

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16358

研究課題名（和文）免疫系ヒト化マウスモデルによるマクロファージを標的とした新規がん免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel cancer immunotherapy targeting macrophages using a humanized mouse model

研究代表者

飯田 理恵（Iida, Rie）

大阪大学・微生物病研究所・特任研究員（常勤）

研究者番号：10816771

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）：本研究では、ヒト免疫細胞の恒常的な生着とヒトマクロファージの分化を促進するヒトサイトカインを複数発現する次世代免疫不全マウスを使用し、抗ヒトSIRP 抗体の抗腫瘍効果について検討した。抗ヒトSIRP 抗体は、抗CD20抗体によるがん細胞のマクロファージによるADCPを有意に増強し、さらに、ヒトリンパ腫細胞を移植した免疫系ヒト化次世代免疫不全マウスの腫瘍増殖をin vivoにて阻害した。これらの発見は、免疫系をヒト化した次世代免疫不全マウスモデルが、抗ヒトSIRP 抗体などのヒトマクロファージを標的とする治療を評価するのに適した新しいツールであることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

In vitroでの薬効評価では複雑な腫瘍免疫環境を再現できず、同系移植などのマウスモデルではヒトに対する抗体医薬が評価できないことから、臨床応用との差異をできるだけなくすためにはヒトの免疫系を有した腫瘍モデルマウスにおいて薬効を評価することが非常に重要である。また免疫系ヒト化マウスを用いた薬効評価系が確立されれば、免疫系を標的とした新規がん治療薬のスクリーニングへの応用も期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated the antitumor effects of anti-human SIRP antibody using immunodeficient mice expressing multiple human cytokines that promote homeostatic engraftment of human immune cells and differentiation of human macrophages. Anti-human SIRP antibody significantly enhanced ADCP of cancer cells by macrophages with anti-CD20 antibody and also inhibited tumor growth in vivo in humanized mice transplanted with human lymphoma cells. These findings suggest that such a humanized mouse model is a suitable new tool for evaluating therapies targeting human macrophages, such as anti-human SIRP antibodies.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Bリンパ腫 免疫系ヒト化マウス 腫瘍免疫 トランスレーショナルリサーチ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、抗 PD-1 抗体、抗 CTLA-4 抗体などの獲得免疫を標的とした免疫チェックポイント阻害薬が様々ながんに対して有効であると報告されている。一方で自然免疫を担うマクロファージや樹状細胞といった単核食細胞に存在する膜型分子 SIRP (Signal regulatory protein) は、がん細胞上に発現する CD47 と結合することで (CD47-SIRP 系) マクロファージや樹状細胞によるがん特異抗原に対する抗体依存性細胞貪食 (ADCP) を抑制する。このことから CD47-SIRP 系は現在新たな免疫チェックポイントとして注目されており、実際に CD47 と SIRP との結合を阻害する抗 SIRP 抗体がマウス腫瘍モデルにおいて抗腫瘍効果を示すことが明らかにされてきた (Yanagita et al., *JCI Insight*, 2017) (Murata et al., *Cancer Sci.*, 2019)。

しかし、ヒトマクロファージを標的とするがん免疫療法の有効性を評価するには、ヒト腫瘍細胞とヒトマクロファージの両方をマウス体内に有する *in vivo* モデルが必要である。健康ヒトの臍帯血に由来する CD34+造血幹細胞を移植した免疫不全マウス (免疫系ヒト化マウス) は、ヒト腫瘍移植モデルに使用されてきた。

しかし従来の免疫不全マウスをヒト化した場合、ヒト T・B 細胞は高効率に分化するが、マクロファージなどの骨髄系細胞の分化が不良であった。

### 2. 研究の目的

上記の問題を克服するため、研究代表者は、BRG 免疫不全マウス (Rag2-/-Il2rg-/-) をベースとし、ヒトサイトカイン (M-CSF, GM-CSF, IL3, TPO) をノックインしたマウス (MITRG マウス) の新生児にヒト CD34+造血幹細胞を移植した免疫系ヒト化マウスにおけるヒト腫瘍モデルの開発を行ってきた。同マウスではマウス免疫細胞がヒト造血幹細胞由来の免疫細胞に置換されることで、マウス体内にヒトの免疫系を構築できる。さらにヒトがん細胞の生着が可能であると同時に、形成されたがん組織内へのマクロファージを含むヒト免疫細胞の浸潤が高効率で引き起こされる (Rongvaux et al., *Nat. Biotechnol.*, 2014)。そこで研究代表者は、上記の免疫系ヒト化マウス腫瘍移植モデルが、ヒトマクロファージを標的とした抗ヒト SIRP 抗体の *in vivo* での評価に適しているか明らかにすることを目的とし研究を行った。

### 3. 研究の方法

前述の免疫系ヒト化 MITRG マウスに B 細胞リンパ腫細胞株 (Raji) を移植し、マウス IgG 投与群、抗 CD20 抗体 (Rituximab) 単独投与群と Rituximab と抗ヒト SIRP 抗体との併用投与群の腫瘍径・重量を比較することで併用による抗腫瘍効果の増強について検討した。また、抗ヒト SIRP 抗体がヒトマクロファージの貪食作用やその他の特性に与える影響を評価するために、*in vitro* での ADCP アッセイや、形成された腫瘍組織内のマクロファージの貪食活性、表面抗原または mRNA 発現について解析した。さらに、同マウスに B 細胞リンパ腫患者のリンパ節生検由来のがん細胞を移植し、抗ヒト SIRP 抗体による抗腫瘍効果の増強について検討した。

