

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

小野 翔矢

論文題目

口腔扁平上皮癌の CCR4 標的制御性 T 細胞 (Treg) 除去療法に MEK1/2 阻害薬が与える細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 減少の緩和効果

I. 緒言

近年、がん免疫療法の新たなターゲットとして、制御性 T 細胞 (Treg) が注目されている。Mogamulizumab は抗 C-C chemokine receptor type4 (CCR4) モノクローナル抗体で、Treg 除去療法の候補薬剤の一つである。しかし、固形癌を対象とした第 Ia/b 相試験では、ほとんど効果がみられなかった。この失敗の一因として、抗腫瘍活性を有する CCR4⁺CD8⁺T 細胞が除去されていることが示唆されている。本研究では、抗腫瘍免疫応答に重要な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に焦点を当て、CCR4⁺CTL を保護する方法を検討した。

II. 対象および方法

1. 細胞培養

ヒト口腔扁平上皮癌 (OSCC) 細胞株である HSC-3 と、サイトメガロウイルス (CMV) pp65 抗原を導入した HSC-3pp65 を使用した。細胞株の維持には 10% ウシ胎児血清 (FBS) 含有ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を用い、HSC-3pp65 の維持には G418 (250 μ g/mL) を添加した。

リンパ球の培養には、Alys505-N 培地を用いた。

2. CMV 抗原特異的 CTL (CMV-CTL) の誘導

末梢血由来単核細胞 (PBMC) にペプチドパルスを行い、CMV-CTL を誘導した。

3. フローサイトメトリー

蛍光標識抗体を用いて、細胞を 4°C で 20 分間染色した。CMV-CTL の解析には HLA-CMVpp65 tetramer を用いて、抗体反応の前に 10 分間染色した。

4. CMV-CTL における CCR4 の発現誘導

CMV-CTL を、HSC-3pp65 または固相化した抗 CD3 抗体で 2 日間刺激した。培地には各種のサイトカイン (10ng/mL)、Trametinib (1 μ mol/L) を添加した。

5. ウェスタンブロット

PBMC から CD8⁺T 細胞を分離し、CD3/CD28 マイクロビーズで 14 日間拡大培養した。その後、トランスフォーミング増殖因子 β 1 (TGF- β 1) (10ng/mL) と Trametinib (1 μ mol/L) で 3 時間処理し、CD3/CD28 マイクロビーズで 10 分間再刺激した。細胞からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロットに供した。一次抗体には抗 Erk1/2、抗リン酸化 Erk1/2 を用いた。化学発光を行い、画像化した。

6. Annexin V による CTL の細胞傷害活性およびアポトーシスの測定

CMV-CTL を HSC-3pp65 と 24 時間共培養した。エフェクター:ターゲット (E:T) 比は 0.5 とした。Annexin V を染色し、細胞傷害活性、アポトーシス

を検討した。

7. 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) による細胞増殖の測定

HSC-3 は 7 日間、CMV-CTL は HSC-3pp65 と 2 日間培養した。E:T 比は 0.5 とした。10 μ mol/L BrdU を添加し 1 時間培養した。BrdU を染色し細胞増殖活性を検討した。

8. 細胞内サイトカイン染色

CMV-CTL を HSC-3pp65 と共培養した。E:T 比は 0.5 とした。2 時間後、1 μ g/mL モネンシンを加え、さらに 2 時間培養した。細胞を回収し、サイトカイン染色を行った。

9. KM2760 による ADCC が CMV-CTL 増殖に与える影響

0.1 μ g/mL KM2760 (脱フコシル化抗 CCR4 IgG1 キメラ抗体) を含む培地で、CMV-CTL および NK 細胞と HSC-3pp65 を共培養した。E:T 比 (CMV-CTL:HSC-3pp65 比) は 1.0 とした。5 日後に細胞を回収し、フローサイトメトリーを行った。

10. KM2760 による PBMC 中の eTreg 除去

0.1 μ g/mL KM2760 を含む培地で PBMC を培養した。7 日後に細胞を回収し、

フローサイトメトリーを行った。

1 1. 統計解析

統計解析にはEZR(ver. 3.6.1)を用いた。群間比較には両側Dunnett検定、Tukeyの多重比較検定を用いた。 p 値0.05未満を統計学的に有意とした。

III. 結果

1. CMV-CTLのCCR4発現に影響する因子

まず、CCR4発現に関わるシグナル伝達経路を探索した。CMV-CTLをHSC-3pp65と共培養すると、CMV-CTL分画にのみCCR4が発現した。また、抗CD3抗体で刺激すると、抗原特異性に関わらずCCR4が発現した。各種のサイトカインを添加すると、IL-2、IL-12、IL-15、TGF- β 1がCCR4発現を増強した。特に、TGF- β 1は著しくCCR4発現を増強した。過去の報告から、これらの受容体下流のシグナル伝達経路のうち共通性の高い経路は、MEK-ERK経路であった。

