

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460587

研究課題名(和文) 共刺激分子による抗腫瘍免疫反応の機能解析とがんワクチンへの応用

研究課題名(英文) Analysis of anti-tumor immune responses by costimulatory molecules and application for the clinics

研究代表者

辛 太廣 (SHIN, Tahiro)

信州大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70637199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：がんに対する標準療法は患者を救えていない。新しい治療方法として、免疫療法が期待されている。以下の解析を行った。(1) がんの免疫校正におけるB7-DCの役割。(2) B7-DCの抗腫瘍効果におけるCD4T細胞の役割。(3) B7-DCを利用したワクチン開発のための基礎実験。我々の実験で、B7-DCはがんのEliminationを促進し、Equilibriumを維持し、Escapeを抑制すると確認された。B7-DC+細胞が直接、CTLを誘導している可能性が示唆された。抗体と、B7-DCによるコンビネーション治療は有意な抗腫瘍効果を見せた。将来、B7-DCを利用した臨床応用が可能かもしれない。

研究成果の概要(英文)：The standard therapies for cancer have not been effective enough yet. As a new approach, cancer immunotherapy is considered very hopeful. In this project, we analyzed the following mechanism: (1) the biological role of B7-DC in cancer immunoediting (Elimination, Equilibrium, Escape) (2) the immunological role of CD4 T cells for the anti-cancer effect of B7-DC (3) the basic experiments for the development of cancer vaccine utilizing B7-DC. By our experiments, those were confirmed that B7-DC facilitates cancer Elimination, maintain cancer Equilibrium and inhibits cancer Escape. Also, it was suggested that the cells expressing B7-DC induce cancer antigen specific CTLs. It seems very possible that the clinical applications for a new cancer immunotherapy utilizing B7-DC would be established in near future.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：腫瘍免疫 共刺激分子 抗腫瘍免疫反応

1. 研究開始当初の背景

がんに対する標準療法は、外科手術、化学療法、放射線療法である。各治療法及びこれらのコンビネーションにより、治療成績は年々向上してはいるが、そのスピードは極めて遅い。基本的な原因は、各標準療法を組み合わせても治療効果の限界にきているからだ。特に進行がんに対しては、これらの標準療法の効果は極めて限定的であり、一般社会から期待されている程にはがん患者を救えていないのが現状である。よって、新しいがんの治療方法の確立が期待されている。理想的な治療法とは、治癒率が高く、再発率が低く、侵襲が少なく、副作用が少ない治療法である。つまり、がんを特異的に攻撃し、正常組織を損傷せず、治療後もワクチンをしたように再発を押さえる効果のあるもの。これらの点において、がんの免疫療法は最もポテンシャルの高い方法であり、がんに対する第四の標準療法になるであろうと期待されている。

1980年代より様々ながんの免疫療法が試されてきたが、その効果は期待されたほどのものではなかった。ところが、最近発表された抗 PD-1 抗体と抗 B7-H1 抗体の第一相臨床試験データでは、悪性黒色腫を中心に様々な癌腫に対して、約 3 割の治療効果を認めるとい画期的なものであった(Topalian et al. N. Engl. J. Med. 2012, Brahmer et al. N. Engl. J. Med. 2012)。特に、免疫原性が低く、免疫療法に抵抗すると考えられていた肺癌に対しても、組織型によっては約 1/3 の症例で癌の退縮が見られており、特に抗 PD-1 抗体は日本で世界に先駆けて販売されてからも、その適応は広がる傾向にある。

PD-1(CD279)は、1992年に京都大学の本庶佑博士によりクローニングされた分子であるが、主に活性化した T 細胞に発現して、その活性を抑制する機能を持つ(Chen. Nat. Rev. Immunol. 2004, Greenwald et al. Ann. Rev. Immunol. 2005)。PD-1 には、B7-H1(PD-L1, CD274)と B7-DC(PD-L2, CD273)という二つのリガンドが発見されている。B7-H1 は PD-1 と相互作用し、様々な免疫反応を抑制することが知られている。B7-H1 はがん細胞上にも高発現しており、細胞障害性 T リンパ球(CTL)上の PD-1 を介して抗腫瘍免疫反応を抑制し、がんの免疫逃避機構として使われている。がん細胞上での B7-H1 の発現量が高い程、予後が悪いことも指摘されている(Topalian et al. Curr Opin Immunol. 2012)。マウスを使った実験で、PD-1 や B7-H1 をノックアウトしても激しい自己免疫疾患を起こさないため、臨床への応用が期待されていた。もう一つの PD-1 リガンドである B7-DC は、2001年、我々によりクローニングされた(Tseng et al. J. Exp. Med. 2001)。驚いたことに、PD-1 や B7-H1 の機能とは逆に T 細胞を介する免疫を刺激する機能を持っていることがわかった(Shin et

al. J. Exp. Med. 2003 and 2005)。そのメカニズムは未だに解明されていないが、B7-DC の発現の分布も機序も機能も B7-H1 とは大きく異なるため、PD-1 とは別の機構で T 細胞の活性化を行っていると思われている。興味深いことに、B7-DC の機能はおおよそ抗腫瘍免疫反応においてのみ顕著に観察され、その他の免疫反応でははっきりしないことが多い。つまり、B7-DC は抗腫瘍免疫反応を励起することに特化した機能を持った分子と言える。抗腫瘍免疫以外の免疫系を動かすににくいということは、つまり、がんの免疫療法で最も危険と考えられる非特異的な自己免疫疾患を起こすににくい分子である、といえる。

