

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：35311

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15617

研究課題名（和文）新規マウス担癌irAEモデルを用いた免疫チェックポイント阻害薬耐性機序の解明

研究課題名（英文）Mechanism of resistance to immune checkpoint inhibitors in a novel tumor-bearing dermal immune-related adverse event model mouse

研究代表者

三重 慧一郎 (Keiichiro, Mie)

倉敷芸術科学大学・生命科学部・講師

研究者番号：30791082

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：抗PD-1抗体をはじめとする免疫チェックポイント阻害薬（ICIs）は顕著な抗腫瘍効果を示す一方で、同一腫瘍種においても治療効果が得られる症例と得られない症例があることが問題となっている。申請者は、MC38細胞を接種した後に抗PD-L1抗体とオキサゾロンにより皮膚炎を誘発した独自の担癌皮膚免疫関連有害事象（irAE）モデルマウスにおいて、実臨床と同様にICIsの抗腫瘍効果とirAE発症が負の相関を示すことを明らかにした。この現象を引き起こす腫瘍の免疫抑制機序は、CD8陽性T細胞におけるTCRシグナル伝達を阻害するものではなく、PI3K/AKT/mTOR経路を阻害するものであることが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、実臨床におけるICIsの抗腫瘍効果とirAE発症が相関する現象を再現するモデルマウスの作製に成功し、その機序は腫瘍によるCD8陽性T細胞のPI3K/AKT/mTOR経路の阻害であることが示唆された。抗腫瘍効果とirAE発症はそれぞれ別の抗原を認識するCD8陽性エフェクターT細胞であること、および本研究で使用したマウスや株化腫瘍細胞の遺伝的背景は同一であることから、この機序は遺伝的背景や抗原の種類に影響されず、かつ腫瘍の微小環境にも非依存的な全身性の免疫抑制機序であると推測され、実臨床におけるICIsに対する腫瘍の耐性獲得機序の解明につながりうる知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Immune checkpoint inhibitors (ICIs) including anti-PD-1 antibody dramatically improved treatment of tumor patients including who are not responding well to conventional anti-tumor treatments; however, a significant fraction of patients is unresponsive to ICIs even if the type of tumor seems to be responsive to ICIs. In this study, it was revealed that anti-tumor effect of anti-PD-L1 antibody significantly correlated with the degree of immune-related adverse event (irAE) in a novel tumor-bearing dermal irAE model mouse. It was suggested that the mechanism of the correlation might be the inhibition of PI3K/AKT/mTOR pathway of CD8+ T cells by the tumor rather than be the inhibition of T cell receptor (TCR) signal transduction.

研究分野：獣医学

キーワード：免疫チェックポイント阻害薬 免疫関連有害事象 PD-1 CD8陽性T細胞

1. 研究開始当初の背景

抗PD-1抗体をはじめとする免疫チェックポイント阻害薬 (ICIs) は、メラノーマや非小細胞性肺癌、頭頸部扁平上皮がんなど様々な腫瘍種において顕著な抗腫瘍効果を発揮したことから腫瘍の第四の治療法としての免疫療法を切り開いたが、一方で、ICIsの抗腫瘍効果が得られない症例が一定数認められることが問題となっている。ICIsの治療効果を予測するために、これまで多くのファクターが検討されてきたが、未だ鍵となるファクターが何であるのかは特定されておらず、なぜICIsによる抗腫瘍効果が得られる症例と得られない症例がいるのかという問いは、依然として解明されていないのが現状である。一方で、臨床的には、ICIsによる正常組織・臓器の障害、すなわち免疫関連有害事象 (irAE) の発症がICIsの抗腫瘍効果と関連することが示唆されてきた (Das S and Johnson DB, 2019, *J Immunother Cancer*)。irAEの発症組織・臓器は必ずしも腫瘍原発巣の組織・臓器とは一致しないことから、この実臨床において認められるICIsの抗腫瘍効果とirAE発症の相関は、ICIsの抗腫瘍効果はT細胞による腫瘍抗原の認識や腫瘍微小環境などの局所的なファクターによってのみ左右されるのではなく、抗腫瘍エフェクターT細胞のみならず、広範なT細胞を抑制する何らかの腫瘍による免疫抑制機構によりICIsの抗腫瘍効果が左右される可能性を示しているが、そのような腫瘍による免疫抑制の機序については未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

