

# 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

小 野 翔 矢

愛知学院大学大学院歯学研究科 歯科臨床系 (口腔外科学)

指導：長尾 徹 教授

愛知学院大学大学院歯学研究科博士 (歯学) 学位申請論文

The alleviation effect of cytotoxic T-lymphocyte reduction by MEK1/2 inhibitor on  
CCR4-targeted regulatory T-cell depletion therapy in oral squamous cell carcinoma

SHOYA ONO

Graduate School of Dentistry, Aichi Gakuin University

Clinical Dentistry (Oral and Maxillofacial Surgery)

Supervisor: Prof. Toru Nagao

The thesis submitted to the Graduate School of Dentistry,

Aichi Gakuin University for Ph.D. degree

本論文の基盤論文は、次のような論文です。

タイトル：Trametinib improves Treg selectivity of anti-CCR4 antibody by regulating CCR4 expression in CTLs in oral squamous cell carcinoma

掲載誌名：Scientific Reports **12**, 21678, 2022

著者：SHOYA ONO<sup>1)</sup>, SUSUMU SUZUKI<sup>2,3)</sup>, YUTARO KONDO<sup>1)</sup>, IKUKO OKUBO<sup>2)</sup>,  
MITSUO GOTO<sup>1)</sup>, TETSUYA OGAWA<sup>4)</sup>, HIDEFUMI KATO<sup>5)</sup>, HIDEAKI ITO<sup>6)</sup>,  
TAISHI TAKAHARA<sup>7)</sup>, AKIRA SATOU<sup>7)</sup>, TOYONORI TSUZUKI<sup>7)</sup>,  
KAZUHIRO YOSHIKAWA<sup>2)</sup>, TORU NAGAO<sup>1)</sup>, RYUZO UEDA<sup>3)</sup>

所属：<sup>1)</sup> Department of Maxillofacial Surgery, Aichi Gakuin University School of dentistry,  
2-11 Semori-dori, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan  
<sup>2)</sup> Research Creation Support Center, Aichi Medical University,  
1-1 Yazakokarimata, Nagakute, 480-1195, Japan  
<sup>3)</sup> Department of Tumor Immunology, Aichi Medical University School of Medicine,  
1-1 Yazakokarimata, Nagakute, 480-1195, Japan  
<sup>4)</sup> Department of Otorhinolaryngology, Aichi Medical University School of Medicine,  
1-1 Yazakokarimata, Nagakute, 480-1195, Japan  
<sup>5)</sup> Transfusion Medicine and Cell Therapy Center, Aichi Medical University Hospital,  
1-1 Yazakokarimata, Nagakute, 480-1195, Japan  
<sup>6)</sup> Department of Pathology, Aichi Medical University School of Medicine,  
1-1 Yazakokarimata, Nagakute, 480-1195, Japan  
<sup>7)</sup> Department of Surgical Pathology, Aichi Medical University School of Medicine,  
1-1 Yazakokarimata, Nagakute, 480-1195, Japan

# 目 次

I. 緒 言 .....	1
II. 対象および方法 .....	2
1. 細胞培養 .....	2
2. 臨床サンプル .....	2
3. 多重蛍光免疫染色 (MF-IHC) .....	2
4. バイオインフォマティクス解析 .....	2
5. CMV 抗原特異的 CTL (CMV-CTL) の誘導 .....	2
6. フローサイトメトリー .....	2
7. CMV-CTL における CCR4 の発現誘導 .....	4
8. ウェスタンブロット .....	4
9. 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 .....	4
10. 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) による細胞増殖の測定 .....	4
11. 細胞内サイトカイン染色 .....	4
12. KM2760 による ADCC が CMV-CTL 増殖に与える影響 .....	5
13. KM2760 による PBMC 中の eTreg 除去 .....	5
14. 統計解析 .....	5
III. 結 果 .....	5
1. 腫瘍微小環境における CCR4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> T 細胞の存在 .....	5
2. CMV-CTL の CCR4 発現に影響する因子 .....	6
3. TCR 刺激、TGF- $\beta$ 1、Trametinib が CMV-CTL の CCR4 発現に与える影響 .....	6
4. TGF- $\beta$ 1、キナーゼ阻害剤が CD8 <sup>+</sup> T 細胞の ERK、STAT3 のリン酸化に与える影響 .....	7
5. Trametinib が CTL の機能に与える影響 .....	7
6. Trametinib が抗 CCR4 抗体による CTL および eTreg 除去に与える影響 .....	8
IV. 考 察 .....	10
V. まとめ .....	15
謝 辞 .....	16
参考文献 .....	16



## 略語一覧

ADCC：抗体依存性細胞傷害  
 BrdU：5-bromo-2'-deoxyuridine  
 CCR4：C-C chemokine receptor type4  
 CMV：サイトメガロウイルス  
 CMV-CTL：サイトメガロウイルス抗原特異的細胞傷害性 T 細胞  
 CTL：細胞傷害性 T 細胞  
 DMEM：ダルベッコ改変イーグル培地  
 E:T 比：エフェクター：ターゲット比  
 eTreg：エフェクター制御性 T 細胞  
 FBS：ウシ胎児血清  
 FoxP3：Forkhead box Protein 3  
 HD：健常人ドナー  
 HLA：ヒト白血球抗原  
 HNSCC：頭頸部扁平上皮癌  
 IFN- $\gamma$ ：インターフェロン  $\gamma$   
 IL：インターロイキン  
 MF-IHC：多重蛍光免疫染色  
 NK：ナチュラルキラー  
 OSCC：口腔扁平上皮癌  
 PBMC：末梢血単核細胞  
 PBS：リン酸緩衝液  
 PBSCT：末梢血幹細胞移植  
 PD-1：programmed cell death-1  
 scRNA-seq：シングルセル RNA シークエンシング  
 TBS：トリス緩衝液  
 T<sub>CM</sub>：セントラルメモリー T 細胞  
 TCR：T 細胞受容体  
 TGF- $\beta$  1：トランスフォーミング増殖因子  $\beta$  1  
 TIL：腫瘍浸潤リンパ球  
 TNF- $\alpha$ ：腫瘍壊死因子  $\alpha$   
 Treg：制御性 T 細胞

## I. 緒 言

抗 programmed cell death-1 (PD-1) 抗体をはじめとする免疫チェックポイント阻害薬は、がん免疫療法に大きな進歩をもたらした。一方でその効果は、未だすべての患者には有益とは言いがたい。その様な中、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。Treg は抗腫瘍免疫を抑制し<sup>1)</sup>、抗 PD-1 療法の予後にも負の影響を及ぼす<sup>2, 3)</sup>。そのため、Treg 除去療法の開発が注目されている<sup>4-6)</sup>。

口腔扁平上皮癌 (OSCC) を含む頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) においても、再発または転移を有する患者に対し、抗 PD-1 療法が標準療法となっている。しかし、この治療法における全生存率の中央値は 1 年に満たないのが現状である<sup>7, 8)</sup>。この結果を受け、抗 PD-1 療法の

予後を改善すべく、他剤との併用療法が数多く試験されている<sup>9)</sup>。

HNSCC と Treg との関係に着目すると、HNSCC は他のがん種と比較して、腫瘍浸潤 Treg が多い<sup>10)</sup>。Treg のマーカーである ForkHead Box Protein3 (FoxP3) の発現と HNSCC の予後との相関には一定の見解が得られていないが<sup>11)</sup>、腫瘍内で免疫抑制活性を有する effector Treg (eTreg) は、HNSCC の予後不良因子である<sup>12, 13)</sup>。さらに、HNSCC において eTreg は PD-1 を高発現しており<sup>14)</sup>、抗 PD-1 療法の予後を増悪させる一因であると考えられる。そのため、HNSCC に対する抗 PD-1 療法と Treg 除去療法の併用は、有望な選択肢であると考えられる。

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。CCR4 は白血球の遊走に関与するケモカイン受容体であり、成人 T 細胞白血病リンパ腫に高発現している。Mogamulizumab は、この成人 T 細胞白血病リンパ腫に対して強力な抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性を有する薬剤として開発<sup>15)</sup>、上市され、ヒトに対する投与の知見が蓄積されてきた。その後の研究で、CCR4 を強く発現した eTreg も同様に、Mogamulizumab により除去されることがわかった<sup>16)</sup>。がん免疫療法では重篤な自己免疫疾患を生じることがあるが、Mogamulizumab は自己免疫疾患の抑制に重要な naïve Treg に影響を与えないため、忍容性が高い<sup>16, 17)</sup>。Treg 除去を目的とした Mogamulizumab の効果については、治療抵抗性または進行 CCR4 陰性固形癌患者を対象とした第 Ia/b 相試験の結果が報告されている<sup>18, 19)</sup>。この臨床試験では、末梢血中の eTreg の枯渇が観察されたものの、固形癌の治療効果判定のためのガイドラインである response evaluation criteria in solid tumors (RECIST) では、客観的奏功は 35 例中 1 例にみられたのみであった。さらに、免疫チェックポイント阻害薬に対する上乗せ効果も得られなかった<sup>20-22)</sup>。これらの低い奏効率の原因として、2つの仮説が考えられる。1つ目は、腫瘍浸潤 eTreg が残存していることである。末梢血中の eTreg と異なり、腫瘍浸潤 eTreg が除去されているかどうかは、まだ十分に評価されていない。2つ目は、CCR4 を発現し抗腫瘍活性を有する細胞集団、特に CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞の減少である。臨床試験の解析結果から、末梢血におけるセントラルメモリー CD8<sup>+</sup>T 細胞 (CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub>) が CCR4 を高発現し、Mogamulizumab の投与により減少することが確認された<sup>23)</sup>。さらに、HNSCC 患者において CD8<sup>+</sup>腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の一部が CCR4 を発現することもわかっている<sup>24)</sup>。CD8<sup>+</sup>TIL はそのほとんどが細胞傷害性 T 細胞 (CTL) であり、CTL は直接的に腫瘍を傷害する、抗腫瘍免疫に最も重要な細胞である。Mogamulizumab が腫瘍浸潤 eTreg を除去するならば、末梢血における

CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> と同様に、腫瘍微小環境では CTL の減少が起これと考えられる。つまり、Mogamulizumab による Treg 除去療法の効果を改善するためには、CTL の保護を考える必要がある。これらの先行研究から着想した本研究の目的は、CTL の CCR4 発現を制御し、抗 CCR4 抗体による CTL 減少を緩和する方法を探索することにある。

本研究では、腫瘍抗原の代わりにサイトメガロウイルス (CMV) 抗原を用いて、抗原刺激と CCR4 発現の関連性を評価した。その結果、CTL の CCR4 発現は T 細胞受容体 (TCR) シグナルにより誘導され、トランスフォーミング増殖因子  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) をはじめとするサイトカインにより増強されることがわかった。先行研究から、これらの受容体の下流で共通するシグナル伝達経路は MEK-ERK 経路であった<sup>24-27)</sup>。そのため、MEK1/2 阻害薬である Trametinib を CCR4 発現制御に用いる候補薬剤として選定し、抗 CCR4 抗体との併用の有効性を検討した。

## II. 対象および方法

### 1. 細胞培養

ヒト OSCC 細胞株である HSC-2、HSC-3、HSC-4 は 10% ウシ胎児血清 (FBS; HyClone Laboratories, Inc., South Logan, UT, USA) 及び 1% ペニシリンストレプトマイシン (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) 中で CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37℃ で培養した。HSC-2pp65、HSC-3pp65、HSC-4pp65 はそれぞれ HSC-2、HSC-3、HSC-4 に CMVpp65 抗原と tdTomato を強制発現させた細胞株で<sup>28)</sup>、これらの細胞株は HSC-2、HSC-3、HSC-4 と分離培養し、250  $\mu$ g/mL の G418 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を添加し維持した。

### 2. 臨床サンプル

多重蛍光免疫染色 (MF-IHC) の解析には、愛知学院大学歯学部附属病院口腔外科第二診療部において前治療を行わず切除した、舌扁平上皮癌原発巣のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。末梢血は、愛知医科大学病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科において、Stage IV の OSCC 患者から治療前に採取した。本研究はヘルシンキ宣言に基づき実施され、愛知学院大学歯学部倫理委員会 (承認番号: 82) および愛知医科大学倫理委員会 (承認番号: 2020-H033、2020-H073) の承認を得た。

### 3. 多重蛍光免疫染色 (MF-IHC)

ホルマリン固定パラフィン包埋切片を、既報に示す方法で染色した<sup>29)</sup>。一次抗体には CD3 (clone M4622; Spring

Biosciences, Eugene, OR, USA)、CD8 (clone 1A5; Biogenex, Fremont, CA, USA)、FoxP3 (clone 236A/E7; Abcam, Cambridge, UK)、CCR4 (clone KM2160; mouse anti-CCR4 mAb; Kyowa Kirin, Japan)、cytokeratin (clone CAM5.2; Biogenex) を用いた。核は DAPI (Beckman coulter, Brea, CA, USA) で染色した。画像化は Vectra (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) を用いて行った。

