
  10. Glypican-3 (GPC3) ペプチドワクチン投与後の投与局所及び腫瘍局所でのペプチド特異的 CTL の解析. 吉川聡明、下村真菜美、澤田雄、高橋真理、植村靖史、中面哲也. 第12回日本免疫治療学研究会学術集会(東京). 2015年2月28日.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



医師主導第 I 相臨床試験（医師主導治験）の計画、および、  
臨床サンプルを用いた抗 CD4 抗体の効果の検証を目的とした前臨床研究

研究分担者 北野滋久 国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 先端医療科 医員  
研究分担者 中面哲也 国立がん研究センター 早期・探索臨床研究センター 免疫療法開発分野 分野長  
研究分担者 塚崎邦弘 国立がん研究センター 東病院 血液腫瘍科 科長  
研究分担者 佐藤暁洋 国立がん研究センター 研究支援センター 研究企画部 部長  
研究分担者 尾崎雅彦 国立がん研究センター 東病院 治験管理室 治験事務局

### 研究要旨

我々は、東京大学、IDAC セラノステイクス株式会社と共同で、新規がん免疫療法として抗 CD4 抗体療法の臨床試験（医師主導治験）の開始に向けて準備を進めている。近年、免疫チェックポイント阻害剤の臨床開発が成功をおさめてきているが、臨床効果を認める患者は限られている。より有効性の高いがん免疫治療薬を創出するためには、抗腫瘍エフェクター T 細胞を活性化させるだけでなく、がん患者体内で起こっているがん免疫応答の逃避機構の解除（抑制の解除）を試みることに期待され、抗 CD4 抗体投与によることによって、免疫抑制細胞の除去による抗腫瘍エフェクター T 細胞の活性化が期待されている。平成 26 年度は、研究代表者らにより、マウスの *in vivo* モデルにおいて、抗腫瘍効果を効率よく発揮させるための抗 CD4 抗体の投与条件、免疫チェックポイント阻害剤との併用療法の検討が進む一方、当センターでは臨床サンプル（がん患者由来血液検体）を用いた本抗体の *in vitro* での効果を検証するための前臨床研究を計画し、臨床研究計画書を作成して、研究倫理審査委員会の承認を得た。

健常人末梢血検体を用いた *in vitro* での ADCC (Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity) アッセイでの検討において、本抗体を投与することによって細胞表面に CD4 分子を強く発現している制御性 T 細胞 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>T 細胞) のみならず、CD4 分子が弱く発現している単球系の MDSC (myeloid-derived suppressor cells) をも除去できることを確認し、より広範に免疫抑制細胞の除去ができることを示すことができた。引き続き、各種がん患者検体を用いて同様の解析を進めていく。

また、全体班会議において固形がんを対象とした第 I 相臨床試験（医師主導治験）における対象疾患、投与スケジュールをはじめとする臨床試験のデザインについて議論を重ねた。

平成 27 年度は、がん患者検体を用いた *in vitro* での解析を終了し、各担当者の研究成果をもとにして臨床試験デザインを確定し、国立がん研究センターで実施予定の第 I 相臨床試験（医師主導治験）のプロトコール、付随する IC 文書、SOP、治験薬概要書の完成につなげていく。

#### A. 目的

新規がん免疫療法として抗 CD4 抗体療法の臨床試験の実施に向け、進行がん患者検体を用いた前臨床研究を行うための研究計画書を作成して、国立がん研究センター研究倫理審査委員会の承認を得て、前臨床研究を実施する。また、国立がん研究センターで実施予定の医師主導第 I 相

臨床試験（医師主導治験）に向けて、試験のデザインを議論し、プロトコールを作成する。

#### B. C. 研究方法・研究結果

ヘルシンキ宣言および厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」に従って、研究計画書を作成し、当センター研究倫理審査委員会の承認を受けた。

