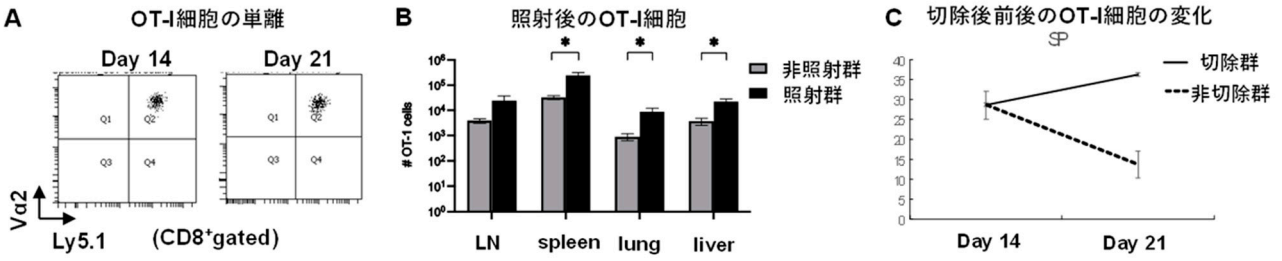
62　新規モデルによる未知の免疫チェックポイント分子探索	調　憲

【目的】近年、免疫チェックポイント分子阻害薬の有効性が明らかとなり様々な癌種で臨床応用されているが、その効果は限定的で、更なる CD8T 細胞の疲弊化誘導メカニズムが存在することが想定される。我々が独自に確立したマウス腫瘍モデルでは抗原特異的 CD8T 細胞を生体内の 10〜50 倍程度まで誘導でき、その細胞を詳細に解析することが可能となる。このモデルを用いて以下の 2 点を解析し新規癌免疫療法の開発につなげる。1. 疲弊化 CD8T 細胞を単離し、遺伝子発現変化を網羅的に解析し新規免疫チェックポイント分子を同定する。2. 外科的切除後または放射線治療後のメモリー細胞の産生・維持の分子機構を解明し新規アジュバント療法を確立する。

【方法】1. OT-I マウス（$OVA_{257-264}$ 特異的 T 細胞レセプタートランスジェニックマウス）の脾臓から CD8T 細胞を単離し C57BL/6 マウスに移入後、EG.7（卵白アルブミン産生 EL-4 細胞）を皮下接種した。経時的に脾臓における OT-I 細胞の動態、その機能および疲弊化マーカーをフローサイトメータで解析した。さらに 14 日目と 21 日目の OT-I 細胞をそれぞれセルソーターで単離後、RNA を抽出し網羅的解析が可能か評価した。2. 放射線照射モデル：OT-I 細胞を移入した系で腫瘍接種 14 日目に腫瘍照射（10 Gy：CR 量）し、7 日目のリンパ組織および非リンパ組織における OT-I 細胞の誘導とメモリーマーカーの発現を非照射群と比較検討した。続いて、メモリー細胞の長期維持を照射 60 日目の OT-I 細胞の割合で調べ、さらに二次免疫応答をペプチドパルス骨髄由来樹状細胞投与または腫瘍再投与で評価した。腫瘍切除モデル：OT-I 細胞を移入した系で腫瘍接種後 14 日目に腫瘍を切除し上記と同様の検討を行った。

【結果】①腫瘍接種後、脾臓で誘導される OT-I 細胞は 14 日目でピークを迎え以後減少し、14 日目又は 21 日目のその細胞の IFN-γ 産生またはグランザイム発現は、それぞれ 70%と 35%、30%と 1%であり、14 日目は活性化細胞、21 日目は疲弊化細胞であると判断した。それぞれの OT-I 細胞を単離すると 100%の純度で単離でき（図 A）、RNA を抽出し定量したところ、21 日目では少なく網羅的解析のためには PCR での増幅が必要だった。また、RNA 分解度の解析で RIN 値は 5.0 未満でソーティング操作にて細胞ダメージがあり条件を検討する必要があった。②照射モデル：照射後 7 日目の OT-I 細胞は非照射群と比較しリンパ組織だけでなく非リンパ組織においても著明に増加し（図 B）、その表面マーカーはエフェクター細胞とエフェクターメモリー細胞がそれぞれ増加していた。60 日目ではリンパ組織および非リンパ組織でメモリー細胞が維持され、その 2 次免疫応答ではペプチドパルス樹状細胞投与または腫瘍再投与で OT-I 細胞はすみやかに再活性化した。これらから照射で誘導されるメモリー細胞は再発制御に有効な細胞で、IL-7R を発現し IL-7 が有効な癌免疫療法の候補として考えられた。腫瘍切除モデル：腫瘍切除後 7 日目の OT-I 細胞は非切除群と比較しリンパ節では差がなかったが脾臓で有意に増加し（図 C）、表面マーカーではエフェクターメモリー細胞が誘導されていた。このことから外科的切除後でも IL-7 がアジュバント療法で有効な可能性が示唆された。

