

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461687

研究課題名(和文) T cell抑制因子を阻害する新しいメラノーマ治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy for melanoma that inhibits T cell suppressive molecules

研究代表者

猪爪 隆史 (INOZUME, Takashi)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号：80334853

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：T cellの活性化を抑制する分子に対する阻害抗体は進行期メラノーマに対する革新的な治療法の一つとして注目されている。代表者は前回採択された課題において新規のT cell抑制分子の候補約80個を同定した。これら候補分子の中で、それらに対する阻害抗体がメラノーマ治療に応用できるよういくつかの分子の機能解析を行った。その結果メラノーマが発現するCD155からT細胞が発現する受容体TIGITに送られる抑制シグナルが、腫瘍環境において選択的に増強され、メラノーマに対するT細胞反応を抑制していることを明らかにした。さらに抗TIGIT阻害抗体のメラノーマ治療薬としての有用性を示した。

研究成果の概要(英文)：Blocking antibody for T cell suppressive factors is an innovative melanoma therapy. In the previous study, we have identified 80 candidate molecules for novel T cell suppressive factors. Among them, we characterized some molecules that were useful as targets of melanoma therapy. We found that an inhibitory signal from CD155 on melanoma cells to TIGIT on T cells was selectively enhanced in the tumor environment. Also we have demonstrated that blocking antibody for TIGIT enhanced the anti-melanoma T cell response cooperatively with anti PD-1 antibody. Our data suggested the usefulness of anti-TIGIT blocking antibody as a novel melanoma therapy.

研究分野：癌免疫

キーワード：メラノーマ 免疫チェックポイント TIGIT CD155 CD226

1. 研究開始当初の背景

免疫チェックポイント阻害抗体(抗 CTLA-4 抗体, 抗 PD-1 抗体)はメラノーマ患者の生存率を著しく改善した。一方で奏効率の改善と副作用の軽減は重要課題となっている。そこで、CTLA-4 や PD-1 以外の免疫チェックポイントを同定して、治療標的としての妥当性を検討してゆく事が重要視されていた。代表者は前回の採択課題にて、メラノーマ反応性 T cell がメラノーマ細胞を認識して活性化しようとしたときに必ず放出される IFN- γ によって、メラノーマ細胞に誘導される未知の免疫抑制分子(PD-L1 がこうした分子の代表)を複数、同定していたため、これら候補分子の治療標的としての妥当性を一つずつ検証することとした。

2. 研究の目的

前回採択された課題において同定したメラノーマ細胞に発現される未知の T cell 抑制分子ひとつひとつの機能、抑制メカニズム、阻害方法を引き続き検討し、有効な進行期メラノーマ治療を開発する。

3. 研究の方法

- 1) 候補分子をコードする遺伝子を単離してメラノーマ細胞に強制発現させ、共培養時のメラノーマ特異的 T 細胞への影響を検討する。
- 2) T cell 抑制に関わる候補分子へのブロッキング抗体の添加によってメラノーマ細胞と共培養した際の T cell 活性が増強されるかを in vitro で検討する。
- 3) 候補分子の T cell への in vivo での作用を検討する。ヒトのメラノーマ組織における候補分子の発現を免疫染色で確認する。ヒトメラノーマ浸潤 T cell が自己メラノーマ細胞に反応する際の候補分子の影響を、腫瘍への強制発現実験や候補分子へのブロッキング抗体添加などで評価する。また、マウスメラノーマに候補分子を強制発現した場合の癌ワクチン感受性を評価し、ヒトメラノーマをヒ

トメラノーマ特異的 T cell で治療するヒト化マウスモデルでの候補分子へのブロッキング抗体の効果を評価する。

4. 研究成果

IFN-g は腫瘍特異的 T cell のエフェクターフェーズに必須のサイトカインであるが、同時に PD-L1 などの腫瘍エスケープに関与する分子を誘導することが明らかにされている。我々はメラノーマ細胞株には IFN-g 処理で T cell からの認識が著明に減弱するものとしていないものが存在することを発見した(図1)。

