

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏 名	高橋 美帆
学 位	博士 (医学)
学 位 記 番 号	新大院博 (医) 第 1051 号
学位授与の日付	令和4年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名	PD-1 blockade therapy augments the antitumor effects of lymphodepletion and adoptive T cell transfer. (抗 PD-1 抗体治療はリンパ球除去と T 細胞移入という養子免疫療法による抗腫瘍効果を高増強する)
論文審査委員	主査 教授 土田 正則 副査 教授 川島 寛之 副査 准教授 坂田 純

博士論文の要旨

背景：近年癌免疫療法は著しく発展し、免疫チェックポイント阻害薬はがん薬物療法として重要となっている。中でも抗 PD-1 抗体は PD-1/PD-L1 経路を介し、疲弊した T 細胞を再活性化させ抗腫瘍効果を得ている。過去に申請者らのグループで化学療法または放射線療法によるリンパ球減少状態からの回復期を利用し、ナイーブ T 細胞からエフェクター T 細胞を誘導可能であり、抗腫瘍効果を増強できることを報告してきた。一方リンパ球除去と T 細胞移入による、腫瘍局所の免疫チェックポイント分子の発現や T 細胞疲弊へ影響は明らかではない。

目的：リンパ球除去と T 細胞移入の併用による腫瘍局所の免疫チェックポイント分子、および T 細胞疲弊への影響を明らかにする。リンパ球除去、T 細胞移入と抗 PD-1 抗体の併用による抗腫瘍効果を検討する。

方法：B6 マウスと、免疫原性の高いマウス由来の腫瘍細胞株である MCA205 (fibrosarcoma)、B16F10 (melanoma) を使用した。皮下にこれらの腫瘍細胞を接種し、リンパ球減少状態の誘導として 500cGy の全身照射、ならびに別の B6 ドナーマウスの脾臓細胞由来のナイーブ T 細胞を尾静脈から注入し、エフェクター T 細胞を誘導した。また、これら治療に加え、抗 PD-1 抗体を腹腔内投与した。腫瘍局所の免疫状態の評価のため、皮下腫瘍組織を回収、単細胞浮遊液を作成し、フローサイトメトリーで免疫チェックポイント分子の発現を評価した。ドナーとして Ly5.1 congenic B6 マウスを用い、ドナー由来 Ly5.1 陽性 T 細胞、レシピエント由来 Ly5.2 陽性 T 細胞の表面抗原をそれぞれ評価した。

結果：MCA205、B16F10、および腫瘍局所の免疫細胞 (CD4、CD8、CD56、CD11b、CD11c、F4/80 陽性細胞) 上の PD-L1 発現を評価した。全身照射や T 細胞移入では、腫瘍細胞上の PD-L1 発現に変化は認められなかった。一方で、照射と T 細胞移入の群で、レシピエント T 細胞と比較しドナー T 細胞上の PD-L1 発現が有意に低下していた。続いて、照射、T 細胞移入療法の腫瘍局所の免疫チェックポイント分子発現への影響を評価した。ドナー CD4 陽性細胞における PD-L1、TIGIT、TIM-3、LAG-3 発現は、レシピエントと比較し有意に低下していた。同様に、ドナー CD8 陽性細胞上の PD-L1、PD-1、ICOS、TIM-3、LAG-3 の発現はレシピエントよりも有意に

低下していた。

次に照射と T 細胞移入療法に抗 PD-1 抗体を併用し、抗腫瘍効果の増強を検討した。腫瘍を皮下接種し、全身照射、ナイーブ T 細胞移入、抗 PD-1 抗体投与の治療を行い、週に 2-3 回腫瘍サイズを計測した。3 つの併用治療群で、腫瘍の成長は有意に抑制された。また照射に替えてシクロホスファミド、エトポシド、パクリタキセル、ゲムシタビンを投与し、T 細胞移入、抗 PD-1 抗体投与を行った。パクリタキセル、T 細胞移入、抗 PD-1 抗体の併用群で、抗腫瘍効果の有意な増強が認められた。