新規モデルによる癌免疫療法の開発



62. 新規モデルによる未知の免疫チェックポイント分子探索

調　憲

群馬大学 大学院医学系研究科 総合外科学講座 肝胆膵外科学分野

Key words：マウスモデル，免疫チェックポイント分子，疲弊化 CD8T 細胞，放射線照射，手術

緒　言

腫瘍免疫応答において抗原特異的 CD8T 細胞が重要な役割を担っているが、それらは疲弊化し十分な抗腫瘍効果を示せないことが知られている。近年、PD-1/PD-L1 を含めた免疫チェックポイント分子がその疲弊化誘導に関与していることが解明され、そのシグナルをブロックする癌免疫療法が様々な癌種で臨床応用されている［1〜3］。しかしながら、その効果は一部の症例に限定され、一時的で、更なる疲弊化誘導メカニズムが存在することが想定される。

その解明のためには、腫瘍免疫応答で誘導される抗原特異的 CD8T 細胞を経時的に単離し、疲弊化誘導に関与する分子を同定することが必要であるが、通常のマウス腫瘍モデルでは、その数がピーク時で CD8T 細胞の 1%以下、モデル抗原の卵白アルブミンを用いても 1%程度と少なく解析困難であることが問題となる［4］。

これまで疲弊化 CD8T 細胞に関する基礎研究の多くは、腫瘍と同様に抗原が持続的に存在する慢性感染症モデルを中心に行われ［5〜7］、その成果をもとに現在の癌免疫療法への臨床応用に至っている。しかし、実際には慢性感染症と腫瘍に対する免疫応答は同じとは言えず、腫瘍モデルでこれらの解析をすることが必要である。

我々は、独自にモデル抗原と OT-I マウスを用いたマウス腫瘍モデルで、抗原特異的疲弊化 CD8T 細胞を生体内の 10〜50 倍程度まで誘導できる実験系を確立している。このモデルでは、抗原特異的 CD8T 細胞がクローン増殖し活性化 CD8T 細胞となるが腫瘍の制御ができず、腫瘍局所におけるこの細胞の PD-1 発現は 90%以上、サイトカイン産生は IFN-γが 60%程度、細胞傷害活性を示すグランザイム発現は 30%程度と低下し疲弊化している。

このモデルを用いて、以下の 2 点を解析し新規癌免疫療法の開発を目指す。

1. 抗原特異的疲弊化 CD8T 細胞を単離し、遺伝子発現の変化を網羅的に解析する。

→疲弊化に関与する新規免疫チェックポイント分子を同定し新規癌免疫療法を開発する。

2. 外科的腫瘍切除後または放射線治療後のメモリー細胞の産生・維持の分子機構を解明する。

→メモリー細胞を効率良く誘導する新規癌免疫アジュバント療法を確立する。

方　法

1. 新規免疫チェックポイント分子の探索

$OVA_{257\text{-}264}$特異的 T 細胞レセプタートランスジェニックマウス（OT-I マウス、$Ly5.1^{+}$）の脾臓からナイーブ CD8T 細胞を単離後、C57BL/6 マウス（$Ly5.2^{+}$）に移入し、翌日卵白アルブミン産生 EL-4 細胞（EG.7）を皮下接種し生体内の 10〜50 倍程度の抗原特異的 CD8T 細胞を誘導させた（図 1a）。腫瘍接種 7、14、21 日目の脾臓を採取し、OT-I 細胞を $OVA_{257\text{-}264}$ペプチドテトラマーまたは$V\alpha2^{+}Ly5.1^{+}$で染色しフローサイトメータで解析した。さらに、その細胞の機能を検討するため、OVA ペプチド刺激後の IFN-γ産生能と細胞内グランザイム発現を解析すると共に、その疲弊化マーカーとして PD-1 の発現を検討し、誘導される抗原特異的 CD8T 細胞の疲弊化を評価した。