健常人ボランティア末梢血検体を用いた *in vitro*でのADCC(Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity)アッセイでの検討により、抗CD4抗体が血液中の各種免疫担当細胞にどのような影響を及ぼすか、CD4陽性細胞を除去できるかどうかを検討した。抗CD4抗体を投与することによってCD4陽性細胞(Th1, Th2, Th17, 制御性T細胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>T細胞)を除去できることを確認した。さらに、細胞表面上にCD4分子が弱く発現している単球系のMDSC(myeloid-derived suppressor cells)についても除去できることも確認できた。以上の結果より、ヒトではより広範に免疫抑制細胞の除去ができる可能性が示唆された。ひきつづき、各種がん患者検体を用いて同様の検討を進めるとともに、ADCC効果によって直接の抗腫瘍効果が期待されるCD4陽性造血器腫瘍への殺細胞効果についても検証をすすめていく。

班会議において臨床試験のデザインについても議論を重ねた。平成25年度はFirst in human(FIH)臨床試験の対象疾患として、抗CD4抗体投与前後において腫瘍局所での免疫解析を行いproof of concept(POC)を確認するために、治療経過中に生検ができる可能性が高い腫瘍を対象とすることが決定された。平成26年度は、CD4陽性細胞除去による感染症の合併の可能性とその対処法、CD4陽性細胞に含まれる免疫抑制細胞の除去により自己免疫疾患が誘発される可能性など、主に安全性について議論された。抗腫瘍効果を最大限に発揮する抗CD4抗体の至適投与回数・間隔についてはマウスでの*in vivo*のデータをそのままヒトに当てはめることは事実上困難であるため、FIH試験では安全性を確保できるように、投与量、投与回数、投与間隔については、PMDAとも議論していきながら慎重にプロトコルを策定する方針が確認された。また、FIH試験において綿密な患者免疫モニタリングを行えるような治験計画書を作成していく方針である。

#### D. E. 今後の予定

平成27年度からは、担当者の各種研究成果、前臨床試験の結果をもとに、試験デザインを最終決定し、第I相臨床試験(医師主導治験)の治験計画書を念頭にしたGLP安全性試験を計画しPMDAとの助言を受けながら治験の準備を進めて行く

予定である。さらに、ICH-GCPに沿った質の高い治験計画書、付随するIC文書・SOP、治験薬概要書を完成させる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ito A, Kondo S, Tada K, Kitano S. Clinical development of immune checkpoint inhibitors. BioMed Research International. BioMed Research International. in press, 2015.
2. Kitano S, Postow MA, Ziegler CG, Kuk D, Panageas K, Cortez C, Rasalan TS, Adamow M, Yuan J, Wong P, Altan-Bonnet G, Wolchok JD, Lesokhin AM. Computational Algorithm Driven Evaluation of Monocytic Myeloid Derived Suppressor Cell Frequency For Prediction of Clinical Outcomes. Cancer Immunol Res. 2(8): 812-821, 2014.
3. Tsukasaki K, Tobinai K. Human T-cell lymphotropic virus type I-associated adult T-cell leukemia-lymphoma. Clin Cancer Res. 20(20): 5217-25, 2014.
4. Yoshida N, Karube K, Utsunomiya A, Tsukasaki K, Imaizumi Y, Taira N, Uike N, Umino A, Arita K, Suguro M, Tsuzuki S, Kinoshita T, Ohshima K, Seto M. Molecular Characterization of Chronic-type Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. Cancer Res. 74(21): 6129-38, 2014.
5. Fukushima T, Nomura S, Shimoyama M, Shibata T, Imaizumi Y, Moriuchi Y, Tomoyose T, Uozumi K, Kobayashi Y, Fukushima N, Utsunomiya A, Tara M, Nosaka K, Hidaka M, Uike N, Yoshida S, Tamura K, Ishitsuka K, Kurosawa M, Nakata M, Fukuda H, Hotta T, Tobinai K, Tsukasaki K. Japan Clinical Oncology Group prognostic index and characterization of long-term

survivors of aggressive adult T-cell leukemia-lymphoma (JCOG0902A). Br J Haematol. 166(5): 739-48, 2014.