### 4. バイオインフォマティクス解析

舌扁平上皮癌患者腫瘍組織のシングルセル RNA シークエンシング (scRNA-seq) における expression levels を Gene Expression Omnibus からダウンロードした (August 20th, 2021 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE103322>)。expression levels とは transcripts per million (TPM) を改変し算出したもので、遺伝子間およびサンプル間の比較が可能である<sup>30)</sup>。5 人の患者の原発巣浸潤 T 細胞の expression levels を用いて、IDEP.93<sup>31)</sup> (October 15th, 2021 <http://bioinformatics.sdstate.edu/idep/>) でヒートマップ解析を行った。CCR4 は Z-score2 以上を発現ありと判定した。

### 5. CMV 抗原特異的 CTL (CMV-CTL) の誘導

ヒト白血球抗原 (HLA) -A\*02:01 または HLA-A\*24:02 拘束性の CMV-CTL を既報の通り調整した<sup>28)</sup>。CMV-CTL の誘導には、健常人または患者由来の末梢血単核細胞 (PBMC) を用いた。健常人由来の PBMC には、研究ボランティアの他、末梢血幹細胞移植ドナー由来の残余検体が含まれた。PBMC は、研究ボランティアと患者からは Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) を用いた密度勾配遠心分離法で、末梢血幹細胞移植ドナーからはアフエーシスで分離した。ドナーの詳細は表 1 に示す。

### 6. フローサイトメトリー

フローサイトメトリーに用いたマルチカラーパネルを表 2 に示す (BioLegend, San Diego, CA, USA; BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA; MBL, Tokyo, Japan)。細胞は 0.25% ヒト血清アルブミン、2.5nmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を添加したリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄し、各種蛍光標識抗体を用いて、4℃ で 20 分間染色した。CMV-CTL 集団を解析する場合は、蛍光標識 HLA-A\*02:01 CMVpp65 tetramer-NLVPMTATV または HLA-A\*24:02 CMVpp65-QYDPVAALF (MBL) を用いて、他の抗体を添加する前に 10 分間染色した。測定は BD LSRFortessa (BD Bioscience)、解析は FlowJo ver.10.8.1 (BD Bioscience) を用いて行った。

表 1 末梢血単核細胞（PBMC）ドナーの一覧

Donor	Disease	PBMC isolation method	Epitopes used for CMV-CTL induction
HD1	None	Density gradient centrifugation	QYDPVAALF (HLA-A*24:02 restricted)
HD2	None	Density gradient centrifugation	NLVPMVATV (HLA-A*02:01 restricted)
HD3	None	Density gradient centrifugation	NLVPMVATV (HLA-A*02:01 restricted)
HD4	None	Apheresis (for PBSCT)	NLVPMVATV (HLA-A*02:01 restricted)
HD5	None	Apheresis (for PBSCT)	NLVPMVATV (HLA-A*02:01 restricted)
HD6	None	Density gradient centrifugation	—
HD7	None	Density gradient centrifugation	—
Pt. 1	OSCC (tongue, T4aN2bM0)	Density gradient centrifugation	NLVPMVATV (HLA-A*02:01 restricted)
Pt. 2	OSCC (lower gingiva, T4aN2cM0)	Density gradient centrifugation	NLVPMVATV (HLA-A*02:01 restricted)

HD: healthy donor, Pt: Patient, OSCC: oral squamous cell carcinoma, CMV-CTL: cytomegalovirus specific cytotoxic T-lymphocyte, HLA: human leukocyte antigen, PBSCT: peripheral blood stem cell transplantation

表 2 フローサイトメトリーに用いたマルチカラーパネル

antibody / molecule	conjugate	clone	manufacture
CCR4 expression			
HLA-CMVpp65-tetramer	APC	-	MBL
CD8	APC-Cy7	RPA-T8	BioLegend
CCR4	BV421	L291H4	BioLegend
BrdU cell proliferation assay			
HLA-CMVpp65-tetramer	APC	-	MBL
CD8	APC-Cy7	RPA-T8	BioLegend
CCR4	BV421	L291H4	BioLegend
BrdU	FITC	3D4	BioLegend
Annexin V cytotoxicity/apoptosis assay			
HLA-CMVpp65-tetramer	APC	-	MBL
CD8	APC-Cy7	RPA-T8	BioLegend
CCR4	BV421	L291H4	BioLegend
Annexin V	FITC	-	BioLegend
Intracellular cytokine staining			
HLA-CMVpp65-tetramer	PE	-	MBL
CD8	APC-Cy7	RPA-T8	BioLegend
CCR4	BV421	L291H4	BioLegend
IFN- $\gamma$	FITC	4S.B3	eBioscience
TNF- $\alpha$	APC	Mab11	eBioscience
Effects of ADCC by KM2760 on the proliferation of CMV-CTLs			
HLA-CMVpp65-tetramer	APC	-	MBL
CD3	FITC	UCHT1	BioLegend
CD8	APC-Cy7	RPA-T8	BioLegend
CD16	BV480	3G8	BD Bioscience
CD56	PE	5.1H11	BioLegend
CCR4	BV421	L291H4	BioLegend
eTreg depletion by KM2760 in PBMCs			
CD3	BUV737	UCHT1	BD Bioscience
CD4	APC	RPA-T4	BioLegend
CD8	BUV395	RPA-T8	BD Bioscience
CD16	BV480	3G8	BD Bioscience
CD45RA	APC-Cy7	HI100	BioLegend
CD56	PE	5.1H11	BioLegend
CCR4	BV421	L291H4	BioLegend
FoxP3	Alexa488	236A/E7	BD Bioscience

CCR4: CC chemokine receptor type 4, BrdU: 5-bromo-2'-deoxyuridine, ADCC: antibody-dependent cellular cytotoxicity, eTreg: effector regulatory T-cell, PBMC: peripheral blood mononuclear cells, FoxP3: Forkhead Box P3 protein,



## 7. CMV-CTL における CCR4 の発現誘導

CMV-CTL を、CMVpp65 抗原導入 OSCC 細胞株、または  $1 \mu\text{g/mL}$  で培養プレートに固相化した抗 CD3 抗体 (clone: OKT-3, eBioscience, San Diego, CA, USA) で、5% CO<sub>2</sub> 条件下、37°C で 2 日間刺激した。培地は無血清の Alys505N-0 培地を用い、各種のサイトカイン ( $10\text{ng/mL}$ )、キナーゼ阻害剤 ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) を添加した。実験に使用したサイトカインとキナーゼ阻害剤は下記の通りである。インターロイキン (IL) -2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、TGF- $\beta$  1、TGF- $\beta$  3、腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、インターフェロン  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Miltenyi Biotec Inc., Bergisch Gladbach, Germany)、SB525334 (TGF- $\beta$  receptor 1 (TGF- $\beta$  R1) inhibitor, Selleck, Houston, TX, USA)、AZD1480 (JAK inhibitor, Selleck)、GSK1120212 (trametinib, MEK1/2 inhibitor, Selleck)

## 8. ウェスタンブロット

健康人 (HD6) 由来の PBMC から、CD8<sup>+</sup>T-cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec Inc.) と Auto MACS (Miltenyi Biotec Inc.) を用いて、CD8<sup>+</sup>T 細胞を分離した。さらに、分離した CD8<sup>+</sup>T 細胞を T-cell Activation/Expansion Kit (Miltenyi Biotec Inc.) を用いて、5% FBS、100IU/mL IL-2 含有 Alys505N-0 培地 (Cell Science & Technology Institute, Inc., Miyagi, Japan) 中で 5% CO<sub>2</sub> 条件下、37°C で 14 日間拡大培養した。拡大培養した CD8<sup>+</sup>T 細胞は、TGF- $\beta$  1 ( $10\text{ng/mL}$ ) とキナーゼ阻害剤 ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) を添加した 100IU/mL IL-2 含有 Alys505N-0 培地で 3 時間処理した後、T-cell Activation/Expansion Kit で 10 分間再刺激した。細胞はペレットにして溶解バッファー (1% TritonX-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)、2mmol/L 2-mercaptoethanol (2-ME; Sigma Aldrich)、2mmol/L EDTA 含有トリス緩衝液: TBS) で溶解した。ライセートにドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 用 sample buffer を加え、95°C で 5 分間、熱変性処理した。等量のサンプルで SDS-PAGE を行い、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレンにドライブロッティングで転写した (iBlot2, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)。5% スキムミルク (Morinaga Milk Industry, Tokyo, Japan) を添加したトリス緩衝液 (TBS) を用い、常温で 1 時間ブロッキングを行った後、4°C で一晩、一次抗体と反応させた。一次抗体には抗 Erk1/2、抗リン酸化 Erk1/2、抗 STAT3、抗リン酸化 STAT3 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を 4000 倍希釈で使用した。メンブレンを TBS で洗浄し、二次抗体と 4°C で 30 分間反応させた。二次抗体にはペルオキシダーゼポリマー抗マウスまたは抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を 400 倍希釈で用いた。メンブレンを TBS で洗浄し、SuperSignal

West Atto (Thermo Fisher Scientific) を用いて化学発光を行い、ImageQuanto LAS 500 (Cytiva, Stockholm, Sweden) で画像化した。

## 9. 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 5% FBS、100IU/mL IL-2、各種濃度の Trametinib を添加した Alys505N-0 培地で 24 時間、HSC-3pp65 と共培養した。エフェクター: ターゲット比 (E:T 比) は 0.5 とした。Annexin V の染色方法は既報の通りである<sup>29)</sup>。HSC-3pp65 に対する細胞傷害活性 (% cytotoxicity to HSC-3pp65)、CMV-CTL のアポトーシス (% apoptosis of CMV-CTLs) は以下の式に従って算出した。

$\% \text{ cytotoxicity to HSC-3pp65} = (\% \text{ annexin expression in tdTomato}^+ \text{ with each concentration trametinib}) / (\% \text{ annexin expression in tdTomato}^+ \text{ with } 0 \text{ nM trametinib}) \times 100$

$\% \text{ apoptosis of CMV CTLs} = (\% \text{ annexin expression in CD8}^+ \text{ HLA CMVpp65 tetramer}^+ \text{ with each concentration trametinib}) / (\% \text{ annexin expression in CD8}^+ \text{ HLA CMVpp65 tetramer}^+ \text{ with } 0 \text{ nM trametinib}) \times 100$

## 10. 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) による細胞増殖の測定

OSCC 細胞株は無血清 DMEM 培地で 7 日間培養した。CMV-CTL は 5% FBS、100IU/mL IL-2、各種濃度の Trametinib を添加した Alys505N-0 培地で、HSC-3pp65 と 2 日間共培養した。E:T 比は 0.5 とした。細胞増殖の測定のため、 $10 \mu\text{mol/L}$  BrdU (Sigma Aldrich) を各サンプルに添加し 1 時間培養した。BrdU の染色法は既報の通りである<sup>29)</sup>。BrdU の取り込み (% BrdU incorporation) は以下の式により算出した。

$\% \text{ BrdU incorporation} = (\% \text{ BrdU expression in CD8}^+ \text{ HLA CMVpp65 tetramer}^+ \text{ with each concentration trametinib}) / (\% \text{ BrdU expression in CD8}^+ \text{ HLA CMVpp65 tetramer}^+ \text{ with } 0 \text{ nM trametinib}) \times 100$

## 11. 細胞内サイトカイン染色

CMV-CTL を 5% FBS、100 IU/mL IL-2、各種濃度の Trametinib を含有した Alys505N-0 培地で培養した。E:T 比は 0.5 とした。2 時間後、 $1 \mu\text{g/mL}$  モネンシン (Selleck) を加え、さらに 2 時間培養した。細胞を回収し、表面抗原の染色を終えた後、4%ホルマリンを用いて、4°C で 20 分固定した。2 度洗浄し、終濃度 0.25% のサポニンを含む PBS で透過処理を行いつつ、4°C で 30 分間サイトカイン染色を行った。サイトカインの発現 (% IFN- $\gamma$ 、% TNF- $\alpha$ ) は以下の式により算出した。

$\% \text{ cytokine expression} = (\% \text{ cytokine expression in CD8}^+ \text{ HLA CMVpp65 tetramer}^+ \text{ with each concentration trametinib}) / (\%$



cytokine expression in CD8<sup>+</sup> HLA CMVpp65 tetramer<sup>+</sup> with 0 nM trametinib) × 100

## 12. KM2760 による ADCC が CMV-CTL 増殖に与える影響

5% FBS、100IU/IL-2、0.1 μg/mL KM2760 (脱フコシル化抗 CCR4 IgG1 キメラ抗体: Kyowa Kirin)、各種濃度の Trametinib を添加した Alys505N-0 培地で、CMV-CTL およびナチュラルキラー (NK) 細胞と HSC-3pp65 を共培養した。この検討には、CMV-CTL の誘導後に NK 細胞を多く含んだ健常人 (HD1) 由来のリンパ球を使用した。E:T 比 (CMV-CTL: HSC-3pp65 比) は 1.0 とした。5 日後にリンパ球を回収し、フローサイトメトリーを行った。CMV-CTL 数は以下の式により算出した。