従来、B7-DC の発現は樹状細胞やマクロファージに限局されると考えられていたが、近年、高齢マウスの B 細胞サブセットや若年及び高齢化マウスの腹腔内 B-1 B 細胞、腸管パイエルパッチ内の B 細胞サブセットで発現しているのが発見された(Tomihara et al. Aging Cell 2012, Shin unpublished data)。特に高齢マウスから取り出された B7-DC⁺ B 細胞は、タイプ I ヘルパー CD4 T 細胞(Th1)と IL-17 産生ヘルパー CD4 T 細胞(Th17)を誘導し、細胞障害性 T リンパ球(CTL)を誘導する能力が高く、高齢マウスの B7-DC⁺ B 細胞でワクチンすると移植がんの発育をほぼ完全に抑制することが観察されている。B7-DC の抗腫瘍免疫機能の詳細を明らかにすることは、がんの抗腫瘍免疫反応の病態生理をより深く理解することになり、引いては新しいがんの免疫治療を開発するための生物科学的根拠を発見することとなると思われる。

2. 研究の目的

共刺激分子である B7-DC は、T 細胞免疫を賦活化することにより抗腫瘍免疫効果を発揮することが知られている。B7-DC の発現は樹状細胞とマクロファージに限られず、近年、B7-DC を発現する特殊な B 細胞が発見され、強力な抗腫瘍免疫反応を誘導することが示された。B7-DC の抗腫瘍効果における機能と作用機序、及びがんの免疫監視機構における役割をさらに詳しく解析し、B7-DC を新しいがんの免疫療法に応用するための基礎的な情報を収集する。

3. 研究の方法

化学物質 methylcholanthrene(MCA)による自発がんの誘発実験を B7-DC ノックアウト(KO)マウスと野生型(WT)マウスに対して同時に行い、発生する Sarcoma の時期、大きさ、頻度を比較した。抗腫瘍効果を発揮する B7-DC を発現する細胞群を同定するために、抗原提示細胞(CD11b⁺細胞群)、腸管パイエルパッチ B7-DC⁺B 細胞、高齢マウスの B7-DC⁺B 細胞を B7-DC KO マウスに移入して、MCA によるがんの誘発を行った。マウス大腸がん細胞

株 MC38-OVA、CT26-OVA やマウス悪性黒色腫細胞株 B16-OVA を使用して担がんマウスを作成し、OVA 特異的な CTL (OVA-CTL) の増加を OVA-MHC ペンタマーで観察した。B7-DC を利用したワクチンの実験では、MCA による発がん誘導と B16 メラノーマによる移植がんの系を使用し、抗 PD-1 抗体か抗 B7-H1 抗体と樹状細胞、B7-DC⁺B 細胞、もしくは GM-CSF 産生癌細胞株ワクチン(GVAX)を同時投与した。

4. 研究成果

以下の3つの課題の解決を目指し、研究を行った。

- (1) がんの免疫校正、Elimination、Equilibrium、Escape の各相におけるおける B7-DC の役割の解析。
- (2) B7-DC が誘導する抗腫瘍効果における CD4 ヘルパーT細胞の役割の解析。
- (3) B7-DC を利用したワクチンの開発のための基礎実験。

研究目的 (1) がんの免疫校正における B7-DC の役割の解析。

MCA によるがんの誘発実験により、免疫校正の Elimination、Equilibrium、Escape の各相での B7-DC の機能評価を行った。MCA を B7-DC KO マウスと WT マウスの皮下に注射したところ、B7-DC KO マウスでは発がんの発生時期が WT マウスに比べて有意に早く、B7-DC は Elimination の段階から腫瘍の発生を抑制していることがわかった。また、WT マウスと違い、途中で成長の止まるマウスは見られなかったため、Equilibrium を誘導する段階においても B7-DC の発現が重要であると考えられた。同様に、MCA で誘導したがんを違う WT マウスの皮下に移植し、その大きさが横ばいになって2週間以上経ったマウスに、抗 B7-DC 抗体を投与するとほとんどのマウスで腫瘍の大きさが増加した。B7-DC の発現が、Equilibrium の状態を維持していたと考えられる。また、MCA によるがんの誘発において、途中で腫瘍が大きくななくなった WT マウスに、抗 B7-DC 抗体を連日投与したところ、腫瘍の成長が復活したことから、B7-DC の発現はがんが Escape するのを抑制していると考えられた。in vivo から取り出された、B7-DC により誘導される CD4 ヘルパーT細胞の性質は、Th1 と Th17 が多いように見られたが、細胞内染色による検出方法では、有意な差を示すことはできなかった。抗原提示細胞(CD11b⁺細胞群)、腸管パイエルパッチに存在する B7-DC⁺B 細胞を B7-DC KO マウス移入する実験では、いずれの場合も発がんの発生時期が WT マウスに近づいたため、どちらがより貢献しているという優劣は、in vivo の実験ではつけ難かった。B7-DC を発現している細胞をたくさんある移入することが大切であるように考えられた。また、担がんマウスより純化した CD4 及び CD8T 細胞のサイトカ