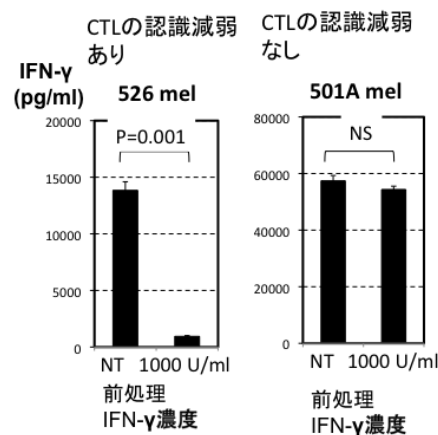


図1 メラノーマ細胞にはIFN- γ 曝露によってT細胞からの認識が低下するものと変化しないものがある。

そこで、IFN-g 処理による遺伝子発現の変化をこの2群間で比較することで、IFN-g 刺激によりメラノーマ細胞に誘導される腫瘍エスケープに関与する遺伝子を網羅的に解析した。最初に候補遺伝子の1つ、NGFR (Nerve growth factor receptor)を解析した。NGFRを強制発現させたメラノーマ細胞株は、メラノーマ抗原特異的 T cell からの in vitro での認識が有意に減弱した。一方 NGFR を発現しているメラノーマ細胞を NGF-NGFR シグナルブロッキング試薬存在下でメラノーマ抗原特異的 T cell と共培養すると in vitro での T cell からの認識がやや増強した。しかしメラノーマ細胞の抗原プロセッシングに影響されないシステムで同じ実験を行うとこれらの効果は観察されなかった。以上より、メラノーマ細胞に IFN-g 刺激で発現増強される NGFR は活性化 T 細胞から放出される NGF

との結合を介してメラノーマ細胞の抗原プロセッシングを変化させることでメラノーマ抗原特異的 T cell からの認識を減弱させる可能性が示唆された。さらにメラノーマ細胞株に NGFR と PD-L1 を同時に強制発現させると、メラノーマ抗原特異的 T cell からの認識は相乗的に低下した (図 2)。

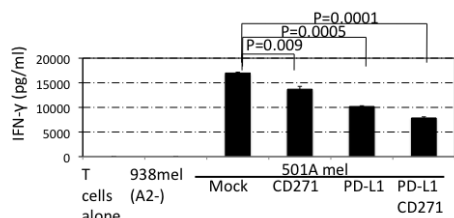


図2 メラノーマ細胞にCD271を強制発現させるとT細胞からの認識が低下する。そのT細胞抑制効果はPD-L1強制発現と協調的であった。

以上より NGFR は PD-L1 とともにメラノーマ抗原特異的 T cell の腫瘍反応性を増強するために阻害すべき分子のひとつである可能性が示唆された。次に候補分子の中から CD155 を検討した。CD155 は腫瘍や APC に発現されるポリオウイルス受容体関連分子ファミリーの一つで T cell 機能を制御している。T cell 上の受容体は CD226 (活性化受容体) と TIGIT (抑制性受容体) が同定されている。TIGIT は T cell 活性化に伴いダイナミックに発現される高親和性の抑制性受容体で、CTLA-4 のような役割を果たしていると考えられる。CD155 は 5/5 のメラノーマ組織、7/7 のメラノーマ細胞株、その他の癌細胞株に恒常的に発現されており、細胞株ではその半数において IFN γ 刺激で発現レベルが上昇した。次に TIGIT を発現したメラノーマ抗原特異的 T cell に対する、メラノーマ細胞上の CD155 の影響を評価した。メラノーマ細胞株に CD155 を遺伝子導入して発現レベルを上昇させ、メラノーマ特異的 CTL と共培養したところ、CTL の活性化は有意に抑制された。この抑制効果は抗 TIGIT 抗体にて解除された (図 3)。

