

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290059

研究課題名(和文) がんに対する免疫賦活化抗体療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of immuno-stimulatory antibody therapy against cancer

研究代表者

八木田 秀雄 (YAGITA, Hideo)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：30182306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞に免疫原性細胞死を惹起する抗DR5抗体の効果を高め副作用を軽減する新たな手法を開発した。また、種々の白血病細胞に直接的に細胞死を誘導する新たな抗体を樹立した。さらに、がんに対する免疫応答を増強する経路(CD137, CD27, Notch2など)及び、逆に抑制する経路(CTLA-4, PD-1, TIM-3, VISTA, TIGITなど)を明らかにし、それらに対する活性化抗体あるいは阻害抗体を用いて、標準的な抗がん剤や放射線あるいはがん細胞を標的とした抗体療法によって惹起されるがんに対する免疫応答の新たな増強法を開発した。

研究成果の概要(英文)：We have developed novel strategies to enhance the immunogenic cell death of cancer cells induced by anti-DR5 monoclonal antibody and to reduce its unfavorable side effect. We have also developed a novel monoclonal antibody that can directly induce unique cell death in human leukemias. We have further developed novel strategies to augment anti-tumor immunity by using antibodies activating the immunostimulatory pathways (such as CD137, CD27, and Notch2) and those blocking the immunosuppressive pathways (such as CTLA-4, PD-1, TIM-3, VISTA, and TIGIT) in combination with standard chemotherapy, radiotherapy, and antibody therapy targeting cancer cells.

研究分野：免疫学

キーワード：がん 免疫 抗体療法 キラーT細胞 CD27 CTLA-4 PD-1 VISTA

### 1. 研究開始当初の背景

最近、CTLA-4 や PD-1 といった免疫抑制分子を標的としたがんに対する抗体療法が注目されているが、単剤での奏効率は充分ではない。我々はこれまでに、マウス腫瘍モデルにおいて、我々が樹立した細胞死誘導性の TRAIL 受容体である DR5 に対するアゴニスト抗体が一次的な腫瘍の退縮を引き起こすのみならず、その Fc 部位を介して宿主の自然免疫系の細胞 (NK 細胞やマクロファージ、樹状細胞など) を腫瘍局所に動員し、DR5 を介して免疫原性細胞死を起こしたがん細胞によって活性化されたこれらの抗原提示細胞が二次的に腫瘍抗原特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL) を誘導することによって、全身的に持続的な抗腫瘍効果を発揮することを見出した。さらに、がん細胞に免疫原性細胞死を誘導する抗 DR5 抗体と免疫系を活性化する抗 CD40 抗体や抗 4-1BB 抗体、さらに、免疫抑制系を阻害する抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-1 抗体を組み合わせることにより、強力な抗腫瘍効果が得られることを証明してきた。

### 2. 研究の目的

本研究においては、種々のマウス可移植性腫瘍や発がんモデルを用いて、免疫系を活性化する抗 CD40 抗体や抗 4-1BB 抗体あるいは抗 CD27 抗体等と免疫抑制系を阻害する抗 CTLA-4 抗体や抗 PD-1 抗体あるいは抗 TIM-3 抗体等の最適な組み合わせとその有効性に相関するバイオマーカーを決定するとともに、より強力な新規標的に対する抗体を探索する。さらに、臨床応用に向けて、標準的な化学療法や放射線療法とこれらの抗体の最適な組み合わせを決定し、奏効率の高いがんに対する免疫賦活化抗体療法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) がん細胞に免疫原性細胞死を誘導する抗体療法の確立： 既に樹立した抗マウス DR5 抗体を用いて、その抗腫瘍効果を増強し、副作用を抑制する新たな手法を検討する。

終末糖化産物 (AGE) や死細胞から放出されるアラミン HMGB1 の受容体である RAGE は種々のがん細胞で高発現しており、腫瘍の増大への関与が示唆されている。そこで、マウス RAGE に対する阻害抗体を作製し、その抗腫瘍効果を検討する。我々は最近、新規 TNF 受容体ファミリー分子である RELT が肺がん細胞に高発現しており、RELT の siRNA によって細胞死が誘導されることを見出した。そこで、細胞死を誘導する抗 RELT 抗体を作製し、その抗腫瘍効果を検討する。これまでに作製したマウス及びヒトの Notch とそのリガンドに対する抗体のマウス及びヒトがん幹細胞に対する効果を *in vitro* 及び *in vivo* で検討する。