これまでに申請者は、抗PD-L1抗体とオキサゾロンを用いて作製される皮膚irAEモデルマウス (Ashoori MD *et al.*, 2021, *Front Immunol*) に腫瘍を接種した担癌皮膚irAEモデルマウスを作製したところ、このモデルマウスでは実臨床におけるICIsの抗腫瘍効果とirAE発症が相関する事象が再現される可能性があることを示す結果を得ていた。そこで本研究では、この担癌皮膚irAEモデルマウスにおいてICIsの抗腫瘍効果とirAE発症が相関する事象を引き起こす鍵となる免疫抑制機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

・担癌皮膚irAEモデルマウスにおけるICIsの抗腫瘍効果とirAE発症の相関性の検証

C57BL/6マウスの右側体幹にマウス結腸癌株細胞であるMC-38細胞を皮内接種した。腫瘍接種10日後から抗PD-L1抗体とオキサゾロンを用いて耳介における皮膚irAEの誘発を開始し、腫瘍接種23日後における耳介の腫脹と腫瘍体積の相関性を検証した。

・腫瘍の有無が皮膚irAE発症に及ぼす影響の検証

C57BL/6マウスの右側体幹にMC-38細胞を皮内接種した腫瘍 (+) 群と接種しない腫瘍 (-) 群を作製し、両群共に抗PD-L1抗体とオキサゾロンを用いて耳介における皮膚irAEを誘発した。耳介腫脹の評価に加え、フローサイトメトリーにより浅耳下腺リンパ節CD8陽性T細胞の活性化をCD44とCD62Lの発現を指標として評価した。

・ICIsの抗腫瘍効果とTCRシグナル伝達の相関性の検証

C57BL/6マウスの右側体幹にMC-38細胞を皮内接種した。腫瘍接種10日後から抗PD-L1抗体の投与を開始し、腫瘍接種16日後に腫瘍領域リンパ節として右側の腋窩リンパ節及び腸骨下リンパ節を採取した。腫瘍領域リンパ節細胞を固相化抗CD3抗体で刺激後、フローサイトメトリーによりCD8陽性T細胞におけるリン酸化ZAP70及びリン酸化Erk1/2発現を解析し、腫瘍重量との相関性を検証した。

・ICIsの抗腫瘍効果の有無による遺伝子発現の差異の検証

C57BL/6マウスの右側体幹にMC-38細胞を皮内接種した。腫瘍接種10日後から抗PD-L1抗体の投与を開始し、腫瘍接種16日後に腫瘍領域リンパ節として右側の腋窩リンパ節及び腸骨下リンパ節を採取した。セルソーターを用いて腫瘍領域リンパ節細胞からCD8陽性T細胞をソーティングし、固相化CD3抗体で刺激後、RNAを抽出した。抽出したRNAを検体とし、Clariom™ S assay, mouse (Thermo Fisher Science) を用いたマイクロアレイ解析を実施した。得られたデータはMicroarray Data Analysis Tool Ver3.2 (Filgen) を用いて解析した。

4. 研究成果

これまでに申請者は、抗PD-L1抗体とオキサゾロンを用いた皮膚irAEモデルマウスに腫瘍を接種した担癌皮膚irAEモデルマウスを作製したところ (図1-A)、担癌皮膚irAEモデルマウスには皮膚irAE発症が認められるマウスと認められないマウスが存在し、皮膚irAEを発症しなかったマウスではirAE誘発部位へのCD8陽性T細胞浸潤が著しく少なく (図1-B)、irAE発症の有無は抗PD-L1抗体の抗腫瘍効果と関連する可能性を示す結果を得ていた。そこで、まずは本担癌皮膚irAEモデルマウスにおける抗PD-L1抗体の抗腫瘍効果と皮膚irAE発症の相関性を検

証したところ、抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果に個体差が認められる中で (図 1-C)、抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果が認められないマウスでは皮膚 irAE 発症が認められず、抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果の指標となる腫瘍重量と皮膚 irAE 発症の指標となる耳介腫脹は良好な負の相関を示すことが示された (図 1-D)。

