様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　６ 月 １７ 日現在

機関番号：１２１０２
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2020～2021
課題番号：２０Ｋ２２８９１

研究課題名（和文）PD-1シグナル阻害誘導免疫関連副作用の病態解明と特異的治療法の開発

研究課題名（英文）The pathogenesis of PD-1 signaling inhibition-induced immune-related adverse effects and development of specific therapies

研究代表者
田中　亮多（Tanaka, Ryota）

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：９０６４９６６７

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、抗PD-1抗体を投与された悪性黒色腫患者で乾癬様皮膚炎（ヒトサンプル）とToll様受容体７アゴニストであるイミキモド誘導乾癬様皮膚炎モデルマウスを用いて、病態を解析した。その結果、病態にはPD-1-PD-L1経路が支配的に関与することを明らかにした。また、PD-1-PD-L1シグナル阻害誘導乾癬様皮膚炎は、CD8 T細胞の活性化と表皮内浸潤によって悪化し、IL-6が病態を悪化させる要因であり、かつ治療標的となり得ることを明らかにした。

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剤であるPD-1阻害薬により免疫は活性化し、がん免疫を増強する。一方で、特有の副作用（免疫関連副作用）も生じ得る。免疫関連副作用は、あらゆる臓器で発症し得るが、皮膚に生じる頻度が最も高い。重篤な皮膚障害は治療中止に至ることもあり、副作用への対策は喫緊の課題である。
PD-1シグナル阻害下誘導乾癬様皮膚炎の特徴、およびIL-6シグナルが治療標的となり得ることが明らかにした本研究成果は、特に重篤な副作用からの早期回復や重篤化する前の予防に関する治療開発に寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study demonstrates that PD-1-PD-L1 signaling inhibition-induced psoriasis-like dermatitis is exacerbated by CD8 T cell activation and intraepidermal infiltration, and that IL-6 is a factor in exacerbating the condition and a potential therapeutic target.

研究分野：皮膚科学

キーワード：PD-1　PD-L1　PD-L2　irAE　免疫関連副作用　IL-6　CD8　T細胞

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

PD-1（programmed cell death-1）を標的とする免疫チェックポイント阻害剤は、悪性黒色腫をはじめ、多くのがんで有効性が証明されている。がん免疫逃避機構では、活性化されたエフェクターT細胞上に発現したPD-1に、そのリガンド（PD-Ls）が結合することで、T細胞の活性化・増殖を抑制して末梢性免疫寛容を誘導する（PD-1-PD-Lsシステム）。

一方で、PD-1 を標的とする免疫チェックポイント阻害剤の使用は、さまざまな臓器における免疫関連副作用（immune-related adverse events; irAE）をも誘導することがある。irAE 発症の機序として、T 細胞上に発現する PD-1 と抗原提示細胞（Antigen Presenting Cells: APCs）やがん細胞上に発現するリガンド（PD-L1,PD-L2）との結合によるシグナルが阻害されることで T 細胞などが活性化することによる自己応答性の免疫誘導が考えられており、特に $CD8^{+}$T 細胞の局所での浸潤が報告されている。重症 irAE では死亡することもあるため、症状を制御するには、全身免疫抑制療法の高用量および/または長期使用が必要となり、がん治療の長期にわたる中断または中止、それら免疫抑制療法による抗腫瘍応答無効化が懸念される。従って、irAE の発現率や重症度を正確に予測すること、発症機序の解明と特異的対処法の開発は喫緊の課題である。

近年、抗ヒト interleukin (IL)-6受容体抗体（トシリズマブ）によるステロイド抵抗性 irAE 制御の可能性を示す症例報告がなされている。しかしながら、その作用機序はまだ解明されていない。

２．研究の目的

本研究の目的は、PD-1シグナル阻害誘導irAEの免疫学的病態を解明し、irAEに対するIL-6標的治療の有用性を検証することである。

３．研究の方法

PD-1阻害の病態に関する研究では、主にPD-1欠損マウスや抗PD-1阻害抗体製剤投与の手法が用いられてきた。しかしながら、PD-1は$CD8^{+}$T細胞のみならず、 $CD4^{+}$T細胞、ナチュラルキラーT（NKT）細胞、B細胞、および単球において、活性化に際し発現が誘導される。欠損マウスや抗体投与を用いた研究では、それら全ての免疫担当細胞におけるPD-1シグナルが遮断されてしまう。また、PD-1欠損マウスでは、免疫エフェクター活性を有するサイトカイン産生が増加するが、どの細胞のPD-1欠損に由来するのかは明らかではない。そこで研究代表者は、各々の免疫担当細胞のPD-1を特異的に阻害した遺伝子改変マウスを用いることを着想し、CRISPR/Casシステムを使用してPD-1-LoxP マウスを作成の上、標的となる細胞特異的分子の Cre マウスと掛け合わせることで、Cre分子発現細胞上のみのPD-1を欠損させたコンディショナルKO（cKO）マウスを用いて実験を行う。これらのマウスに炎症性疾患を誘導し、irAE の動物モデルとすることで、その病態を明らかにする。

