

# IL-12/IL-23p40モノクローナル抗体製剤ウステキヌマブの 腫瘍抗原特異的細胞傷害性T細胞（CTL）に対する影響

西澤 幹則<sup>1)</sup>・成田美和子<sup>1)</sup>・岩谷 俊平<sup>1)</sup>・大岩 恵理<sup>1)</sup>  
岩渕 南<sup>1)</sup>・内山 孝由<sup>1)</sup>・松山 麻子<sup>2)</sup>・高橋 益廣<sup>1)</sup>

**Key words** : ウステキヌマブ, 乾癬, 抗原特異的細胞傷害性T細胞, 樹状細胞, 抗腫瘍免疫

**要旨** ウステキヌマブはヒト型抗ヒト interleukin (IL)-12/IL-23p40モノクローナル抗体製剤であり, 乾癬の治療に用いられている。しかし, IL-12は抗腫瘍免疫において重要な役割を担うため, ウステキヌマブによる腫瘍発生率の増加が懸念されている。今回の検討では, ウステキヌマブの抗原特異的癌免疫における影響を明らかにすることを目的とした。乾癬患者に対する *in vivo* の検討では, ウステキヌマブの投与により乾癬症状は改善されたが, 腫瘍抗原特異的細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の frequency は投与開始以降も抑制されることはなかった。また *in vitro* の検討では, 樹状細胞の抗原提示能及び抗原特異的 CTL の誘導に対するウステキヌマブの抑制効果は確認できなかった。これらの結果から, ウステキヌマブは樹状細胞の機能や腫瘍抗原特異的 CTL の誘導を抑制することなく乾癬症状を改善することが可能であり, ウステキヌマブ治療症例における腫瘍発症の増加は見られないという最近の臨床試験の知見を支持するものと考えられた。

## 緒言

乾癬とはケラチノサイトの過剰増殖を特徴とするT細胞介在性自己免疫性皮膚疾患である。その病態には, IL-12/IL-23により naïve CD4陽性 T 細胞から誘導・活性化された T helper(Th)-1・Th-17が深く関与している。ウステキヌマブはヒト型抗ヒト IL-12/IL-23p40モノクローナル抗体製剤であり, IL-12及び IL-23の p40サブユニットに特異的に結合することで IL12/IL23の活性を阻害する<sup>1)</sup>。近年の臨床研究では, 乾癬の治療におけるウステキヌマブの明確な有効性及び安全性が報告されている<sup>2,3)</sup>。

IL-12は naïve CD4陽性 T 細胞の Th-1への分化を誘導し, Th-1の IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  の産生を増強させる<sup>4)</sup>。また, NK 細胞や CTL の機能を活性化し, それらのサイトカイン産生能及び細胞傷害活性を増強させることにより抗腫瘍活性を有する<sup>5)</sup>。それ故に, ウステキヌマブによる治療を受けた患者において, 抗腫瘍免疫が阻害されることにより, 腫瘍の発症リスクが増加す

る可能性が考えられる。ウステキヌマブを用いた phase II/III の臨床研究において, ウステキヌマブによる治療を受けた乾癬患者群とコントロール群との比較では, 腫瘍発症率に差は確認されなかったと報告されている<sup>6)</sup>。しかし一方で, 別のヒト型抗ヒト IL-12/IL-23p40モノクローナル抗体製剤であるバリアキヌマブを用いた臨床研究では, バリアキヌマブによる治療を受けた患者において非メラノーマ性皮膚癌の発生が増加したという報告がある<sup>7)</sup>。

ウステキヌマブのよる治療を受けた患者において, ウステキヌマブは memory CD4陽性細胞のサイトカイン産生能及び naïve CD4陽性 T 細胞の Th-1, Th-2または Th-17への分化に対して影響を及ぼすことなく乾癬を改善することができると報告されている<sup>8)</sup>。しかしながら, ウステキヌマブの樹状細胞及び CD8陽性 T 細胞に対する影響については未だ検討されていない。そこで, 本研究では がん抗原ペプチド投与により *in vivo* で 抗原特異的CD8 陽性CTLの誘導が確認された乾癬症例において, CTLの frequency に対するウステ

1) 新潟大学大学院保健学研究科血液・腫瘍検査学

2) 新潟大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野

平成26年2月24日受理

キヌマブの効果についての検討を行った。さらに, *in vitro* において樹状細胞の抗原提示能及び 抗原特異的 CD8陽性CTL の誘導に対してウステキヌマブの影響があるか否かを検討した。

## 材料と方法

### 症例

60歳男性。56歳の頃に健常人ボランティアとして20回の改変型 WT1 (mWT1) ペプチドの投与を受けた。mWT1ペプチドの投与終了後, ウステキヌマブの使用基準 (Psoriasis Area and Severity Index : PASI $\geq$ 10, Body Surface Area : BSA $\geq$ 10%) を満たしたため, 乾癬の治療のためにウステキヌマブの投与を開始した。