(2) 免疫系を活性化する抗体療法の確立： CD40, 4-1BB, GITR, CD27 に対するアゴニス

ト抗体と CTLA-4, PD-1, TIM-3 に対する阻害抗体の種々の組み合わせの中から、最も効果的なものをいくつかの可移植性腫瘍モデルで決定する。既に樹立済みの Notch2 及び Jagged2 に対するアゴニスト抗体の抗腫瘍効果をいくつかの可移植性腫瘍モデルにおいて検討する。T 細胞活性化に関わる TNF 受容体ファミリー分子 HVEM に対するアゴニスト抗体を作製しその抗腫瘍効果を検討する。(3) 免疫抑制系を阻害する抗体療法の確立：メラノーマを自然発症する PTEN 欠損 BRAFV600 変異マウスや前立腺がんを発症する TRAMP マウスあるいは大腸がんを発症する APC-Min マウスといった自然発がんモデルにおいて、CTLA-4, PD-1, TIM-3 等の免疫チェックポイントに対する阻害抗体の組み合わせを比較検討し、奏効例と無効例において、腫瘍局所での PD-1 や TIM-3 に対するリガンド等の発現の差異をマイクロアレイ等で解析し、有効性と相関するバイオマーカーを決定するとともに、治療抵抗性の機序を解明する。いくつかの可移植性腫瘍あるいは発がんモデルにおいて、新規免疫抑制分子である B7-H4 の発現と抗 B7-H4 抗体の抗腫瘍効果を検討する。新規チェックポイント分子である VISTA や TIGIT に対する阻害抗体を作製し、その抗腫瘍効果を検討する。

### 4. 研究成果

(1) 天然物由来の化合物ライブラリーから、ヒト triple-negative breast cancer (TNBC) 細胞株 MDA-MB-468 及び MDA-MB-231 の TRAIL に対するアポトーシス感受性を亢進するものとしてピペリンを見出し、マウス TNBC 細胞株 4T1 担がんマウスにおいてピペリンが TRAIL 受容体である DR5 に対するアゴニスト抗体の抗腫瘍効果を増強することを示した。

(2) 担がん状態の免疫抑制に関わる myeloid-derived suppressor cells (MDSC) においては、ER ストレスによって TRAIL 受容体である DR5 の発現が亢進しており、DR5 に対するアゴニスト抗体が、がん細胞に対する直接的な抗腫瘍効果のみならず、MDSC の除去による抗腫瘍免疫の増強にも有用であることを示した。

(3) MLL-AF9 誘発性のマウス急性骨髄性白血病 (AML) モデルにおいて、Notch2 に対するアゴニスト抗体が、Hes1 を介した FLT3 発現抑制によって、AML 細胞にアポトーシスを誘導することを見出し、AML の新たな治療法となる可能性が示唆された。

(4) Notch1 及び Notch2 を介した刺激は、グルコース取り込みの調節によってメモリー T 細胞の維持に関わることを見出し、Notch2 に対するアゴニスト抗体の抗腫瘍免疫増強効果の 1 機序が解明された。

(5) CT26 マウス大腸がんモデルにおいて、4-1BB (CD137) に対するアゴニスト抗体と PD-1 に対する阻害抗体の組み合わせによって相乗的な抗腫瘍効果が得られることを示

した。抗 PD-1 抗体耐性のヒト大腸がんへの応用が期待される。

(6) がん局所で産生される VEGF-A が CD8 T 細胞の消耗に関わる PD-1 や TIM-3 の発現を増強することを見出し、抗 PD-1 抗体によって VEGF-A の免疫抑制が解除されることを示した。

(7) 養子移入したセントラルメモリー T 細胞が宿主の寛容誘導性樹状細胞によって不活化される状況においても、抗 PD-1 抗体によってその抗腫瘍活性が増強されることを示した。

(8) 胸腺由来制御性 T 細胞 (tTreg) は CD27 を高発現しており、樹状細胞 (DC) 上の CD70 を downregulate することによって起炎性の Th1 反応を抑制することを見出した。CD27 に対するアゴニスト抗体が Treg による免疫抑制の解除に有用である可能性が示唆された。

(9) 前立腺がんを自然発症する TRAMP マウスモデルにおいて、抗 CD40 抗体と IL-2/抗 IL-2 抗体複合体と IL-12Fc の組み合わせによって最も強い抗腫瘍効果が得られることを示した。

