

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：34533

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07741

研究課題名（和文）免疫チェックポイント阻害薬が誘発する免疫関連有害事象の克服戦略

研究課題名（英文）Overcoming immune-related adverse events (irAE) induced by immune checkpoint inhibitors

研究代表者

大野 喜也 (Ohno, Yoshiya)

兵庫医療大学・薬学部・講師

研究者番号：40509155

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：免疫チェックポイント阻害薬は腫瘍に対する免疫応答を強く誘導する一方、自己に対する免疫応答を解除して組織傷害（免疫関連有害事象，irAE）をもたらす。しかし、irAEの機序には不明な点が多い。申請者らは、irAE（肝傷害）のマウスモデルを用いた解析から、免疫チェックポイント阻害薬による肝傷害は炎症性細胞の浸潤に伴う自己炎症性の組織破壊であること、また肝臓においてIL-18が自然リンパ球を介して抗炎症に関わる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害薬による免疫療法の拡大に伴って作用である免疫関連有害事象の報告が増加し、その機序の解明と克服が急がれる。免疫関連有害事象の機序の解明は、免疫療法の安全性をもたらす、大きな社会的・医学的意義を持つ。また、IL-18による正常組織保護作用を明らかにすることは、新たな治療標的を開拓し、IL-18を中心とした新しい学術分野の創造が期待されるなど大きな学術的意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：Immune checkpoint inhibitors (ICIs) strongly induce an immune response against tumor, but they also release the immune response against the self, resulting in tissue injury (immune-related adverse events, irAEs). However, the mechanisms of irAEs remain unclear. We generated an irAE mouse model in which liver injury is induced by ICI, and found that ICI-induced liver injury is an autoinflammatory tissue destruction associated with inflammatory cell infiltration, and that IL-18 may be involved in anti-inflammation via innate lymphocytes in the liver.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：免疫関連有害事象 免疫チェックポイント阻害薬 IL-18 肝傷害

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害薬 (immune checkpoint inhibitor, ICI) は、免疫抑制を解除して抗腫瘍免疫を発現する革新的な医薬品であり、多くの進行癌における新たな標準治療として期待される。しかし一方で、ICI に特有の自己免疫性および炎症性の副作用である免疫関連有害事象 (immune-related Adverse Event; irAE) の報告も増加している。ICI は、投与中止後も抗腫瘍作用が持続する特徴を有し、継続的な治療効果が期待できる反面、副作用も持続する可能性が指摘されている。また、重篤な irAE (肝傷害、内分泌障害、大腸炎など) に加えて致死例も報告されるなど、効果的かつ安全な ICI の使用にあたって、irAE の発症機序の解明と克服は喫緊の課題となっている。しかし、マウスモデルを用いた irAE の詳細な解析は十分ではなく、基本的な部分で、免疫寛容と炎症制御における ICI の役割にも不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、irAE のマウスモデルを用いて irAE 発症機構の解明とその克服に取り組む。また、予備的検討から IL-18 が正常組織保護作用を有することに着目し、IL-18 による irAE の保護作用とその機構を明らかにする。

3. 研究の方法

() irAE マウスモデルの作出：これまでに irAE のマウスモデルは十分確立しているとは言い難い。研究代表者らは独自に確立した ICI に起因するマウス肝傷害モデルを用いて、irAE の検討を試みる。さらに TCR レパトワの拡大を目的に、コンベンショナルエリアで飼養したマウス(環境抗原暴露マウス)や加齢マウスを用いることや特異抗体による制御性 T 細胞の除去が、irAE に与える影響を解析し、irAE マウスモデルの最適化を試みる。

() irAE の発症を修飾する因子の解析：自己免疫疾患を自然発症する遺伝的背景を持つマウスに腫瘍を移植して irAE の誘導を行い、自己抗体や自己反応性 T 細胞が irAE に与える影響を明らかにする。また、IFN- γ や IL-17 などのロックアウトマウスやそれらに対する中和抗体、および抗 NK1.1 抗体などの特異抗体を用いた NK 細胞や CD8 T 細胞、制御性 T 細胞 (Treg) の除去が、irAE 発症に与える影響を解析し、発症に関与する炎症メディエーターや細胞群を明らかにする。

() IL-18 による正常組織保護とその作用機序：IL-18 併用群と対照群における肝傷害を、免疫組織学的な解析および血清マーカー変動 (トランスアミナーゼやクレアチニンキナーゼなどの逸脱酵素) を指標に解析し、IL-18 による保護効果を明らかにする。また、IL-18 欠損マウスを用いて同様の解析を試み、内因性 IL-18 の irAE からの保護作用を明らかにする。IL-18 が *in vitro* で PI3K/AKT 系を介して正常表皮細胞のアポトーシスを抑制する。そこで細胞死 (アポトーシスおよびオートファジー) に関連する分子群および、細胞ストレス抵抗性に関連する分子群の発現変動を解析し、IL-18 による正常組織の保護機構を明らかにする。さらに、IL-18 が肝臓内 ILC3 の誘導を介して実験的肝傷害を保護することに着目し、irAE マウスモデルにおいて、IL-18 が ILC3 の誘導およびそれらの細胞が産生するサイトカイン (IL-22 など) 発現に与える影響を検討し、IL-18 による irAE からの組織保護作用を明らかにする。

