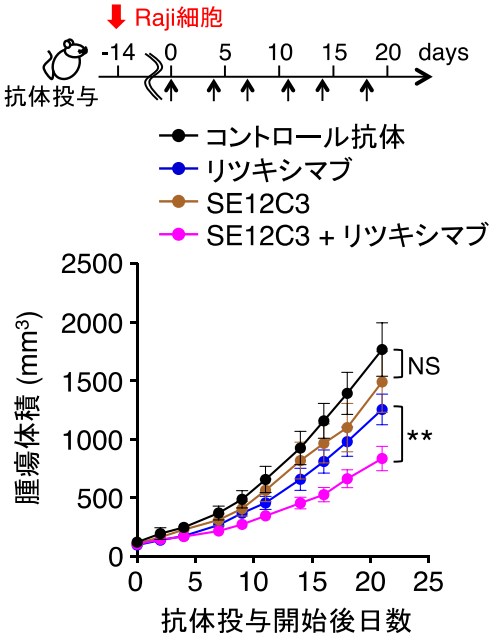
67　新しいがん免疫チェックポイント機構の解明と治療応用	村田　陽二

【目的】最近、研究代表者は、マウス及びヒトがん由来株化細胞を移植したマウスを用いた解析から、マクロファージなどの貪食細胞とがん細胞の間で形成される細胞間シグナル CD47-SIRPα 系を阻害する抗マウス SIRPα 抗体が、単独、もしくは既存の分子標的薬との併用により強力な抗腫瘍効果を発揮することを見出していた。しかしながら、マウスとヒト SIRPα のいずれにも反応性を示す抗 SIRPα 抗体はこれまで存在せず、臨床応用を目指す上で重要な抗ヒト SIRPα 抗体の抗腫瘍剤としての有効性の確立、また、その作用機序の解明について、とりわけ、動物モデルを用いた解析がなされていなかった。そこで研究代表者らは、ヒト SIRPα を発現する免疫不全マウス（hSIRPα-Tg マウス）を用いることで、抗ヒト SIRPα 抗体の抗腫瘍剤としての有効性とその作用機序について解析を試みた。

【方法】本研究では、抗体医薬により標識されたがん細胞に対する hSIRPα-Tg マウス骨髄由来マクロファージによる貪食作用を CD47-SIRPα 結合の阻害活性を持つ抗ヒト SIRPα 抗体が促進するかについて検討した。また、ヒト B 細胞リンパ腫由来株化細胞 Raji を皮下移植した hSIRPα-Tg マウスを用い、抗体医薬リツキシマブによる Raji 腫瘍に対する抗腫瘍効果を *in vivo* において抗ヒト SIRPα 抗体が増強するかについて検討した。さらに、クロドロン酸内包リポソームを Raji 細胞皮下移植後の hSIRPα-Tg マウスに投与し、マウス個体内からマクロファージを枯渇化させた際、リツキシマブによる抗腫瘍効果を抗ヒト SIRPα 抗体が増強し得るかについて検討した。

【結果】CD47-SIRPα 結合を阻害する抗ヒト SIRPα 抗体が、がん抗原を認識し抗体依存性細胞貪食（ADCP）の誘導能を持つ抗体医薬によるがん細胞のマクロファージによる貪食作用を hSIRPα-Tg マウス骨髄由来マクロファージを用いることで増強することが明らかとなった。また、Raji 細胞を皮下移植した hSIRPα-Tg マウスを用いた解析から、抗ヒト SIRPα 抗体がリツキシマブによる抗腫瘍効果を増強することが確認された。さらに、この *in vivo* における抗腫瘍効果には少なくともマクロファージが関与することが明らかとなった。従って、腫瘍モデル動物において、抗ヒト SIRPα 抗体が ADCP の誘導能を持つ抗体医薬の抗腫瘍効果を増強する薬剤として有効性を示す可能性が高く、今後、ヒト SIRPα に作用する様々な薬剤の抗腫瘍剤としての薬効評価や作用機序の解明に hSIRPα-Tg マウスが有用であると考えられた。