### mWT1ペプチド投与

大坂大学のプロトコールに従い mWT1ペプチド 3 mg を DMSO で溶解後, 5 %ブドウ糖液にて希釈し, モンタナイドを加えて emulsion を作成した。そして, その1 mg を上腕に皮下注射した。1 ~11回目は2週間間隔で, その後は4週間間隔で投与した。

### ウステキヌマブ投与

ウステキヌマブ45 mg を皮下注射した。1, 2回目は4週間間隔で, その後は12週間間隔で投与した。

### 細胞培養

PMDC11は10% fetal bovine serum (FBS) 添加 Iscov's Modified Dulbecco's medium (IMDM : Life Technologies Corporation, CA) で培養を行った。

### サイトカインとペプチドおよび試薬

IL-2 (シオノギ製薬, 大阪), IL-4 (R&D system, Minneapolis, MN), IL-7 (R&D system, Minneapolis, MN), Granulocyte Macrophage colony-stimulating Factor (GM-CSF : Kirin Brewery, 群馬), mWT1ペプチド (HLA-A\*24:02-restricted, 9-mer peptide ; CYTWNQMNL : Neo MPS, San Diego, CA), lipopolysaccharide (LPS : SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO), ウステキヌマブ (Stelara® : ヤンセンファーマ, 東京) を用いた。

### フローサイトメトリーによる解析

培養細胞にFc $\gamma$ レセプターブロック試薬を加え 4℃, 10分間反応させ, 各染色抗体で 4℃, 20分間

染色した。抗体及び tetramer は, fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗体 : IgG1 (BD Biosciences, San Jose, CA), CD8 (Biolegend, San Diego, CA), phycoerythrin (PE) 標識抗体 : IgG1, CD8 (BD Biosciences), mWT1/MHC tetramer (HLA-A:24:02 WT1 (mutant) tetramer-CYTWNQMNL-PE, 医学生物学研究所, 長野) を使用した。染色後, phosphate buffered saline (PBS) で1回洗浄し, FACSCalibur (BD Biosciences) で測定し, CellQuest Pro (BD Biosciences) で解析した。

### 混合リンパ球ペプチド培養法 (mixed lymphocyte peptide culture : MLPC)

健常人及び乾癬患者由来の末梢血単核球を5%自己血清 (5%AS) 添加 RPMI1640で $3 \times 10^6$  cells/ml に調節し, mWT1ペプチドを加え十分に混和した。PBMNCとペプチドの混和液を100  $\mu$ l ずつ96-well U-bottom plate に,  $3 \times 10^5$  cells/well でペプチド終濃度10  $\mu$ g/ml となるように播種した。3日後にIL-2 50 U/ml, 5%AS 添加 RPMI1640培地を100  $\mu$ l ずつ各 well に加えた。その後2日毎に培地の半分を新しい IL-2 50 U/ml, 5%AS 添加 RPMI1640培地と交換した。培養2週目に mWT1/major histocompatibility complex (MHC) tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞をフローサイトメトリーで解析した。また, mWT1/MHC tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の frequency は以下の計算式により算出した。Frequency = (mWT1/MHC tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞が検出された well 数) / [(well 当たりの培養単核球数)  $\times$  (培養 well 数)  $\times$  (CD8<sup>+</sup>細胞の割合)]

### MLPC 法におけるウステキヌマブの作用

MLPC 開始から1週間後, 各 well の細胞を等しく2つの well に分配し, 1つの well は IL-2 50 U/ml, 5%AS 添加 RPMI1640培地で培養を続け, もう1つの well はウステキヌマブ 10  $\mu$ g/ml, IL-2 50 U/ml, 5%AS 添加 RPMI1640培地で培養を続けた。その後2日毎に培地の半分を新しい培地と交換した。分配培養1週目に mWT1/MHC tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞をフローサイトメトリーで解析した。

### 単球由来樹状細胞 (monocyte derived dendritic cell : moDC) の誘導

健常人由来の末梢血単核球を plastic culture dish に播種し, 37℃で培養した。培養後, 非付着細胞を取り除き付着細胞を分離した。分離した付着細胞に IL-4 5 ng/ml, GM-CSF 50 ng/ml, 10%FBS 添加 RPMI1640培

地を加え37℃で6日間培養した。6日後, IFN- $\gamma$  1000 U/ml, LPS 0.1 mg/ml を加え, さらに24時間培養し moDC を誘導した。

#### 抗原提示能の測定

moDC, PMDC11の抗原提示能を混合白血球培養法 (mixed leukocyte culture : MLC) を用いて測定した。刺激細胞には moDC 及び PMDC11を用いた。反応細胞には健康人由来の末梢血単核球を用いた。回収した moDC 及び PMDC11は, RPMI1640培地で3回洗浄後, 10%FBS 添加 RPMI1640培地で $1 \times 10^4$  cells/100  $\mu$ l に調節し, 30 Gy の $\gamma$ 線照射を行った。その後96-well U-bottom plate に100  $\mu$ l ずつ播種した。健康人由来の末梢血単核球は10%FBS 添加 RPMI1640培地で $1 \times 10^5$  cells/100  $\mu$ l に調整後, プレートの各 well に100  $\mu$ l ずつ分注し, 5日間刺激細胞との共培養を行った。培養培地にはウステキヌマブ0  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml または100  $\mu$ g/ml となるように添加した。反応細胞の増殖の程度は, $^3$ H-thymidine の取り込みによって測定した。共培養後, 各 well に $^3$ H-thymidine (Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom) を0.02 MBq (0.5  $\mu$ Ci) 添加し, 24時間後, cell harvester (Bramdel, Gaithersburg, MD) を用いて細胞を回収し, 液体シンチレーションカウンター (アロカLSC-3100, アロカ株式会社, 東京) で測定した。実験は全て triplicate で行った。