これらの抗腫瘍効果における CD4、CD8 陽性 T 細胞の関与を評価した。全身照射、ナイーブ T 細胞移入、抗 PD-1 抗体の 3 つの併用治療後に、抗 CD4 または抗 CD8 抗体を腹腔内投与し、CD4、CD8 陽性細胞を除去すると抗腫瘍効果は消失した。またドナー T 細胞から CD4 または CD8 陽性細胞を除去し移入した場合も、抗腫瘍効果は消失していた。抗 NK1.1 抗体を投与し NK 細胞を除去した場合は、抗腫瘍効果は減弱しなかった。

過去に申請者らのグループでは、照射などのリンパ球減少状態で抑制性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg) の割合が増加し、Treg の除去により抗腫瘍効果の増強が得られることを報告した。今回、併用療法による腫瘍局所での Treg と骨髄由来抑制性細胞 (Myeloid-derived suppressor cell: MDSC) への影響を評価した。腫瘍局所における CD4 陽性 Foxp3 陽性 Treg の割合は、照射単独群で最も高く、照射と T 細胞移入や抗 PD-1 抗体の併用群、無治療群の順で有意に高い割合を示した。腫瘍局所における MDSC の割合は、各治療群では差がなかった。

照射、リンパ球移入、抗 PD-1 抗体併用療法後に残存する Treg を、抗 CD25 抗体を用いて除去し、Treg による本療法への影響を検討した。腫瘍接種 3 日後に全身照射、T 細胞移入、抗 PD-1 抗体、Treg の除去を行ったところ、更なる抗腫瘍効果の増強を認めた。

考察：リンパ球除去、T 細胞移入後の腫瘍局所では、ドナー T 細胞は疲弊しておらず、抗腫瘍効果増強の機序の一つと考えられた。また抗 PD-1 抗体の併用による T 細胞移入療法の抗腫瘍効果の増強には、レシピエント T 細胞の再活性化が関わっている可能性が示唆された。

リンパ球除去、T 細胞移入、抗 PD-1 抗体の併用治療により抗腫瘍効果の増強が示され、より臨床に近い抗癌剤投与モデルでも T 細胞移入と抗 PD-1 抗体の併用効果が認められた。CD4、CD8 陽性細胞が併用治療において重要であり、さらに Treg の除去により効果の増強が示され相互作用を持つことが明らかになった。

審査結果の要旨

近年癌免疫療法は著しく発展し重要な存在となっている。今回リンパ球除去と T 細胞移入の併用による腫瘍局所の免疫チェックポイント分子、T 細胞疲弊への影響を評価し、抗 PD-1 抗体の併用による抗腫瘍効果を検討された。

マウスモデルを用いて腫瘍組織を回収、単細胞浮遊液を作成しフローサイトメトリーを行った。

結果は腫瘍局所において、照射と T 細胞移入の群で、レシピエント T 細胞と比較しドナー T 細胞上の PD-L1 発現が有意に低下していた。照射と T 細胞移入に抗 PD-1 抗体を併用した群で、腫瘍の成長は有意に抑制された。Treg の割合は無治療群と比較し照射単独群や照射と T 細胞移入の併用群で優位に高く、MDSC の割合は各治療群で差がなかった。照射と T 細胞移入、抗 PD-1 抗体の併用に加え、Treg 除去で抗腫瘍効果の増強を認めた。

本研究では、抗 PD-1 抗体が宿主のコンディショニングにより効果増強が得られる点において今後の臨床応用においても示唆的である。リンパ球除去と T 細胞移入後の腫瘍局所ではドナー T 細胞の疲弊が抑制されていることから抗 PD-1 抗体によりレシピエント T 細胞の再活性化が抗腫瘍効果に影響した可能性が示唆された。現在免疫療法を併用した治療戦略が期待されることから本論文は有意義な研究であり博士論文としての価値に値する。