

令和元年5月16日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10148

研究課題名(和文)新規免疫チェックポイントの同定と阻害方法の開発

研究課題名(英文) Identification of novel immunecheckpoints and development of methods to inhibit them

研究代表者

猪爪 隆史 (Inozume, Takashi)

山梨大学・大学院総合研究部・講師

研究者番号：80334853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では腫瘍拒絶の中心的役割を担うヒト腫瘍浸潤リンパ球を用いたin vitroの実験やヒトの体に近づけたマウスモデルを用いたin vivoの治療実験で以下を実証した。(1)新規免疫チェックポイント候補分子であるTIGIT、LAG3がPD-1と同様に腫瘍特異的な腫瘍浸潤T細胞に選択的に発現され、T細胞の機能を協調して抑制していること(2)これらを同時に阻害することで腫瘍特異的T細胞を相乗的に効率よく活性化できること

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、がん治療に使用される抗PD-1抗体、抗CTLA-4抗体は一部のメラノーマ患者に高い効果を示すが、効果が無い例、強い副作用が出る例も存在する。本研究では新規免疫チェックポイント候補であるTIGITとLAG3をPD-1とともに阻害すれば効果増強、副作用軽減が可能となる可能性を示した。この結果は今後の免疫チェックポイント阻害剤によるがん治療の効率化、安全化に高く貢献する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study we have shown (1) and (2) as below, in the in vitro experiment using human melanoma tumor infiltrating lymphocytes that are thought to play central role in tumor rejection, and, in the in vivo tumor-treatment model using a humanized mouse model.

(1) PD-1, TIGIT, and LAG3 are selectively expressed by tumor-infiltrating, tumor-specific T cells, and cooperatively suppress T cell function (2) Co-blockade for their signals by the blocking antibodies synergistically activate the tumor specific T cells.

研究分野：皮膚科学

キーワード：抗PD-1抗体 抗CTLA-4抗体 TIGIT LAG3 メラノーマ 免疫チェックポイント阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

抗 PD-1 抗体によるがん拒絶において、PD-1 などの免疫チェックポイント分子(T細胞抑制因子)を発現した腫瘍浸潤T細胞が重要な役割を果たしている。そして腫瘍拒絶に重要な腫瘍浸潤T細胞は複数の免疫チェックポイント分子を発現し、それによって抑制されていることも近年、明らかにされた。従って腫瘍拒絶に重要な腫瘍浸潤T細胞を完全に活性化するには PD-1 に加えて複数の免疫チェックポイント分子を同時に阻害することが有効と考えられる。しかし免疫チェックポイント分子はそれぞれの程度で免疫恒常性の維持に関与しているため、PD-1 のように、より腫瘍免疫に選択的に関与する免疫チェックポイントを同定して阻害することが効果増強と副作用(自己免疫)軽減のために重要である。我々は前回の研究課題において、TIGIT がメラノーマ特異的T細胞の機能を強く抑制することを発見した。その他、LAG3 も新規免疫チェックポイント分子として注目されている。TIGIT, LAG-3 ノックアウトマウスは自己免疫現象の自然発生が観察されないことも加味すると、副作用の観点からも TIGIT, LAG-3 は PD-1 に続く免疫チェックポイント阻害療法の有力な新規標的であると考えられる。しかし、ヒト腫瘍浸潤T細胞内でこれらの分子の抑制シグナルが干渉し合うメカニズム、シグナルを同時に阻害した場合の変化、などは十分に解明されてこなかった。

## 2. 研究の目的

副作用が少なく効果が高い免疫チェックポイント阻害療法を開発するため、新規候補分子 TIGIT, LAG-3 それぞれの PD-1 とのシグナル干渉、また候補分子を PD-1 とともに阻害した時の T細胞活性に対する影響を、in vitro, in vivo で評価する。とりわけ重要なヒトメラノーマ腫瘍浸潤T細胞におけるシグナルの干渉や阻害効果を、我々のグループが保有する反応特異性が高い実験系で検証する。

## 3. 研究の方法

### (1)PD-1 と新規免疫チェックポイント候補分子 TIGIT, LAG-3 の干渉の解析

ヒト腫瘍特異的T細胞における TIGIT, LAG-3 が特異的刺激によって発現されるタイミング、これらの分子が単独ないしは複数同時に抑制シグナルを産生した場合に起こる腫瘍への反応性の変化、これらの分子を PD-1 と同時に阻害した際の腫瘍への反応性の変化、を腫瘍特異的T細胞、とりわけ重要な腫瘍浸潤T細胞とそれに認識される自己腫瘍細胞株を用いた in vitro の共培養実験で検証した。