#### PMDC 刺激培養法 (抗原特異的 CTL 誘導)

健康人由来の末梢血単核球から Anti-FITC Microbeads MACS system (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) を用いて CD8 $^+$ 細胞を分離した。分離した細胞は90%以上が CD8陽性細胞であった。それを $1 \times 10^6$  cells/well ずつ12-well plate, 2 well に播種し, 1つの well にはウステキヌマブを10  $\mu$ g/ml となるように添加した。

抗原提示細胞には PMDC11を用いた。PMDC11は $1 \times 10^6$  cells/ml に調整し, mWT1ペプチドを10  $\mu$ g/ml となるように加え, 37℃で24時間培養した。培養後, RPMI1640培地で3回洗浄し, 30 Gy の $\gamma$ 線照射を行った。その後 $5 \times 10^5$  cells/well ずつ well に加え抗原提示細胞と CD8 $^+$  T (すべてTを加える) 細胞を共培養した。共培養開始3日目に IL-2, IL-7をそれぞれ50 U/ml, 10 ng/ml となるように加え, 以後は2日毎に培地の半分を新しい IL2 50 U/ml, IL-7 10 ng/ml, 5%AS 添加 RPMI1640 培地と交換し, 一方の well にはウステキヌマブ 10  $\mu$ g/ml を添加した。抗原提示細胞による再刺激は毎週行

い, 培養2週目より mWT1/ MHC tetramer $^+$ CD8 $^+$  T細胞をフローサイトメトリーで解析した。

#### 統計解析

統計解析は GraphPad Prism software (GraphPad Prism Inc, San Diego, CA) を用いて行い, 統計差は対応のある t 検定により評価した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

#### 結果

##### 抗原特異的 CTL の frequency に対するウステキヌマブの効果

新潟大学倫理委員会の承認後, 56歳男性ボランティアに mWT1ペプチドの皮下注射を行った。mWT1/ MHC tetramer $^+$ CD8 $^+$ 細胞はペプチド投与前には検出されなかったが, 1回目の投与直後から検出され, 繰り返しのペプチド投与により mWT1/ MHC tetramer $^+$ CD8 $^+$ 細胞の frequency は CD8陽性細胞 $10^6$ 個中15個以上にまで増加した。mWT1ペプチドの投与終了後, 56週経過した後も同様の mWT1/ MHC tetramer $^+$ CD8 $^+$ 細胞の frequency が維持されている (図1)。

本ボランティアには10年以上にわたる乾癬が認められた。mWT1ペプチドの投与終了後32ヶ月経過した時点から, 乾癬の治療のためにウステキヌマブの投与を開始した。治療効果はウステキヌマブ投与開始から2週間後に現れ, 12週目の時点で乾癬病変はほぼ消失した。ウステキヌマブによる副作用は治療開始から今に至るまで現れていない。mWT1/ MHC tetramer $^+$ CD8 $^+$ 細胞の frequency はウステキヌマブの投与開始以降も以前と同様に検出され, mWT1/ MHC tetramer $^+$ CD8 $^+$ 細胞の frequency に対するウステキヌマブの影響は見られなかった (図1)。

##### MLPC 法におけるウステキヌマブの効果

次に in vitro において, MLPC 法による mWT1特異的 CTLの誘導に対するウステキヌマブの影響の有無を検討した。培養開始から1週間後, 各 well の細胞を等しく2つの well に分配し, 一方の wellにウステキヌマブ 10  $\mu$ g/mlとなるように加え培養を続けた。分配培養1週目にmWT1テトラマーの解析を行い, mWT1特異的 CTL のmWT1テトラマー平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity : MFI) 及びその陽性分画の割合について比較を行った。ウステキヌマブの添加の有無に関わらず, mWT1特異的 CTL が誘導され, mWT1特