hSIRPα-Tg マウスにおける抗ヒト SIRPα 抗体（SE12C3）によるリツキシマブ依存的な抗腫瘍効果の増強



67. 新しいがん免疫チェックポイント機構の解明と治療応用

村田　陽二

神戸大学 大学院医学研究科 生化学･分子生物学講座 シグナル統合学分野

Key words：がん細胞，マクロファージ，貪食，抗体

緒　言

依然としてがんは我が国の死因の第一位であり、より有効な治療薬の開発が喫緊の課題である。私共は、これまでにマクロファージなどの貪食細胞に強く発現する膜型分子であるSIRPα（別名SHPS-1）が、貪食標的となる細胞上に発現する膜型分子 CD47 と相互作用することで細胞内のシグナル系を介してマクロファージによる標的細胞の貪食を抑制的に制御することを明らかにしている［1，2］。さらに、最近、私共は、がん細胞上に存在するCD47がマクロファージなど貪食細胞上のSIRPα と相互作用すると、分子標的薬により貪食細胞に誘導される［抗体依存性細胞貪食（ADCP）を介した］抗腫瘍効果が抑制される機序が存在すること、一方、抗SIRPα 抗体により CD47-SIRPα 相互作用が解除されると分子標的薬による抗腫瘍効果が増強されることを見出している［3］。また、腎がん、メラノーマでは、SIRPα をがん細胞が高度に発現することに加え、これらのがんに対して抗SIRPα 抗体が、直接ADCPを誘導すると共に、CD47-SIRPα の結合解除によるADCPの増強という2重の効果により抗腫瘍効果を発揮することを示した［3］。しかしながら、抗SIRPα 抗体を抗腫瘍剤として開発する上では、ヒトSIRPα に対する抗体を用い腫瘍モデルマウスでの薬効や毒性の評価が重要であるが、CD47との結合に関わる SIRPα の責任領域のアミノ酸配列の相同性がマウスとヒトの間において低いため、ヒトとマウスのいずれにも交差する抗SIRPα 抗体が得られず、抗ヒトSIRPα 抗体を用いた *in vivo* での有効性の評価やその作用機序の解析は行われていなかった。そこで、この課題を解決する目的で、ヒトSIRPα を発現し、且つ、*Rag2* と *Il2γc* 遺伝子の二重欠損により重症免疫不全を呈するヒト SIRPα トランスジェニック免疫不全マウス（hSIRPα-Tg）［4］を用い、抗ヒトSIRPα 抗体の *in vivo* での抗腫瘍効果について解析を行った。

方　法

1. マウス

hSIRPα-Tgマウス（129S4-Rag2tm1.1Flv Il2rgtm1.1Flv Tg(SIRPA)1Flv/J）は米国Jackson Laboratoryから購入したマウスであり、神戸大学医学部附属動物実験施設にて飼育･繁殖を行い、本研究に必要となるマウスを取得し、実験に用いた。本研究で行った全ての動物実験は、神戸大学動物実験委員会の承認を得た上で行った。

2. 細胞培養

ヒトB細胞リンパ腫由来株化細胞Rajiおよびヒト乳がん由来株化細胞BT474は、ATCC（American type culture collection）より購入した細胞であり、10%ウシ胎児血清を添加したRPMI1640培地（Raji細胞）または、ATCC Hybri-Care Medium（BT474細胞）にて培養し、実験に用いた。

3. *in vitro* 貪食実験

hSIRPα-Tg マウスの大腿骨および脛骨から骨髄を回収し、M-CSF（マクロファージコロニー刺激因子）存在下にて 10%ウシ胎児血清を含む IMDM 培地にて 1 週間培養することで、マウス骨髄由来マクロファージを得た。得られたマウス骨髄由来マクロファージを 6 穴プレートに播種し、翌日、CFSE（carboxyfluorescein succinimidyl ester）にて蛍光標識を行ったがん細胞と 4 時間、抗体存在下もしくは非存在下にて共培養を行った。その後、6 穴プレートより細胞を回収し、マクロファージマーカーである F4/80 に対する抗体にて染色後、FACS（fluorescence activated cell sorter）による解析を行い、CFSE 陽性且つF4/80 陽性細胞をがん細胞貪食マクロファージとし、F4/80 のみ陽性細胞をがん細胞非貪食マクロファージとすることで、がん細胞のマクロファージによる貪食率を求めた。