(10) マウス B16F10 メラノーマモデルにおいて、腫瘍局所への IFN- $\beta$  投与は、M2 マクロファージによる Treg 動員を抑制するが、腫瘍内での PD-1/PD-L1 発現も亢進するため、抗 PD-1 抗体の併用によって相乗的な抗腫瘍効果が得られることを示した。ヒトメラノーマ患者での I 型 IFN 治療に抗 PD-1 抗体の併用が期待される。

(11) CD8 陽性 CTL の誘導において、CD27 と I 型 IFN はそれぞれ Eomesodermin と T-bet の発現を誘導することによって相乗効果を示すことを明らかにした。ヒト腎がん等の治療においても、I 型 IFN と CD27 に対するアゴニスト抗体の併用が期待される。

(12) マウスのメラノーマ及び腎がんモデルにおいて、プロテアソーム阻害剤である bortezomib は、CD8 陽性 CTL の FasL 発現を増強するとともに、がん細胞の Fas 発現を亢進することによってがん特異的 T 細胞移入療法の効果を高めることを示した。

(13) 腫瘍内に浸潤した Treg に高発現している PTEN は免疫抑制機能の維持に重要であり、PTEN 阻害剤の投与によって、T 細胞移入とワクチン療法の効果が著しく高まることを示した。

(14) 肝障害を起こさない低用量の DR5 に対するアゴニスト抗体を 5-FU や CPT-11 といった化学療法剤と併用すると腸管幹細胞の障害による毒性が認められるが、CHK2 阻害剤の投与によって抗腫瘍効果を損なうことなく腸管障害を緩和しうることを示した。

(15) ヒト樹状細胞 (DC) 上に活性化によって発現する Notch リガンドである DII4 が Th1 や Th17 誘導に重要であることを明らかにし、DII4 の発現が DC ワクチンの有用なマーカーであることが示唆された。

(16) 種々のマウス皮下腫瘍モデルを比較し

て、抗 PD-1 抗体を用いた免疫チェックポイント阻害療法に抵抗性の腫瘍では腫瘍内マクロファージの PD-L1 や MHCII の発現が低いことを見出し、腫瘍抗原の免疫原性によって規定される腫瘍局所での炎症の惹起が抗 PD-1 抗体治療反応性を決定する重要な因子であることを示した。

(17) ホジキンリンパ腫やパーキットリンパ腫あるいは成人 T 細胞白血病 (ATL) 細胞に対して既知のアポトーシスともネクローシスとも異なる新たな細胞死を直接的に誘導する pan-MHCII 抗体を樹立した。

(18) B16-F10 マウスメラノーマモデルにおいて、抗 CTLA-4 抗体と抗 RANKL 抗体の組み合わせによって、相乗的に肺転移が抑制されることを示した。抗 RANKL 抗体は骨粗鬆症の治療に既に用いられており、早期にヒトでの応用が期待される。

(19) HPV 発現マウス腫瘍モデルにおいて、CTL エピトープの DNA ワクチン効果を、CD27 に対するアゴニスト抗体と PD-1 に対する阻害抗体との組み合わせによって、CD4 陽性ヘルパー T 細胞非依存性に増強しうることを示した。

(20) 新規チェックポイント分子 VISTA に対する阻害抗体を樹立し、VISTA と CTLA-4 のコンビネーション阻害によって相乗的な抗腫瘍効果が得られることを示した。

(21) ヒト IgG1 の CDR 領域に TRP-2 や gp100 あるいは NY-ESO-1 エピトープを導入した DNA ワクチンの抗腫瘍効果が抗 PD-1 抗体との併用で著しく増強されることを示した。

(22) PTEN 欠損 BRAFV600 変異マウスメラノーマモデルにおいて、PD-1 阻害抗体と CD137 アゴニスト抗体の組み合わせによって放射線療法の効果が相乗的に増強されることを示した。

(23) IL-17A を産生して炎症性の腫瘍増大に関与する gamma/delta T 細胞が CD30 を高発現しており、CD30 リガンドに対する阻害抗体が抗腫瘍効果を示すことを見出した。

(24) 抗 PD-1 抗体耐性のマウス腫瘍モデルにおいて、CD40 アゴニスト抗体との併用によって IL-12 依存性に抗 PD-1 抗体の効果が増強されることを示した。

(25) 放射線照射後の腫瘍内で産生される VEGF を標的として、VEGF 特異的なアプタマーと CD137 特異的なアプタマーとの複合体によって、全身的な CD137 アゴニスト抗体や PD-1/CTLA-4 阻害抗体の投与よりも強い抗腫瘍効果が得られることを示した。