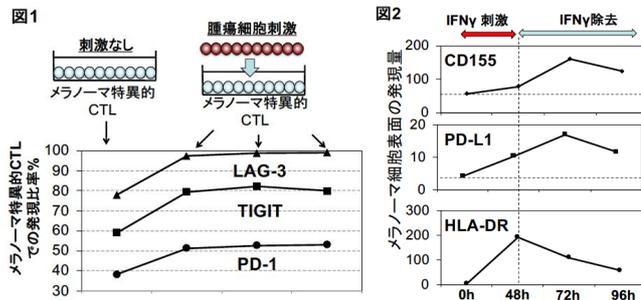
(2) TIGIT シグナルを効率よく阻害する抗ヒト抗体を作成した。そして in vivo でそれらを阻害した場合の抗腫瘍効果と副作用を、共同研究グループが保有するヒト化マウスでのヒトメラノーマ治療モデルなどで解析した。

## 4. 研究成果

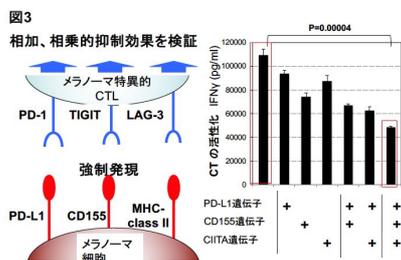
### (1)新規免疫チェックポイント分子の発現パターン、PD-1- PDL1 結合と同時に阻害した際のT細胞活性増強効果の検証

健康人末梢血リンパ球よりメラノーマ抗原(MART-1)特異的人工T細胞を作成し、それぞれ複数の MART-1 抗原を発現したメラノーマ細胞株による共培養刺激を行った。刺激後 24, 48, 72 時間後までの PD-1, TIGIT, LAG-3 の発現レベルの経時変化をフローサイトメトリーにて確認した。その結果、これら 3 つの分子が刺激後に発現されるタイミング、また刺激後に発現が維持される時間、はほぼ同じであることが確認された (図 1)。次にメラノーマ細胞を IFN $\gamma$  で刺激した後に、PD-1, TIGIT, LAG-3 それぞれに抑制シグナルを送るリガンド、PD-L1, CD155, MHC class

II の発現がどう推移するか、をフローサイトメトリーにて確認した。その結果、これらの分子が刺激後に発現されるタイミング、また刺激後に発現が維持される時間もほぼ同じであることが確認された(図 2)。



次に PD-L1, CD155, MHC class II を強制発現したメラノーマ細胞と特異的 T 細胞とメラノーマ細胞株の共培養を行うと、T 細胞の活性化は相乗的に抑制された (図 3)。この共培養系に PD-1, TIGIT, LAG-3 それぞれのシグナルを阻害する抗体を添加すると、抑制は解除された。



(2) 腫瘍免疫で最も重要な役割を担うとされる腫瘍浸潤 T 細胞と自己がん細胞株を用いた検討  
ヒトメラノーマ切除組織を酵素で消化し、single cell suspension を作成する。これより腫瘍浸潤 T 細胞のラインと腫瘍細胞株のペアを複数、作成できたので、共培養刺激による T 細胞の活性化やがん細胞の傷害能力を検討した。さらにそこに PD-1, TIGIT, LAG-3 それぞれのシグナルを阻害する抗体を添加し、腫瘍浸潤 T 細胞の自己癌細胞への攻撃活性が相乗的に増強されるかどうかを検討した。その結果、抗 PD-1 抗体、抗 TIGIT 抗体、抗 LAG-3 抗体添加によって腫瘍浸潤 T 細胞の自己癌細胞刺激に対するサイトカイン放出量が相乗的に増強された。そして、各分子の阻害効果、組み合わせによる増強効果の程度は、患者ごとに個人差があることも判明した。全体の傾向としては抗 PD-1 抗体と抗 TIGIT 抗体の組み合わせが最良の相乗効果を示した。

### (3) TIGIT の新規治療標的としての有用性の追求

ヒト化モデルマウスを用いた in vivo 実験で TIGIT の新規治療標的としての有用性を検証した。共同研究を行っている慶応大学先端医科学研究所が保有するヒト化マウス皮下にヒトメラノーマを増殖させ、それを認識する T 細胞の静脈移入で治療するモデルにおいて、同施設と共同で作成した抗ヒト TIGIT 阻害抗体を添加した。その結果、我々が開発した抗ヒト TIGIT 阻害抗体によって移入 T 細胞の腫瘍縮小効果が有意に増強された。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

(1) Inozume T, Yaguchi T, Ariyasu R, Togashi Y, Ohnuma T, Honobe A, Nishikawa H, Kawakami Y, Kawamura T. Analysis of the tumor reactivity of tumor-infiltrating lymphocytes in a metastatic melanoma lesion that lost MHC class I expression after anti-PD-1 therapy. J Invest Dermatol. 査読あり, in press. doi: 10.1016/j.jid.2019.01.007.