貪食率 ＝ 100×CFSE 陽性F4/80 陽性細胞数／（CFSE 陽性F4/80 陽性細胞数＋CFSE 陰性 F4/80 陽性細胞数）

4. 腫瘍モデルマウス作製および抗体投与

8～12 週齢の hSIRPα-Tg マウスの皮下に、マトリゲルと混ぜ合わせ Raji 細胞の移植を行い、その後、皮下に形成された腫瘍の体積が約 100 mm^3 に到達した時点から、コントロール抗体、リツキシマブ、抗ヒト SIRPα 抗体をマウス腹腔内に投与（週 2 回）し、経時的に皮下に形成された腫瘍の体積を測定した。腫瘍体積は、デジタルノギスを用いて、皮下腫瘍の長径（a）と短径（b）を測定することで求めた（腫瘍体積 $= a \times b^2 / 2$）。

5. マクロファージの枯渇実験

8～12 週齢の hSIRPα-Tg マウスの皮下にマトリゲルと混ぜ合わせた Raji 細胞を移植した。移植後 10 日目から 3 日毎にクロドロン酸内包リポソームまたは生理食塩水を内包したリポソーム（コントロールリポソーム）を尾静脈より投与することで、マウス生体内からマクロファージの枯渇を行った。生体内からのマクロファージの枯渇の程度については、クロドロン酸内包リポソームまたはコントロールリポソームを投与した。hSIRPα-Tg マウスの脾臓より調製した脾細胞中でのマクロファージの存在率を比較することにより評価した。

6. 統計処理

データは、平均±標準誤差で示した。統計解析は、ANOVA 解析後、Tukey's 法による多重比較検定を行った。*P* 値が 0.05 未満で統計的有意と判断した。

結果および考察

1. 抗ヒト SIRPα 抗体による hSIRPα-Tg マウス骨髄由来マクロファージの抗体依存性貪食活性の増強

抗ヒト SIRPα 抗体の抗腫瘍剤としての薬効を腫瘍モデルマウスにおいて検証するには、マウス生体内においてヒト SIRPα を発現するマウスを用いることが有効であると想定された。以前の報告により、Strowig T.らが作製した *Rag2* と *Il2γc* 遺伝子を二重欠損したヒト SIRPα を発現する免疫不全マウス（hSIRPα-Tg マウス）［4］は、内在性のマウス SIRPα と同様に、マクロファージおよび好中球において、ヒト SIRPα の高度な発現が確認されている。そこで、hSIRPα-Tg マウス骨髄由来マクロファージを用い、抗ヒト SIRPα 抗体が、がん抗原を認識する抗体によるマクロファージのがん細胞に対する ADCP を増強するか否かについて検討した。図 1a で示すように、ヒト CD47-SIRPα 結合を阻害する抗ヒト SIRPα 抗体（SE12C3）は、抗体医薬であるリツキシマブ（抗 CD20 抗体）による hSIRPα-Tg マウス骨髄由来マクロファージの CD20 陽性ヒト B リンパ腫由来 Raji 細胞の貪食能を著明に増強した。一方、CD47-SIRPα 非結合阻害抗ヒト SIRPα 抗体である 040 では僅かに増強活性が認められたが、その程度は SE12C3 に比べ低度のものであった。さらに、抗体医薬トラスツズマブ（抗 HER2 抗体）によるマクロファージの HER2 高発現ヒト乳がん由来株化細胞 BT474 に対する hSIRPα-Tg マウス骨髄由来マクロファージの貪食についても、SE12C3 がその貪食を著明に増強した（図 1b）。これらのことから、CD47-SIRPα 結合を阻害する抗ヒト SIRPα 抗体が hSIRPα 発現マウス骨髄由来マクロファージによるがん細胞に対する ADCP を増強することが明らかとなった。