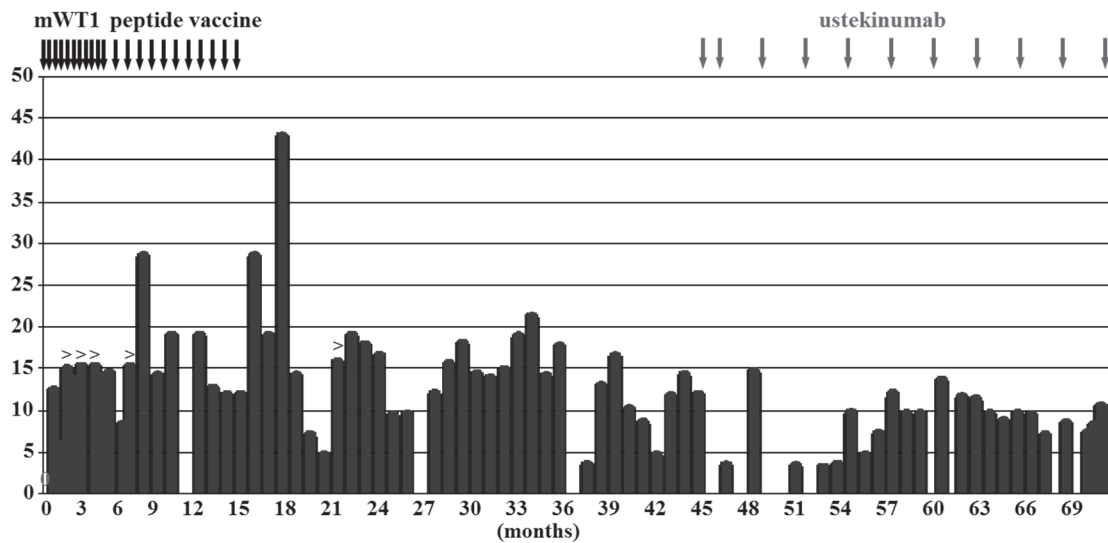


図1. mWT1ペプチドワクチン及びウステキヌマブの投与を受けた乾癬患者における mWT1/ MHC tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の frequency の経時的変化

乾癬患者由来の末梢血単核球を用いてMLPCを行い, CD8陽性細胞10<sup>6</sup>個中の mWT1/ MHC tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の個数を算出した。

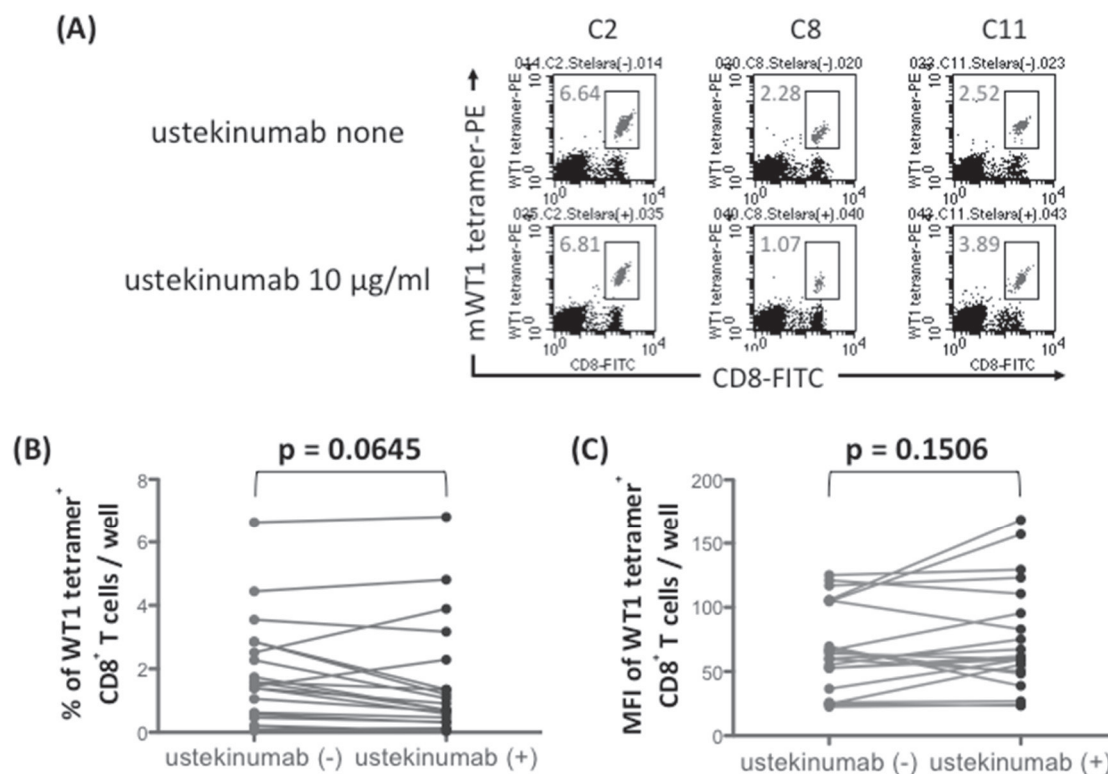


図2. MLPC 2分割培養法におけるウステキヌマブの効果の検討

(A) MLPC 法の培養1週目に分割して, ウステキヌマブ添加・非添加培養した細胞の mWT1/ MHC tetramer 解析の結果。解析は20 well行い, その内の代表的なデータを示した。ドットプロット内の数値は培養細胞中の mWT1/ MHC tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の割合を表している。(B) 分割培養した細胞中のmWT1/ MHC tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の割合の比較。(C) 分割培養した細胞中のmWT1/ MHC tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の MFI の比較。



