

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07229

研究課題名（和文）IL-18が誘導する I 型免疫応答と腫瘍ネオ抗原による免疫チェックポイントの制御

研究課題名（英文）IL-18-induced type I immune response and regulation of immune checkpoints by tumor neoantigens

研究代表者

田中 稔之（Tanaka, Toshiyuki）

兵庫医科大学・薬学部・教授

研究者番号：30217054

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の治療効果の増強と治療抵抗性の克服を目的とした研究を通じて、以下の成果を得た。

1) IL-18による免疫チェックポイント阻害薬の治療効果増強過程で、IL-18はNK細胞と樹状細胞の両者に作用して、XCL1とIL-12が関与するNK細胞と樹状細胞のクロストークを促進する。2) DNA修復の鍵分子であるMLH1とPD-L1の二重欠損により、免疫チェックポイント治療に対する感受性を付与できる可能性がある。3) 実臨床で使用される併用薬が免疫チェックポイント治療に及ぼす影響を明らかにするために、胸部悪性腫瘍患者を対象に後方視的観察研究を実施した。

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は担癌宿主のT細胞を抑制状態から解放し、強い抗腫瘍効果を発揮する。しかし、半数以上の患者には未だ十分な腫瘍縮小効果が見られない。また、克服すべき副作用として免疫関連有害事象が残されている。現在、免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果を増強し、治療抵抗性を克服する新しい戦略の開発が強く望まれている。IL-18による免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果の増強機構やDNA修復阻害による癌細胞の異物性の増大並びに併用薬が免疫チェックポイント阻害治療に及ぼす影響の解明は、臨床医学的に大きな意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：Through research aimed at enhancing the therapeutic effects of immune checkpoint inhibitors and overcoming treatment resistance, the following results were obtained: 1) IL-18 enhances the therapeutic effects of immune checkpoint inhibitors by acting on both NK cells and dendritic cells, promoting their crosstalk involving XCL1 and IL-12. 2) A dual deficiency of MLH1, a key molecule in DNA repair, and PD-L1 may confer increased sensitivity to immune checkpoint therapy. 3) A retrospective observational study was conducted to elucidate the effects of concomitant drug use in clinical practice on immune checkpoint therapy of patients with lung cancer.

研究分野：免疫学

キーワード：癌免疫治療 IL-18 免疫チェックポイント I型免疫応答 腫瘍ネオ抗原 免疫関連有害事象 併用薬

## 1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイントは、CTLA-4 や PD-1 を中心とした抑制性受容体が発する「抑制性シグナル」による免疫応答の負の制御機構である。免疫チェックポイントの阻害が担癌個体の T 細胞を抑制状態から解放して抗腫瘍免疫を強く惹起することが示され、免疫チェックポイント阻害薬が革新的な医薬品として開発されている。しかし、現状の免疫チェックポイント阻害によるがん免疫治療は半数以上の患者で十分な治療効果が認められず、抵抗性を克服し治療効果を増強する戦略が必要である。免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果を増強するためには、癌をとりまく免疫抑制環境を是正して IFN- $\gamma$  産生を基軸とした I 型免疫反応を効率的に誘導し、キラー T 細胞を中心とする抗腫瘍エフェクター細胞を積極的に腫瘍局所に動員する必要がある。また、腫瘍細胞のチェックポイント阻害治療に対する感受性は、変異遺伝子に由来する腫瘍ネオ抗原の発現による異物性に依存している。我々は、自然免疫を制御する IL-18 が免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果を増強し、特徴的な NK 細胞が中心的な役割を担うことを見出した。また、免疫チェックポイント治療抵抗性腫瘍に DNA 修復の鍵分子である MLH1 欠損を導入すると、腫瘍排除を誘発する腫瘍ネオ抗原を発現することを見出した。本研究は、このような独自の知見に基づき、「免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果の増強と治療抵抗性の克服」を目的として、「IL-18 が誘導する I 型免疫応答」と「腫瘍ネオ抗原の生成」による抗腫瘍効果の増強と治療抵抗性を克服する癌免疫治療法の開発を目的として立案された。

