

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：10107

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06609

研究課題名(和文) 免疫チェックポイント分子PD-L1を標的とした頭頸部扁平上皮癌に対する免疫治療

研究課題名(英文) Cancer immunotherapy against head and neck cancer which targeting immune checkpoint ligand; PD-L1

研究代表者

野崎 結 (Nozaki-Hirata, Yui)

旭川医科大学・大学病院・医員

研究者番号：60646066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では複数のHLA-DR分子に結合可能である、PD-L1特異的なペプチドPD-L1 241-265 peptideを同定した。このペプチドを使用して誘導されたHTLクローンは、PD-L1を発現している頭頸部癌をはじめとする腫瘍細胞株へ応答性を有しており、共培養によりIFN- γ 等のサイトカインの分泌を認めている。またこのHTLクローンはPD-L1陽性腫瘍細胞株に対して抗腫瘍効果を認め、ヒト腫瘍細胞株を移植したヌードマウスモデルにおいても腫瘍の増大を抑える結果となった。このことから、PD-L1 241-265 peptideを用いたヒトへの癌ワクチン療法への応用が期待される結果となった。

研究成果の概要(英文)：Recently, anti-programmed cell death-1 monoclonal antibody has yielded good clinical responses in recurrent and/or metastatic HNSCC patients. Therefore, programmed death-ligand 1 (PD-L1) may be a favorable target molecule for cancer immunotherapy. Furthermore, PD-L1-expressing malignant cells could be targeted by PD-L1-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. However, it remains unclear whether CD4+ helper T lymphocytes (HTLs) recognize and kill tumor cells in a PD-L1-specific manner. Therefore, in this study, we designed an MHC class II binding peptide PD-L1241-265 using computer-based algorithms and assessed its potential to activate CD4+ HTLs from peripheral blood of healthy donors. PD-L1241-265-specific HTLs showed not only cytokine production but also cytotoxicity against tumor cells in a PD-L1-dependent manner and significantly inhibited growth of PD-L1-expressing human tumor cell lines after adoptive transfer into immunodeficient mice.

研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

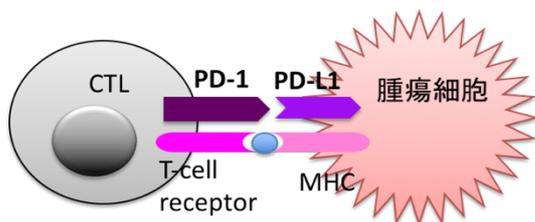
キーワード：頭頸部癌 腫瘍免疫 免疫チェックポイント分子 PD-L1 癌ワクチン療法

様式 C-19、F-19、Z-19(共通)

1. 研究開始当初の背景

癌免疫治療では、CD8 陽性細胞障害型 T 細胞 (CTL) が抗腫瘍効果を担う中心的存在であるが、その産生・維持には CD4 陽性ヘルパー T 細胞 (HTL) が重要な役割を果たしている。¹⁾ また、HTL 自身が腫瘍局所で IFN- γ などのサイトカイン産生を通じて直接的に抗腫瘍効果を発揮することも報告されているため、HTL を誘導可能な腫瘍関連抗原由来のエピトープペプチドを同定することは癌免疫治療を進展させる上で有用である。

PD-1/PD-L1 経路は免疫チェックポイントの 1 つとして知られており、CTL に発現する PD-1 と腫瘍細胞に発現する PD-L1 とが結合することによって、CTL に抑制性シグナルを伝達しアポトーシス・アナジーを誘導する。この経路は腫瘍細胞による免疫逃避機構と考えられている。²⁾ 頭頸部癌においてもこの PD-1/PD-L1 経路を阻害する抗体療法の有効性が報告されてきており、免疫療法の高い関心が集まっていた。研究開始当時、PD-L1 由来の HLA class I 拘束性エピトープペプチドが同定され、PD-L1 特異的 CTL の誘導とその抗腫瘍効果を検討した報告³⁾⁴⁾ が散見されていた。このことから我々は頭頸部癌細胞表面に発現している PD-L1 が癌免疫療法の新たな標的分子として注目した。



2. 研究の目的

(1) 頭頸部扁平上皮癌患者の生検・手術検体を用いて、PD-L1 発現の有無について検討を行う。

(2) PD-L1 全アミノ酸配列より HLA class II 分子に拘束される HTL ペプチドを同定し、PD-L1 特異的な HTL の誘導を行う。

(3) 誘導された PD-L1 特異的 HTL クローンによる腫瘍細胞株への応答性、抗腫瘍効果について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 2009~2014 年に当科で初期治療を行なった中咽頭癌症例 24 例の生検・手術検体を用いて PD-L1 の発現の有無について免疫染色で検討を行なった。腫瘍細胞の 5% 以上に発現を認めた場合を陽性と判定した。

(2) ①アミノ酸配列中の HLA class II 分子に結合しやすい部位を抽出し、PD-L1 全 290 塩基のうち複数の HLA-DR と結合しうる特定のアミノ酸配列をアルゴリズム解析し、それを元に PD-L1₂₄₁₋₂₆₅ peptide を同定した。