## 2. 学会発表

1. Novel function of the BAP1 nuclear deubiquitinase in the non-homologous end joining (NHEJ) pathway of double strand DNA repair. Ito T, Kitano S, Erdjument-Bromage H, Ladanyi M. AACR Annual Meeting 2014(San Diego). April 5-9, 2014.
2. International session: Antibody therapy. 進行メラノーマ患者における抗 CTLA-4 抗体療法後のがん抗原特異的細胞障害性 CD4 陽性 T 細胞反応の増強. 北野滋久. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜). 2014 年 9 月 25-27 日.
3. A nationwide survey of patients with adult T cell leukemia/lymphoma (ATL) in Japan: 2010-2011. 野坂生郷、岩永正子、石澤賢一、石田陽治、内丸薫、石塚賢治、天野正宏、石田高司、今泉芳孝、鶴池直邦、宇都宮與、大島孝一、河井一浩、田中淳司、戸倉新樹、飛内賢正、渡邊俊樹、塚崎邦弘. 第 76 回日本血液学会(大阪). 2014 年 10 月 31 日-11 月 2 日.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

1. がん免疫療法開発のガイダンス2015 早期臨床試験の考え方 ～安全で効果的な開発を目指して～ 厚生労働省医薬品等審査迅速化事業費補助金 革新的医薬品・医療機器・再生医療製品 実用化促進事業 ガイダンス作成のための検討委員会 報告書 平成27年1月30日

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ueha S, Yokochi S, Ishiwata Y, Ogiwara H, Chand K, Nakajima T, Hachiga K, Shichino S, Terashima Y, Toda E, Shand FH, Kakimi K, Ito S, Matshushima K.	Robust anti-tumor effects of combined anti-CD4 depleting antibody and anti-PD-1/PD-L1 immune checkpoint antibody treatment in mice.	Cancer Immunol Res		Published Online First on Feb. 20, 2015; DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0190	2015
Matsushita H, Hosoi A, Ueha S, Abe J, Fujieda N, Tomura M, Maekawa R, Matsushima K, Ohara O, Kakimi K.	Cytotoxic T lymphocytes block tumor growth both by lytic activity and IFN $\gamma$ -dependent cell-cycle arrest.	Cancer Immunol Res	3(1)	26-36	2015
Shand FH, Ueha S, Otsuji M, Koid SS, Shichino S, Tsukui T, Kosugi-Kanaya M, Abe J, Tomura M, Ziogas J, Matsushima K.	Tracking of intertissue migration reveals the origins of tumor-infiltrating monocytes.	Proc Natl Acad Sci USA	111(21)	7771-6	2014
Iinuma H, Fukushima R, Inaba T, Tamura T, Inoue T, Horikawa M, Ogawa E, Ikeda Y, Matsutani N, Takeda K, Yoshida K, Tsunoda T, Ikeda T, Nakamura Y, Okinaga K.	Phase I clinical study of multiple epitope peptide vaccine combined with chemoradiation therapy in esophageal cancer patients.	J Transl Med	12(1)	84	2014
Ferrari de Andrade L, Ngiow SF, Stannard K, Rusakiewicz S, Kalimutho M, Khnna KK, Tey SK, Takeda K, Zitvogel L, Martinet L, Smyth MJ.	Natural killer cell are essential for the ability of BRAF inhibitor to control BRAFV600E-mutant metastatic melanoma.	Cancer Res	74(24)	7298-7308	2014
Munakata S, Tashio Y, Nishida C, Sato A, Komiyama H, Shimazu H, Dhahi D, Salama Y, Eiamboonsert S, Takeda K, Yagita H, Tsuda Y, Okada Y, Nakauchi H, Sakamoto K, Heissig B, Hattori K.	Inhibition of plasmin protects against colitis in mice by suppressing matrix metalloproteinase 9-mediated cytokine release from myeloid cells.	Gastroenterology	148(3)	565-578	2015
Hata R-I, Izukuri K, Kato Y, Sasaki S, Mukaida N, Maehata Y, Miyamoto C, Akasaka T, Yang X, Nagashima Y, Takeda K, Kiyono T, Taniguchi M.	Suppressed rate of carcinogenesis and decreases in tumour volume and lung metastasis in CXCL14/BRAK transgenic mice.	Scientific Reports	5	9083	2015