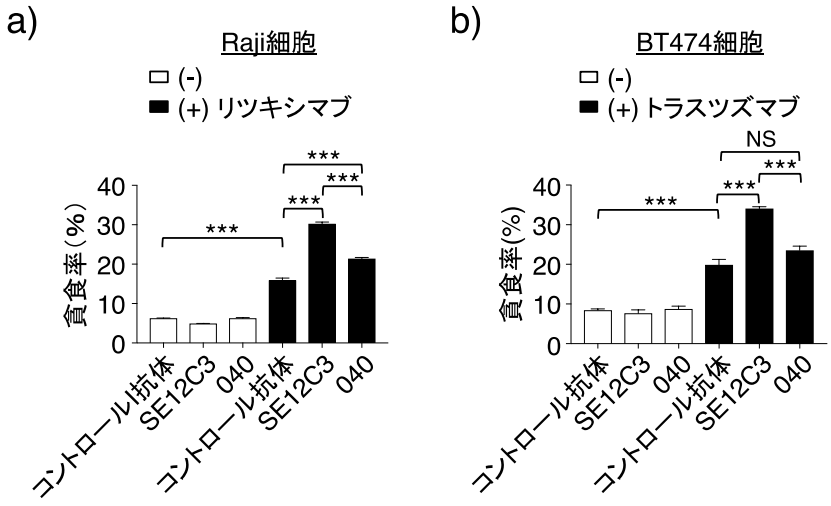


図 1. hSIRPα-TG マウス骨髄由来マクロファージのがん細胞に対する貪食作用の抗ヒト SIRPα 抗体による増強

（a, b）CD47-SIRPα 結合阻害活性を有する抗ヒト SIRPα 抗体（SE12C3）によるリツキシマブ依存的な Raji 細胞（a）または BT474 細胞（b）の hSIRPα-Tg マウス骨髄由来マクロファージによる貪食の増強。データは平均値±標準誤差で示した（n = 3、***P> 0.001、Tukey's 多重比較検定。コントロール抗体：正常マウス IgG、040：CD47-SIRPα 結合阻害活性をもたない抗ヒト SIRPα 抗体、NS：有意差なし。

2. 腫瘍モデルマウスでの抗ヒト SIRPα 抗体の抗腫瘍効果の増強

in vitro の解析により、ヒト CD47-SIRPα 結合を阻害する抗ヒト SIRPα 抗体が、がん細胞に対するマクロファージの ADCP を促進させたことから、Raji 細胞を皮下移植した hSIRPα-Tg マウスを用い、抗ヒト SIRPα 抗体とリツキシマブとの併用による抗腫瘍効果を検討した。SE12C3 とリツキシマブの併用群では、抗体投与開始後 21 目において他の抗体投与群に比べ、腫瘍体積の有意な増加抑制が認められた（図 2a）。一方、040 とリツキシマブの併用群においては、それぞれの単独投与群に比べ、腫瘍体積の増加抑制が認められたものの、その抑制効果は SE12C3＋リツキシマブ投与群に比べ低度のものであった（図 2b）。従って、ヒト CD47-SIRPα 結合を阻害する抗ヒト SIRPα 抗体がリツキシマブとの併用により、hSIRPα-Tg マウスを用いた腫瘍モデルにおいて強い抗腫瘍効果を誘導することが明らかとなった。