続いて、腫瘍接種 14 日目と 21 日目の脾臓における OT-I 細胞を、$V\alpha2^{+}CD8^{+}Ly5.1^{+}$でゲーティングし、セルソーター（FACS Aria）で単離した。それぞれ単離後の細胞純度をフローサイトメータで検討した。単離して回収できた細胞数を確認し、さらにその細胞から RNA を抽出し、その収量と質をそれぞれ評価した。

2. 局所療法後のメモリー細胞の産生・維持の分子機構の解明

1）放射線照射モデルでの解析

同様に OT-I 細胞を移入した系を用いて、EG.7 接種後 14 日目に腫瘍局所に 10 Gy 照射（CR dose）を行った（図 2a)。照射後 7 日目に腫瘍の CR を確認し、さらにフローサイトメータを用いて OT-I 細胞数をリンパ節、脾臓、肺、肝臓、末梢血で解析し、非照射群とそれぞれ比較検討した。照射で誘導された脾臓の OT-I 細胞におけるメモリーマーカー（CD44、CD62L、IL-7Rα、IL-2Rβ）の発現を非照射群と比較検討した。

続いて、メモリー細胞としての長期維持を検討するため、照射後 60 日目のリンパ節、脾臓、肺、肝臓、末梢血の OT-I 細胞の数を検討した。それらの細胞のメモリーマーカーの発現、抗アポトーシス分子として Bcl-2 発現、その機能としてペプチド刺激後の IFN-γ産生能を調べた。さらにその細胞の 2 次免疫応答を *in vivo* で評価するため、骨髄由来樹状細胞を IL-4 と GM-CSF で誘導し OVA ペプチドをパルスした後、経静脈的に投与して、OT-I 細胞の増殖を検討した。また、腫瘍を再投与して OT-I 細胞の動態も確認した。

2）腫瘍切除モデルでの解析

同様に OT-I 細胞を移入した系を用いて、EG.7 接種後 14 日目に外科的腫瘍切除を行い、腫瘍接種 21 日目（外科的切除後 7 日目）に OT-I 細胞の数をリンパ節、脾臓、末梢血でフローサイトメータを用いて解析し、非切除群と比較検討した。さらにそのメモリーマーカー（CD44、CD62L、IL-7Rα、IL-2Rβ）を検討すると共にその機能（IFN-γ、Granzyme B）について解析し、非切除群と比較した。

結果および考察

1. 新規免疫チェックポイント分子探索

腫瘍を皮下接種後、脾臓において誘導される OT-I 細胞は、皮下腫瘍結節を認める 7 日目でクローン増殖が始まり検出でき、以後腫瘍の増大に伴い増殖し 14 日目でピークを迎え、21 日目にはその数が減少してきていた（図 1b、c)。OT-I 細胞におけるペプチド刺激後の IFN-γの産生能は、14 日目では 70%であったが 21 日目には 35%まで有意に低下していた（図 1d)。細胞傷害活性の指標であるグランザイムの発現は、14 日目で 30%であったが 21 日目にはほとんど検出できなかった（図 1e)。一方、免疫チェックポイント分子として PD-1 の発現を検討すると、14 日目に 80%程度誘導され 21 日目には 70%程度と横ばいであった（図 1f)。これらの結果からピーク時の 14 日目は活性化 CD8T 細胞が誘導されているが、21 日目は機能的に低下し腫瘍の増大に伴い疲弊化が進んでいると判断した。そこで、14 日目を活性化細胞、21 日目を疲弊化細胞として脾臓において誘導される OT-I 細胞をセルソーター（FACS Aria）で単離した。ソート後の細胞純度をフローサイトメータで解析すると 14 日目、21 日目共に 100%であった（図 1g)。ソートを行った後の細胞数を検討すると、14 日目が 6×10^5 cells、21 日目が 2×10^5 cells で 10^5オーダーの細胞が得られていた。これらの細胞から RNA を抽出しその量を定量したところ、それぞれ 21.9 ng/μl、5.9 ng/μl であった。得られた RNA 量から疲弊化がすすむ 21 日目は細胞数が減るため網羅的解析を行う前に PCR での増幅が必要であることがわかった。また、それぞれの RNA 分解度の解析を行なったところ RIN 値は 5.0 未満であり、ソーティング操作の過程で細胞ダメージが加わっている可能性があった。ダメージを与えないような工夫をこらし RIN 値を高められるか検討を行っていく必要がある。RIN 値の高い条件設定を行ってから網羅的解析を行う必要がある。