Souza-Fonseca-Guimaraes F, Young A, Mittal D, Martinet L, Bruedigam C, Takeda K, Andoniou CE, Degli-Esposti MA, Hill GR, Smyth MJ.	NK cells require IL-28R for optimal in vivo activity.	Proc Natl Acad Sci USA	112 (8)	E2376-E2384	2015
Guillerey C, Chow MT, Miles K, Olver S, Sceneay J, Takeda K, Moller A, Smyth MJ.	Toll-Like Receptor 3 regulates NK cell responses to cytokines and controls experimental metastasis.	OncoImmunology		in press	2015
Yoshimura M, Tada Y, Ofuzi K, Yamamoto M, Nakatsura T.	Identification of a novel HLA-A* 02:01-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope derived from the EML4-ALK fusion gene.	Oncol Rep	32(1)	33-39	2014
Ofuji K, Saito K, Yoshikawa T, Nakatsura T.	Critical analysis of the potential of targeting GPC3 in hepatocellular carcinoma.	Journal of Hepatocellular Carcinoma	1	35-42	2014
Yoshikawa T, Takahara M, Tomiyama M, Nieda M, Maekawa R, Nakatsura T.	Large-scale expansion of $\gamma \delta$ T cells and peptide-specific cytotoxic T cells using zoledronate for adoptive immunotherapy.	Int J Oncol	45	1847-1856	2014
Sawada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Iwama T, Endo I, Nakatsura T.	Programmed death-1 blockade enhances the antitumor effects of peptide vaccine-induced peptide-specific cytotoxic T lymphocytes.	Int J Oncol	46	28-36	2015
Ofuji K, Tada Y, Yoshikawa T, Shimomura M, Yoshimura M, Saito K, Nakamoto Y, Nakatsura T.	A peptide antigen derived from EGFR T790M is immunogenic in non-small cell lung cancer.	Int J Oncol	46	497-504	2015
Ito A, Kondo S, Tada K, Kitano S.	Clinical development of immune checkpoint inhibitors. BioMed Research International.	BioMed Research International		in press	2015
Kitano S, Postow MA, Ziegler CG, Kuk D, Panageas K, Cortez C, Rasalan TS, Adamow M, Yuan J, Wong P, Altan-Bonnet G, Wolchok JD, Lesokhin AM.	Computational Algorithm Driven Evaluation of Monocytic Myeloid Derived Suppressor Cell Frequency For Prediction of Clinical Outcomes.	Cancer Immunol Res	2(8)	812-821	2014
Tsukasaki K, Tobinai K.	Human T-cell lymphotropic virus type I-associated adult T-cell leukemia-lymphoma.	Clin Cancer Res	20(20)	5217-25	2014
Yoshida N, Karube K, Utsunomiya A, Tsukasaki K, Imaizumi Y, Taira N, Uike N, Umino A, Arita K, Suguro M, Tsuzuki S, Kinoshita T, Ohshima K, Seto M.	Molecular Characterization of Chronic-type Adult T-cell Leukemia/Lymphoma.	Cancer Res	74(21)	6129-38	2014

Fukushima T, Nomura S, Shimoyama M, Shibata T, Imaizumi Y, Moriuchi Y, Tomoyose T, Uozumi K, Kobayashi Y, Fukushima N, Utsunomiya A, Tara M, Nosaka K, Hidaka M, Uike N, Yoshida S, Tamura K, Ishitsuka K, Kurosawa M, Nakata M, Fukuda H, Hotta T, Tobinai K, Tsukasaki K.	Japan Clinical Oncology Group prognostic index and characterization of long-term survivors of aggressive adult T-cell leukemia-lymphoma (JCOG0902A).	Br J Haematol	166(5)	739-48	2014
--	---	---------------	--------	--------	------

研究成果の刊行物・別刷



Anti-CD4 and immune checkpoint antibody synergy

1 **Robust antitumor effects of combined anti-CD4-depleting antibody and anti-PD-1/PD-L1**  
2 **immune checkpoint antibody treatment in mice**