次に、本担癌皮膚 irAE モデルマウスにおいて、腫瘍の存在が皮膚 irAE 発症に及ぼす影響を明らかにするために、腫瘍の有無による耳介腫脹の程度を比較した。その結果、腫瘍の存在は耳介腫脹を有意に軽減することが明らかとなった (図 2-A)。さらに、耳介の領域リンパ節である浅耳下腺リンパ節において、担癌マウスでは CD8 陽性エフェクター T 細胞 (CD44^{high}CD62L^{low}CD8⁺T 細胞) の割合が有意に低下した (図 2-B, C)。これらの結果から、腫瘍は CD8 陽性抗腫瘍エフェクター T 細胞のみならず、腫瘍抗原とは異なる抗原を認識する CD8 陽性 T 細胞を広範に抑制することが示唆された。

T 細胞レセプター (TCR) が抗原を認識することでエフェクター細胞への分化が始まることから、続いて、この腫瘍による CD8 陽性 T 細胞の抑制機序が TCR シグナル伝達を抑制することによるものであるかどうかを検証した。その結果、TCR シグナル伝達カスケードを構成する因子であるリン酸化 ZAP70 やリン酸化 Erk1/2 と腫瘍重量の間に相関性は認められなかった (図 3-A, B)。したがって、この腫瘍による CD8 陽性 T 細胞の抑制機序は TCR シグナル伝達を直接抑制するものではなく、TCR シグナル伝達後に T 細胞が活性化してエフェクター細胞へと分化する段階を抑制するものであることが示唆された。

この腫瘍による CD8 陽性 T 細胞活性化の抑制機序を明らかにするために、抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果が認められたマウスと認められなかったマウスから、それぞれ腫瘍領域リンパ節の CD8 陽性 T 細胞を採取し、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行なった。発現遺伝子の差異を比較検討したところ、抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果が認められたマウスでは 269 遺伝子の発現が上昇し、一方、認められなかったマウスでは 287 遺伝子の発現が上昇していた (図 4-A)。抗腫瘍効果が認められたマウスにおいて発現が上昇していた遺伝子を選択して GO 解析を行なったところ、

亢進している生物学的プロセスの中に多くの糖代謝に関連するプロセスが含まれていた (図 4-B)。抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果が認められたマウスと認められなかったマウスのそれぞれで発現が上昇していた遺伝子の詳細を見てみると、抗腫瘍効果が認められなかったマウスでは糖代謝を含む数多く

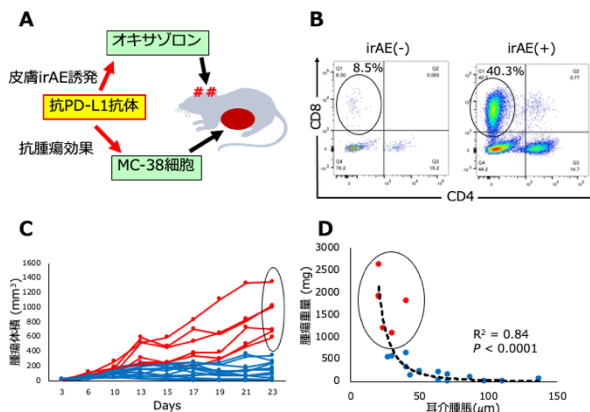


図 1. 担癌皮膚 irAE モデルマウスにおける抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果と皮膚 irAE 発症の相関

- A: 担癌皮膚 irAE モデルマウスの概要
- B: 皮膚 irAE 発症の有無による耳介浸潤 CD8 陽性 T 細胞の差異
- C: 腫瘍体積の経時的変化
- D: 腫瘍重量と耳介腫脹の相関関係