CTL number = total cell × percentage of CD8<sup>+</sup> HLA CMVpp65 tetramer<sup>+</sup> cells

## 13. KM2760 による PBMC 中の eTreg 除去

PBMC は 5% FBS、100IU/mL IL-2、0.1 μg/mL KM2760、各種濃度の Trametinib を含む培地で培養した。7 日後、細胞を回収しフローサイトメトリーを行った。FoxP3 の染色には FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific) を使い、メーカーの推奨するプロトコルに従って染色した。eTreg 除去率および CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞除去率は以下の式により算出した。

eTreg depletion ratio = 1 - (% CD45RA<sup>+</sup> FoxP3<sup>hi</sup> in CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> at day 7) / (% CD45RA<sup>+</sup> FoxP3<sup>hi</sup> in CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> at day 0)

CCR4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-cell depletion ratio = 1 - (% CCR4<sup>+</sup> in CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> at day 7) / (% CCR4<sup>+</sup> in CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> at day 0)

## 14. 統計解析

数値データは平均値と標準誤差で示した。統計解析には EZR (ver.3.6.1)<sup>32)</sup> を用いた。群間比較には両側 Dunnett 検定または 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判定した。

## Ⅲ. 結 果

### 1. 腫瘍微小環境における CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞の存在

CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞の局在や、CD8<sup>+</sup>T 細胞における CCR4 mRNA の発現に関する既知の報告はなく、確認を要した。まず、CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞の局在を評価するため、MF-IHC を行った (図 1)。CCR4<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 細胞は、舌扁平上皮癌患者の間質や腫瘍蜂巣内に存在した (白矢印)。さらに、scRNA-seq の解析により、5 人の舌扁平上皮癌患者の原発巣において、CD8<sup>+</sup>T 細胞の 4.19%、CD4<sup>+</sup>T 細胞の 11.4% が CCR4 を発現していた (図 2)。CD8<sup>+</sup>T 細胞において、免疫機能に関連する mRNA の発現は、CCR4 の発現の有無で明らかな違いは検出されなかった。

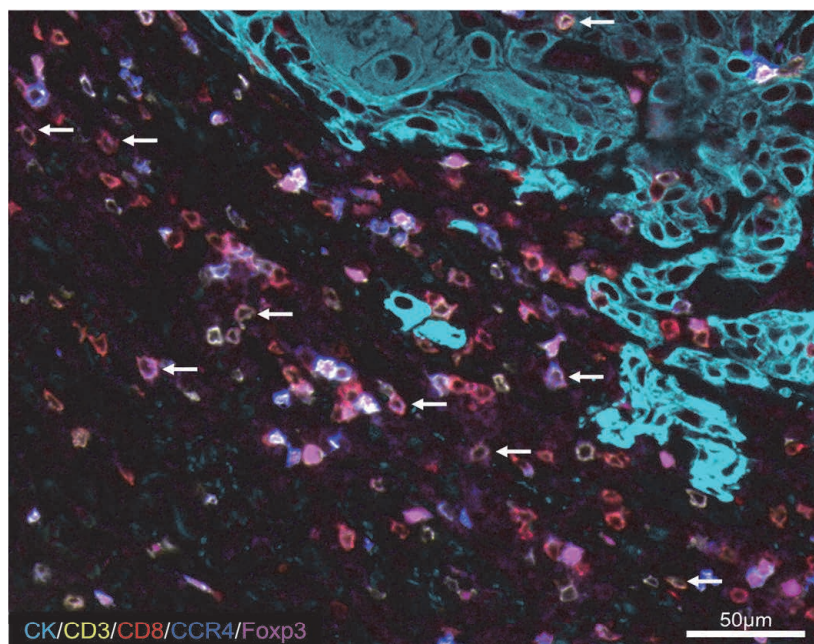


図 1 多重蛍光免疫染色 (MF-IHC) による CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞の口腔扁平上皮癌 (OSCC) 微小環境における局在  
OSCC 原発巣の MF-IHC の典型像を示す。白矢印は CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞を指す。CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞は腫瘍蜂巣内または腫瘍周辺部に存在した。

OSCC: oral squamous cell carcinoma, MF-IHC: multifuorescence immunohistochemistry

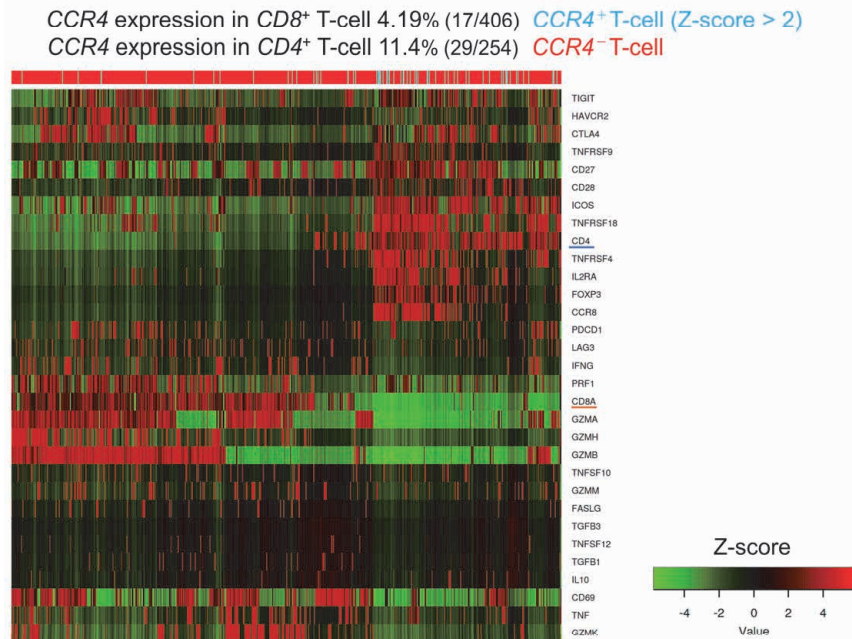


図2 シングルセル RNA シークエンシング (scRNA-seq) における腫瘍浸潤 T 細胞 (TIL) の CCR4 mRNA および免疫関連分子の発現 scRNA-seq による expression levels をもとに、ヒートマップ解析を行った。対象は 5 人の患者に由来する OSCC 原発巣 TIL とした。CCR4<sup>+</sup> T 細胞は Z-score > 2 で定義した。CCR4 は CD8<sup>+</sup> T 細胞の 4.19%、CD4<sup>+</sup> T 細胞の 11.4% に発現していた。CD8<sup>+</sup> T 細胞における CCR4 の発現と免疫機能分子の発現に明らかな相関はなかった。

scRNA-seq: single cell RNA sequencing, TIL: tumor-infiltrating lymphocyte

## 2. CMV-CTL の CCR4 発現に影響する因子

CTL の CCR4 発現を制御する候補薬剤を選定するため、CCR4 発現に関わると考えられるシグナル伝達経路を探索した (図 3)。まず、TCR 刺激と CCR4 発現の関連を評価した (図 3a)。拡大培養した CMV-CTL を含むリンパ球を HSC-3pp65 で刺激すると、CMV-CTL 分画にのみ CCR4 が発現した。抗 CD3 抗体で刺激すると、CMV 抗原に対する特異性に関わらず 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- $\beta$ 1 が CMV-CTL の CCR4 発現を増強した (図 3b)。既報をもとに作成した、TCR と IL-2、IL-12、IL-15、TGF- $\beta$ 1 受容体下流の経路の概略図を示す (図 3c)。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。

## 3. TCR 刺激、TGF- $\beta$ 1、Trametinib が CMV-CTL の CCR4 発現に与える影響

図 3 の結果をもとに、CTL の CCR4 発現を変化させると考えられたサイトカイン (IL-2、IL-12、IL-15、TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 3) とキナーゼ阻害剤 (TGF- $\beta$  受容体 1 (TGF- $\beta$  R1) 阻害剤、JAK 阻害剤、MEK 阻害剤: Trametinib) を用いて、CCR4 発現に与える影響を検討した。まず、3 人の健常人に由来する CMV-CTL を用いて、網羅的に評価を行った (図 4)。CCR4 の発現はサイトカイン刺激

のみでは誘導されず、本実験系においては TCR 刺激が必須であった。また、3 人のドナーに共通して、CMV-CTL の CCR4 発現は TGF- $\beta$ 1 により最も強く増強され、Trametinib により最も強く抑制された。この結果をもとに、TCR 刺激、TGF- $\beta$ 1、Trametinib にフォーカスし、CTL の CCR4 発現に与える影響を定量的に評価した (図 5)。まず、HSC-3pp65 と CMV-CTL を共培養した (図 5a)。抗原刺激により CMV-CTL の CCR4 発現が上昇し (3.14% から 29.0%)、TGF- $\beta$ 1 により CCR4 発現が増強された (29.0% から 51.2%)。Trametinib を添加すると、TGF- $\beta$ 1 の投与の有無に関わらず CCR4 の発現が抑制された (TGF- $\beta$ 1 非添加: 29.0% から 6.98%、TGF- $\beta$ 1 添加: 51.2% から 11.4%)。この CCR4 発現の変動は、由来ドナー (健常人または Stage IV 口腔癌患者) に関わらず観察されたが、CCR4 の発現率はドナー間で大きなばらつきがみられた。次に、抗 CD3 抗体や HSC-2pp65、HSC-4pp65 で TCR 刺激を加えた (図 5b、5c)。いずれの場合も HSC-3pp65 でみられた結果と同様の変化が観察された。さらに、HSC-3pp65 と HLA 型が一致し HSC-2pp65 と HLA 型が不一致の健常人 (HD4) に由来する CMV-CTL を、それぞれの細胞株と共培養した (図 5d)。HLA 型が一致した場合にのみ CMV-CTL の CCR4 発現が誘導され、CCR4 発現は特異的な抗原提示プロセスにより誘導されることが示された。最後に、Trametinib が濃度依存

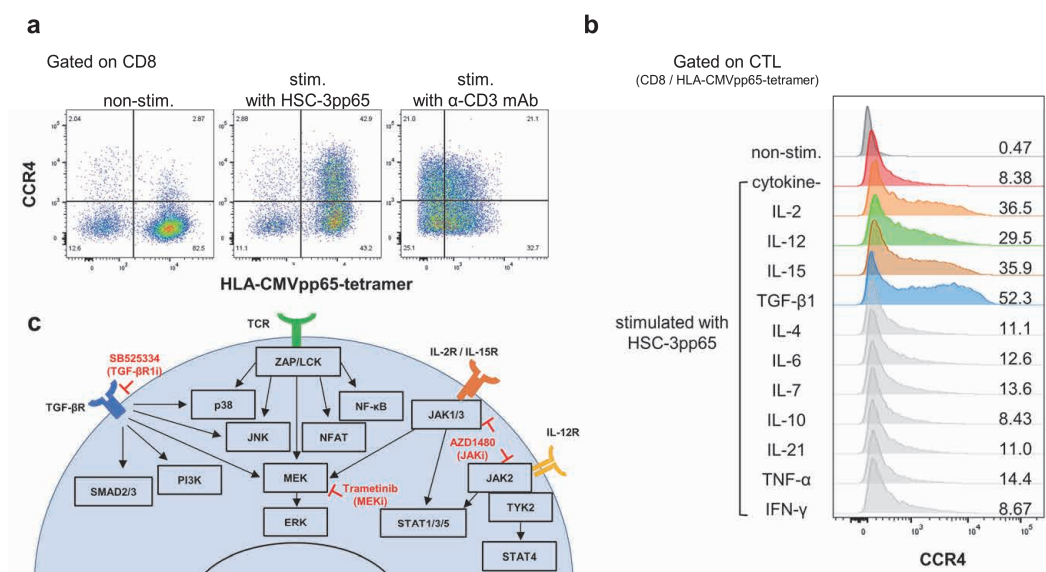


図3 細胞傷害性T細胞（CTL）のCCR4発現に関連する因子

HD1由来のCMV-CTLをHSC-3pp65、または固相化した抗CD-3抗体（OKT-3）により刺激した。2日後、フローサイトメトリーでCCR4の発現を解析した。(a) サイトカイン非添加、(b) サイトカイン添加の各条件におけるCMV-CTLのCCR4発現を示す。(a) および (b) の結果から得られた下流のシグナル伝達経路と、図4以降の実験に用いたキナーゼ阻害剤の作用部位を示す (c)。HSC-3pp65からの抗原提示により、抗原特異的CMV-CTL分画にのみCCR4が発現した。また、抗CD3抗体の刺激により、非特異的にCD8<sup>+</sup>T細胞のCCR4の発現が上昇した (a)。各種のサイトカインを添加すると、IL-2、IL-12、IL-15、TGF-β1はCCR4の発現を増強し、TGF-β1は最も顕著であった (b)。CCR4の発現に関わる可能性があるシグナル伝達経路のうち、最も共通性の高い経路はMEK-ERK経路であった (c)。