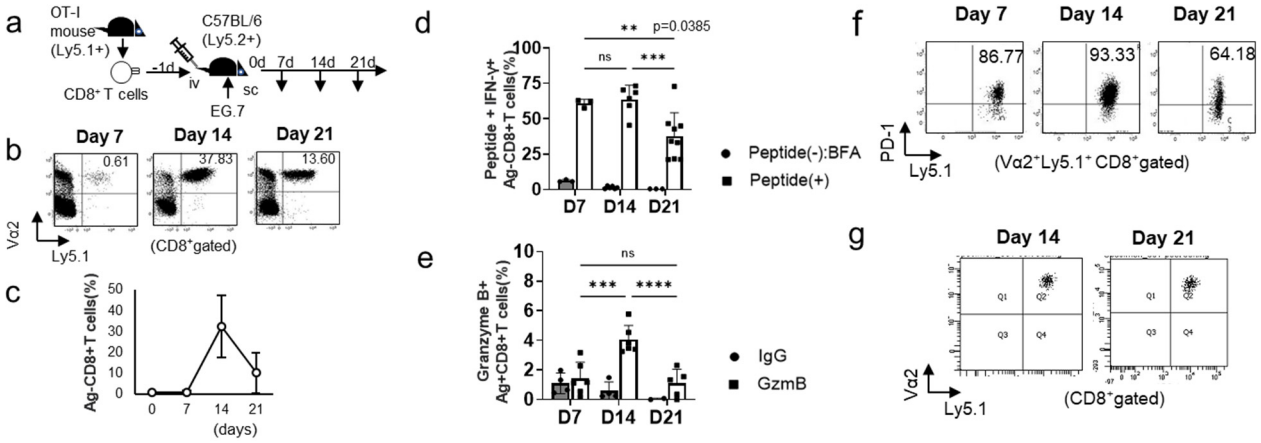


図 1. モデルにおける OT-I 細胞の疲弊化とセルソーターでの単離

a) OT-I 細胞を用いた抗原特異的 CD8T 細胞の解析モデル。

b) モデルにおける OT-I 細胞率の経時的変化。

c) OT-I 細胞絶対数の経時的変化（n＝5）。

d) OT-I 細胞のペプチド刺激後 IFN-γ産生能の経時的変化（n＝8）。独立標本 t-検定、**p＜0.01、***p＜0.05。

e) OT-I 細胞の細胞内グランザイム発現の経時的変化（n＝8）。独立標本 t-検定、***p＜0.05、****p＜0.001。

f) OT-I 細胞における PD-1 発現率の経時的変化。

g) 腫瘍接種 14 日目と 21 日目の脾臓における OT-I 細胞ソーティング後の純度。

2. 局所療法後のメモリー細胞の産生・維持の分子機構の解明

1）放射線照射モデルでの解析

照射後 7 日目に腫瘍は CR となり以後再発を認めなかった（図 2b）。照射後 7 日目の OT-I 細胞の割合と絶対数は、非照射群と比較しリンパ組織（脾臓、所属リンパ節）だけでなく非リンパ組織（肝臓、肺）でも著明に増加していた（図 2c～e）。照射群と非照射群共に $CD44^+$、$CD62L^-$、IL-7Rα^+、IL-2Rβ^+でありエフェクターメモリータイプの細胞が多く誘導されていた（図 2f、g）。絶対数では照射群は IL-7Rα^+および IL-7Rα^-共に増えておりエフェクター細胞とエフェクターメモリー細胞が共に増加していた。これらの細胞の長期的維持を 60 日目で検討すると、リンパ節、脾臓、肺、肝臓、末梢血いずれにおいても維持されており、表面マーカーもメモリー細胞となっていた（図 3a、b）。