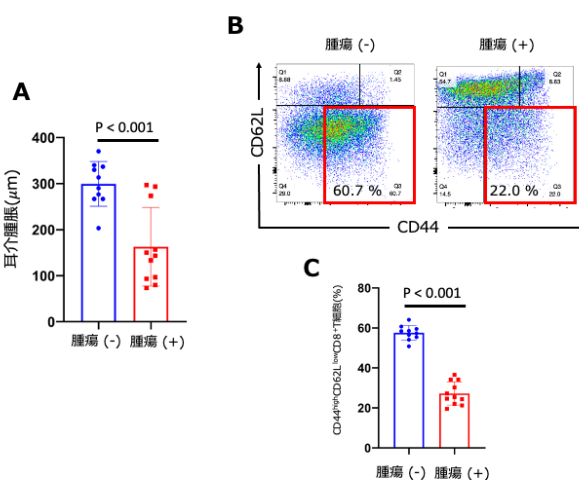


図 2. 腫瘍が皮膚 irAE 発症に及ぼす影響

- A: 腫瘍の有無による耳介腫脹の差異
- B・C: 腫瘍の有無による浅耳下腺リンパ節 CD8 陽性エフェクター T 細胞の差異

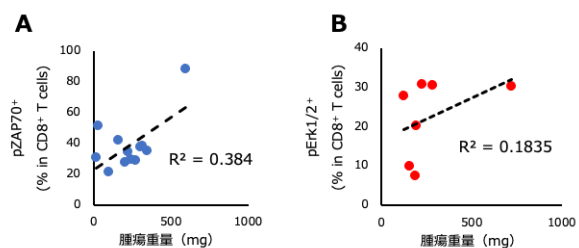


図 3. CD8 陽性 T 細胞の TCR シグナル伝達と腫瘍重量の相関

- A: CD8 陽性 T 細胞のリン酸化 ZAP70 発現と腫瘍重量の相関
- B: CD8 陽性 T 細胞のリン酸化 Erk1/2 発現と腫瘍重量の相関

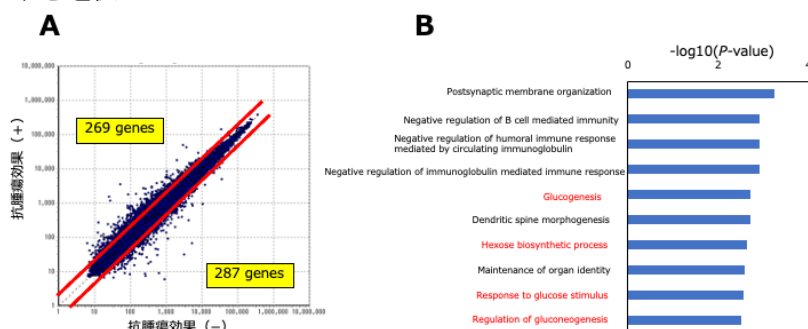


図 4. 抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果の有無による腫瘍領域リンパ節 CD8 陽性 T 細胞における発現遺伝子の比較

- A: 抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果の有無による発現遺伝子数の比較
- B: 抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果が認められたマウスにおける上位 10 の Go term

の生物学的プロセスを司る PI3K/AKT/mTOR 経路を抑制する遺伝子の発現上昇が認められ、一方で抗腫瘍効果が認められたマウスでは PI3K/AKT/mTOR 経路を促進する遺伝子の発現上昇が認められた (図 5)。これらの結果から、本担癌皮膚 irAE モデルマウスにおいて腫瘍が広範な CD8 陽性 T 細胞を抑制する機序は、CD8 陽性 T 細胞の PI3K/AKT/mTOR 経路を抑制するものであることが示唆された。

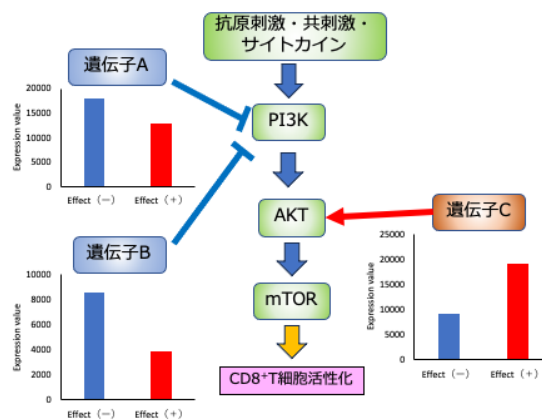


図 5. 抗 PD-L1 抗体の抗腫瘍効果の有無による発現遺伝子の差異と PI3K/AKT/mTOR 経路の関連

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 篠崎由妃乃、塩山高広、鈴木あかね、杉本忠則、中村瑞穂、三重慧一郎、西田英高、中村仁、大槻主税、秋吉秀保、永田鎮也
2. 発表標題 埋込み型多孔質デバイスによるマウス乳がんモデルにおける延命効果
3. 学会等名 第32回日本がん転移学会
4. 発表年 2023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
---------	---------