CCR4: CC chemokine receptor type 4, TCR: T-cell receptor, IL: interleukin, IFN-γ: interferon gamma, TNF-α: tumor necrosis factor alpha

的にCTLのCCR4発現を抑制することを確認した (図5e)。CMV-CTLのCCR4発現はTrametinibの濃度依存的に抑制され、200nmol/Lで有意であった。

#### 4. TGF-β1、キナーゼ阻害剤がCD8<sup>+</sup>T細胞のERK、STAT3のリン酸化に与える影響

CTLのCCR4発現に関連すると考えられたシグナル伝達経路 (図1c参照) の信頼性を検証するために、ERK及びSTAT3のリン酸化をウェスタンブロッティングにより評価した (図6)。実験に使用したサンプルの調製方法を示す (図6a)。まず、拡大培養したCD8<sup>+</sup>T細胞が、TGF-β1やキナーゼ阻害剤での処理により、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 (図6b)。しかし、拡大培養に用いた一次刺激の影響が残っているため、再刺激を行わなくてもCCR4の発現は観察された。さらに、TGF-β1を添加した場合、CMV-CTLのCCR4発現は強く誘導され、キナーゼ阻害剤の効果は限定的であった。次に、ERKおよびSTAT3の発現変化を示す (図6c)。CD3/CD28刺激はERKのリン酸化を誘導するが、TGF-β1は抑制的に働いた。MEK阻害剤は、ERKのリン酸

化を強く抑制したが、STAT3のリン酸化は変化させなかった。TGF-β受容体1阻害剤は、試験した阻害剤の中でERKのリン酸化に与える影響は最も乏しく、STAT3のリン酸化には影響しなかった。JAK阻害剤は、STAT3およびERKのリン酸化を抑制した。

#### 5. TrametinibがCTLの機能に与える影響

Trametinibの免疫療法との併用の妥当性を評価するため、TrametinibがCTLの免疫機能に及ぼす影響を検討した (図7)。CMV-CTLの細胞傷害活および活性化CMV-CTLのアポトーシスは、Trametinibによって影響を受けなかった (図7a-d参照)。BrdU細胞増殖アッセイにおいて、TrametinibによってCMV-CTLのBrdU取り込みの変化に有意差はなかったが、1人のドナーでは取り込みの減少を示した (図7e、f)。OSCC細胞株 (HSC-2、HSC-3、HSC-4) のBrdU取り込みは、CMV-CTLと比較して顕著に抑制された。細胞内サイトカイン染色では、TrametinibによりCMV-CTLにおけるTNF-αの発現が低下した (図7g、h)。IFN-γの発現に有意差はなかったが、3人のドナーのうち2人で発現が減少した。



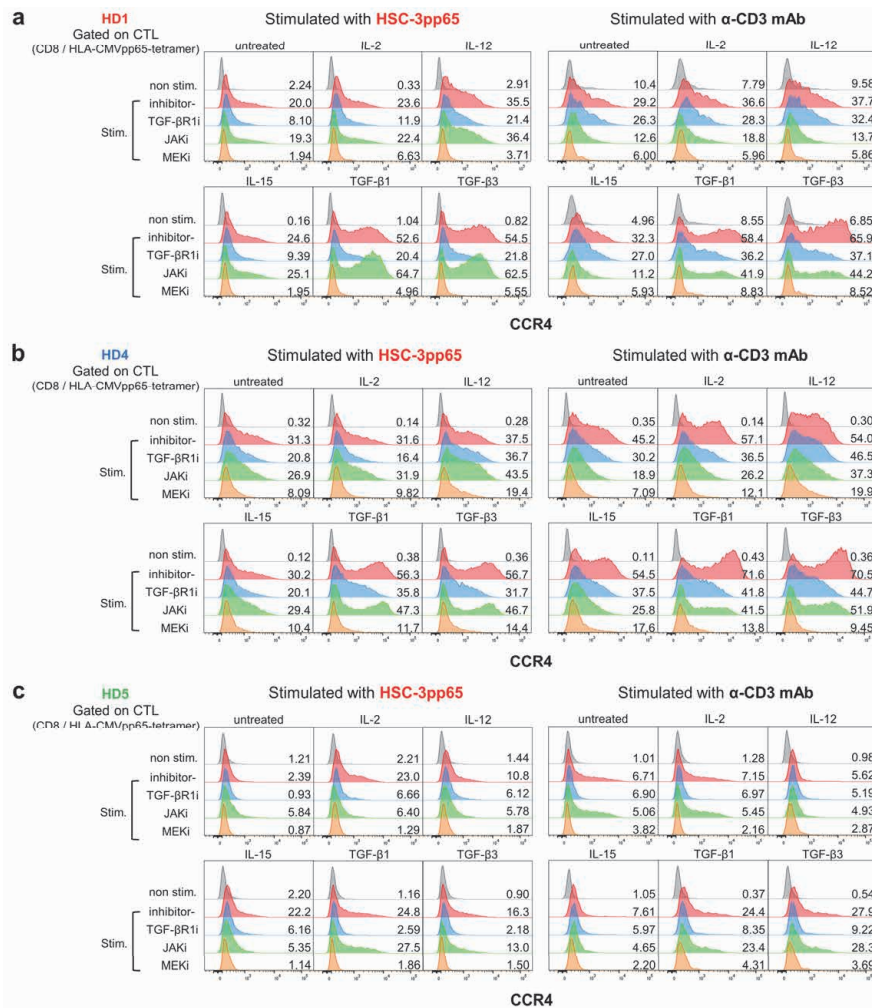


図 4 細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の CCR4 発現に影響する因子の網羅的評価

3 人のドナー由来の CMV-CTL を、各種のサイトカイン (10 ng/mL)、キナーゼ阻害剤 (1  $\mu$ mol/L) を添加した培地で、HSC-3pp65 または固相化した抗 CD3 抗体 (OKT-3) で刺激した。(a) HD1、(b) HD4、(c) HD5 由来の CMV-CTL による結果を示す。3 人のドナーに共通した結果として、TCR 刺激は CCR4 の発現誘導に必須であり、TGF- $\beta$  は最も強く CCR4 発現を増強し、MEKi (Trametinib) は最も強く CCR4 発現を抑制した。

mAb: monoclonal antibody, nM: nmol/L, TGF- $\beta$ 1i: TGF- $\beta$  receptor 1 inhibitor (SB525334), MEKi: MEK inhibitor (GSK1120212; trametinib), JAKi: JAK inhibitor (AZD1480)

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

抗 CCR4 抗体に対する Trametinib の併用の有効性を証明するためには、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す必要があった。Mogamulizumab と同様に ADCC 活性が増強された抗 CCR4 キメラ抗体である KM2760 を用いて、検討を行った。CCR4 発現の評価には、抗 CCR4 抗体クローン L291H4 を使用した。このクローンは、CCR4 の発現が知られている成人 T 細胞白血病リンパ腫の細胞株である MT-4 に対して、KM2760 と競合的拮抗を来さなかった (図 8)。すなわち、KM2760 処理による CCR4 陽性細胞分画の減少は、これらの細胞集団が除去された

ことを示す。

KM2760 による CMV-CTL の減少に関する実験に使用した CMV-CTL 及び NK 細胞を含むリンパ球の代表例を示す (図 9a)。これらの細胞と HSC-3pp65 を共培養した、CMV-CTL における CCR4 発現、および CMV-CTL 数の変化を解析した (図 9b-e)。CMV-CTL における CCR4 発現は、Trametinib によって抑制された。また、CCR4<sup>+</sup>CMV-CTL の割合は、KM2760 の添加によって減少した (図 9b)。Trametinib は、CMV-CTL における CCR4 発現を抑制することで、KM2760 による CMV-CTL 数の減少を緩和した。非 Trametinib 処理群 (CMV-CTL 数 =  $10.2 \times 10^4$ ) と比較して、100nmol/L Trametinib 処理群 (CMV-CTL 数 =  $16.4 \times 10^4$ ,  $p = 0.038$ ) および 200nmol/L Trametinib

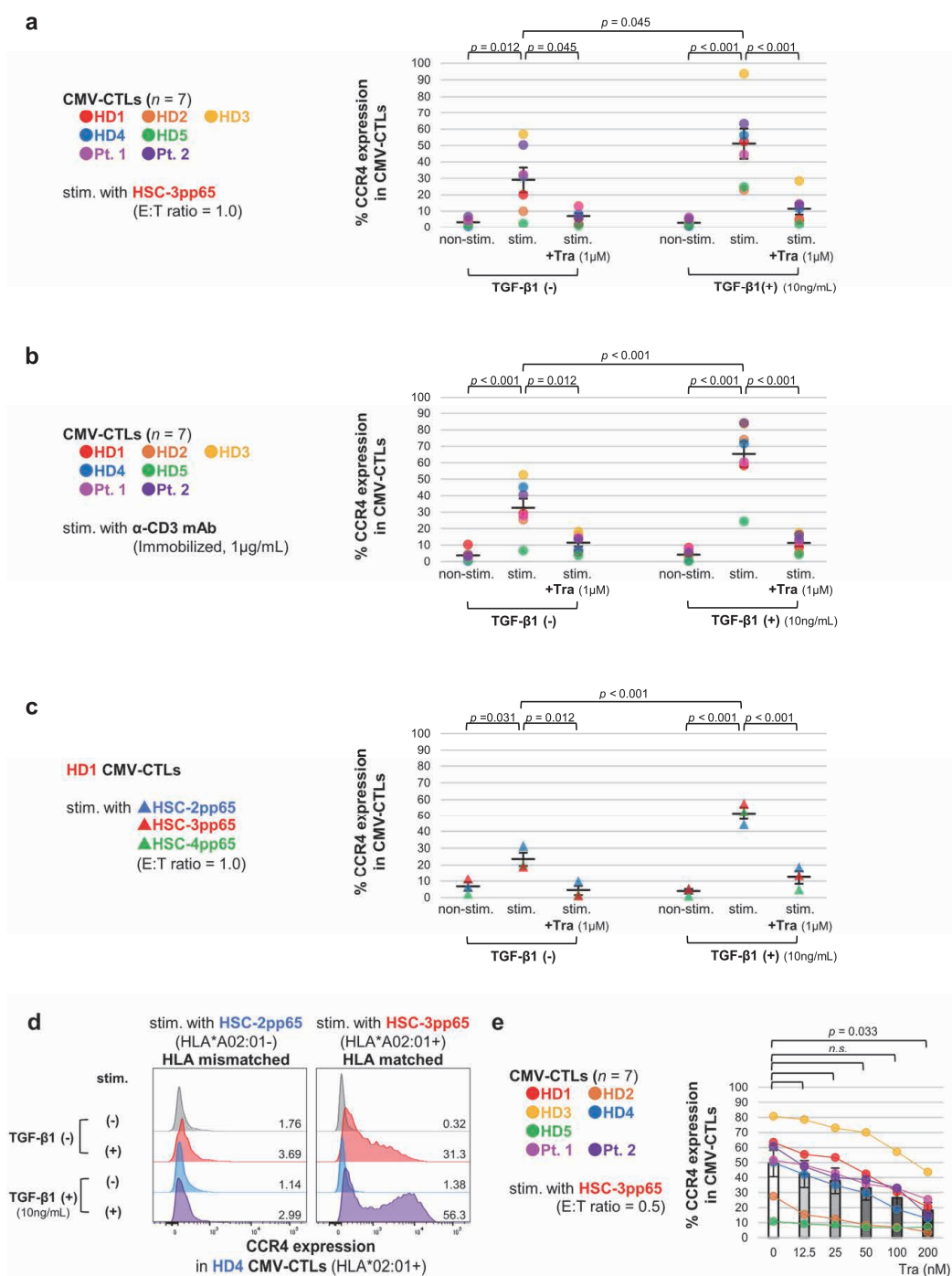


図5 T細胞受容体 (TCR) 刺激、TGF- $\beta$ 1、Trametinib (MEK1/2 阻害薬) が細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の CCR4 発現に与える影響の定量的評価