## 2. 研究の目的

免疫チェックポイント阻害薬の導入により、がん免疫治療法の有効性に関する情報が飛躍的に蓄積されている。しかし、その治療効果は未だ限定的で、抗腫瘍効果を増強する新しい戦略の開発が強く望まれている。また自己免疫性機序で誘発される免疫関連有害事象(irAE)が克服すべき課題として残されている。IL-18 は自然免疫を制御するサイトカインで、IFN- $\gamma$  を誘導する特性を持つ。また DNA 修復を阻害して癌細胞に遺伝子変異を蓄積させ腫瘍ネオ抗原の発現を誘導できれば、免疫チェックポイント治療に対する感受性を増強できる可能性がある。また臨床においては、併用薬の使用を含む様々な患者背景が免疫チェックポイント治療に影響する可能性がある。そこで、本研究では、免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果の増強と治療抵抗性の克服を目的に「IL-18 が誘導する I 型免疫応答と免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果の増強機構」と「DNA 修復阻害による腫瘍ネオ抗原の生成と免疫チェックポイント感受性の付与機構」について解析した。また、免疫チェックポイント治療に影響する患者背景を明らかにするために、「実臨床で使用される併用薬が免疫チェックポイント治療に及ぼす影響」について後方視的観察研究に取り組んだ。

## 3. 研究の方法

### (1) IL-18 が誘導する I 型免疫応答と免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果の増強機構

IL-18 による免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果を増強機構の解析から、その最終的な抗腫瘍エフェクターはキラー CD8+ T 細胞であることが示されているが詳細は不明である。我々はこの過程で IL-18 が、特徴的な活性化 NK 細胞が誘導し、この活性化 NK 細胞が I 型樹状細胞 (cDC1) の腫瘍組織への動員を通じて、免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果の増大に必須の役割を担う事を見出している。本研究では、まず IL-18 活性化 NK 細胞による cDC1 の腫瘍組織への動員機構を解析する。次に IL-18 併用で誘導される活性化 NK 細胞をマウスに移入し、IL-18 と免疫チェックポイント阻害薬の併用による抗腫瘍効果増強機構の本態としての役割を明らかにする。

### (2) DNA 修復阻害による腫瘍ネオ抗原の生成と免疫チェックポイント感受性の付与機構

黒色腫 B16 および大腸癌 CT26 に対する抗腫瘍効果は IL-18 の併用により著しく増強されるが、乳がん 4T1 は抗 PD-1 抗体と IL-18 の併用治療にも抵抗性である。B16, CT26 および 4T1 はいずれも IFN- $\gamma$  刺激に応答して PD-L1 を発現する。チェックポイント阻害治療に対する抵抗性克服を目的に、ゲノム編集法で PD-L1 欠損細胞を作製し、造腫瘍性を解析したところ、PD-L1 を欠損する B16 および CT26 細胞の造腫瘍性は著しく阻害されたが、PD-L1 欠損 4T1 細胞は野生型 4T1 細胞と同様な造腫瘍性を持つことが示された。この結果は、B16 と CT26 には、PD-L1 欠損により顕在化し、腫瘍排除を誘発する腫瘍ネオ抗原が発現するが、4T1 は異物性が乏しく、同様な腫瘍ネオ抗原を発現しないことが示唆された。そこで、本研究では、DNA 修復の遮断によるネオ抗原の蓄積に注目し、DNA 修復の鍵分子である MLH1 単独欠損細胞と MLH1 と PD-L1 の二重欠損細胞を用いて、抗腫瘍免疫の発動に及ぼす腫瘍ネオ抗原の役割と腫瘍 PD-L1 による遮蔽機構を解析する。また、マイクロサテライトマーカーの変動を指標に変異蓄積を明らかにする。

### (3) 実臨床で使用される併用薬が免疫チェックポイント治療に及ぼす影響

抑制性癌微少環境は腫瘍関連マクロファージ (TAM) や制御性 T 細胞 (Treg) などの抑制性細胞や TGFβ や IL-10 などの抑制性サイトカインが優位であり、この抑制性環境の是正が免疫チェックポイント阻害薬による抗腫瘍免疫応答の増強に不可欠である。また腸内細菌叢が免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果発現に重要な役割をはたすことが示されている。しかし、日常診療で併用される医薬品が免疫チェックポイント阻害治療における治療効果と副作用としての irAE に及ぼす影響については、不明な点が多い。そこで、兵庫医科大学呼吸器内科で免疫チェックポイント阻害治療を受けた患者を対象に、日常診療に汎用される医薬品が免疫チェックポイント治療に及ぼす影響を明らかにすることを目的に後方視的な観察研究を行う (兵庫医科大学呼吸器内科学との共同研究)。

