

論文の内容の要旨

論文題目 抗 4-1BB 抗体を用いた腫瘍内細胞傷害性 T 細胞の選択的活性化

氏名 野地秀一

研究の背景と目的

1991年に細胞傷害性Tリンパ球(cytotoxic T lymphocyte:CTL)の標的となる腫瘍特異抗原が同定された。その後、数多くの腫瘍抗原が同定され、それらを標的とした癌特異的免疫療法がさまざまな癌に対して試みられている。「がんワクチン」や「細胞移入治療」などの癌特異的免疫療法において、CTLなどのT細胞が腫瘍排除の中心的役割を担っている。しかしながら、腫瘍内は免疫抑制性環境であり、腫瘍に対する免疫応答が誘導されているにも関わらず、抗腫瘍効果を得ることができないことが問題となっている。そこで、本研究では、腫瘍特異的 CTL に対して、腫瘍内の免疫抑制性環境に打ち勝つ強力な活性化を引き起こす免疫増強法を検討した。

一般的に T 細胞が活性化、増殖、分化し、CTL としてのエフェクター機能を獲得するには、抗原認識(シグナル 1)と共刺激分子を介した補助シグナル(シグナル 2)の 2 つのシグナルが必要である。正と負の制御作用を持つ共刺激分子に対する抗体を用いて、抗腫瘍免疫反応を増強する治療法が、すでに試みられている。しかしながら、正の共刺激分子である CD28 に対する完全ヒト型抗 CD28 モノクローナル抗体製剤 TGN1412 の臨床治験においては、活性化された T 細胞からの急激なサイトカイン放出が全身性の炎症反応を引き起こす「サイトカインストーム」による重大な副作用が発生した。

また、4-1BB を標的とした免疫増強法についても、すでに検討がなされているが、抗腫瘍効果の増強を目的として高用量の抗 4-1BB 抗体を反復投与した報告例においては、抗原非特異的な CD8⁺T 細胞の活性化による有害事象を認めており、また実際にヒトにおいても肝炎などの有害事象を生じたため、臨床試験が中断されている。このため、共刺激分子を標的とした抗体治療においては、腫瘍内に浸潤し、腫瘍を認識した腫瘍特異的 CTL においてのみ発現している共刺激分子を選択することが望ましい。4-1BB に対しても、その発現パターンを詳細に解明し、抗 4-1BB 抗体の標的に特異性を持たせることによって、従来の抗体治療における問題点を克服できると考えた。

そこで本研究において、はじめにマウスの腫瘍特異的 CTL 治療モデルを用いて、標的とする CTL の体内動態を検討した。次に、4-1BB は、腫瘍以外の組織に浸潤した CTL および宿主免疫細胞には発現がみられず、腫瘍内の腫瘍特異的 CTL に選択的に発現している共刺激分子であることを示し、腫瘍内の CTL を選択的に活性化する標的分子としての有用性を

検証した。そして、実際に、4-1BB を標的とした刺激抗体を用いることにより、他の臓器を傷害することなく、腫瘍内の腫瘍特異的 CTL を選択的に活性化し、抗腫瘍効果の増強が得られるかを検討した。

方法と結果

C57BL/6 マウスに B16F10 メラノーマ細胞を皮下接種して担癌マウスを作成した。B16F10 に発現する腫瘍抗原 gp100 特異的な T 細胞受容体遺伝子 (TCR) が導入された Pmel-1 マウスから分離した脾細胞を、樹状細胞により刺激することで、B16F10 メラノーマ細胞特異的 CTL を誘導した。刺激後 3 日目の抗原特異的 CTL は、活性化エフェクター細胞に特徴的な細胞表面マーカーを発現しており、この CTL を B16F10 接種から 9 日目の担癌マウスに投与した。

CTL 治療後 5 日目の腫瘍体積では、無治療群($370 \pm 204.9 \text{mm}^3$)に対し、CTL 投与群($93.6 \pm 42.3 \text{mm}^3$)では有意な腫瘍の増殖抑制がみられた($p < 0.05$)。投与した CTL は投与後 1 日目から腫瘍内へ浸潤し始め、投与後 3 日目に腫瘍内へ著しく浸潤していた。また、CTL は末梢血、所属リンパ節、脾臓、肺、肝など腫瘍以外の全身組織へも浸潤していた。

CTL 治療後 3 日目に全身の CTL について、共刺激分子の発現をフローサイトメーターで解析したところ、CD27、CD28、GITR は腫瘍内だけではなく、全ての組織の CTL において強い発現がみられた。これらに対し、OX40 と 4-1BB は腫瘍内の CTL においては発現がみられたが、腫瘍以外の組織における CTL では発現がみられなかった。腫瘍内の CTL において、4-1BB の発現($40.3 \pm 3.8\%$)は、OX40 の発現($9.1 \pm 0.3\%$)に比べ高く、4-1BB がより有望な共刺激分子と考えられた。

CTL の抗原認識に伴う共刺激分子の発現変化を検討したところ、4-1BB は naïve CTL では発現がみられず、樹状細胞による抗原刺激を受けると、その発現は上昇した。投与時に 4-1BB の発現が低下した後、CTL が腫瘍内に浸潤すると再びその発現は強く上昇した。このことから、CTL が腫瘍内に浸潤し抗原認識をすることにより、4-1BB は CTL 上に誘導されたと考えられた。