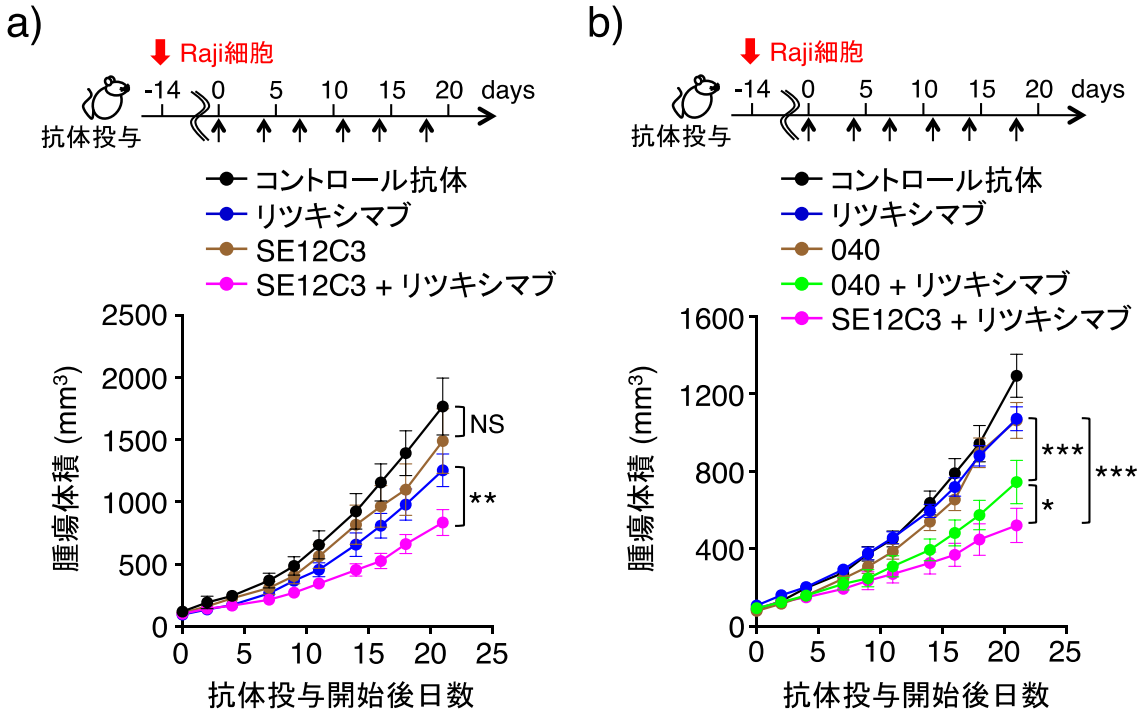


図 2. 抗ヒト SIRPα 抗体によるリツキシマブ依存的な抗腫瘍効果の増強

（a, b）hSIRPα-Tg マウスの皮下に Raji 細胞を移植し、移植後 14 日目から、コントロール抗体（正常マウス IgG）（a, b）、リツキシマブ、SE12C3（CD47-SIRPα 結合阻害抗ヒト SIRPα 抗体）（a, b）、040（CD47-SIRPα 結合非阻害抗ヒト SIRPα 抗体）（b）、SE12C3 +リツキシマブ（a, b）、又は、040＋リツキシマブ（b）を腹腔内に投与（週 2 回）を行い、経時的に皮下に形成された腫瘍の体積を測定した。データは平均値±標準誤差で示した。

［n = 10 （コントロール抗体および SE12C3）、n = 12（リツキシマブおよび SE12C13＋リツキシマブ）（a）、n = 11（b）、*P > 0.05、**P > 0.01、***P > 0.001、Tukey's 多重比較検定］。NS: 有意差なし。

3. 抗ヒト SIRPα 抗体の抗腫瘍効果におけるマクロファージの重要性

さらに、この併用による抗腫瘍効果がマクロファージ依存的であるかについて、クロドロン酸内包リポソーム（Clodronate）によりマウス生体内からマクロファージの枯渇を行い、SE12C3 とリツキシマブの併用による抗腫瘍効果について検討を行った。その結果、コントロールリポソーム（クロドロン酸を内包しないリポソーム、Ctrl）で処理したマウスでは、SE12C3 とリツキシマブの併用による腫瘍体積の増加抑制がコントロール抗体のみを投与したマウスに比べ有意に認められた（図 3）。一方、クロドロン酸内包リポソームにて処理したマウスにおいては、腫瘍体積の増加抑制がコントロールリポソームで処理したマウスに比べ、有意な減弱が認められた（図 3）。このことから、ヒト CD47-SIRPα 結合を阻害する抗ヒト SIRPα 抗体によるリツキシマブのヒト SIRPα-Tg マウス生体内での抗腫瘍効果の増強には、少なくともマクロファージが関与すると考えられた。

本研究において、私共は、hSIRPα-Tg マウスの骨髄由来マクロファージを用い、抗ヒト SIRPα 抗体が、がん抗原を認識し ADCP の誘導能を持つ抗体医薬リツキシマブやトラスツズマブによるがん細胞のマクロファージによる貪食を *in vitro* で高めることを示した。また、Raji 細胞を皮下移植した hSIRPα-Tg マウスにおいて、抗ヒト SIRPα 抗体がリツキシマブによる抗腫瘍効果を増強することを見出した。さらに、この *in vivo* における抗腫瘍効果には少なくともマクロファージが関与することを示した。従って、hSIRPα-Tg マウスを用いた解析により、抗ヒト SIRPα 抗体が ADCP の誘導能を持つ抗体医薬の抗腫瘍効果を増強する抗腫瘍剤としての有効性を示す可能性が高く、また、ヒト SIRPα に作用する様々な薬剤の抗腫瘍剤としての薬効評価や作用機序の解明に hSIRPα-Tg マウスが有用であると考えられた。