CMV-CTL を HSC-2pp65、HSC-3pp65、HSC-4pp65、または固相化した抗 CD3 抗体 (OKT-3) で刺激した。E/T 比は 1.0 (a、c、d) または 0.5 (e) とした。TGF- $\beta$ 1 (10 ng/mL) と 1  $\mu$ mol/L (a-d) または各濃度 (e) の Trametinib を添加した。2 日後にフローサイトメトリーで CMV-CTL の CCR4 発現を評価した。HSC-3pp65 (a、 $n = 7$ 、独立したドナー)、抗 CD3 抗体 (b、 $n = 7$ 、独立したドナー)、3 つの異なる細胞株 (c、 $n = 3$ 、独立した細胞株) を用いて刺激した CMV-CTL の CCR4 発現を示す。HD4 に由来する HLA\*A02:01 拘束性 CMV-CTL を、HLA 不一致の HSC-2pp65、HLA 一致の HSC-3pp65 とそれぞれ培養した場合の、CCR4 発現を示す (d)。Trametinib の濃度依存的な影響を、TGF- $\beta$ 1 非添加で HSC-3pp65 と共培養し、評価した (e、 $n = 7$ 、独立したドナー)。CMV-CTL の CCR4 発現は HSC-3pp65 との共培養により発現し、TGF- $\beta$ 1 で増強され、Trametinib で抑制された (a)。抗 CD3 抗体、HSC-2pp65、HSC-4pp65 を用いた場合も、同様の傾向で CCR4 の発現が変動した (b、c)。また、細胞株と CMV-CTL のドナー間で HLA 型不一致の場合は、CCR4 の発現は誘導されなかった (d)。Trametinib の濃度依存的影響をみると、200nM で有意に CCR4 の発現を抑制した (e)。

Tra: trametinib, n.s.: not significant

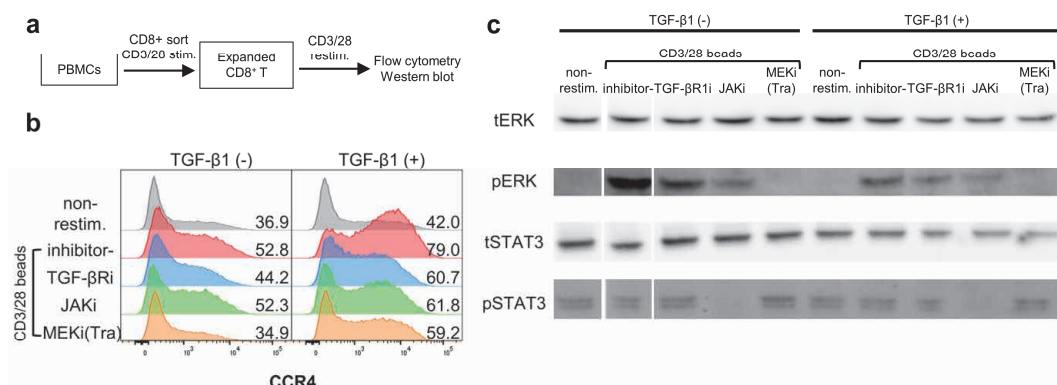


図 6 TGF-β1、キナーゼ阻害剤が CD8<sup>+</sup>T 細胞の ERK、STAT3 のリン酸化に与える影響

拡大培養した HD6 由来の CD8<sup>+</sup>T 細胞を 100IU/mL IL-2 を含む培地で、TGF-β1 (10ng/mL)、各種キナーゼ阻害剤 (1 μg/mL) で 3 時間処理し、その後 CD3/28 ビーズで刺激した。実験の概略を (a) に示す。CCR4 発現はフローサイトメトリーで 2 日目に評価した (b)。(b) のサンプルと同一のサンプルで、CD3/28 刺激後 10 分で回収しウェスタンブロットで ERK 及び STAT3 のリン酸化を評価した結果を示す (c)。(c) の図では左側の 2 つのレーンを入れ替えて表示している。CD8<sup>+</sup>T 細胞に CD3/28 刺激を加えた場合の CCR4 発現は、CMV-CTL に対する特異的抗原刺激と同様の傾向で変化した (b)。CD3/CD28 刺激は ERK をリン酸化させた。TGF-β1 は ERK のリン酸化を抑制した。キナーゼ阻害剤については、いずれも ERK のリン酸化を抑制し、その効果は MEKi、JAKi、TGF-β Ri の順に強かった (c)。

t: total, p: phosphorylated

処理 (CMV-CTL 数 =  $21.3 \times 10^4$ ,  $p < 0.001$ ) で CMV-CTL 数が増加した (図 9c)。TGF-β1 を添加した条件も検討した。CCR4 の発現がより顕著になったが、変化の傾向は TGF-β1 非添加の場合と同じであった (図 9d)。CMV-CTL 数の差は、TGF-β1 非存在下よりも存在下で大きかった。非 Trametinib 処理群 (CMV-CTL 数 =  $2.63 \times 10^4$ ) と比較して、100nmol/L Trametinib 処理群 (CMV-CTL 数 =  $10.2 \times 10^4$ ,  $p < 0.001$ ) および 200nmol/L Trametinib 処理群 (CMV-CTL 数 =  $12.4 \times 10^4$ ,  $p < 0.001$ ) で CMV-CTL の数が増加した (図 9e)。

KM2760 による eTreg 除去は、PBMC を培養して評価した (図 10)。KM2760 は、PBMC 中の全ての CCR4 陽性細胞を枯渇させた。CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>high</sup> で示される eTreg は、CCR4 を強く発現していた (図 10a)。また、Trametinib は eTreg における CCR4 の発現を抑制しなかった。その結果、Trametinib 処理の有無に関わらず、eTreg は KM2760 により同様に除去された (図 10b)。eTreg 除去率は高く (> 0.8)、添加した Trametinib の濃度により差は見られなかった。このような eTreg 除去は、健常者ドナーおよび Stage IV 口腔癌患者の両方で観察された。この解析に使用された PBMC は、CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞を含んでいた。培養開始時に CCR4 を既に発現している CD8<sup>+</sup>T 細胞は、Trametinib により CCR4 発現が抑制されず (図 11a)、Trametinib 添加の有無にかかわらず、KM2760 によって完全に除去された (図 11b)。CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞の減少も、健常者ドナーおよび Stage IV 口腔癌患者の間で差はみられなかった。

#### IV. 考察

制御性 T 細胞 (Treg) 除去療法はがん免疫療法の新たなオプションとして期待されており、CD25 (Daclizumab)<sup>33)</sup> や CCR4 (Mogamulizumab)<sup>18)</sup> などの標的分子に対するモノクローナル抗体を用いて、臨床試験が実施されてきた。しかしこれらの臨床試験では、末梢血において Treg を十分に除去することができても、臨床的利益はほとんど得られなかった。この結果の要因として、Treg 除去療法の標的分子が Treg 以外の T 細胞、特に CD8<sup>+</sup>T 細胞に発現し、Treg と同様に除去されていることが考えられる。さらに、免疫チェックポイント阻害剤である Ipilimumab (抗 CTLA-4 抗体) も、Treg に対する抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を誘導することが知られており<sup>34-36)</sup>、Treg 除去薬としての側面も有している。しかし、CTLA-4 も CCR4 と同様に、活性化した CD8<sup>+</sup>T 細胞に発現している。したがって、これらの Treg 除去療法を成功させるためには、Treg に対する選択性を向上させることが必要である。

CD8<sup>+</sup>T 細胞における CCR4 の発現については、いくつかの報告がある。末梢血中の CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞は主にメモリー細胞であり<sup>37)</sup>、Mogamulizumab の投与により、末梢血中の CD8<sup>+</sup>T<sub>CM</sub> が減少した<sup>23)</sup>。腫瘍微小環境においても、フローサイトメトリーにより、HNSCC の CD8<sup>+</sup>腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の平均約 20% に CCR4 が発現していることが確認された<sup>14)</sup>。本研究では、CCR4<sup>+</sup>TIL の存在を指示する補足的なデータとして、mRNA レベルにおいても、CD8<sup>+</sup>T 細胞における CCR4 の発現を示し



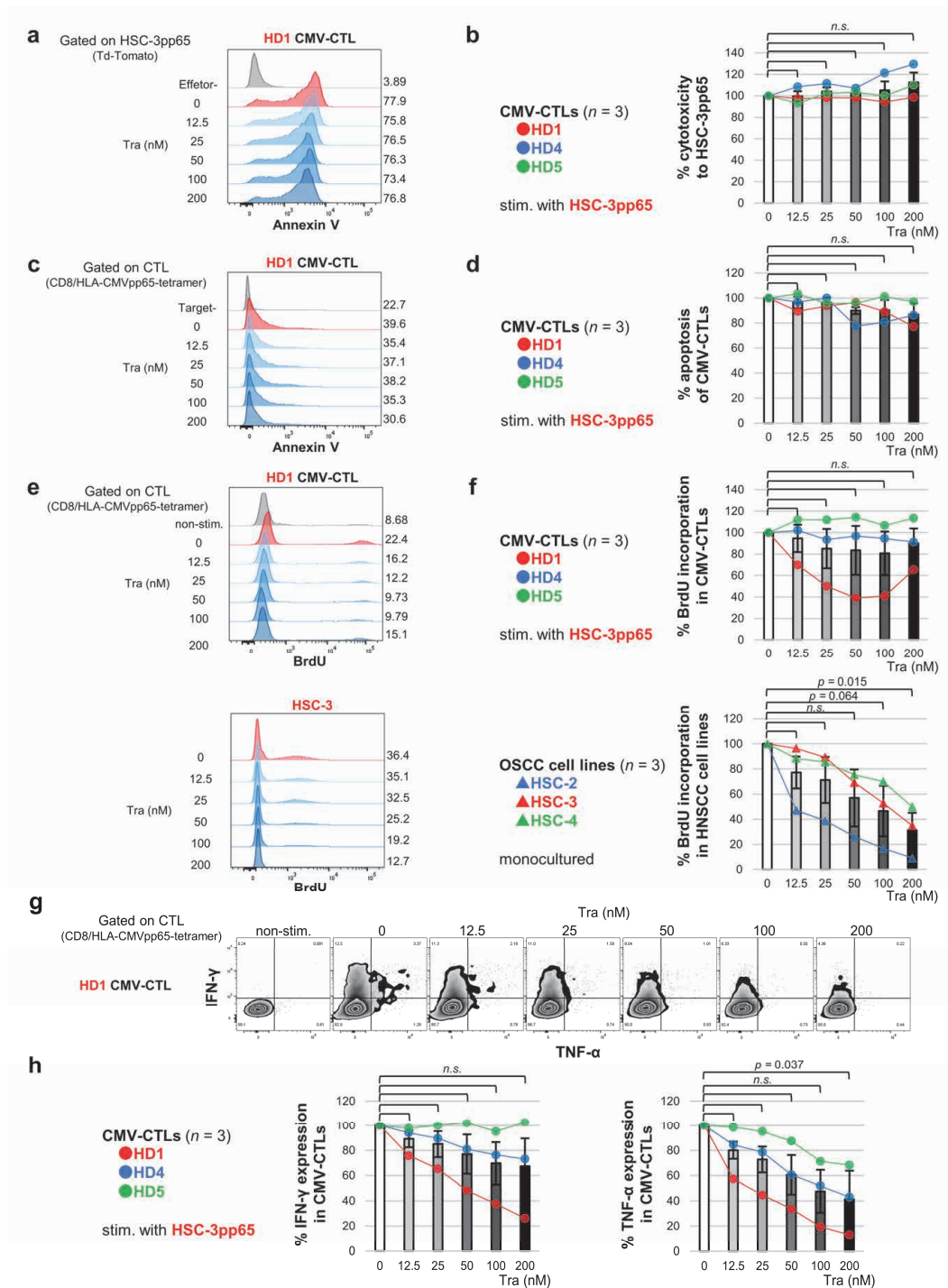


図7 Trametinib (MEK1/2 阻害薬) が細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の機能に与える影響

CMV-CTL と HSC-3pp65 を共培養し、CMV-CTL の機能を評価した。CMV-CTL の細胞傷害活性は腫瘍細胞への Annexin V の結合で (a, b)、CMV-CTL のアポトーシスは CMV-CTL への Annexin V の結合で評価した (c, d)。CMV-CTL と OSCC 細胞株の増殖活性 (e, f) は BrdU 細胞増殖アッセイで評価した。CMV-CTL のサイトカイン産生は IFN- $\gamma$  と TNF- $\alpha$  の細胞内染色を用いて評価した (g, h)。全ての図は代表例と結果をまとめたグラフで示した (n = 3, 独立したドナー)。Trametinib は CMV-CTL の細胞傷害活性 (a, b)、アポトーシス (c, d) に影響しなかった。Trametinib は 3 人のドナーのうち 1 人で CMV-CTL の BrdU の取り込みを減少させたが、HSC-2、HSC-3、HSC-4 に対してより強く BrdU の取り込みを減少させた (e, f)。CMV-CTL におけるサイトカイン発現に関しては、Trametinib は IFN- $\gamma$  の発現を 3 人のドナーのうち 2 人で減少させ、TNF- $\alpha$  の発現を全てのドナーで減少させた (g, h)。