②PD-L1₂₄₁₋₂₆₅ peptide を樹状細胞に提示させ、同一健康人ドナーの末梢血から比重遠心法と磁気細胞分離にて分離された CD4 陽性細胞を共培養した。これを何度か繰り返すことにより、ペプチド特異性を持つ CD4 陽性 HTL クローンを樹立した。

(3) ①誘導された HTL クローンをを用いて、ペプチド提示された放射線照射後の末梢単核球に対する反応性を上清中の IFN- γ や GM-CSF を ELISA 法で測定することにより検討した。また頭頸部扁平上皮癌細胞株への応答性を確認するため、誘導された HTL クローンと PD-L1 を発現している悪性腫瘍細胞株を共培養し、その反応性について検討を行なった。

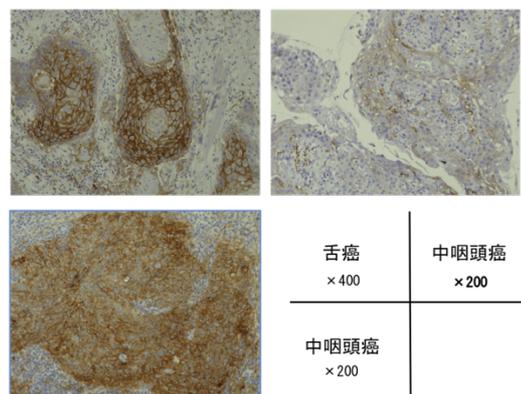
②また今回実験に用いたいずれの頭頸部扁平上皮癌細胞株も PD-L1 の発現を認めていたことから、siRNA transfection 法を用いて PD-L1 knock down させた細胞株を作成した。PD-L1 特異的 HTL クローンとの共培養により、未処理細胞株と PD-L1 knock down 細胞株での反応性の違いについて検討を進めた。

③PD-L1 特異的 HTL クローンの cytotoxicity を検討するため、CFSE で染色した腫瘍細胞と誘導された HTL クローンを共培養し、死細胞を 7-AAD で染色して Flow cytometry で評価した。さらに、ヒト肺大細胞癌を移植したヌードマウスに誘導された PD-L1 特異的 HTL クローンを静注し腫瘍増大の変化を検討した。

4. 研究成果

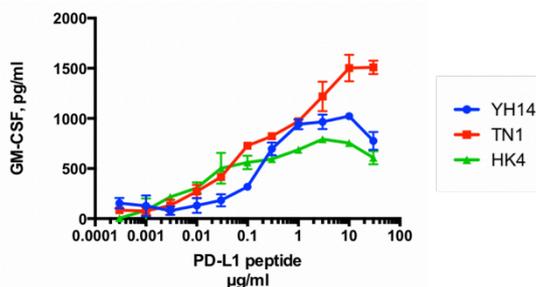
(1) 当科で初期治療を行なった中咽頭癌症例 24 例中 16 例 (66.7%) で PD-L1 の発現を認めた。予後との相関を検討したが、症例数が少ないため有意差は認められなかった。

頭頸部扁平上皮癌検体での PD-L1 発現 (免疫染色)



(2)①コンピューターアルゴリズム解析の結果をもとに、HLA-DR と結合しうと思われる アミノ酸配列を含む独自のペプチドを合成した。このペプチドは PD-L1₂₄₁₋₂₆₅ peptide を PD-L1 ヘルパーペプチドとして、その後の実験に用いた。

②PD-L1₂₄₁₋₂₆₅ peptide を用いて、3人の健康人ドナーから HLA-DR 拘束性ペプチド特異性のある HTL クローンを樹立した。誘導された3つの HTL クローン (YH14, TN1, HK4) とペプチドを提示した末梢血単核球を 抗原提示細胞として共培養したところ、ペプチド濃度依存性に上清中の GM-CSF, IFN- γ が上昇し、ペプチド特異的な反応を認めた。続いて、誘導された HTL クローンに抗 HLA-DR 抗体を添加したところ、反応性の低下を認めたことから、PD-L1₂₄₁₋₂₆₅ peptide は HLA-DR 上で提示されたものと考えられた。



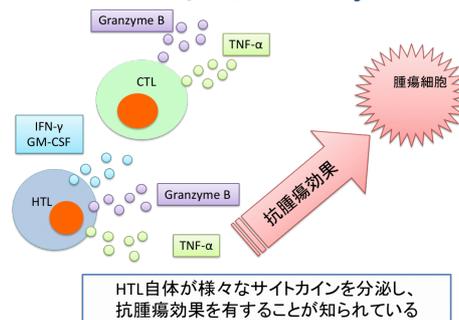
3) Flow cytometry にて PD-L1 発現を認めた頭頸部扁平上皮癌 (head and neck squamous cell carcinoma; HNSCC) 細胞株を用いて HTL クローンの反応性について調べた。

①YH14 は HSC4 (口腔癌) との共培養で腫瘍細胞表面に発現している PD-L1 に反応して IFN- γ を放出していた。他の PD-L1 特異的ヘルパー T 細胞クローンでも同様の結果が得られた。