2. TCR刺激、TGF- β 1、TrametinibがCMV-CTLのCCR4発現に与える影響

前述の結果をもとに、TCR刺激、TGF- β 1、Trametinibに焦点を置き、CTLのCCR4発現に与える影響を定量的に評価した。HSC-3pp65とCMV-CTLを共

培養すると CCR4 発現が誘導され(3.14%から 29.0%)、TGF- β 1 は CCR4 発現を増強した(29.0%から 51.2%)。Trametinib は、TGF- β 1 の投与の有無に関わらず CCR4 の発現を抑制した(51.2%から 11.4%、29.0%から 6.98%)。

3. TGF- β 1、Trametinib が CD8⁺T 細胞の ERK のリン酸化に与える影響

CD8⁺T 細胞が CMV-CTL と同様の傾向で CCR4 発現を変化させることをフローサイトメトリーで確認した。CD3/CD28 刺激は ERK のリン酸化を誘導したが、TGF- β 1 は抑制的に働いた。Trametinib は、ERK のリン酸化を強く抑制した。

4. Trametinib が CTL の機能に与える影響

Trametinib の免疫療法との併用が妥当か評価するため、CTL の機能に及ぼす影響を検討した。CMV-CTL の細胞傷害活性やアポトーシスは、Trametinib によって影響を受けなかった。Trametinib は 3 人中 1 人のドナーで BrdU の取り込みを抑制したが、腫瘍細胞により選択的であった。また、Trametinib は CMV-CTL の TNF- α 、IFN- γ 発現を抑制した。

5. Trametinib が抗 CCR4 抗体による CTL および eTreg 除去に与える影響

Trametinib 併用の有効性を証明するため、Trametinib が抗 CCR4 抗体による CTL 減少を緩和し、eTreg 除去に影響しないことを示した。実験に用い

た KM2760 は、ヒト化された Mogamulizumab に対応するキメラ抗体である。

HSC-3pp65 との共培養により誘導された CCR4⁺CMV-CTL は、KM2760 により除去された。Trametinib は、CMV-CTL における CCR4 発現を抑制し、CMV-CTL 数の減少を緩和した。結果として非 Trametinib 処理群と比較し、100 または 200nmol/L Trametinib 処理群で CMV-CTL 数が有意に増加した。また、TGF- β 1 を添加すると CCR4 の発現がより顕著になり、CTL 数の変化率も増大した。

KM2760 による eTreg 除去は、PBMC を培養して評価した。eTreg は CCR4 を強く発現し、Trametinib によって抑制されなかった。その結果、eTreg 除去率は Trametinib の濃度に影響を受けなかった。

IV. 考察

本研究の結果、腫瘍上に発現する抗原は、抗原特異的 CTL にのみ CCR4 を誘導した。したがって、腫瘍浸潤 CCR4⁺CD8⁺T 細胞は腫瘍抗原特異的 CTL を含む可能性があり、保護すべき対象と考えられる。Trametinib の併用は、Mogamulizumab による Treg 除去療法から腫瘍抗原特異的 CTL を保護するための有望な選択肢である。

Trametinib は、RAS/RAF 変異を有する悪性黒色腫、非小細胞性肺癌に対して承認されている。OSCC に対しては、Trametinib を術前投与する第 II 相試験で、著しい腫瘍の縮小、ダウンスレージングが認められた。この結果

は、今後の Mogamulizumab と Trametinib の併用療法の研究対象として、OSCC が適切なターゲットの一つであることを示唆している。

本研究では、Trametinib はサイトカイン産生以外の免疫機能に負の影響を与えなかった。過去の報告でも、Trametinib は *in vitro* ではサイトカイン産生を減少させたが、*in vivo* では抗腫瘍免疫を増強させた。その一因、骨髄由来抑制細胞の抑制が挙げられる。すなわち、Mogamulizumab に対する Trametinib の併用は、Treg 選択性の向上のみでなく、より広く免疫抑制状態を解除し、抗腫瘍免疫の賦活化につながる可能性がある。

この研究には限界がある。この研究はまだヒトの腫瘍微小環境への外挿を保証するものではない。また、CCR4 発現の詳細なメカニズムを評価していない。このメカニズムの解明は、Mogamulizumab による Treg 除去療法を行う上で Trametinib の併用の適応を決定するための指標となり得る。

V. まとめ

Mogamulizumab (抗 CCR4 抗体) の臨床効果を改善させるため、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) における CCR4 発現を制御する方法を検討した。Trametinib (MEK1/2 阻害薬) は活性化 CTL における CCR4 の発現を抑制し、抗 CCR4 抗体による CTL の減少を緩和したが、エフェクター制御性 T 細胞 (eTreg) の除去に影響しなかった。これらの知見から、Trametinib は Mogamulizumab による CTL 減少を緩和するためのアジュバントとして有望で

(論文内容の要旨)

No. 8

愛知学院大学

ある。