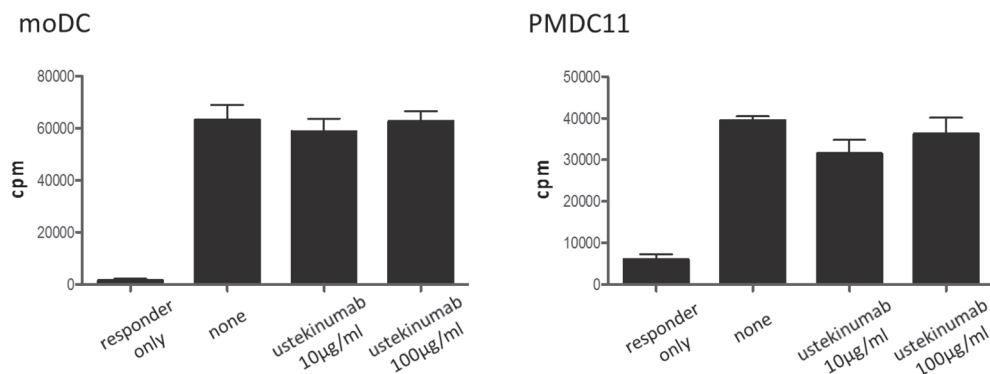


図3. moDC 及び PMDC11の抗原提示能に対するウステキヌマブの効果の検討

moDC, PMDC11の抗原提示能に対するウステキヌマブの効果を MLC により評価した。同種末梢血単核球 $1 \times 10^5$  cells/wellと  $\gamma$ 線照射したmoDC, PMDC11を $1 \times 10^4$  cells/well 濃度で共培養し, 培養培地にはウステキヌマブを0  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/mlまたは100  $\mu$ g/mlとなるように添加した。培養後, 同種末梢血単核球の $^3$ H-thymidine の取り込みを測定することで抗原提示能の評価を行った。測定はすべて triplicate で行った。