- (2) Inozume T, Hanada KI, Takeda K, Maeda T, Harada K, Kawamura T. Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 expressed by melanoma cells does not affect melanoma-specific cytotoxic T lymphocytes in the effector phase. *J Dermatol.* 査読あり, 2019;46(1):52-6. doi: 10.1111/1346-8138.14685.
- (3) Yaguchi T, Kobayashi A, Inozume T, Morii K, Nagumo H, Nishio H, et al. Human PBMC-transferred murine MHC class I/II-deficient NOG mice enable long-term evaluation of human immune responses. *Cell Mol Immunol.* 査読あり, 2018;15(11):953-62. doi: 10.1038/cmi.2017.106.
- (4) Inozume T, Tsunoda T, Morisaki T, Harada K, Shirasawa S, Kawamura T. Acquisition of resistance to vemurafenib leads to interleukin-10 production through an aberrant activation of Akt in a melanoma cell line. *J Dermatol.* 査読あり, 2018;45(12):1434-9. doi: 10.1111/1346-8138.14651.
- (5) 猪爪隆史 新・皮膚科セミナーウム メラノーマの新しい治療法 免疫チェックポイント阻害剤の効果と副作用, 日本皮膚科学会雑誌, 査読なし依頼原稿, vol.128, vol.6, P1291-1299, 2018
- (6) Takahashi N, Sugaya M, Inozume T, et al. Increased Soluble CD226 in Sera of Patients with Cutaneous T-Cell Lymphoma Mediates Cytotoxic Activity against Tumor Cells via CD155. *J Invest Dermatol.* 査読あり, 2017;137(8):1766-73. doi:10.1016/j.jid.2017.03.025.
- (7) Ohnuma T, Matsuzawa T, Kinoshita M, Sano S, Kawamura T, Shimada S, Inozume T. Case of metastatic uveal melanoma in which an antitumor effect appeared after ipilimumab discontinuation due to autoimmune hypophysitis. *J Dermatol.* 査読あり, 2017;44(11):1325-6. doi: 10.1111/1346-8138.13692.
- (8) 猪爪隆史 免疫チェックポイント阻害薬同士の併用, 腫瘍内科, 査読なし依頼原稿, vol.20, No.2 特集 免疫療法の進歩と問題点 p95-99, 2017
- (9) 猪爪隆史 免疫チェックポイント阻害療法と自己免疫現象, 臨床免疫・アレルギー科, 査読なし依頼原稿, vol.68, No3, p341-345, 2017

〔学会発表〕(計 21 件)

- (1) 猪爪隆史、抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体の可能性と限界を考える、第 82 回日本皮膚科学会東京支部学術大会 スポンサーシップシンポジウム メラノーマ薬物療法の進歩(招待講演)、2018 年 12 月 1 日、ザプリンスパークタワー東京、東京
- (2) 猪爪隆史、免疫チェックポイント阻害剤の理解に役立つがん免疫の知識、第 70 回日本皮膚科学会西部支部学術大会 スポンサーシップシンポジウム 2 悪性黒色腫 現状と課題(招待講演)、2018 年 11 月 10 日、島根県民会館、島根
- (3) 猪爪隆史ら、抗 PD-1 抗体により長期安定後に悪化した病巣のメラノーマ細胞と TIL の解析、第 22 回日本がん免疫学会総会、2018 年 8 月 1 日-3 日、岡山コンベンションセンター、岡山
- (4) 猪爪隆史、抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体とその先、第 34 回日本皮膚悪性腫瘍学会学術大会シンポジウム 2 アブスコパル効果とその周辺(招待講演)、2018 年 7 月 6 日、アクトシティ浜松、浜松
- (5) Takashi Inozume, et al. CTLA-4 expressed by melanoma cells showed enhanced susceptibility to anti-melanoma T-cell responses, The 42<sup>nd</sup> annual meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology, 2017 年 12 月 15 日-17 日, 高知市文化プラザカルポート、高知
- (6) Takashi Inozume, Identification of suitable immune checkpoints as targets for cancer immunotherapy, The 42<sup>nd</sup> annual meeting of The Japanese Society for Investigative Dermatology, afternoon seminar 3 (招待講演), 2017 年 12 月 16 日, 高知市文化プラザカルポート、高知
- (7) 猪爪隆史、新規免疫チェックポイント分子を標的としたがん免疫療法の開発、山梨科学アカデミー奨励賞受賞講演(招待講演)、2017 年 11 月 27 日、ベルクラシック甲府、甲府
- (8) 猪爪隆史、免疫チェックポイント阻害療法のこれから、第 69 回日本皮膚科学会西部支部学