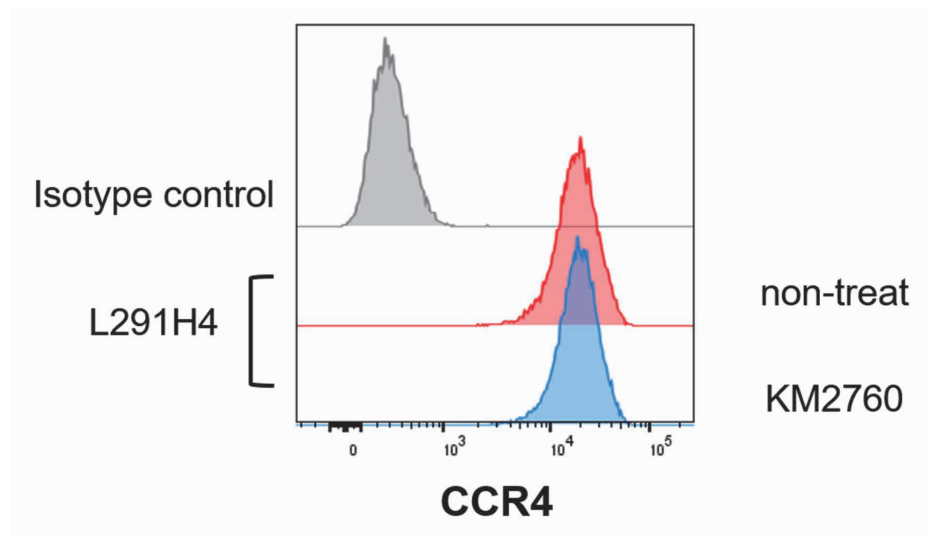


図 8 KM2760 とフローサイトメトリー用抗 CCR4 抗体の CCR4 に対する非競合的結合

CCR4 を強く発現することで知られる、成人 T 細胞白血病リンパ腫の細胞株である MT-4 を、KM2760 (1  $\mu$ g/mL) 添加、または非添加条件で培養した。BV421 標識抗 CCR4 抗体 (clone L291H4) で染色し、フローサイトメトリーを行った。MT-4 に対するフローサイトメトリー用抗体の結合は、KM2760 (ヒト化された Mogamulizumab に対応する抗 CCR4 キメラ抗体) の添加によって阻害されなかった。

た (図 2)。CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TIL の機能については確認出来なかったが、CD8<sup>+</sup>TIL はそのほとんどが細胞傷害性 T 細胞 (CTL) である。さらに、本研究では多重蛍光免疫染色 (MF-IHC) によって、口腔扁平上皮癌 (OSCC) 組織の腫瘍巣内部や周辺の間質、すなわち抗原を認識し活性化し得る領域に CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞が浸潤していることを確認した (図 1)。したがって、CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TIL は抗原認識により活性化した CTL である可能性が高い。本研究では、この仮説を *in vitro* で検討した。十分な量の腫瘍抗原特異的 CTL を得ることは困難であるため、CMVpp65 抗原を腫瘍抗原の代替として使用した。CMVpp65 抗原は免疫原性の高い外来抗原であり、CMV-CTL の TCR と、腫瘍細胞のペプチド-HLA 複合体との結合親和性が高い。しかし、OSCC の抗腫瘍免疫に重要な役割を果たすネオ抗原やヒトパピローマウイルス抗原は、CMVpp65 抗原と類似の特性を有している。

CTL の CCR4 発現は、T 細胞受容体 (TCR) 刺激によって誘導された (図 3-5)。この知見は、CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TIL が、TCR が活性化された抗原特異的 CTL である可能性を支持している。したがって、Mogamulizumab を投与し抗腫瘍免疫を増強するためには、CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TIL を ADCC から保護する必要がある。Trametinib は TCR 下流の MEK のリン酸化を阻害し、CTL の CCR4 発現を著しく低下させた (図 5、図 7)。さらに、抗 CCR4 抗体 (KM2760) で処理すると ADCC による CTL 減少が起こるが、Trametinib がこれを緩和することを示した (図 9)。しかし、抗原刺激のみでは CTL の CCR4 発現が誘導されな

いドナーが存在した (図 5a、HD5)。このようなドナーでは抗 CCR4 抗体による CTL 減少はほとんど起きないと推測される。CTL の CCR4 発現を予測することは、Mogamulizumab に対する Trametinib の併用の適応を決定するための、いわゆるプレシジョン・メディシンの観点から重要である。

CCR4 発現を制御する Trametinib の効果は CTL にのみ観察され、eTregs や末梢性 CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞には影響しなかった (図 9-11)。今回の実験では、CTL は抗原刺激により CCR4 を発現するため、CCR4 の発現前に Trametinib 処理を行った。一方、常に CCR4 を発現している eTregs および末梢性 CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞は、CCR4 の発現後に処理した。同じ CD8<sup>+</sup>T 細胞でも CTL と末梢性 CD8<sup>+</sup>CCR4<sup>+</sup>T 細胞では反応が異なることから、Trametinib の CCR4 発現に対する効果の違いは、Trametinib 処理のタイミングに依存していることを示唆している。すなわち、TCR 刺激によりこれから発現する CCR4 の発現を抑制することは出来るが、既に発現している CCR4 を変化させることは出来ない。生体内では、Treg 除去は CTL の活性化をもたらすと予想される。したがって、腫瘍微小環境において eTreg に対する標的選択性が向上させるためには、Mogamulizumab 投与前に Trametinib を投与する必要があるだろう。一方、本研究では末梢性 CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞の保護の戦略は示していない。しかし、*in vitro* の検討において、CD8<sup>+</sup>T 細胞の Mogamulizumab に対する感受性は eTreg も低く、血中の抗体濃度を調整することで末梢における Mogamulizumab の Treg 選択性

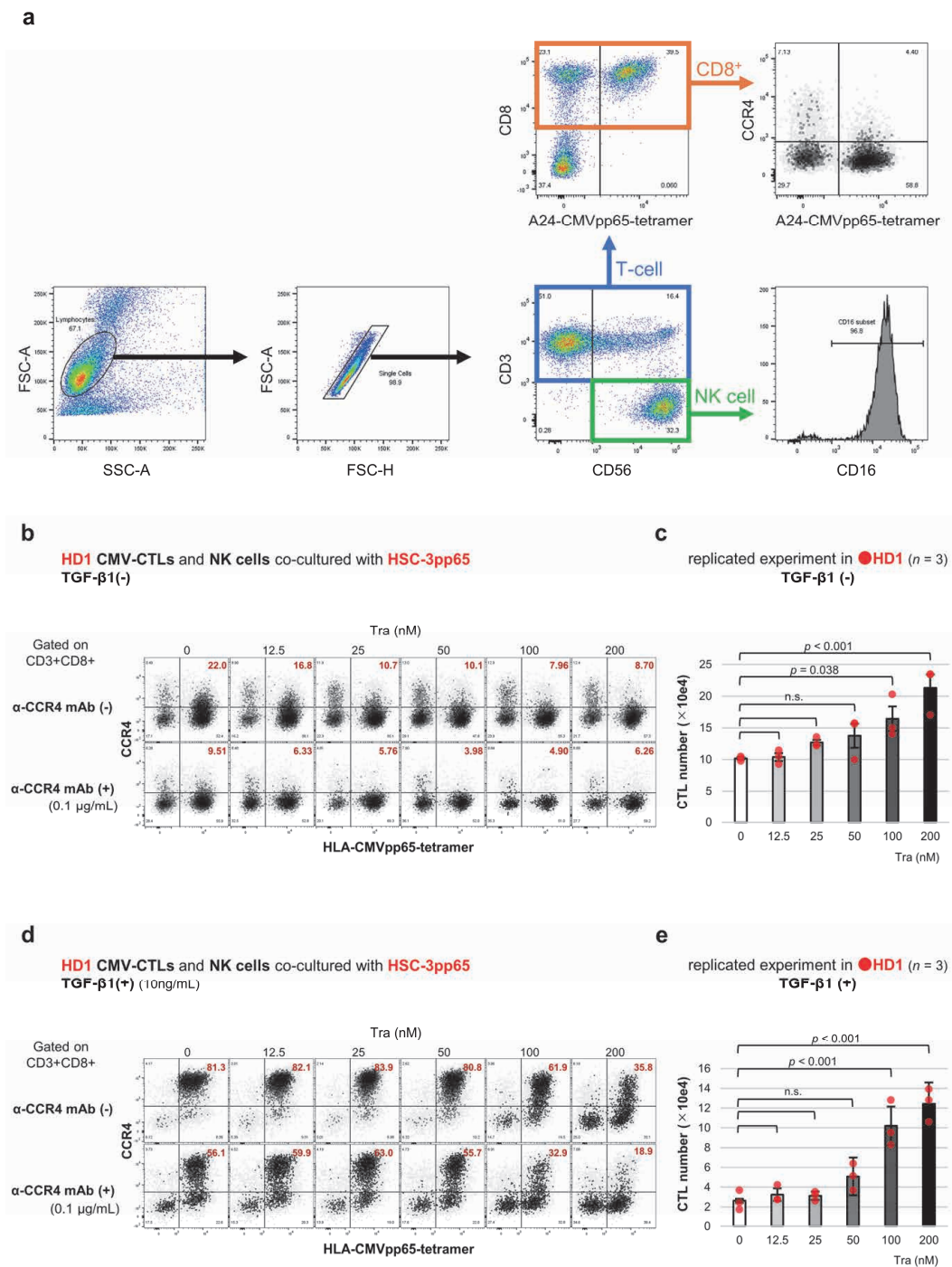


図9 Trametinib (MEK1/2 阻害薬) が与える抗 CCR4 抗体による活性化細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 減少の緩和効果  
CMV-CTL と NK 細胞を多く含む、HD1 由来のリンパ球を HSC-3pp65 と 5 日間共培養した。KM2760 (0.1  $\mu$ g/mL)、各濃度の Trametinib を添加した。実験開始時のリンパ球の一例と、フローサイトメトリーのゲーティング法を示す (a)。(b、c) は TGF- $\beta$ 1 非添加、(d、e) は 10ng/mL の TGF- $\beta$ 1 を添加している。CD8<sup>+</sup>T 細胞における HLA-CMVpp65-tetramer と CCR4 の発現をフローサイトメトリーで評価した (b、d)。さらに、KM2760 添加群における CMV-CTL の実数をグラフで示した (c、e、n = 3、独立した実験)。CMV-CTL の CCR4 発現は Trametinib により抑制され、KM2760 は CCR4<sup>+</sup>CMV-CTL を除去した (b、d)。また、KM2760 添加群において、CTL 数は Trametinib 100nM 以上で有意に増加した (c、e)。

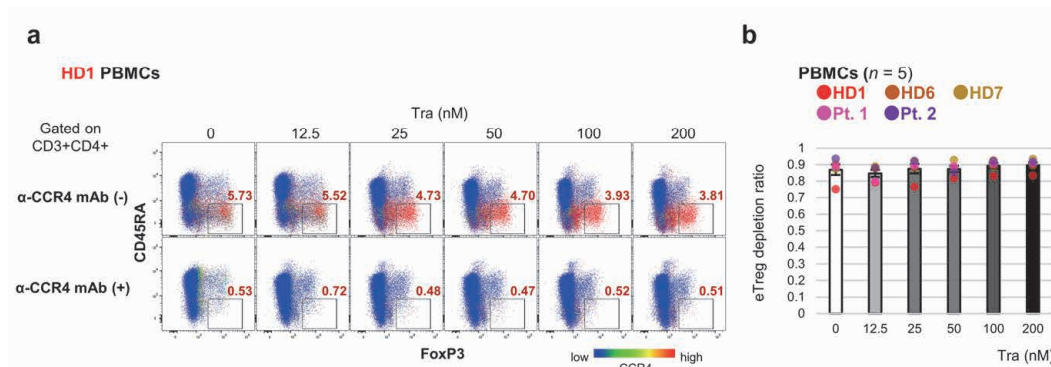


図 10 Trametinib (MEK1/2 阻害薬) がエフェクター制御性 T 細胞 (eTreg) 除去に与える影響

PBMC を KM2760 (0.1  $\mu$ g/mL)、各濃度の Trametinib を添加して 7 日間培養した。代表例を (a) に示す。eTreg は CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>high</sup> で定義し割合を示し、CCR4 の発現をヒートマップで示した。KM2760 添加群における eTreg 除去率をグラフで示す (b, n = 5、独立したドナー)。eTreg 上の CCR4 発現は Trametinib の添加によって抑制されず (a)、抗 CCR4 抗体による eTreg の除去率は Trametinib の濃度に関わらず一定であった (b)。

eTreg: effector Treg

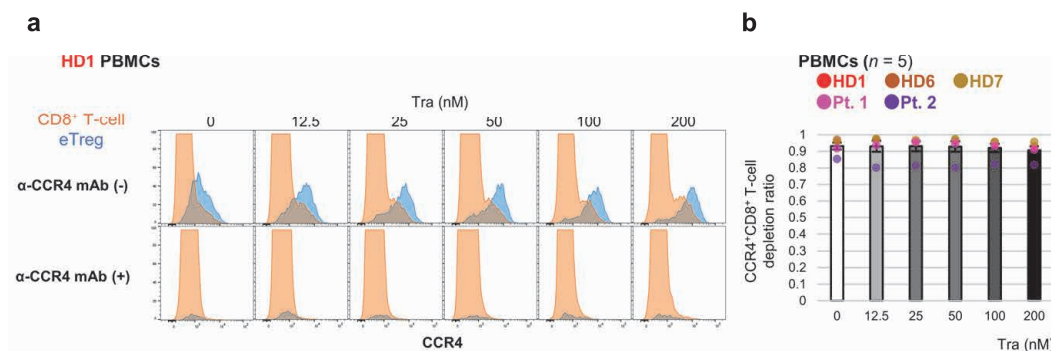


図 11 Trametinib (MEK1/2 阻害薬) が末梢性 CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞除去に与える影響