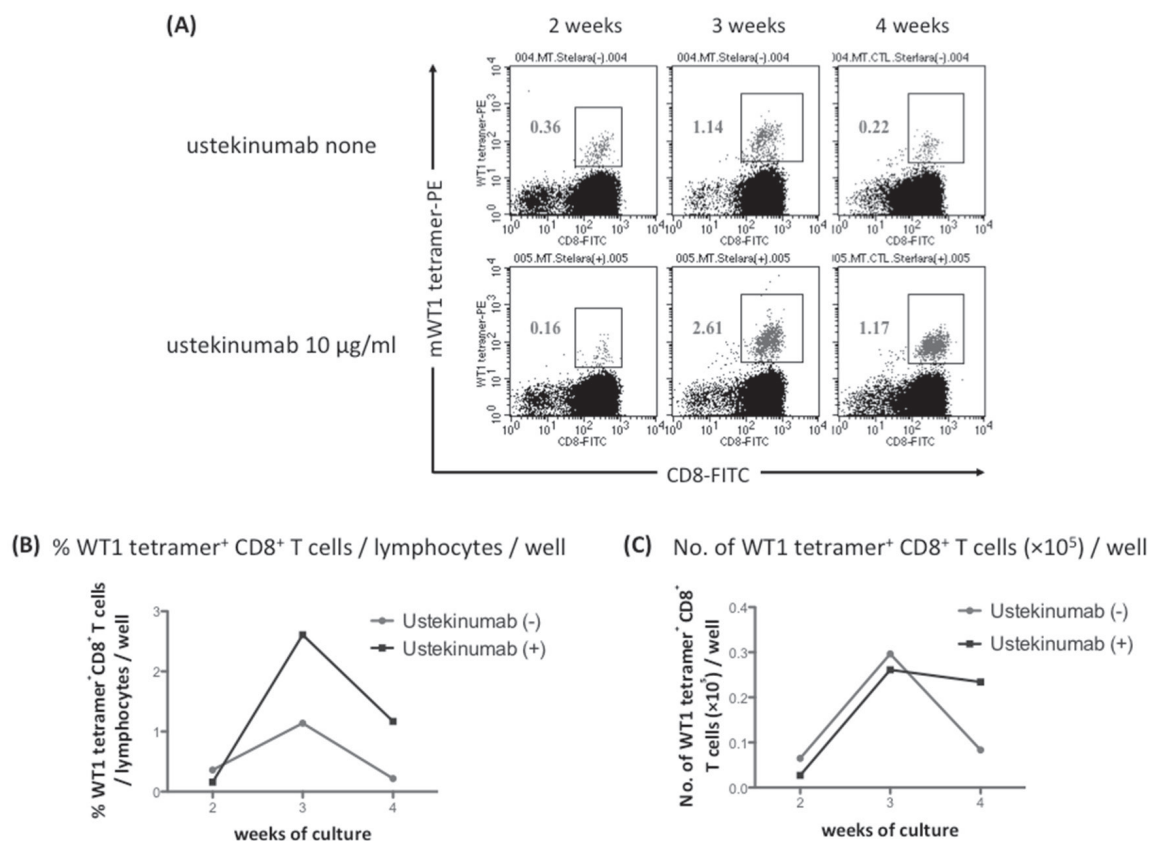


図4. PMDC 刺激培養法によるmWT1特異的CTL の誘導におけるウステキヌマブの効果の検討

(A) 抗原提示細胞に mWT1ペプチドをパルスした PMDC11を用い, 純化 CD8<sup>+</sup>細胞と抗原提示細胞を2:1で共培養を行った。培養培地はウステキヌマブ非添加または10  $\mu$ g/mlとなるように添加したものをを用いた。抗原提示細胞による再刺激は1週間毎に行い, 培養2週目から mWT1 tetramer 解析を行った。ドットプロット内の数値は培養細胞中 mWT1/ MHC tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の割合を表している。(B) PMDC 刺激培養法で培養した細胞中のmWT1/ MHC tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の割合(%)の変化。(C) PMDC 刺激培養法で培養した細胞中のmWT1/ MHC tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の絶対数 ( $\times 10^6$ ) の変化。

異的 CTL の MFI とその割合共に有意差は確認されなかった (図2A, 2B, 2C)。

#### 樹状細胞の抗原提示能におけるウステキヌマブの効果

樹状細胞 (dendritic cell : DC) は強力な抗原提示細胞であり, T 細胞の免疫応答に関して重要な役割を担っている。当研究室で樹立した白血病性形質細胞様樹状細胞株 PMDC05 及びその誘導株である PMDC11 は, 抗原提示細胞としての機能を有することが報告されている<sup>9,10)</sup>。そこで, 樹状細胞の抗原提示能に対するウステキヌマブの影響について, moDC 及び PMDC11 を用いて検討した。刺激細胞として moDC, PMDC11 を用いて MLC を行い, 培養培地にはウステキヌマブを 0 µg/ml, 10 µg/ml または 100 µg/ml となるように添加した。その結果, moDC, PMDC11 共にウステキヌマブの添加により細胞の増殖に差はなく, 樹状細胞の抗原提示能におけるウステキヌマブの影響は見られなかった (図3)。

#### PMDC 刺激培養法におけるウステキヌマブの効果

樹状細胞の抗原提示能におけるウステキヌマブの影響がないことが確認されたので, 実際に PMDC11 を用いた腫瘍抗原特異的 CTL の誘導に対してウステキヌマブの影響があるか否かを検討した。健康人由来 CD8<sup>+</sup>T 細胞と mWT1 ペプチドをパルスした PMDC11 を共培養し, mWT1 特異的 CTL を誘導した。培養培地にはウステキヌマブを 0 µg/ml または 100 µg/ml となるように添加した。ウステキヌマブの添加の有無に関わらず mWT1 特異的 CTL が誘導され, ウステキヌマブの影響により抗原特異的 CTL の誘導が抑制されないことが確認された (図4A, 4B, 4C)。

#### 考察

乾癬は T 細胞介在性自己免疫性皮膚疾患であり, その病因には環境的・遺伝的要因の複雑な相互作用が関与している<sup>11)</sup>。乾癬は Th-1 が関与した皮膚疾患と認識されていたが, 近年 IL-23 及び Th-17 がその機序に強く関与していると考えられており<sup>12)</sup>, 乾癬患者の皮膚病変部周辺では IL-23 が高発現していると報告されている<sup>13)</sup>。真皮樹状細胞から過剰分泌された IL-23 は Th-17 を活性化し炎症性サイトカインである IL-17A, IL-17F, IL-22 や IFN  $\gamma$  の分泌を増強する。これらのサイトカインは表皮のケラチノサイト・線維芽細胞に多面的に作用し, ケラチノサイト・線維芽細胞の過剰増殖

を誘導し乾癬症状を引き起こす<sup>12)</sup>。また, 活性化されたケラチノサイト・線維芽細胞は IL-6 や TNF  $\alpha$  などの炎症性サイトカイン及び CXCL1, CXCL2, CCL20 や CXCL8 のような炎症性ケモカインを産生し, これが好中球, リンパ球やマクロファージを刺激し局所的な皮膚炎症を導く<sup>14)</sup>。それ故に, IL-23 の作用を阻害することは乾癬のような T 細胞介在性自己免疫性皮膚疾患に対する治療に有効な方法と考えられる。ウステキヌマブはヒト型抗ヒト IL-12/IL-23p40 モノクローナル抗体製剤であり, IL-12 及び IL-23 の p40 サブユニットに特異的に結合し, IL-12/IL-23 の活性を阻害する作用を持つ<sup>2)</sup>。近年, ウステキヌマブは乾癬の治療に用いられ始め, 臨床試験においてその有用性と安全性が報告されている。