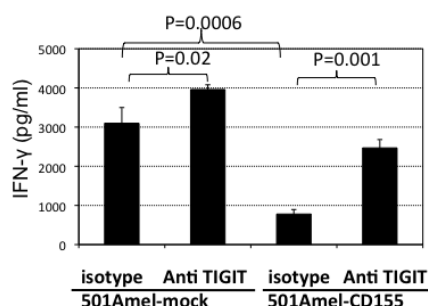


図3 メラノーマ細胞にCD155を強制発現するとT細胞からの認識が著明に低下した。この効果はT細胞上のTIGITへの阻害抗体によって解除された。

また同じ実験系でメラノーマに強制発現させた CD155 と PD-L1 はメラノーマ抗原特異的 T cell 上のそれぞれの受容体を介して協調的に T cell の活性化を抑制した。最後に、TIGIT と CD155 の結合の in vivo での作用を解析した。まず、メラノーマの腫瘍拒絶に最も重要な役割を果たすヒトメラノーマ組織由来の腫瘍浸潤リンパ球を自己メラノーマ細胞に反応させる際に CD155-TIGIT シグナル、PD-L1-PD-1 シグナルを同時に阻害すると、腫瘍浸潤リンパ球の抗腫瘍活性が協調的に上昇するのを確認した (図 4)。

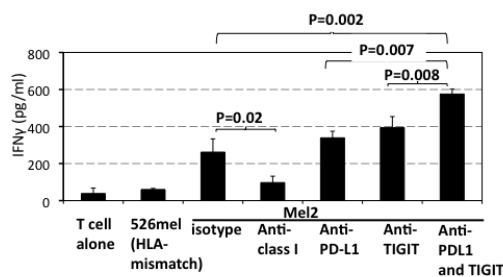


図4 ヒトメラノーマ腫瘍浸潤T細胞と自己メラノーマ細胞の共培養に TIGITシグナルとPD-1シグナル阻害抗体を添加すると相乗的にヒトメラノーマ腫瘍浸潤T細胞の活性を増強した。

さらに TIGIT-CD155 結合の腫瘍免疫への影響を完全な in vivo で評価するため、CD155 を過剰発現させたメラノーマ細胞株 B16 を背部に接種したマウスを、癌に対する T 細胞反応を惹起するワクチンで治療する実験を行った。その結果、CD155 の過剰発現は in vivo においても T 細胞上の TIGIT との結合を介してメラノーマに対する T 細胞反応を抑制していることが明らかとなった。以上より、TIGIT-CD155 結合は in vivo でも重要な免疫抑制因子として働いていることが示唆され、

抗 TIGIT 阻害抗体が単独でも抗 PD-1 抗体との併用においても有望な治療ツールとなりうることを証明した。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 6 件)

(1) Inozume Takashi, Yaguchi Tomonori, Furuta Junpei, Harada Kazutoshi, Kawakami Yutaka, Shimada Shinji. Melanoma Cells Control Antimelanoma CTL Responses via Interaction between TIGIT and CD155 in the Effector Phase. *J Invest Dermatol*. 査読有、136,2016,255-63. DOI: 10.1038/JID.2015.404

(2) 猪爪隆史、新規免疫チェックポイントの可能性、最新医学、査読無、70巻、2015、378-375、DOI なし

(3) 猪爪隆史、メラノーマに対する免疫療法の開発、山梨大学雑誌、査読無、30巻、2015、7-13、DOI なし

(4) 猪爪隆史、進行期メラノーマ治療 update、日本臨床皮膚科医会雑誌、査読無、32巻、2015、017-022、DOI なし

(5) 猪爪隆史、悪性黒色腫に対する免疫療法、産科と婦人科、査読無、81巻、2014、223-230、DOI なし

(6) Furuta Junpei, Inozume Takashi, Harada Kazutoshi, Shimada Shinji. CD271 on melanoma cell is an IFN γ inducible immunosuppressive factor that mediates downregulation of melanoma antigens. *J Invest Dermatol*. 査読有、134,2014,1369-1377. DOI: 10.1038/JID.2013.490

(学会発表) (計 12 件)

(1) 猪爪隆史、癌免疫療法の現状と課題、東葛北部がん治療、支持療法フォーラム (招待講演)、2016年3月11日、柏の葉カンファレンスセンター、千葉県、柏

(2) Inozume Takashi, Tomonori Yaguchi, Kawakami Yutaka, Shimada Shinji.