これらメモリー細胞の 2 次免疫応答を調べるため、60 日目以降に骨髄由来樹状細胞に OVA ペプチドをパルスし経静脈的に移入すると、すみやかに増殖し細胞傷害活性を示しメモリー細胞として機能があることがわかった（図 3c、d）。腫瘍を再投与すると脾臓におけるメモリー細胞は増殖し腫瘍は生着しなかった（図 3e、f）。これらの結果から照射で誘導される OT-I 細胞は、メモリー細胞が多く、再発制御に関わる可能性が示唆された。その細胞は IL-7R を発現し IL-7 が有効な癌免疫療法の候補として期待されることが明らかとなった。

2）腫瘍切除モデルでの解析

腫瘍切除後 7 日目の OT-I 細胞の割合は、非切除群に比較してリンパ節では差がなかったが、脾臓と末梢血において有意に多かった（図 4a）。また、表面マーカーの解析では、切除群の脾臓において IL-7Rαの発現割合が有意に上昇していた（図 4b）。その細胞の機能としてペプチド刺激後の IFN-γ産生能は、切除と非切除間では差を認めなかった。表面マーカーでは、エフェクターメモリー細動が誘導されていたことから、外科的切除後でも IL-7 によるアジュバント療法が有効な可能性が示唆された。

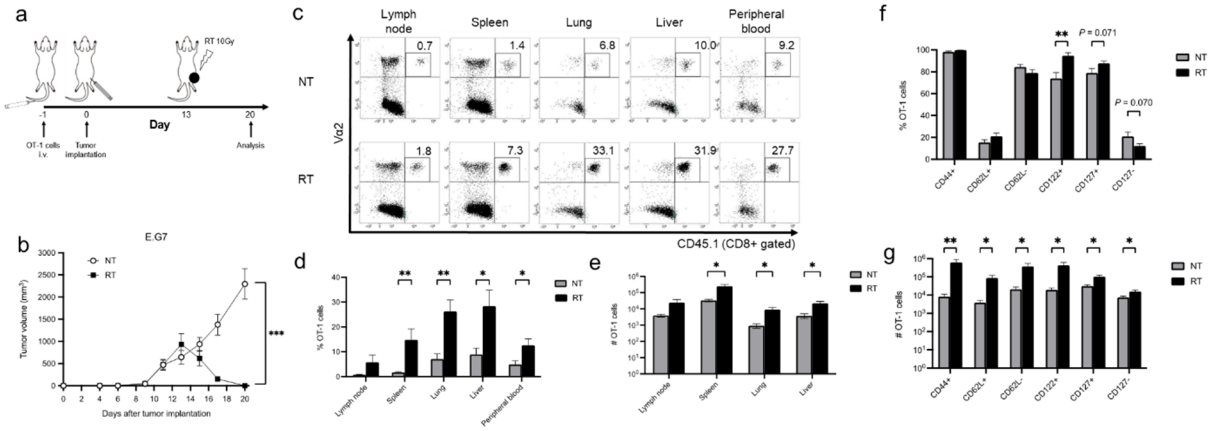


図 2. 放射線照射後 7 日目の OT-I 細胞誘導

a) OT-I 細胞を用いた放射線照射後の抗原特異的 CD8T 細胞解析モデル。

b) モデルでの照射による腫瘍増殖抑制効果。独立標本 t-検定、***p＜0.005。NT：非照射群、RT：照射群。

c) 照射群と非照射群での各リンパ組織、各非リンパ組織における OT-I 細胞の割合。NT：非照射群、RT：照射群。

d) 照射群と非照射群での各リンパ組織、各非リンパ組織における OT-I 細胞率の比較（n＝5）。独立標本 t-検定、*p＜0.05、**p＜0.01。NT：非照射群、RT：照射群。