術大会、スポンサードセミナー 1 (招待講演) 2017 年 10 月 28 日、熊本県民交流会館パレア、熊本

(9)猪爪隆史、免疫チェックポイント阻害剤を再考する、第 81 回日本皮膚科学会東部支部学術大会イブニングセミナー 1 (招待講演) 2017 年 9 月 23 日、ビッグパレットふくしま、郡山

(10)猪爪隆史、次の免疫チェックポイント分子、第 38 回日本炎症・再生医学会 シンポジウム 14 がん免疫療法 (招待講演) 2017 年 7 月 19 日、グランキューブ大阪、大阪

(11)猪爪隆史ら、4-1BB刺激は免疫チェックポイント阻害と相乗的にメラノーマ特異的CTLの活性を増強する、第21回日本がん免疫学会、2017年 6月28日-30日、幕張メッセ国際会議場、千葉

(12)猪爪隆史、癌免疫療法の現状と今後、第 116 回日本皮膚科学会総会 教育講演 42 (招待講演) 2017 年 6 月 4 日、仙台国際センター、仙台

(13)Takashi Inozume, et al. Activation of 4-1BB signal and co-blockade of PD-1 and TIGIT signaling synergistically enhance melanoma-specific CTL responses during the effector phase, Society for Investigative Dermatology 76<sup>th</sup> annual meeting, 2017年 4月 26日-29日, Oregon convention center, Portland, Oregon

(14)猪爪隆史、抗 PD-1 抗体の成功から考える癌免疫、第 31 回長野県臨床細胞学会総会・学術集会ランチョンセミナー (招待講演) 2017 年 3 月 12 日、信州大学、松本

(15)Takashi Inozume, PD-1, TIGIT, and LAG-3 signals synergistically suppress the anti-melanoma CTL response in the effector phase, Japanese Society for Investigative Dermatology 41st annual meeting, 2016 年 12 月 9 日-11 日, 仙台国際センター、仙台

(16)猪爪隆史、メラノーマに対する T 細胞免疫療法の臨床と基礎最新の話、第 27 回日本色素細胞学会学術大会ランチョンセミナー 1 (招待講演) 2016 年 11 月 12 日、岐阜大学サテライトキャンパス、岐阜

(17)猪爪隆史、癌免疫療法の現状、第 80 回日本皮膚科学会東部支部学術大会スポンサードシンポジウム 2 (招待講演) 2016 年 10 月 29 日、アクトシティ浜松、浜松

(18)Takashi Inozume, Identification of suitable immune checkpoints as targets for cancer immunotherapy, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences - The Japanese Society for Immunology International Symposium on Immunology 2016 (招待講演) ,2016年6月16-17日, パシフィコ横浜、横浜

(19)猪爪隆史、メラノーマ上のPD-L1, CD155, MHC class II分子は協調的に特異的CTLによる認識を抑制する、第20回日本がん免疫学会、2016年 7月28日-30日、大阪国際交流センター、大阪

(20)猪爪隆史、免疫チェックポイント阻害剤の効果と副作用について、第115回日本皮膚科学会総会 教育講演12-2 (招待講演) 2016年 6月 4 日、国立京都国際会館、京都

(21)Takashi Inozume, et al. Blockade of multiple immune checkpoints cooperatively enhanced the antitumor effect of melanoma-specific CTLs, Society for Investigative Dermatology 75<sup>th</sup> annual meeting, 2016年 5月11日-14日, Arizona Westin Kierland Resort & Spa, Scottsdale, Arizona

〔図書〕(計 1 件)

(1)猪爪隆史 他、医学書院、今日の治療指針 2018年版 悪性黒色腫, p1264-1265, 2018

〔その他〕

ホームページ等

(1)山梨大皮膚科ホームページにて研究グループ、内容紹介

<https://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/dermatol/groupe/index.html>

(2)2018/10/7 6:30 日本経済新聞 電子版に研究が紹介された

ノーベル賞のがん免疫薬、効力向上へ 進む研究

<https://www.nikkei.com/article/DGXMZ036186080V01C18A0TJM000/>

## 6 . 研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：谷口 智憲

ローマ字氏名：YAGUCHI tomonori

研究協力者氏名：富樫 庸介

ローマ字氏名：Togashi Yosuke

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。