本研究では、PD-1阻害誘導皮膚炎irAE発症例での治療前後でのIL-6値の推移を、ヒト血清サンプルを用い解析する。また、Toll 様受容体７アゴニストであるイミキモ

ド誘導乾癬様皮膚炎マウスモデルを使用する。マウスモデルで病態を解明することで、これまで乾癬様皮膚炎で捉えていた事象が irAE に共通するものなのかどうか考察する。

　また、本研究では、$CD8^{+}$T 細胞特異的 PD-1 欠損マウスを用い、$CD8^{+}$T 細胞上 PD-1 シグナル遮断が irAE 発症の本態的な病態であるかの検証と共に、これを起点として生じる疾患の免疫機構を解明し、更には、その病態に対する IL-6 標的治療の有効性を検証する。

　まず PD-1 欠損マウス、$CD8^{+}$T 細胞特異的 PD-1 欠損マウスとその野生型同腹子マウスにおいて、イミキモド誘発乾癬マウスモデルを作成し、経時的に局所（皮膚）、血液、リンパ節からサンプルを採取し解析する。特に、乾癬様皮膚炎モデルマウスで疾患制御性と考えている IL-6 に関しては、抗マウス IL-6 受容体抗体を用いて治療実験を行い、疾患の重症度が抑制できるかを観察するとともに、前述と同様に局所、リンパ節、血液のプロファイル解析を行って、治療による変化を検証する。

４．研究成果

PD-1 シグナル阻害誘導乾癬様皮膚炎は、PD-1 シグナルが遮断された CD8 T 細胞の活性化と表皮内浸潤によって悪化し、IL-6 が治療標的となり得る

１．ヒトサンプル解析

抗 PD-1 抗体を投与された悪性黒色腫患者で乾癬様皮膚炎を発症した患者と、通常の乾癬患者の、皮膚組織を比較した。その結果、PD-1 シグナル阻害誘導乾癬様皮膚炎の特徴として、表皮内に CD8 T 細胞が優位に浸潤していることを見出した。また、血清では、免疫関連副作用を未発症例よりも、IL-6 が上昇していることを明らかにした。

２．マウスモデル解析

イミキモド誘導乾癬様皮膚炎モデルマウスを用いて、病態を解析した。PD-1 欠損マウスもしくは抗 PD-1 抗体治療マウスに乾癬様皮膚炎を惹起した場合、野生型マウスに比べ、皮膚炎が悪化し、さらに CD8 T 細胞上のみで PD-1 を欠損させたマウスでも同様に、皮膚炎は増悪した。そして、ヒトと同様に、表皮内 CD8 T 細胞浸潤が増強している特徴を有していた。耳介皮膚を用いた mRNA 発現解析では、IL-6 をはじめ、IL-23、IL17A といった乾癬関連サイトカインが PD-1 欠損マウス、抗 PD-1 抗体治療マウス、CD8 T 細胞特異的 PD-1 欠損マウスで、それぞれ野生型マウスに比べて優位に上昇していた。更に、抗 IL-6 受容体抗体による治療実験では、PD-1 全欠損マウス、CD8 T 細胞上 PD-1 欠損マウスともに、悪化した乾癬様皮膚炎が、野生型マウスでの乾癬様皮膚炎と同程度にまで改善した一方、野生型マウスの乾癬様皮膚炎では治療効果は観察されなかった。

本研究により、PD-1 シグナル阻害誘導乾癬様皮膚炎は、PD-1 シグナルが遮断された CD8 T 細胞の活性化と表皮内浸潤によって悪化し、IL-6 が病態を悪化させる要因であり、かつ治療標的となり得ることが明らかとなった。

免疫チェックポイント（PD-1）とそのリガンド（PD-L1/L2）との相互作用は皮膚疾患の炎症反応タイプにより異なる

これまで、マウス in-vitro 実験により PD-1 のリガンド（PD-L1,PD-L2）は、１型ヘルパーT 細胞(Th1)反応では PD-L1-PD-1 経路が、Th2 反応では PD-L2-PD-1 経路による支配を受けることが知られていたが、Th17 反応ではどちらの経路により制御されるかは明らかでなかった。