PBMC を KM2760 (0.1  $\mu$ g/mL)、各濃度の Trametinib を添加して 7 日間培養した (図 10 と同一のサンプルの解析)。eTreg、CD8<sup>+</sup>T 細胞の CCR4 発現について、代表例を (a) に示す。eTreg は CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>FoxP3<sup>high</sup> で定義し青色で示し、CD8<sup>+</sup>T 細胞は橙色で示す。KM2760 添加群における CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞除去率をグラフで示す (b, n = 5、独立したドナー)。eTreg と同様に末梢性 CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞上の CCR4 発現は Trametinib の添加によって抑制されず (a)、抗 CCR4 抗体による末梢性 CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T 細胞の除去率は Trametinib の濃度に関わらず一定であった (b)。

を高める可能性が示唆されている<sup>23)</sup>。

TGF- $\beta$ 1 は CTL の CCR4 発現を強く亢進させた (図 5)。非古典的経路ではあるが、TGF- $\beta$  受容体下流には MEK-ERK 経路を含むため、当初はこの経路が関与していると推測した。しかし、TGF- $\beta$ 1 の添加は CD8<sup>+</sup>T 細胞における ERK のリン酸化を増強しなかった (図 6)。今回の研究では、TGF- $\beta$ 1 が CCR4 の発現を増強する経路を探索していない。しかしながら、TGF- $\beta$ 1 シグナル伝達経路が有望な標的の一つであることには違いない。なぜなら、*TGFB1* mRNA は T 細胞浸潤が多い OSCC の浸潤先端に多く分布しており、TGF- $\beta$  受容体を阻害するこ

とで CTL の機能が回復することが分かっているためである<sup>29)</sup>。すなわち、TGF- $\beta$ 1 の阻害は、CTL の CCR4 発現を制御するだけでなく、CTL 機能を回復させるための治療標的でもある。TGF- $\beta$ 1 が T 細胞機能に影響を与えるシグナル伝達経路を明らかにするためには、今後さらなる研究が必要である。

Trametinib は、MEK1/2<sup>38)</sup> に対して非常に高い選択性を持つ、アロステリック阻害剤である。Trametinib の主な適応疾患は、RAF/RAS 変異を有する悪性黒色腫と非小細胞肺癌である<sup>39)</sup>。しかし、Trametinib は、OSCC に対する適応拡大も期待されている。なぜなら、HNSCC



では RAS/RAF 変異の頻度は低いものの<sup>40, 41)</sup>、HNSCC 症例の 90% 以上で ERK1/2 の過剰なリン酸化が起こっているからである<sup>42, 43)</sup>。OSCC に対して Trametinib を術前投与する第Ⅱ相試験の結果が既に報告されており、65% の患者の腫瘍が縮小し、54% の患者はダウンスタージングした<sup>44)</sup>。これらの結果は、OSCC 患者に対する Trametinib 療法の可能性を支持しており、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 CMV-CTL の細胞傷害活性やアポトーシスは変化させなかった (図 7a-d)。さらに、Trametinib は腫瘍細胞株の増殖を著しく抑制したが、CMV-CTL の増殖に与える影響は比較的軽度であった (図 7e, f)。しかし、CTL のサイトカイン産生は抑制された (図 7g, h)。以前の報告でも同様に、*in vitro* では Trametinib で T 細胞のサイトカイン産生が減少していた<sup>45)</sup>。しかし、この報告において、*in vivo* では腫瘍浸潤 T 細胞が増加し、抗腫瘍免疫が増強されていた。その理由として、腫瘍細胞の増殖を選択的に阻害することによるエフェクターターゲット比 (E:T) の向上、抗腫瘍免疫応答を抑制する骨髄由来抑制細胞の減少などが考えられる<sup>46)</sup>。本研究の結果は、個々の免疫機能に対する Trametinib の効果を評価し、サイトカイン産生の抑制という潜在的な欠点を改めて示した。しかし、生体内では免疫系はより複雑なメカニズムで制御されており、包括的には、Trametinib は少なくとも一過性に抗腫瘍免疫を増強する効果を持つ。すなわち、Mogamulizumab を用いた Treg 除去療法に Trametinib を併用することは、Treg 選択性の向上のみ

でなく、抗腫瘍免疫の増強という点においても有望である。Trametinib の承認された用量 (2mg 経口投与) では、最大血漿中濃度は 14-32.9 ng/mL ( $\approx$  22.8-53.5 nmol/L)<sup>47)</sup> である。しかし、本研究では、CCR4 発現の抑制はより高濃度で強く観察された (図 4e)。したがって、副作用を最小限に抑えて CCR4 発現を制御するためには、局所投与や動脈内注射のように、局所濃度を高める戦略の可能性も検討されるべきであろう。

この研究にはいくつかの限界がある。まず、Mogamulizumab がヒト腫瘍内で eTreg や CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TIL の数を減少させることを示すエビデンスはほとんどない。この仮説の証明には、Mogamulizumab を術前投与する臨床試験 (NCT02946671) の結果を待つ必要がある。第二に、CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TIL の抗原特異性はまだ証明されていない。言い換えれば、この *in vitro* 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。この課題を解決するためには、CCR4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TIL を採取し、腫瘍抗原に対する反応を評価する必要がある。第三に、CCR4 発現の詳細なメカニズムは評価していない。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 抗体薬) 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 発現を誘導する因子と、Trametinib (MEK1/2 阻害薬) を用いてこれを制御する方法を検討した。研究の概略を図 12 に示す。CTL は抗原を認識し活性化すると CCR4

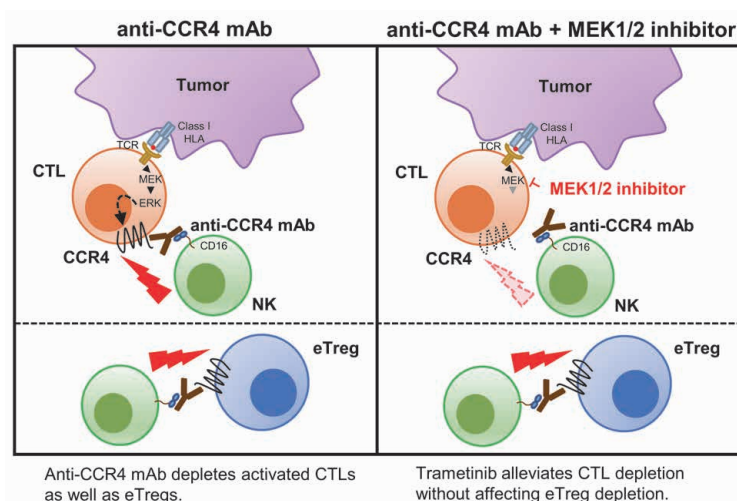


図 12 抗 CCR4 抗体の臨床効果を改善させるため MEK1/2 阻害薬を用いて細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の CCR4 発現を選択的に制御した本研究の概略図

腫瘍細胞からの抗原提示を受けた細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は T 細胞受容体 (TCR) 下流の MEK-ERK 経路を介して CCR4 を発現する。CCR4<sup>+</sup>CTL はエフェクター制御性 T 細胞 (eTreg) と同様に抗 CCR4 抗体により除去される。MEK1/2 阻害薬は CTL の CCR4 発現を抑制するが、eTreg の CCR4 発現を抑制しない。そのため、抗 CCR4 抗体に MEK1/2 阻害薬を併用すると eTreg の除去には影響を与えず、CTL の減少のみを緩和する。すなわち、CCR4 標的 Treg 除去療法において、MEK1/2 阻害薬の併用は CTL 減少を緩和する。

を発現した。Trametinib 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。一方、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、CCR4 標的 Treg 除去療法を行う上で、MEK1/2 阻害薬は CTL 減少を緩和し、抗腫瘍効果を向上させるためのアジュバントとして有望である。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、多大な御指導・ご鞭撻を賜りました愛知学院大学歯学部顎顔面外科学講座の長尾徹教授、後藤満雄准教授に厚く御礼申し上げます。また、実験の直接的な御指導を賜りました愛知医科大学研究創出支援センターの鈴木 進准教授に心より御礼申し上げます。愛知医科大学腫瘍免疫寄附講座（現名古屋大学大学院医学系研究科）の上田龍三教授、研究創出支援センターの吉川和宏教授、耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座の小川徹也教授、病理診断学講座の都築豊徳教授には、日頃より多くのご指導を賜りました。心より感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) Tanaka A, Sakaguchi S: Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Cell Research*, **27**: 10, 2017.
- 2) Kamada T, Togashi Y, Tay C, Ha D, Sasaki A, Nakamura Y, Sato E, Fukuoka S, Tada Y, Tanaka A, Morikawa H, Kawazoe A, Kinoshita T, Shitara K, Sakaguchi S, Nishikawa H: PD-1<sup>+</sup> regulatory T cells amplified by PD-1 blockade promote hyperprogression of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, **116**: 9999-10008, 2019.
- 3) Kumagai S, Togashi Y, Kamada T, Sugiyama E, Nishinakamura H, Takeuchi Y, Vitaly K, Itahashi K, Maeda Y, Matsui S, Shibahara T, Yamashita Y, Irie T, Tsuge A, Fukuoka S, Kawazoe A, Udagawa H, Kirita K, Aokage K, Ishii G, Kuwata T, Nakama K, Kawazu M, Ueno T, Yamazaki N, Goto K, Tsuboi M, Mano H, Doi T, Shitara K, Nishikawa H: The PD-1 expression balance between effector and regulatory T cells predicts the clinical efficacy of PD-1 blockade therapies. *Nat Immunol*, **21**: 1346-1358, 2020.
- 4) Sato K, Sato N, Xu B, Nakamura Y, Nagaya T, Choyke PL, Hasegawa Y, Kobayashi H: Spatially selective depletion of tumor-associated regulatory T cells with near-infrared photoimmunotherapy. *Sci Transl Med*, **8**: 352ra110-352ra110, 2016.
- 5) Arce Vargas F, Furness AJS, Solomon I, Joshi K, Mekkaoui L, Lesko MH, Miranda Rota E, Dahan R, Georgiou A, Sledzinska A, Ben Aissa A, Franz D, Werner Sunderland M, Wong YNS, Henry JY, O'Brien T, Nicol D, Challacombe B, Beers SA, Melanoma TRACERx Consortium, Renal TRACERx Consortium, Lung TRACERx Consortium, Turajlic S, Gore M, Larkin J, Swanton C, Chester KA, Pule M, Ravetch JV, Marafioti T, Peggs KS, Quezada SA: Fc-Optimized Anti-CD25 Depletes Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells and Synergizes with PD-1 Blockade to Eradicate Established Tumors. *Immunity*, **46**: 577-586, 2017.
- 6) Ha D, Tanaka A, Kibayashi T, Tanemura A, Sugiyama D, Wing JB, Lim EL, Teng KWW, Adeegbe D, Newell EW, Katayama I, Nishikawa H, Sakaguchi S: Differential control of human Treg and effector T cells in tumor immunity by Fc-engineered anti-CTLA-4 antibody. *Proc Natl Acad Sci USA*, **116**: 609-618, 2019.
- 7) Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington K, Kasper S, Vokes EE, Even C, Worden F, Saba NF, Iglesias Docampo LC, Haddad R, Rordorf T, Kiyota N, Tahara M, Monga M, Lynch M, Geese WJ, Kopit J, Shaw JW, Gillison ML: Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med*, **375**: 1856-1867, 2016.
- 8) Burtess B, Harrington KJ, Greil R, Soulières D, Tahara M, de Castro G, Psyrri A, Basté N, Neupane P, Bratland Å, Fuereder T, Hughes BGM, Mesía R, Ngamphaiboon N, Rordorf T, Wan Ishak WZ, Hong RL, González Mendoza R, Roy A, Zhang Y, Gumuscu B, Cheng JD, Jin F, Rischin D, on behalf of the KEYNOTE-048 Investigators: Pembrolizumab alone or with chemotherapy versus cetuximab with chemotherapy for recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-048): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*, **394**: 1915-1928, 2019.
- 9) Yokota T, Homma A, Kiyota N, Tahara M, Hanai N, Asakage T, Matsuura K, Ogawa T, Saito Y, Sano D, Kodaira T, Motegi A, Yasuda K, Takahashi S, Tanaka K, Onoe T, Okano S, Imamura Y, Ariizumi Y, Hayashi R, Japan Clinical Oncology Group (JCOG) Head and Neck Cancer Study Group: Immunotherapy for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Japanese J Clin Oncol*, **50**: 1089-1096, 2020.
- 10) Mandal R, Şenbabaoğlu Y, Desrichard A, Havel JJ, Dalin MG, Riaz N, Lee KW, Ganly I, Hakimi AA, Chan TA, Morris LGT: The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI Insight*, **1**: e89829, 2016.
- 11) Cho JH, Lim YC: Prognostic impact of regulatory T cell in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*, **112**: 105084, 2021.
- 12) Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochoff G, Sakaguchi S: Functional Delineation and Differentiation Dynamics of Human CD4<sup>+</sup> T Cells Expressing the FoxP3 Transcription Factor. *Immunity*, **30**: 899-911, 2009.
- 13) Ihara F, Sakurai D, Horinaka A, Makita Y, Fujikawa A, Sakurai T, Yamasaki K, Kunii N, Motohashi S, Nakayama T, Okamoto Y: CD45RA<sup>-</sup>Foxp3<sup>high</sup> regulatory T cells have a negative impact