3

4 Satoshi Ueha<sup>1,\*</sup>, Shoji Yokochi<sup>1,2,\*</sup>, Yoshiro Ishiwata<sup>1,2,\*</sup>, Haru Ogiwara<sup>1</sup>, Krishant Chand<sup>1</sup>,  
5 Takuya Nakajima<sup>1</sup>, Kosuke Hachiga<sup>1,2</sup>, Shigeyuki Shichino<sup>1</sup>, Yuya Terashima<sup>1</sup>, Etsuko Toda<sup>1</sup>,  
6 Francis HW Shand<sup>3</sup>, Kazuhiro Kakimi<sup>4</sup>, Satoru Ito<sup>1,2</sup>, and Kouji Matsushima<sup>1</sup>

7

8 <sup>1</sup>Department of Molecular Preventive Medicine, Graduate School of Medicine, The University  
9 of Tokyo; <sup>2</sup>IDAC Theranostics, Inc.; <sup>3</sup>Department of Pharmacology and Therapeutics, The  
10 University of Melbourne; <sup>4</sup>Department of Immunotherapeutics, The University of Tokyo  
11 Hospital.

12 \* S. Ueha, S. Yokochi and Y. Ishiwata contributed equally to this paper.

13

14 Running title: Anti-CD4 and immune checkpoint antibody synergy

15

16 Keywords: cancer treatment, CD4 depletion, immune checkpoint antibodies, CTL, Treg

17

18 Correspondence: Kouji Matsushima

19 Department of Molecular Preventive Medicine, Graduate School of Medicine, The University of  
20 Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033 Japan

21 Telephone: 81-3-5841-3431; E-mail: koujim@m.u-tokyo.ac.jp

22

23 Conflicts of interest: SY, SU, SI and KM own stock in IDAC Theranostics, Inc. We declare no  
24 other conflicts of interest.

25 Financial support: This work was supported by the Japan Science and Technology Agency  
26 CREST program; Grants-in-Aid for Scientific Research (C) 25460491 (to S.U.) and (B)  
27 25293113 (to K.M.) from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and  
28 Technology; and Health and Labor Science Research Grants for Research for Promotion of  
29 Cancer Control (Applied Research for Innovative Treatment of Cancer).

30

31 Word count: 5,967/ 6,000

32 Figures: 6 main, 9 supplementary

33 Tables: 2 supplementary

Anti-CD4 and immune checkpoint antibody synergy

34 **ABSTRACT**

35 Depletion of CD4<sup>+</sup> cells in tumor-bearing mice has strong antitumor effects. However, the  
36 mechanisms underlying these effects and the therapeutic benefits of CD4<sup>+</sup> cell depletion relative  
37 to other immunotherapies have not been fully evaluated. Here, we investigated the antitumor  
38 effects of an anti-CD4-depleting monoclonal antibody (mAb) as a monotherapy or in  
39 combination with immune checkpoint mAbs. In B16F10, Colon 26 or LLC subcutaneous tumor  
40 models, administration of the anti-CD4 mAb alone had strong antitumor effects that were  
41 superior to those elicited by CD25<sup>+</sup> Treg depletion or other immune checkpoint mAbs, and  
42 which were completely reversed by CD8<sup>+</sup> cell depletion. CD4<sup>+</sup> cell depletion led to the  
43 proliferation of tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells in the draining lymph node and increased  
44 infiltration of PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells into the tumor, with a shift towards type I immunity within the  
45 tumor. Combination treatment with the anti-CD4 mAb and immune checkpoint mAbs,  
46 particularly anti-PD-1 or anti-PD-L1 mAbs, synergistically suppressed tumor growth and  
47 greatly prolonged survival. To our knowledge, this work represents the first report of robust  
48 synergy between anti-CD4 and anti-PD-1 or anti-PD-L1 mAb therapies.