## 4. 研究成果

### (1) IL-18 が誘導する I 型免疫応答と免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果の増強機構

IL-18 が免疫チェックポイント阻害薬の治療効果を増強する過程で、IL-18 刺激を受けた NK 細胞に cDC1 の動員に關与するケモカイン (CCL5 及び XCL1) が発現することを見出した。また、樹状細胞はその一部が IL-18 受容体を発現しており、IL-18 刺激により IL-12 mRNA の発現が増加し、血中 IL-12 濃度が上昇した。さらに、NK 細胞においては、IL-18 投与により XCL1 mRNA の発現増強が認められ、この IL-18 刺激による NK 細胞における XCL1 mRNA の発現増強は抗 IL-12 抗体の投与により阻害された。これらの結果は、IL-18 が免疫チェックポイント阻害薬の治療効果を増強する過程で、樹状細胞と NK 細胞の両者に作用し、IL-12 と XCL1 が關与する樹状細胞と NK 細胞のクロストークを促進することが示唆された。

また、IL-18 活性化 NK 細胞の担癌マウスへの移入により、IL-18 による免疫チェックポイント阻害薬の作用増強効果が部分的に代替されることが示された。また、ゲノム編集法により 2 ミクログロブリン (2M) を欠損する腫瘍細胞においては、野生型細胞でみられる IL-18 による免疫チェックポイント阻害薬の治療効果の増強作用が著しく減弱していることが示された。これらの結果は、IL-18 による免疫チェックポイント阻害薬の治療効果の増強作用には治療早期に出現する活性化 NK 細胞が重要な役割を果たしているが、活性化 NK 細胞だけでは不十分であり、最終的な腫瘍拒絶にはキラー T 細胞が不可欠であることを示している。

### (2) DNA 修復阻害による腫瘍ネオ抗原の生成と免疫チェックポイント感受性の附与機構

腫瘍ネオ抗原の蓄積と免疫チェックポイント阻害による抗腫瘍効果の關連について解析した。免疫チェックポイント阻害治療に対して抵抗性を示すマウス乳癌細胞 4T1 を用いてゲノム編集により DNA ミスマッチ修復の鍵分子である MLH1 を欠損する細胞および MLH1 と PD-L1 を共に欠損する二重欠損細胞を作成し、95 日間培養した後の造腫瘍性を解析した。その結果、MLH1 欠損 4T1 細胞は野生型 4T1 細胞と同様な造腫瘍性を示したが、MLH1 と PD-L1 の両者を欠損する二重欠損細胞では造腫瘍性が著しく減弱していた。このことは、MLH1 欠損により蓄積する腫瘍ネオ抗原に対する抗腫瘍免疫応答を腫瘍に発現する PD-L1 が遮蔽することを示唆している。また 4 種類のマイクロサテライト領域マーカー (Bat 24, Bat 26, Bat 37, Bat 67) を対象とした PCR フラグメント解析でマイクロサテライト不安定性 (MSI) を解析した結果、MLH1 欠損細胞と二重欠損細胞は共に全てのマーカーにおいて MSI<sup>+</sup> と判定された。これらの結果から、95 日間の培養期間中に MLH1 欠損により免疫チェックポイント阻害に対して感受性を付与する腫瘍ネオ抗原が 4T1 細胞に出現したことが示唆された。

### (3) 実臨床で使用される併用薬が免疫チェックポイント治療に及ぼす影響

ICB 治療の実臨床においては、患者背景にある基礎疾患に対する医薬品が併用されており、これらの併用薬が宿主の抗腫瘍免疫応答を修飾している可能性がある。そこで、汎用される医薬品のヒト免疫治療への影響を解析するために、兵庫医科大学病院・呼吸器内科で実施された胸部悪性腫瘍 (肺癌および悪性胸膜中皮腫) に対する免疫チェックポイント阻害薬治療の治療効果や副作用の発現などに及ぼす併用薬の影響について、後方視的観察研究を開始した。これまでに予定症例数を 400 とし、研究対象者の臨床情報 (患者背景・診断時情報・副作用情報・転帰情報・併用薬の使用状況) を収集した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Natsumi Hayashi, Akitaka Yamasaki, Shiho Ueda, Shogo Okazaki, Yoshiya Ohno, Toshiyuki Tanaka, Yuichi Endo, Yoshihisa Tomioka, Kazue Masuko, Takashi Masuko, Reiko Sugiura	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 -

〔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 recruits CD103+ dendritic cells via NK cell activation and potentiates immunotherapy mediated by PD-1 blockade
3. 学会等名 The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2021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	大野 喜也 (Ohno Yoshiya) (40509155)	兵庫医科大学・薬学部・准教授 (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
---------	---------