- on the clinical outcome of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*, **66**: 1275-1285, 2017.
- 14) Suzuki S, Ogawa T, Sano R, Takahara T, Inukai D, Akira S, Tsuchida H, Yoshikawa K, Ueda R, Tsuzuki T: Immune-checkpoint molecules on regulatory T-cells as a potential therapeutic target in head and neck squamous cell cancers. *Cancer Sci*, **111**: 1943-1957, 2020.
  - 15) Ishii T, Ishida T, Utsunomiya A, Inagaki A, Yano H, Komatsu H, Iida S, Imada K, Uchiyama T, Akinaga S, Shitara K, Ueda R: Defucosylated Humanized Anti-CCR4 Monoclonal Antibody KW-0761 as a Novel Immunotherapeutic Agent for Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. *Clin Cancer Res*, **16**: 1520-1531, 2010.
  - 16) Sugiyama D, Nishikawa H, Maeda Y, Nishioka M, Tanemura A, Katayama I, Ezoe S, Kanakura Y, Sato E, Fukumori Y, Karbach J, Jager E, Sakaguchi S: Anti-CCR4 mAb selectively depletes effector-type FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells, evoking antitumor immune responses in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**: 17945-17950, 2013.
  - 17) Zhang T, Sun J, Li J, Zhao Y, Zhang T, Yang R, Ma X: Safety and efficacy profile of mogamulizumab (Poteligeo) in the treatment of cancers: an update evidence from 14 studies. *BMC Cancer*, **21**: 618, 2021.
  - 18) Kurose K, Ohue Y, Wada H, Iida S, Ishida T, Kojima T, Doi T, Suzuki S, Isobe M, Funakoshi T, Kakimi K, Nishikawa H, Udon H, Oka M, Ueda R, Nakayama E: Phase Ia Study of FoxP3<sup>+</sup> CD4 Treg Depletion by Infusion of a Humanized Anti-CCR4 Antibody, KW-0761, in Cancer Patients. *Clin Cancer Res*, **21**: 4327-4336, 2015.
  - 19) Saito T, Kurose K, Kojima T, Funakoshi T, Sato E, Nishikawa H, Nakajima J, Seto Y, Kakimi K, Iida S, Doki Y, Oka M, Ueda R, Wada H: Phase Ib study on the humanized anti-CCR4 antibody, KW-0761, in advanced solid tumors. *Nagoya J Med Sci*, **83**: 827-840, 2021.
  - 20) Doi T, Muro K, Ishii H, Kato T, Tsushima T, Takenoyama M, Oizumi S, Gemmoto K, Suna H, Enokitani K, Kawakami T, Nishikawa H, Yamamoto N: A Phase I Study of the Anti-CC Chemokine Receptor 4 Antibody, Mogamulizumab, in Combination with Nivolumab in Patients with Advanced or Metastatic Solid Tumors. *Clin Cancer Res*, **25**: 6614-6622, 2019.
  - 21) Zamarin D, Hamid O, Nayak-Kapoor A, Sahebjam S, Sznol M, Collaku A, Fox FE, Marshall MA, Hong DS: Mogamulizumab in Combination with Durvalumab or Tremelimumab in Patients with Advanced Solid Tumors: A Phase I Study. *Clin Cancer Res*, **26**: 4531-4541, 2020.
  - 22) Hong DS, Rixe O, Chiu VK, Forde PM, Dragovich T, Lou Y, Nayak-Kapoor A, Leidner R, Atkins JN, Collaku A, Fox FE, Marshall MA, Olszanski AJ: Mogamulizumab in Combination with Nivolumab in a Phase I/II Study of Patients with Locally Advanced or Metastatic Solid Tumors. *Clin Cancer Res*, **28**: 479-488, 2022.
  - 23) Maeda Y, Wada H, Sugiyama D, Saito T, Irie T, Itahashi K, Minoura K, Suzuki S, Kojima T, Kakimi K, Nakajima J, Funakoshi T, Iida S, Oka M, Shimamura T, Doi T, Doki Y, Nakayama E, Ueda R, Nishikawa H: Depletion of central memory CD8<sup>+</sup> T cells might impede the antitumor therapeutic effect of Mogamulizumab. *Nat Commun*, **12**: 7280, 2021.
  - 24) Gaud G, Lesourne R, Love PE: Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, **18**: 485-497, 2018.
  - 25) Lin JX, Leonard WJ: The Common Cytokine Receptor  $\gamma$  Chain Family of Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **10**: a028449, 2018.]
  - 26) Watford WT, Hissong BD, Bream JH, Kanno Y, Muul L, O'Shea JJ: Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol Rev*, **202**: 139-156, 2004.
  - 27) Ikushima H, Miyazono K: TGF  $\beta$  signalling: a complex web in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, **10**: 415-424, 2010.
  - 28) Nishio-Nagai M, Suzuki S, Yoshikawa K, Ueda R, Kazaoka Y: Adoptive immunotherapy combined with FP treatment for head and neck cancer: An in vitro study. *Int J Oncol* **51**: 1471-1481, 2017.
  - 29) Kondo Y, Suzuki S, Takahara T, Ono S, Goto M, Miyabe S, Sugita Y, Ogawa T, Ito H, Satou A, Tsuzuki T, Yoshikawa K, Ueda R, Nagao T: Improving function of cytotoxic T-lymphocytes by transforming growth factor- $\beta$  inhibitor in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*, **112**: 4037-4049, 2021.
  - 30) Puram SV, Tirosh I, Parikh AS, Patel AP, Yizhak K, Gillespie S, Rodman C, Luo CL, Mroz EA, Emerick KS, Deschler DG, Varvares MA, Mylvaganam R, Rozenblatt-Rosen O, Rocco JW, Faquin WC, Lin DT, Regev A, Bernstein BE: Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell*, **171**: 1611-1624.e24, 2017.
  - 31) Ge SX, Son EW, Yao R: iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics*, **19**: 534, 2018.
  - 32) Kanda Y: Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*, **48**: 452-458, 2013.
  - 33) Rech AJ, Mick R, Martin S, Recio A, Aqui NA, Powell DJ, Colligon TA, Trosko JA, Leinbach LI, Pletcher CH, Tweed CK, DeMichele A, Fox KR, Domchek SM, Riley JL, Vonderheide RH: CD25 Blockade Depletes and Selectively Reprograms Regulatory T Cells in Concert with Immunotherapy in Cancer Patients. *Sci Transl Med*, **4**: 134ra62, 2012.
  - 34) Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, Roddie C, Henry JY, Yagita H, Wolchok JD, Peggs KS, Ravetch JV, Allison JP, Quezada SA: Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med*, **210**: 1695-1710, 2013.
  - 35) Bulliard Y, Jolicoeur R, Windman M, Rue SM, Ettenberg S, Knee DA, Wilson NS, Dranoff G, Brogdon JL: Activating Fc  $\gamma$

- receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies. *J Exp Med*, **210**: 1685-1693, 2013.
- 36) Selby MJ, Engelhardt JJ, Quigley M, Henning KA, Chen T, Srinivasan M, Korman AJ: Anti-CTLA-4 Antibodies of IgG2a Isotype Enhance Antitumor Activity through Reduction of Intratumoral Regulatory T Cells. *Cancer Immunol Res*, **1**: 32-42, 2013.
  - 37) Kondo T, Takiguchi M: Human memory CCR4+CD8+ T cell subset has the ability to produce multiple cytokines. *Int Immunol*, **21**: 523-532, 2009.
  - 38) Yamaguchi T, Kakefuda R, Tajima N, Sowa Y, Sakai T: Antitumor activities of JTP-74057 (GSK1120212), a novel MEK1/2 inhibitor, on colorectal cancer cell lines in vitro and in vivo. *Int J Oncol* **39**: 23-31, 2011.
  - 39) Gilmartin AG, Bleam MR, Groy A, Moss KG, Minthorn EA, Kulkarni SG, Rominger CM, Erskine S, Fisher KE, Yang J, Zappacosta F, Annan R, Sutton D, Laquerre SG: GSK1120212 (JTP-74057) Is an Inhibitor of MEK Activity and Activation with Favorable Pharmacokinetic Properties for Sustained In Vivo Pathway Inhibition. *Clin Cancer Res*, **17**: 989-1000, 2011.
  - 40) The Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, **517**: 576-582, 2015.
  - 41) Hammerman PS, Hayes DN, Grandis JR: Therapeutic Insights from Genomic Studies of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Discov*, **5**: 239-244, 2015.
  - 42) Albanell J, Codony-Servat J, Rojo F, Raspall G, Giral J, Rosello J, Nicholson RI, Mendelsohn J, Baselga J. Activated Extracellular Signal-regulated Kinases: Association with Epidermal Growth Factor Receptor/Transforming Growth Factor  $\alpha$  Expression in Head and Neck Squamous Carcinoma and Inhibition by Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Treatments. *Cancer Res*, **61**: 6500-6510, 2001.
  - 43) Søland TM, Husvik C, Koppang HS, Boysen M, Sandvik L, Clausen OPF, Christoffersen T, Bryne M: A study of phosphorylated ERK1/2 and COX-2 in early stage (T1-T2) oral squamous cell carcinomas: p-ERK1/2 and COX-2 in oral cancer. *J Oral Pathol Med*, **37**: 535-542, 2008.
  - 44) Uppaluri R, Winkler AE, Lin T, Law JH, Haughey BH, Nussenbaum B, Paniello RC, Rich JT, Diaz JA, Michel LP, Wildes T, Dunn GP, Zolkind P, Kallogjeri D, Piccirillo JF, Dehdashti F, Siegel BA, Chernock RD, Lewis JS, Adkins DR: Biomarker and Tumor Responses of Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma to Trametinib: A Phase II Neoadjuvant Window-of-Opportunity Clinical Trial. *Clin Cancer Res*, **23**: 2186-2194, 2017.
  - 45) Liu L, Mayes PA, Eastman S, Shi H, Yadavilli S, Zhang T, Yang J, Seestaller-Wehr L, Zhang SY, Hopson C, Tsvetkov L, Jing J, Zhang S, Smothers J, Hoos A: The BRAF and MEK Inhibitors Dabrafenib and Trametinib: Effects on Immune Function and in combination with Immunomodulatory Antibodies Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4. *Clin Cancer Res*, **21**: 1639-51, 2015.
  - 46) Prasad M, Zorea J, Jagadeeshan S, Shnerb AB, Mathukkada S, Bouaoud J, Michon L, Novoplansky O, Badarni M, Cohen L, Yegodayev KM, Tzadok S, Rotblat B, Brezina L, Mock A, Karabajakian A, Fayette J, Cohen I, Cooks T, Allon I, Dimitstein O, Joshua B, Kong D, Voronov E, Scaltriti M, Carmi Y, Conde-Lopez C, Hess J, Kurth I, Morris LGT, Saintigny P, Elkabets M: MEK1/2 inhibition transiently alters the tumor immune microenvironment to enhance immunotherapy efficacy against head and neck cancer. *J Immunother Cancer*, **10**: e00391, 2022.
  - 47) Infante JR, Fecher LA, Falchook GS, Nallapareddy S, Gordon MS, Becerra C, DeMarini DJ, Cox DS, Xu Y, Morris SR, Peddareddigari VG, Le NT, Hart L, Bendell JC, Eckhardt G, Kurzrock R, Flaherty K, Burris HA, Messersmith WA: Safety, pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy data for the oral MEK inhibitor trametinib: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol*, **13**: 773-781, 2012.

論文提出先：愛知学院大学大学院歯学研究科委員会  
(名古屋市千種区楠元町 1-100)