IL-12 は naïve CD4 陽性 T 細胞の Th-1 への分化を誘導する他に, T 細胞, NK 細胞や NKT 細胞の機能を活性化し, それらの IFN  $\gamma$  産生能及び細胞傷害活性を増強させる。また IL-12 を投与した担癌マウスにおいて, 抗血管新生ケモカインである IFN- $\gamma$ -inducible protein-10 (IP10 ; CXCL10) や monokine induced by IFN- $\gamma$  (MIG ; CXCL9) が腫瘍組織内で増加すると報告されている。IP10 及び MIG は腫瘍組織内の血管新生の阻害作用に加え, 活性化した T 細胞や NK 細胞に発現している CXCR3 レセプターを介して, これらの細胞を腫瘍組織へと誘導する作用を有する<sup>15)</sup>。さらに, IP10 は腫瘍組織に浸潤した CTL の機能及び生存能を増強する<sup>16)</sup>。それ故に, IL-12 は強力な抗腫瘍活性を有するサイトカインであり, ウステキヌマブにより抗腫瘍免疫が抑制される可能性が考えられる。

臨床試験で確認されたウステキヌマブの主な副作用は気道感染症, 鼻咽頭炎, 頭痛や注射部位の発赤などである。重篤な感染症や腫瘍の発生という副作用はウステキヌマブを用いた治療期間中及び治療完了後も確認されておらず, 腫瘍発生率もコントロール群と比較して有意差は確認されていない<sup>17)</sup>。しかし一方で, 別のヒト型抗ヒト IL-12/IL-23p40 モノクローナル抗体製剤であるバリアキヌマブを用いた 2520 人を対象とした臨床研究では, バリアキヌマブによる治療を受けた患者で重篤な感染症や基底細胞癌, 扁平上皮癌などの副作用が確認されたと報告されている<sup>7)</sup>。

今回の検討では, 我々は mWT1 ペプチドの投与により mWT1 特異的 CTL が誘導された乾癬患者において腫瘍抗原特異的 CTL の frequency に対するウステキヌマブの影響を調査した。ウステキヌマブ投与開始から 2.5 年以上経過しても腫瘍抗原特異的 CTL の frequency は

投与開始前と同等のレベルで検出された。それに加えMLPC法を用いた *in vitro* での検討においても、培養細胞中の mWT1/ MHC tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞の割合及び平均蛍光強度に対するウステキヌマブの影響は認められなかった。

ヒト樹状細胞は、形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cell : pDC) と骨髓系樹状細胞 (myeloid dendritic cell : mDC) に大きく分類される。樹状細胞は最も強力な抗原提示細胞であり、naïve T 細胞を活性化して、初期の細胞免疫応用を開始させる。当研究室において樹立した白血病性形質細胞様樹状細胞株 PMDC05は、pDCとmDCの両方の性質を併せ持つことが確認されている<sup>18)</sup>。PMDC05を用いてCTLを誘導することが可能であり、PMDC05にレンチウイルスベクターを用いてCD80遺伝子を導入した誘導株であるPMDC11は、PMDC05よりも優れた抗原提示能を有することが報告されている<sup>9,10)</sup>。そこで、本検討において健康人由来の単球より誘導した moDC 及び PMDC11の抗原提示能、PMDC11を用いた腫瘍抗原特異的 CTL の誘導におけるウステキヌマブの影響を検討した。MLC の検討では、ウステキヌマブの添加量に関わらず樹状細胞の抗原提示能への影響は認められなかった。PMDC刺激培養法による検討では、ウステキヌマブは腫瘍抗原特異的 CTL の誘導を抑制しないことが確認された。これより、樹状細胞による抗原特異的CTLの誘導にはIL-12の関与は少なく、CD80やCD86などの共刺激分子を介したシグナル伝導やCD40-CD40Lを介した相互活性化作用が強く関与している可能性が示唆された。

これらの *in vivo/in vitro* の結果は、ウステキヌマブは腫瘍抗原特異的CTLの誘導を抑制することなく、乾癬症状を改善できることを示唆しており、ウステキヌマブによる腫瘍発生率の有意な増加は認められないという近年の臨床研究の知見を支持するものと考えられる。今後は CTL と同様に抗腫瘍免疫において重要な役割を担うNK 細胞に対するウステキヌマブの作用についても検討する必要があると思われる。