そこで、研究代表者らは、皮膚 irAEs の発生機序や制御機構について、さらに深く理解すべく、マウスサンプルを用いた in-vitro 実験と皮膚炎マウスモデル(in-vivo)実験により、PD-1 のリガンド（PD-L1,PD-L2）の関与につき明らかにすることとした。

１．in-vitro 解析

はじめに、抗原提示細胞（Antigen Presenting Cells: APCs）であるマクロファージと樹状細胞を培養し、IFN-γ（Th1）、IL-4（Th2）、IL-17（Th17）で刺激して PD-L1、PD-L2 発現を解析した。その結果、IFN-γおよび IL-17 刺激で PD-L1 発現が増強した一方で、PD-L2 発現亢進は IL-4 刺激時でのみ増強された。

２．in-vivo 解析

次に、皮膚炎マウスモデル{接触過敏反応（1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene[DNFB]塗布）（Th1 反応)、アトピー性皮膚炎（Calcipotriol [MC 903]）塗布）(Th2 反応)、乾癬様皮膚炎（イミキモド塗布）(Th17 反応）}を惹起し、皮膚や所属リンパ節での抗原提示細胞（マクロファージ、樹状細胞、ランゲルハンス細胞）上の PD-L1/L2 発現プロファイルを解析した。その結果、Th1・Th17 反応皮膚炎モデルマウスでは PD-L1 発現が増強した一方で、PD-L2 発現増強は Th２反応皮膚炎モデルマウスでのみ誘導され、in-vitro 実験の結果と一致した。そこで、PD-L1 欠損マウス、PD-L2 欠損マウスを作出し、同様に皮膚炎マウスモデルを惹起し、野生型マウスとそれぞれ比較した。その結果、PD-L1 欠損マウスでは、Th1 反応の接触過敏反応と Th17 反応の乾癬様皮膚炎が増悪した一方で、PD-L2 欠損マウスでは、Th2 反応のアトピー性皮膚炎のみが増悪した。

　本研究成果は、PD-1 もしくは PD-L1 阻害療法下では、Th1 反応に分類される扁平苔癬や Th17 反応に分類される乾癬様皮膚炎が起こりやすい一方で、少なくとも PD-L1 阻害療法であれば Th2 反応に分類されるアレルギー性疾患は惹起・悪化しにくいことを示唆している。また、炎症反応が Th1、Th2、Th17 反応に分類されることは免疫疾患に共通の事象であるため、他の臓器疾患も含めた基礎疾患のある患者へのがん免疫療法施行時の、免疫関連副作用への対策や管理に役立つことが期待される。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計2件（うち査読付論文　2件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Tanaka Ryota、Ichimura Yuki、Kubota Noriko、Saito Akimasa、Nakamura Yoshiyuki、Ishitsuka Yosuke、Watanabe Rei、Fujisawa Yasuhiro、Kanzaki Mirei、Mizuno Seiya、Takahashi Satoru、Fujimoto Manabu、Okiyama Naoko	４．巻 3
２．論文標題 Activation of CD8 T cells accelerates anti-PD-1 antibody-induced psoriasis-like dermatitis through IL-6	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Communications Biology	６．最初と最後の頁 571
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-020-01308-2	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 Tanaka Ryota、Ichimura Yuki、Kubota Noriko、Saito Akimasa、Nakamura Yoshiyuki、Ishitsuka Yosuke、Watanabe Rei、Fujisawa Yasuhiro、Mizuno Seiya、Takahashi Satoru、Fujimoto Manabu、Okiyama Naoko	４．巻 142
２．論文標題 Differential Involvement of Programmed Cell Death Ligands in Skin Immune Responses	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	６．最初と最後の頁 145～154.e8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2021.06.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 田中亮多　高向梨沙　神崎美玲　沖山奈緒子
２．発表標題 PD-1阻害薬による免疫関連副作用としての乾癬様皮膚炎の病態解明
３．学会等名 第84回日本皮膚科学会東部支部学術大会
４．発表年 2020年

〔図書〕　計0件

〔出願〕　計1件

産業財産権の名称 免疫関連副作用の予防および治療の少なくとも一方を行う薬剤、遺伝子改変非ヒト動物、および免疫関連副作用モデル非ヒト動物	発明者 沖山奈緒子　田中亮多	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/003050	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕　計0件

〔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