## Anti-CD4 and immune checkpoint antibody synergy

### 49 INTRODUCTION

50 Immune checkpoint modulators such as those targeting cytotoxic  
51 T-lymphocyte-associated antigen-4 (CTLA-4) and programmed cell death-1 (PD-1) have  
52 attracted attention due to their extraordinary antitumor effects in patients with advanced  
53 melanoma, lung cancer, and renal cancer (1, 2). A monoclonal antibody (mAb) against CTLA-4  
54 (ipilimumab) that enhances both early T-cell activation and CTL function was approved for  
55 treatment of patients with advanced melanoma in the USA in 2011. An anti-PD-1 mAb  
56 (nivolumab) that protects activated T cells from exhaustion in peripheral tissues was approved  
57 for treatment of patients with melanoma in Japan and in the US in 2014. In addition, other  
58 mAbs against CTLA-4 (tremelimumab), PD-1 (pembrolizumab) and programmed death-ligand  
59 1 (PD-L1, a ligand for PD-1) are currently undergoing clinical trials to evaluate their antitumor  
60 efficacy. However, despite clear survival benefits in a subset of tumor patients, other groups of  
61 patients are refractory to these single agent therapies.

62

63 Combination therapies comprising immune checkpoint modulators that have different  
64 points of action, targeting for example the activation and expansion of T cells in lymphoid  
65 tissues and the exhaustion and deletion of T cells in the effector site, represent promising  
66 strategies for tumor immunotherapy (1). Synergistic anti-tumor effects in advanced melanoma  
67 have been reported with a combination of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 mAbs (3). The antitumor  
68 efficacy of other combinations of regulators of lymphocyte activation and expansion (e.g.  
69 Lymphocyte activation gene-3/LAG-3, OX40/CD134) and of lymphocyte exhaustion and  
70 deletion (e.g. T-cell immunoglobulin mucin-3/TIM-3, 4-1BB/CD137, B- and T-lymphocyte  
71 attenuator/BTLA, glucocorticoid-induced TNF-receptor/GITR) are currently under investigation.  
72 Because immune checkpoint modulators play both positive and negative roles in the immune  
73 inhibitory pathway with some redundancy, identification of optimal therapeutic combinations  
74 remains a considerable challenge.

75

76 Another approach to immune checkpoint modulation involves depleting  
77 immunosuppressive leukocyte populations such as forkhead box P3 (Foxp3)<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory  
78 T cells (Treg), Th2 cells, T regulatory (Tr) 1/3 cells (4), myeloid-derived suppressor cells  
79 (MDSC) and indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO)<sup>+</sup> plasmacytoid DCs (pDC) (5-7). Several  
80 groups have suggested that depletion of CD4<sup>+</sup> cells, including Tregs, Th2 cells, Tr1/3 cells, and  
81 a subpopulation of MDSCs and pDCs, results in strong antitumor effects in mouse models due  
82 to the enhancement of CTL responses (8-12). These antitumor effects may be associated with  
83 the modulation of multiple immune checkpoints caused by CD4<sup>+</sup> cell depletion. However, the  
84 relative advantage of CD4<sup>+</sup> cell depletion over other immune checkpoint mAb-based treatments

### Anti-CD4 and immune checkpoint antibody synergy

85 remains unclear. Encouraged by the positive reports surrounding the benefits of anti-CD4 mAb  
86 treatment in mice, and by the recent clinical data supporting anti-CTLA-4 and anti-PD-1 mAb  
87 therapies, here we examine whether treatments that combine an anti-CD4 mAb and immune  
88 checkpoint modulators produce synergistic antitumor activity.

89

90 Thus, in the present study we used comprehensive immunologic analyses to compare the  
91 antitumor effects of an anti-CD4-depleting mAb with those of a variety of mAbs against  
92 immune checkpoint molecules, including PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, OX40, LAG-3,  
93 TIM-3, BTLA and GITR, in mouse subcutaneous tumor models. We also investigated the  
94 antitumor effects of treatments that combined an anti-CD4 mAb and antibodies against these  
95 immune checkpoint molecules. We report that treatment with an anti-CD4 mAb alone induces  
96 strong antitumor effects and expansion of tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells, and that combination of  
97 an anti-CD4 mAb with anti-PD-1 or anti-PD-L1 mAbs results in striking synergy in the  
98 suppression of tumor growth.