e) 照射群と非照射群でのリンパ節、脾臓、肺、肝臓、末梢血における OT-I 細胞絶対数の比較（n＝5）。独立標本 t-検定、*p＜0.05。NT：非照射群、RT：照射群。

f) 照射群と非照射群の脾臓における OT-I 細胞における各表面マーカー発現率の比較（n＜5）。独立標本 t-検定、**p＜0.01。NT：非照射群、RT：照射群。

g) 照射群と非照射群の脾臓における OT-I 細胞における各表面マーカー発現細胞数の比較（n＝5）。独立標本 t-検定、*p＜0.05、**p＜0.01。NT：非照射群、RT：照射群。

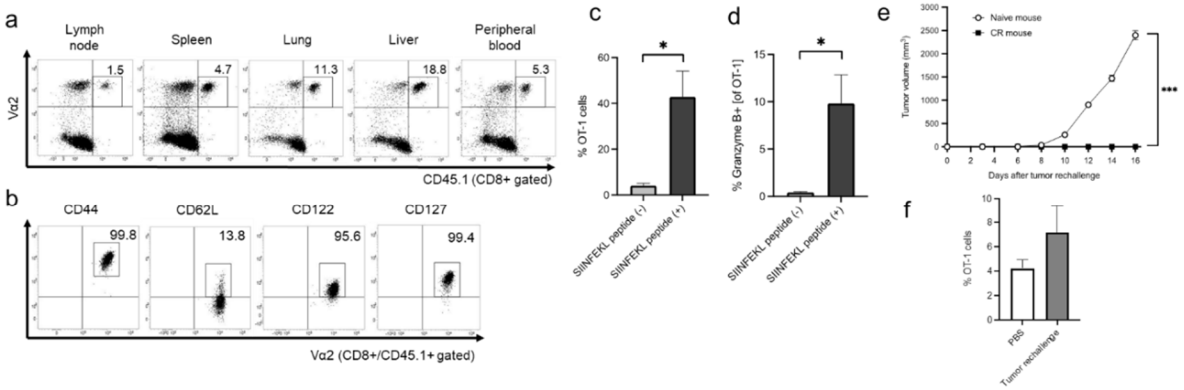


図 3. 放射線照射 60 日後の OT-I 細胞の維持

a) 放射線照射 60 日後の各リンパ組織、各非リンパ組織における OT-I 細胞の割合。

b) 脾臓 OT-I 細胞における各メモリーマーカーの発現率。

c) ペプチドパルス骨髄由来樹状細胞投与後の OT-I 細胞の割合。独立標本 t-検定、*p＜0.05。

d) ペプチドパルス骨髄由来樹状細胞投与後の OT-I 細胞のグランザイム発現率。独立標本 t-検定、*p＜0.05。

e) CR 例の EG.7 皮下再投与後の腫瘍増殖曲線、独立標本 t-検定、***p＜0.005。

f) EG.7 皮下再投与後の OT-I 細胞の割合。

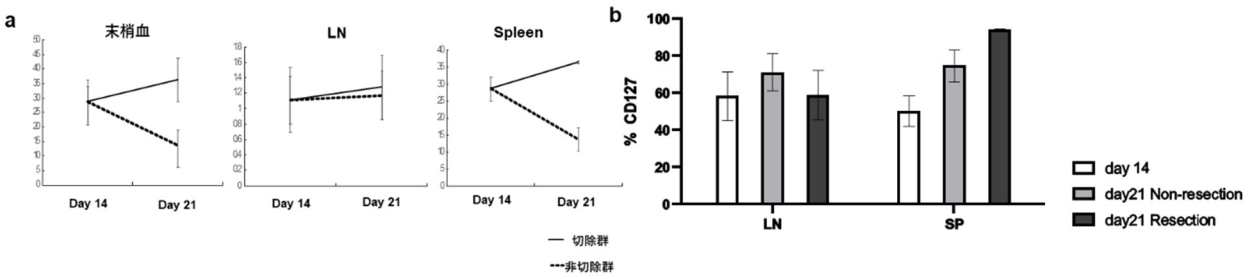


図 4. 外科的腫瘍切除後 7 日目の OT-I 細胞誘導

a) 腫瘍切除前（Day 14）、腫瘍切除後または腫瘍非切除 7 日目（Day21）の OT-I 細胞率。

b) 腫瘍切除前（Day 14）、腫瘍切除後または腫瘍非切除 7 日目（Day21）の OT-I 細胞における IL-7Rα陽性率。

共同研究者

本研究の共同研究者は、群馬大学大学院先端腫瘍免疫治療学講座の矢島俊樹である。

文　献

1) Reck M, Rodríguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csőszi T, Fülöp A, Gottfried M, Peled N, Tafreshi A, Cuffe S, O'Brien M, Rao S, Hotta K, Leiby MA, Lubiniecki GM, Shentu Y, Rangwala R, Brahmer JR; KEYNOTE-024 Investigators. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2016 Nov 10;375(19):1823-1833. Epub 2016 Oct 8.PMID: 27718847 Clinical Trial. DOI: 10.1056/NEJMoa1606774.

2) Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E, Holgado E, Barlesi F, Kohlhäufl M, Arrieta O, Burgio MA, Fayette J, Lena H, Poddubskaya E, Gerber DE, Gettinger SN, Rudin CM, Rizvi N, Crinò L, Blumenschein GR Jr, Antonia SJ, Dorange C, Harbison CT, Graf Finckenstein F, Brahmer JR. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2015 Oct 22;373(17):1627-39. Epub 2015 Sep 27.PMID: 26412456 DOI: 10.1056/NEJMoa1507643.