## 参考文献

- 1) Luo J, Wu SJ, Lacy ER, et al. Structural basis for the dual recognition of IL-12 and IL-23 by ustekinumab. *J Mol Biol.* 2010;402(5):797-812.
- 2) Igarashi A, Kato T, Kato M, et al. Efficacy and safety of ustekinumab in Japanese patients with moderate-to-severe plaque-type psoriasis: long-term results from a phase 2/3 clinical trial. *J Dermatol.* 2012;39(3):242-52.
- 3) Lin VW, Ringold S, Devine EB. Comparison of Ustekinumab With Other Biological Agents for the Treatment of Moderate to Severe Plaque Psoriasis: A Bayesian Network Meta-analysis. *Arch Dermatol.* 2012;148(12):1403-10.
- 4) Klink DJ 2nd. A multiscale systems perspective on cancer, immunotherapy, and Interleukin-12. *Mol Cancer.* 2010;9:242.
- 5) Gately MK, Renzetti LM, Magram J, et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:495-521.
- 6) Gordon KB, Papp KA, Langley RG, et al. Long-term safety experience of ustekinumab in patients with moderate to severe psoriasis (Part II of II): results from analyses of infections and malignancy from pooled phase II and III clinical trials. *J Am Acad Dermatol.* 2012;66(5):742-51.
- 7) Langley RG, Papp K, Gottlieb AB, et al. Safety results from a pooled analysis of randomized, controlled phase II and III clinical trials and interim data from an open-label extension trial of the interleukin-12/23 monoclonal antibody, briakinumab, in moderate to severe psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2013;27(10):1252-61.
- 8) Tsuda K, Yamanaka K, Kondo M, Matsubara K, et al. Ustekinumab improves psoriasis without altering T cell cytokine production, differentiation, and T cell receptor repertoire diversity. *PLoS One.* 2012;7(12):e51819.
- 9) Yamahira A, Narita M, Nakamura T, et al. Generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes using a leukemic plasmacytoid dendritic cell line as antigen presenting cells. *Leuk Res.* 2011;35(6):793-9.
- 10) Yamahira A, Narita M, Ishii K, et al. Enhancement of antigen presenting ability in the leukemic plasmacytoid dendritic cell line (PMDC05) by lentiviral vector-mediated transduction of CD80 gene. *Leuk Res.* 2012;36(12):1541-6.
- 11) Nestle FO, Kaplan DH, Barker J. Psoriasis. *N Engl J Med.* 2009;361(5):496-509.
- 12) Di Meglio P, Nestle FO. The role of IL-23 in the immunopathogenesis of psoriasis. *F1000 Biol Rep.* 2010;2: pii: 40.
- 13) Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL, et al. Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med.* 2004;199(1):125-30.
- 14) Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology.* 2010;129(3):311-21.
- 15) Nagai H, Oniki S, Fujiwara S, et al. Antimelanoma immunotherapy: clinical and preclinical applications of IL-12 family members. *Immunotherapy.* 2010;2(5):697-709.
- 16) Yang X, Chu Y, Wang Y, et al. Targeted *in vivo* expression of IFN-gamma-inducible protein 10 induces specific antitumor activity. *J Leukoc Biol.* 2006;80(6):1434-44.
- 17) Croxtall JD. Ustekinumab: a review of its use in the management of moderate to severe plaque psoriasis. *Drugs.* 2011;71(13):1733-53.
- 18) Narita M, Watanabe N, Yamahira A, et al. A leukemic plasmacytoid dendritic cell line, PMDC05, with the ability to secrete IFN-alpha by stimulation via Toll-like receptors and present antigens to naïve T cells. *Leuk Res.* 2009;33(9):1224-32.

## Effects of anti-IL-12/IL-23p40 monoclonal antibody (ustekinumab) on tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs)

Yoshinori NISHIZAWA<sup>1)</sup>, Miwako NARITA<sup>1)</sup>, Shunpei IWAYA<sup>1)</sup>  
Eri OIWA<sup>1)</sup>, Minami IWABUCHI<sup>1)</sup>, Takayoshi UCHIYAMA<sup>1)</sup>  
Asako MATSUYAMA<sup>2)</sup>, Masuhiro TAKAHASHI<sup>1)</sup>

1) Laboratory of Hematology and Oncology, Graduate School of Health Sciences, Niigata University

2) Division of Dermatology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University

**Key words :** Ustekinumab, Psoriasis, Antigen specific cytotoxic T lymphocytes, Dendritic cells, Anti-tumor immunity

**Abstract** Ustekinumab (a humanized monoclonal antibody against the common p40 subunit shared by IL-12 and IL-23) blocks the pathways of T helper (Th) -1 and Th-17, which play pivotal roles in cell-mediated immunity and production of pro-inflammatory cytokines. Ustekinumab is currently used for the treatment of moderate to severe psoriasis with remarkable efficiency. However, worries about the development of malignancies in ustekinumab-treated patients could not be completely cleared because of the major role of IL-12 and IL-23 in tumor immunity. In the present study, we tried to elucidate the effects of ustekinumab on antigen-specific tumor immunity. A 56 years-old male volunteer was subcutaneously administered with 20 times of WT1 peptide. WT1 tetramer<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells appeared after the first peptide administration and the frequency of WT1 tetramer<sup>+</sup> T cells elevated to more than 15 in 10<sup>6</sup> CD8<sup>+</sup> T cells. He began to be treated with subcutaneous injections of ustekinumab for moderate psoriasis. Psoriasis plaques were almost cleared up at week 12. The frequency of WT1 tetramer<sup>+</sup> T cells with cytotoxic ability has not changed for 22 months since the initiation of ustekinumab treatment. The effects of ustekinumab on antigen presenting and CTL inducing abilities of dendritic cells were explored *in vitro*, resulting in little effects on both immune functions. These *in vivo/vitro* findings imply that ustekinumab improves psoriasis without suppressing tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes and support the data of recent clinical trials showing a comparable incidence of malignancies between ustekinumab-treated psoriatic patients and the control.

Accepted : 2014.2.24