(26) マウス RAGE 及び RELT に対する新規モノクローナル抗体を樹立し、その in vitro 及び in vivo での抗腫瘍効果を検討している。

(27) 新規チェックポイント分子 TIGIT に対する阻害抗体を樹立し、B16 メラノーマモデルにおいて、単独あるいは特に抗 PD-1 抗体との併用で強い抗腫瘍効果が得られ、抗 PD-1 抗体抵抗性のヒト腫瘍においても抗 TIGIT 抗体の適用が期待される。

(28) 担がんマウスにおいて、抗 CTLA-4 抗体

と抗 PD-1 抗体の併用によって起こる肝障害や腸管障害といった副作用を、CD134L 及び CD30L に対する阻害抗体の投与によって、抗 CTLA-4 及び抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果を損なうことなく抑制出来ることを見出し、ヒトでの応用が期待される。

(29) マウス HVEM に対するアゴニスト抗体を樹立し、いくつかの可移植性腫瘍モデルに投与したが、有意な抗腫瘍効果は得られなかった。

(30) マウス B7-H4 に対する阻害抗体を樹立し、がん細胞自身に発現する B7-H4 よりも宿主側の B7-H4 が抗腫瘍免疫の抑制に働く可能性が示唆された。

## 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 30 件)

(1) Bransi A, Camilo Salgado O, Beffinger M, Milo K, Silina K, Yagita H, Becher B, Knuth A, van den Broek M: Rational combination of immunotherapies with clinical efficacy in mice with advanced cancer. *Cancer Immunol Res* 3: 1279-1288, 2015 査読あり

DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0103-T

(2) Ahrends T, Babala N, Xiao Y, Yagita H, van Eenennaam H, Borst J: CD27 agonism plus PD-1 blockade recapitulates CD4+ T cell help in therapeutic anti-cancer vaccination. *Cancer Res* 76: 2921-2931, 2016 査読あり

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3130

(3) Matsuoka S, Ishii Y, Nakao A, Abe M, Ohtsuji N, Momose S, Jin H, Arase H, Sugimoto K, Nakauchi Y, Masutani H, Maeda M, Yagita H, Komatsu N, Hino O: Establishment of a therapeutic anti-pan HLA-class II monoclonal antibody that directly induces lymphoma cell death via large pore formation. *PLoS One* 11(3): e0150496, 2016 査読あり

DOI: 10.1371/journal.pone.0150496

(4) Kroon P, Gadiot J, Peeters M, Gasparini A, Deken MA, Yagita H, Verheij M, Borst J, Blank CU, Verbrugge I: Concomitant targeting of programmed death-1 (PD-1) and CD137 improves the efficacy of radiotherapy in a mouse model of human BRAFV600-mutant melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 65: 753-763, 2016 査読あり

DOI: 10.1007/s00262-016-1843-4

(5) Ngiow SF, Young A, Blake SJ, Hill GR, Yagita H, Teng MW, Korman AJ, Smyth MJ: Agonistic CD40 mAb-driven IL-12 reverses resistance to anti-PD1 in a T cell-rich tumor. *Cancer Res* 76: 6266-6277, 2016 査読あり

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2141

〔学会発表〕(計 18 件)

(1) Matsuoka S, Therapeutic anti-pan HLA class II mAb induces the death of leukemia/lymphoma cells via large pore formation, 第 73 回日本癌学会学術集会、2014 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

(2) Kondo Y, VISTA and CTLA-4 combination blockade enhances multifunctionality of tumor-infiltrating CD8+ T cells, 第 74 回日本癌学会学術集会、2015 年 10 月 9 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

(3) Muraoka D, The immunogenicity of antigen decides the tumoral inflammation and therapeutic efficacy of immune checkpoint blockade, 第 74 回日本癌学会学術集会、2015 年 10 月 9 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

(4) Muraoka D, Antigen delivery to tumoral macrophages leads to eradication of tumor resistant to immune checkpoint inhibitors, 第 75 回日本癌学会学術集会、2016 年 10 月 6 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

(5) Terashima K, Augmented anti-cancer therapeutic effect using antibodies to multiple target molecules with immune checkpoint blockade, 第 75 回日本癌学会学術集会、2016 年 10 月 8 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木田 秀雄 (YAGITA, Hideo)

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号: 30182306