3) Brahmer J, Reckamp KL, Baas P, Crinò L, Eberhardt WE, Poddubskaya E, Antonia S, Pluzanski A, Vokes EE, Holgado E, Waterhouse D, Ready N, Gainor J, Arén Frontera O, Havel L, Steins M, Garassino MC, Aerts JG, Domine M, Paz-Ares L, Reck M, Baudelet C, Harbison CT, Lestini B, Spigel DR.Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 2015 Jul 9;373(2):123-35. Epub 2015 May 31.PMID: 26028407 DOI: 10.1056/NEJMoa1504627.

4) Yajima T, Hoshino K, Muranushi R, Mogi A, Onozato R, Yamaki E, Kosak a T, Tanaka S, Shirabe K, Yoshikai Y, Kuwano H. Fas/FasL signaling is critical for the survival of exhausted antigen-specific CD8+ T cells during tumor immune response. Mol Immunol. 2019 Mar;107:97-105. Epub 2019 Jan 30. PMID: 30711908 DOI: 10.1016/j.molimm.2019.01.014.

5) Hudson WH, Gensheimer J, Hashimoto M, Wieland A, Valanparambil RM, Li P, Lin JX, Konieczny BT, Im SJ, Freeman GJ, Leonard WJ, Kissick HT, Ahmed R. Proliferating Transitory T Cells with an Effector-like Transcriptional Signature Emerge from PD-1^{+} Stem-like CD8^{+} T Cells during Chronic Infection.Immunity. 2019 Dec 17;51(6):1043-1058. Epub 2019 Dec 3.PMID: 31810882 DOI: 10.1016/j.immuni.2019.11.002.

6) Hashimoto M, Kamphorst AO, Im SJ, Kissick HT, Pillai RN, Ramalingam SS, Araki K, Ahmed R. CD8 T Cell Exhaustion in Chronic Infection and Cancer: Opportunities for Interventions. Annu Rev Med. 2018 Jan 29;69:301-318. PMID: 29414259 DOI:10.1146/annurev-med-012017-043208.

7) Im SJ, Hashimoto M, Gerner MY, Lee J, Kissick HT, Burger MC, Shan Q, Hale JS, Lee J, Nasti TH, Sharpe AH, Freeman GJ, Germain RN, Nakaya HI, Xue HH, Ahmed R. Defining CD8+ T cells that provide the proliferative burst after PD-1 therapy. Nature. 2016 Sep 15;537(7620):417-421. Epub 2016 Aug 2.PMID: 27501248 DOI: 10.1038/nature19330.