イン(IFN-g、IL-2、TNFα、IL-4、IL-17A、IL-17F等)やトランスクリプショナルファクター(T-bet、GATA-3、ROR-gt、FoxP3等)の発現をリアルタイム PCR にて比較する予定でサンプルを凍結保存してあり、近日中に解析する予定である。

研究目的 (2) B7-DC が誘導する抗腫瘍効果における CD4 ヘルパーT細胞の役割の解析。

我々は、抗 CD4 抗体を投与して CD4T 細胞を消去した B7-DC KO マウスもしくは WT マウスに、抗原提示細胞か腸管パイエルパッチ B7-DC⁺B 細胞と抗原の存在下に培養された OVA 特異的な CD4 ヘルパーT細胞を移入し、MC38-OVA、CT26-OVA か B16-OVA を移植して、OVA 特異的 CTL の誘導を観察した。B7-DC⁺細胞と共に培養された CD4T 細胞を移入した WT マウスでは、OVA 特異的 CTL の誘導が確認されたが、B7-DC KO マウスでは B7-DC⁺細胞と共に培養された CD4T 細胞を移入しても OVA 特異的 CTL は極めて限定的であった。このことから、B7-DC⁺細胞に刺激された CD4T 細胞のみでは抗原特異的な CTL の誘導は難しく、CD4 ヘルパーT細胞の存在は必要であるとは思われるが、B7-DC⁺細胞が、直接、抗原特異的な CTL を誘導している可能性があるのではないかと考えられた。OVA 特異的な CD4T 細胞を移入したマウスに移植した MC38-OVA、CT26-OVA、B16-OVA の増殖は、移入した CD4T 細胞を共培養した細胞の種類によらず、同様の増殖を示した。B7-DC KO マウスと WT マウスの間の差は、移入した細胞の差というよりは、ホスト個体の差であると考えられた。

研究目的 (3) B7-DC を利用したワクチンの開発のための基礎実験。

がんの Escape の機能をブロックする抗 PD-1 抗体や抗 B7-H1 抗体と、B7-DC による抗腫瘍免疫反応のコンビネーションががんに対して効果的な治療法となるか、動物実験レベルで評価してみた。MCA による発がん誘導と B16 メラノーマによる移植がんの系を使用し、腫瘍が肉眼で観察されるようになってからという、治療するには大変厳しい条件下で、抗 PD-1 抗体か抗 B7-H1 抗体と樹状細胞、B7-DC⁺B 細胞、もしくは GVAX のコンビネーション治療を行った。いずれのコンビネーション治療も、コントロールに対して有意な腫瘍増殖の抑制を見せた。一番強力な効力を発揮したと思われるのは、抗 B7-H1 抗体と B7-DC⁺B 細胞によるコンビネーション治療であった。90%近くのマウスで腫瘍の完全消退が確認され、週に二回、計8回の治療で、完全消退した腫瘍は約6カ月にわたり再発しなかった。GVAX に B7-DC を強制的に高発現させたがん細胞ワクチンは、B7-DC⁺B 細胞によるワクチンには及ばなかったが、有意な腫瘍増殖の抑制効果を示した。腫瘍の完全消退が確認されたマウスでは、その後も長期間にわたり再発しないマウスが多くを占めた。将来的

に、B7-DC⁺GVAX として臨床応用が可能かもしれないと考えられた。今後は、B7-DC⁺GVAX のように B7-DC の発現を利用したがんワクチンの開発の研究を続けていきたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Jerome T. McKay, Ryan P. Egan, Rama D. Yammani, Liepieng Chen, Tahiro Shin, Hideo Yagita, and Karen M. Haas. PD-1 suppresses protective immunity to *Streptococcus pneumoniae* through a B cell-intrinsic mechanism *J Immunol*. 2015 March 1; 194(5): 2289-2299, 査読有

〔学会発表〕(計1件)

Tokumaru S, Okubo Y, Shin T, Sanjo H, Taki S, The transcription factor IRF-2 controls CD8 α ⁺ intraepithelial lymphocyte development at the level of thymic precursor. 第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月18日～20日、札幌コンベンションセンター

6 . 研究組織

(1)研究代表者

辛 太廣 (SHIN, Tahiro)

信州大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70637199