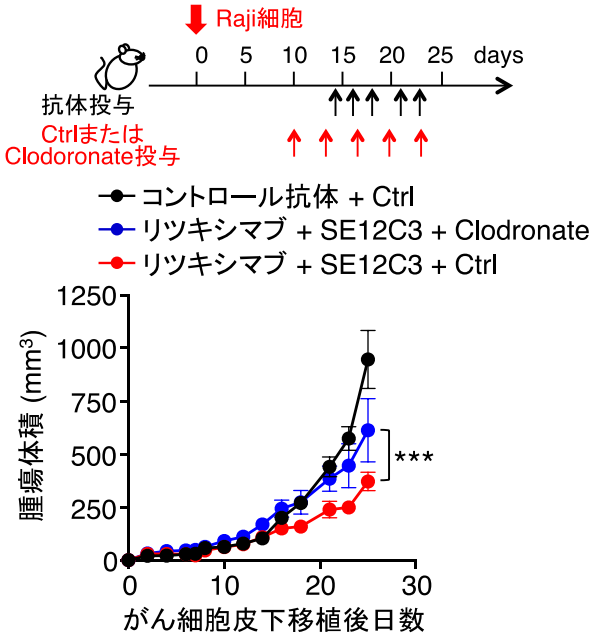


図 3. 抗ヒト SIRPα 抗体によるリツキシマブ依存的な抗腫瘍効果の増強

hSIRPα-Tg マウスの皮下に Raji 細胞を移植し、移植後 10 日目から 2 日ごとにクロドロン酸内包リポソーム（Clodoronate）の尾静注を行うことで、マクロファージのマウス個体内からの枯渇を行った。一方、対照としては、生理食塩水内包リポソーム（Ctrl）の尾静注を行った。Clodoronate もしくは、Ctrl を投与したマウスに対して、さらに、Raji 細胞移植後 14 日目から、週 2 回のコントロール抗体（正常マウス IgG）、SE12C3＋リツキシマブの腹腔内投与を行い、経時的に皮下に形成された腫瘍の体積を測定した。データは平均値±標準誤差で示した（n = 5、***P> 0.001、Tukey's 多重比較検定）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、神戸大学大学院医学研究科生化学･分子生物学講座シグナル統合学分野の的崎尚教授、齊藤泰之講師である。

文　献

1) Matozaki T, Murata Y, Okazawa H, Ohnishi H. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPα signalling pathway. Trends Cell Biol. 2009 Feb;19(2):72-80. Epub 2009 Jan 12. PMID: 19144521 DOI: 10.1016/j.tcb.2008.12.001

2) Murata Y, Kotani T, Ohnishi H, Matozaki T. The CD47-SIRPα signalling system: its physiological roles and therapeutic application. J Biochem. 2014 Jun;155(6):335-44. Epub 2014 Mar 12. PMID: 24627525 DOI: 10.1093/jb/mvu017

3) Yanagita T, Murata Y, Tanaka D, Motegi SI, Arai E, Daniwijaya EW, Hazama D, Washio K, Saito Y, Kotani T, Ohnishi H, Oldenborg PA, Garcia NV, Miyasaka M, Ishikawa O, Kanai Y, Komori T, Matozaki T. Anti-SIRPα antibodies as a potential new tool for cancer immunotherapy. JCI Insight. 2017 Jan 12;2(1):e89140. PMID: 28097229 DOI: 10.1172/jci.insight.89140

4) Strowig T, Rongvaux A, Rathinam C, Takizawa H, Borsotti C, Philbrick W, Eynon EE, Manz MG, Flavell RA. Transgenic expression of human signal regulatory protein alpha in Rag2-/-γ_c-/- mice improves engraftment of human hematopoietic cells in humanized mice. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Aug 9;108(32):13218-23. Epub 2011 Jul 25. PMID: 21788509 DOI: 10.1073/pnas.1109769108