### 4. 研究成果

免疫系ヒト化マウスを用いた抗ヒト SIRP 抗体の抗腫瘍効果の検討

上記のヒト化 MITRG マウスに B 細胞リンパ腫細胞株 (Raji) を移植し、マウス IgG 投与群、抗 CD20 抗体 (Rituximab) 単独投与群と Rituximab・抗ヒト SIRP 抗体併用投与群の腫瘍径・重量を比較した。Rituximab 単独投与と比較し、抗ヒト SIRP 抗体との併用において抗腫瘍効果が有意に亢進されることを明らかにした (図 1)。

以上の抗体投与実験をマクロファージ枯渇試薬 (Clodronate) 投与下で行った結果、抗ヒト SIRP 抗体による抗腫瘍効果がキャンセルされることから、この抗体の効果はマクロファージへの作用を介していることが明らかになった。

さらに、ヒト化していない MITRG マウスで同様の腫瘍移植と抗体投与実験を行ったところ、マウス CD20 とも交差する Rituximab による単独の抗腫瘍効果は見られたが、ヒト化

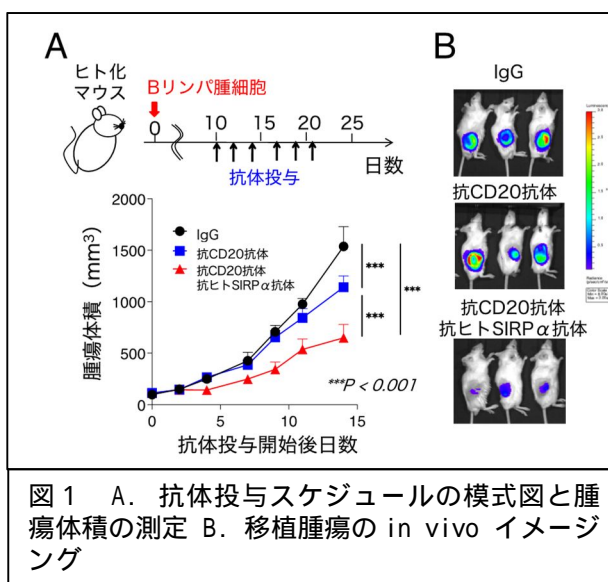


図 1 A. 抗体投与スケジュールの模式図と腫瘍体積の測定 B. 移植腫瘍の *in vivo* イメージング

と、マウス CD20 とも交差する Rituximab による単独の抗腫瘍効果は見られたが、ヒト化

MITRG マウスで見られたような抗ヒト SIRP 抗体による効果の亢進(図 1)は見られなかったことから、抗ヒト SIRP 抗体による抗腫瘍効果はマウスマクロファージではなく、ヒトマクロファージを介しておこることが確認された。

#### 抗ヒト SIRP 抗体がヒトマクロファージの特性に与える影響について

ヒトマクロファージの貪食作用について評価するために、前述のマウス IgG, Rituximab、抗ヒト SIRP 抗体を用いた ADCP アッセイを *in vitro* で行い、Raji を貪食したマクロファージの比率を評価した結果、抗ヒト SIRP 抗体単独では貪食促進作用が無いが、Rituximab の ADCP を強く増強することが明らかとなった。

また上述の実験と同様に Raji を皮下移植したヒト化 MITRG マウスに抗 CD20 抗体と抗ヒト SIRP 抗体を 2 週間併用投与し、腫瘍内マクロファージの特性について解析した。その結果、腫瘍細胞に対する貪食は抗 CD20 抗体単独投与でも上昇していたが、併用投与ではさらに亢進しており、前述した *in vitro* での結果と同様に、抗ヒト SIRP 抗体による ADCP の増強が *in vivo* でも起こることを確認した。また、移植腫瘍から単離したマクロファージの RNA-seq 解析を行ったところ、併用投与群では、いくつかの炎症系サイトカインの mRNA 発現が亢進していた。同時にマルチプレックス抗体アッセイを用いてマウス血清中のサイトカインを定量したところ、同様の炎症系サイトカインが上昇していた。以上の結果より、併用投与は腫瘍内ヒトマクロファージの活性化を引き起こし、炎症性サイトカインの発現上昇を誘導することが示唆された。

#### PDX モデルの確立とそれを用いた抗ヒト SIRP 抗体の抗腫瘍効果の評価

B リンパ腫患者由来の検体をヒト化 MITRG マウスへ移植し、生着効率について検討した。その結果、腎皮膜下移植によって効率的に生着することが明らかとなった。上記と同様に抗体の併用投与を行ったところ、抗ヒト SIRP 抗体による抗腫瘍効果の増強を示唆するデータを得た。このことから、本マウスモデルは PDX も可能であり、抗ヒト SIRP 抗体の薬効についてより臨床に近い知見が得られることが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 飯田理恵、齊藤泰之、羽間大介、小森里美、小谷武徳、村田陽二、的崎尚
2. 発表標題 免疫系ヒト化マウスモデルによるマクロファージを標的としたがん免疫療法の開発
3. 学会等名 2021年度 文部科学省新学術領域研究 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rie Iida-Norita, Yasuyuki Saito, Daisuke Hazama, Satomi Komori, Hiroki Yoshida, Risa Sugihara, Yoji Murata, Takashi Matozaki
2. 発表標題 A novel humanized mouse model for assessing human macrophage-targeted cancer immunotherapy in vivo
3. 学会等名 The 14th international conference of protein phosphatases (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯田理恵、齊藤泰之、羽間大祐、村田陽二、小谷武徳、的崎尚
2. 発表標題 免疫系ヒト化マウスモデルによるマクロファージを標的としたがん免疫療法の開発
3. 学会等名 第1回日本癌学会若手の会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------