Co-blockade of TIGIT and PD-1 signals in tumor infiltrating cytotoxic T lymphocytes is an effective anti-melanoma therapy, The 40th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2015年12月11日-13日、岡山コンベンションセンター、岡山県、北区

(3) Inozume Takashi. Recent Development in Cancer Immunotherapy, 14th International Workshop on Langerhans Cells (招待講演)、2015年11月6日-8日、京都市国際交流会館、京都府、左京区

(4) 猪爪隆史、メラノーマに対する免疫療法の現状と展望、免疫チェックポイント阻害薬適正使用セミナー (招待講演)、2015年11月11日、信州大学、長野県、松本

(5) 猪爪隆史、抗 PD-1 抗体療法の成功から見てきた癌免疫療法の展望、第 6 回 JBCRG 学術集会 (招待講演)、2015年11月1日、京都リサーチパークバズホール、京都府、下京区

(6) Inozume Takashi, Tomonori Yaguchi, Kawakami Yutaka, Shimada Shinji. Blockade for CD155-TIGIT interaction is an immune checkpoint regulating anti melanoma TIL responses, *がん免疫、マクロファージ国際会議 2015*, 2015年7月9日-11日、東京大学伊藤謝恩ホール、東京都、文京区

(7) Inozume Takashi, Tomonori Yaguchi, Kawakami Yutaka, Shimada Shinji. Blockade for CD155-TIGIT interaction is an effective therapy for melanoma, Society for Investigative Dermatology The 40th annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2015年5月6日-9日、Hilton Atlanta, Atlanta, Georgia

(8) Inozume Takashi, Tomonori Yaguchi, Furuta Junpei, Kawakami Yutaka, Shimada Shinji. Blockade for CD155-TIGIT interaction elicits anti-melanoma T cell responded in vitro and in vivo, The 39th

annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, 2014 年 12 月 12 日-14 日、ホテル阪急エキスポパーク、大阪、吹田市

(9) 猪爪隆史、進行期メラノーマは治癒できるか、新潟がん免疫療法セミナー(招待講演)、2014 年 11 月 15 日、ホテル日航新潟、新潟県、新潟市

(10) Inozume Takashi, Tomonori Yaguchi, Furuta Junpei, Kawakami Yutaka, Shimada Shinji. CD155-TIGIT interaction is an immune checkpoint regulating anti melanoma immune response, 第 18 回日本がん免疫学会、2014 年 7 月 30 日-8 月 1 日、ひめぎんホール、愛媛県、松山市

(11) Inozume Takashi, Tomonori Yaguchi, Furuta Junpei, Harada Kazutoshi, Kawakami Yutaka, Shimada Shinji. CD155-TIGIT interaction is an immune checkpoint regulating anti-melanoma immune responses, 2014 annual meeting of Society for Investigative Dermatology, 2014 年 5 月 7 日-10 日、Albuquerque Convention Center, Albuquerque, New Mexico

(12) Inozume Takashi, Furuta Junpei, Harada Kazutoshi, Kawakami Yutaka, Shimada Shinji. CD271 on melanoma cells is an IFNg inducible immunosuppressive factor that mediates downregulation of melanoma antigens, International Investigative Dermatology, 2013 年 5 月 8 日 -11 日、Edinburg International Conference Center, Scotland, Edinburg

(図書)(計1件)

(1)猪爪隆史、島田眞路、南山堂、癌と免疫 第 2 部 15 がん免疫における共刺激分子、共抑制分子と免疫チェックポイント、2015、9 ページ

(その他)

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/dermatol/>

6. 研究組織

(1) 代表研究者

猪爪 隆史 (INOZUME Takashi)

山梨大学・総合研究部・講師

研究者番号：80334853