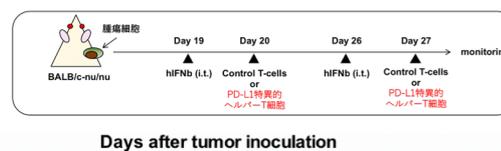
②siRNA transfection 法により PD-L1 の発現が knock down されていることを flow cytometry と Western blot で確認をした。この knock down された細胞株と未処理細胞株で PD-L1 特異的 HTL クローンの反応性を検討したところ、PD-L1 knock down 群では有意に上清中の IFN- γ が減少しており、PD-L1 特異的 HTL クローンの反応性が低下していた。このことから PD-L1 特異的 HTL クローンは腫瘍細胞表面に発現している PD-L1 を特異的に認識し、サイトカインを産生していることが判明した。

③CFSE でラベリングされた腫瘍細胞と誘導された HTL を共培養したところ、IFN- γ 処理を行なった細胞株では腫瘍細胞中 50% 程度の死細胞を検出し、高い cytotoxicity を認めた。

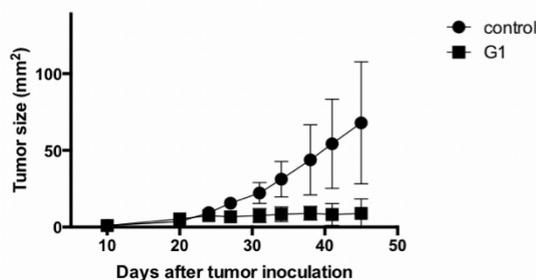
ヘルパーT細胞によるcytotoxicity



PD-L1特異的HTLクローンの抗腫瘍効果



Days after tumor inoculation



さらに、Lu65 (ヒト肺大細胞癌) を移植したヌードマウスモデルに PD-L1 特異的 HTL クローンを静注したところ、コントロール群に比べて有意に腫瘍増大を抑制する結果となった。

PD-L1 特異的 CTL クローンについての報告はすでになされているが、HTL ペプチドはいまだ同定されていない。本研究で用いた PD-L1₂₄₁₋₂₆₅ peptide は、複数の HLA-DR 分子に結合可能なペプチドであると考えられる。またそのペプチドを使用して誘導された HTL クローンは、PD-L1 を発現している腫瘍細胞株へ反応性を認めている。またこの HTL クローンは PD-L1 陽性腫瘍細胞株に対して抗腫瘍効果を認め、ヌードマウスモデルにおいても腫瘍の増大を抑えており、今後癌免疫治療への応用が期待される。

<引用文献>

- ① Hiroya K, Esteban C. Peptide epitope identification for tumor-reactive CD4 T cells. *Curr Opin Immunol.* 2008; 20(2): 221-7
- ② S. Ahmad, M.H. Andersen, et al. PD-L1-specific T cells. *Cancer Immunology.* 2016 Jan 2. [Epub ahead of print]

- ③ Munir S. M.H.Andersen, et al. HLA-restricted CTL that are specific for the immune checkpoint ligand PD-L1 occur with high frequency in cancer patients. *Cancer Research*. 2013;15;73(6): 1764-76.
- ④ T. Minami, H. Uemura, et al. Identification of Programmed Death Ligand 1-derived Peptides Capable of Inducing Cancer-reactive Cytotoxic T Lymphocytes From HLA-A24+ Patients With Renal Cell Carcinoma. *Journal of Immunotherapy*, 2015; 38(7): 285-91.
- ⑤ K. Li, M. Baird, et al. Conditions for the generation of cytotoxic CD4+ Th cells that enhance CD8+ CTL-mediated tumor regression. *Clinical & Translational Immunology*. 2016; 5(8): e95.

5. 主な発表論文等（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- ① 平田 結、小林博也、原渕保明 免疫チェックポイント分子 PD-L1 特異的ヘルパーT細胞の誘導とその抗腫瘍効果、耳鼻咽喉科 免疫アレルギー、35 巻 2 号、2017、153- 154

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 野崎 結、腫瘍免疫における PD-L1 特異的 CD4 陽性ヘルパーT細胞クローンの有用性、日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2018 年 2 月 24 日、山口県
- ② 平田 結、Cancer immunotherapy of HTL which are specific for the immune checkpoint ligand PD-L1. 日本癌学会、2017 年 9 月 28 日、神奈川県
- ③ 平田 結、免疫チェックポイント分子 PD- L1 特異的 CD4 陽性ヘルパーT細胞クローンの誘導とその抗腫瘍効果、日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会、2017 年 4 月 15 日、北海道
- ④ 平田 結、The immune checkpoint molecule, PD-L1 is a specific tumor associated antigen for CD4 helper T lymphocytes. 日本癌学会、2016 年 10 月 7 日、神奈川県

- ⑤ 平田 結、Induction of tumor-reactive CD4 helper T lymphocytes which are specific for the immune check point ligand PD-L1. 日本病理学会、2016 年 4 月 27 日、神奈川県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野崎 結 (NOZAKI-HIRATA, Yui)
 旭川医科大学・大学病院・医員
 研究者番号：60646066