4. 研究成果

(1) B16 担がんマウスに複数の免疫チェックポイント阻害薬 (ICI カクテル) を組み合わせて複数回投与することで、肝傷害の指標となる血清トランスアミナーゼ (GOT および GPT) の上昇が観察された。このことから本プロトコルで ICI に起因する肝傷害が誘発されることを見出した。一方、正常マウスでは ICI カクテルによる肝傷害が誘発されなかったことから、肝傷害は担癌環境においてのみ出現する可能性が示唆された。次に、ホストマウスにおける TCR レパトワの拡大を目的に、マウスをコンベンショナルエリアで飼養して環境抗原に暴露させた後、担癌および ICI カクテルの投与を行い、肝傷害について検討を行った。その結果、SPF 環境と比較してコンベンショナル環境では、肝傷害の程度が増悪する傾向にあった。一方、加齢マウスを用いて同様の検討を実施したところ、若齢マウスと比較して加齢マウスでは肝傷害の程度が軽減する傾向にあった。そこで、マウスの飼養環境や週齢が、T 細胞や NK 細胞などの細胞傷害性細胞の免疫チェックポイント関連分子 (PD-1, CTLA4, 4-1BB, TIGIT, LAG-3, Tim-3) の発現に与える影響を解析した。その結果、特に NK 細胞における 4-1BB の発現が、コンベンショナル環境と若齢マウスにおいて亢進していた。そのため、NK 細胞における 4-1BB の活性化が肝傷害の誘導に重要な役割の一部を担う可能性が示唆された。

(2) rAE 肝傷害の発症における免疫学的な機序を明らかにする目的で、抗 CD25 抗体 (PC61) や抗 NK1.1 抗体 (PK136) を用いて Treg 細胞や NK 細胞の除去が肝傷害に及ぼす影響を解析した。しかし、予想に反して本肝傷害は Treg 細胞や NK 細胞除去の影響を受けなかったため、それ以外の細胞の関与が示唆された。そこで肝傷害マウスの肝臓における組織学的検討を行ったところ、ICI カクテルの投与に伴う肝細胞壊死と中心静脈付近に単球などの細胞浸潤を認めた。そのため、ICI による肝傷害は炎症性細胞の浸潤に伴う自己炎症性の組織破壊であり、炎症性細胞における抑制シグナルの過剰な解除と活性化が自己反応性を顕在化させる可能性が示唆された。

(3) 申請者らはこれまでに IL-18 が ICI の抗腫瘍作用を強化する機序を解析する過程で、炎症性組織傷害、特に肝傷害から正常組織を保護することを見出した。そこでこの機序について検討を試みた。その結果、IL-18 の投与は肝臓における 2 型自然リンパ球 (type 2 innate lymphoid cells, ILC2) を有意に増加させることを見出した。さらに肝臓における IL-18 活性化 ILC2 は、IL-33 で活性化した場合と類似したサイトカイン発現パターンを示した。本解析から、IL-18 は肝臓の ILC2 を活性化することで抗炎症に関わる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hayashi N, Yamasaki A, Ueda S, Okazaki S, Ohno Y, Tanaka T, Endo Y, Tomioka Y, Masuko K, Masuko T, Sugiura R.	4. 巻 12
2. 論文標題 Oncogenic transformation of NIH/3T3 cells by the overexpression of L-type amino acid transporter 1, a promising anti-cancer target	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 1256-1270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.27981.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Manabe E, Ito S, Ohno Y, Tanaka T, Naito Y, Sasaki N, Asakura M, Masuyama T, Ishihara M, Tsujino T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Reduced lifespan of erythrocytes in Dahl/Salt sensitive rats is the cause of the renal proximal tubule damage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 22023
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79146-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ito S, Ohno Y, Tanaka T, Kobuchi S, Ayajiki K, Manabe E, Masuyama T, Jun-Ichi S, Tsujino T.	4. 巻 41
2. 論文標題 Neutrophil/lymphocyte ratio elevation in renal dysfunction is caused by distortion of leukocyte hematopoiesis in bone marrow	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ren Fail	6. 最初と最後の頁 284-293
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/0886022X.2019.1597736.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yoshiya Ohno & Toshiyuki Tanaka
2. 発表標題 IL-18 recruit CD103+ dendritic cells via NK cell activation and potentiate immunotherapy mediated by PD-1 blockade
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	田中 稔之 (Tanaka Toshiyuki) (30217054)	兵庫医療大学・薬学部・教授 (34533)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------