さらに、CTL 治療後の各組織における宿主の CD8、NK、CD4 細胞の 4-1BB 発現について検討した。これらの宿主免疫細胞では、腫瘍内においてのみ 4-1BB の発現がみられ、腫瘍以外の組織においては 4-1BB の発現はほとんどみられなかった。

以上の結果から、4-1BB は腫瘍以外の組織における CTL および宿主免疫細胞には発現せず、腫瘍内に浸潤し腫瘍を認識した CTL で発現が増強しており、腫瘍特異的 CTL を選択的に活性化させる最も有望な標的分子であると考えられた。

そこで、4-1BB のアゴニストである抗 4-1BB 抗体の CTL に対する作用について、はじめに *in vitro* で検討した。抗 4-1BB 抗体は、抗原認識していない CTL に対しては活性化しないが、抗原認識し 4-1BB の発現が増強した CTL を強く活性化し、IFN- γ 産生を増強していた。

次に、CTL 治療モデルに抗 4-1BB 抗体投与を併用して抗腫瘍効果の検討を行った。腫瘍

内の CTL をすみやかに活性化するために、CTL の腫瘍内浸潤のピークである CTL 治療後 3 日目に抗 4-1BB 抗体 100 μ g を腹腔内に単回投与した。その結果、抗 4-1BB 抗体投与群では、rat IgG 抗体投与群と比べ、CTL 治療後 7 日目以後、抗腫瘍効果が増強していた($p < 0.05$)。

腫瘍内に浸潤した CTL 数について検討したところ、rat IgG 抗体投与群と比較して抗 4-1BB 抗体投与群で、腫瘍内 CTL の増加はみられなかった。次に腫瘍内における CTL の IFN- γ 発現を検討したところ、抗体投与から 6 時間後で、rat IgG 抗体投与群($11.6 \pm 1.7\%$)と比較して、抗 4-1BB 抗体投与群($17.7 \pm 2.9\%$)において増強を認めた($p < 0.01$)。また、IFN- γ^+ 細胞の MFI(Mean fluorescence intensity)についても、rat IgG 抗体投与群($24.8 \pm 3.6\%$)と比較して、抗 4-1BB 抗体投与群($33.9 \pm 6.1\%$)では増強がみられた($p < 0.05$)。細胞傷害性顆粒タンパク質である Granzyme B においても、同様の結果が得られた。これらのことから、4-1BB 刺激によって、腫瘍内の CTL において、1 つ 1 つの細胞あたりのエフェクター機能が増強されていることが示された。

抗 4-1BB 抗体投与によって、腫瘍内 CTL では IFN- γ 産生の増強がみられたが、腫瘍以外の組織内の CTL においては、抗 4-1BB 抗体投与による IFN- γ の産生増強は全くみられなかった。宿主の CD8、NK、CD4 細胞においても、抗 4-1BB 抗体投与による IFN- γ 産生の増強はみられなかった。すなわち 4-1BB 刺激は、腫瘍を含む各組織において、宿主免疫細胞を活性化しないことが確認された。病理組織学的検査においても、抗 4-1BB 抗体の投与により、脾、肺、肝の各組織における炎症所見などはみられなかった。

以上のことから、4-1BB 刺激は、腫瘍以外の臓器傷害を起こさずに、腫瘍内の腫瘍特異的 CTL を選択的に活性化し、抗腫瘍効果を増強することが示された。

考察

本研究において、4-1BB は、腫瘍以外の組織に浸潤した CTL および宿主免疫細胞には発現がみられず、腫瘍内の腫瘍特異的 CTL に選択的に発現している共刺激分子であることを示し、4-1BB を標的とした刺激抗体を用いることにより、他の臓器を傷害することなく、腫瘍内の腫瘍特異的 CTL を選択的に活性化し、抗腫瘍効果の増強が得られることを明らかにした。

抗 4-1BB 抗体を用いた臨床試験において、高用量の抗体を反復投与したことによって、ポリクローナルな CD8⁺T 細胞を活性化し、肝炎を生じた例が報告されている。本研究において抗 4-1BB 抗体は、腫瘍以外の組織における CTL や、腫瘍を含む各組織における宿主免疫細胞を活性化しなかった。腫瘍内へ浸潤し 4-1BB 発現の増強した CTL を活性化することを目的として、CTL の腫瘍内浸潤のピークを狙って抗 4-1BB 抗体を単回投与したことが、有害事象の防止に結びついたと考えられる。

今日では臨床試験として、免疫細胞における共刺激分子を標的とした抗体治療が盛んに行われている。有害事象を生じたために臨床試験が中断されている抗 4-1BB 抗体においても、T 細胞の抗原認識や活性化・分化に伴った共刺激分子の時間的な発現変化と、共刺激分

子を発現する細胞の種類や存在部位をしっかりと把握し、腫瘍内に標的となる 4-1BB 分子を発現する腫瘍特異的エフェクター細胞を集積させた上で、刺激抗体を投与することにより、有害事象を起こさずに、強力な抗腫瘍効果を得ることが可能であった。免疫刺激分子を標的とする抗体治療においては、標的分子の発現制御メカニズムに基づいた治療戦略が重要である。