

学位論文の要旨

学位の種類	博士(医学)	氏名	野崎 結
学位論文題目			
PD-L1-specific helper T-cells exhibit effective antitumor responses: New strategy of cancer immunotherapy targeting PD-L1 in head and neck squamous cell carcinoma (PD-L1を標的とした頭頸部扁平上皮癌に対する癌免疫療法に関する研究)			
共著者名			
大栗敬幸, 大原賢三, 熊井琢美, 永田真莉乃, 原淵翔平, 小坂朱, 長門利純, 石橋佳, 及川賢輔, 青木直子, 大原みずほ, 原淵保明, 鶴野裕治, 武井英博, Esteban Celis, 小林博也			
Journal of Translational Medicine, (2019)17:207 DOI: 10.1186/s12967-019-1957-5.			
研究目的			
<p>悪性腫瘍に対する新たな治療法として、近年様々な癌種で免疫療法が注目を集めている。PD-1/PD-L1経路は免疫チェックポイント分子の一つとして知られ、活性型T細胞表面に発現しているPD-1が、リガンドであるPD-L1と結合することにより抗原特異的に細胞傷害性T細胞(CTL)の活性を抑制している。近年、様々な癌種においてPD-L1の発現増加が認められている。腫瘍細胞に発現しているPD-L1がCTL表面に発現しているPD-1と結合することで、CTLに抑制性シグナルを伝達しアポトーシス・アナジーが誘導され、癌の免疫逃避の大きな一因となっている。このPD-1/PD-L1経路を阻害する抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体による抗腫瘍効果が明らかとなり、頭頸部癌に対しても腫瘍退縮などの治療効果が示され、既に抗体医薬として上市されている。</p> <p>今回我々は、腫瘍細胞表面に発現しているPD-L1を癌免疫療法の新たな標的抗原として着目し、PD-L1エピトープペプチドを用いた癌ワクチン療法の可能性について検討を行った。</p>			
材料・方法			
1. 中咽頭癌患者におけるPD-L1の発現の検討			
2010年から2014年の間に旭川医科大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科で治療を行った新規中咽頭癌患者24例の検体を用いて、免疫組織化学染色によってPD-L1、HLA-class II分子(HLA-DR)の発現を評価し、予後との相関を検討した。			

2. ヒト末梢血を用いたPD-L1ペプチド特異的CD4陽性ヘルパーT細胞 (HTL) クローンの誘導
PD-L1の全アミノ酸配列からHLA-class II分子への結合能が高い配列をコンピューターアルゴリズム解析にて同定し、その結果を元に候補エピトープペプチドを合成した。次に健常人末梢血より分離したCD4陽性ヘルパーT細胞を合成したPD-L1エピトープペプチドで刺激し、ペプチドへの特異的な反応性を有するHTLクローンを樹立した。
3. PD-L1陽性腫瘍細胞株に対するPD-L1特異的HTLクローンの反応性の検討
PD-L1特異的HTLクローンの腫瘍細胞株に対する反応性を評価するため、誘導したT細胞クローンをPD-L1陽性腫瘍細胞株と共培養し、上清中のサイトカインを測定した。またPD-L1発現を抑制した腫瘍細胞株を作成し、PD-L1発現量によるT細胞クローンの反応性の違いを検討した。
さらにPD-L1を発現している正常組織へのPD-L1特異的HTLクローンの反応性を評価するため、同一ドナーの末梢血より分離したPD-L1陽性樹状細胞との反応性を検討した。
4. PD-L1特異的HTLクローンの細胞傷害活性
PD-L1特異的HTLクローンとPD-L1陽性腫瘍細胞株を共培養し、腫瘍細胞を傷害する上清中のGranzyme Bを定量した。さらにフローサイトメーターを用いて、腫瘍傷害活性を検討した。
5. *in vivo*動物モデルにおけるPD-L1特異的HTLクローンの抗腫瘍増殖能の検討
PD-L1陽性腫瘍細胞株を移植したnude mouseにPD-L1特異的HTLクローンを静注し、マウス内での腫瘍増殖が抑制されるか検討した。
6. 頭頸部扁平上皮癌患者末梢血中PD-L1ペプチド反応性T細胞の存在評価
頭頸部扁平上皮癌患者の末梢血中単核球 (PBMC) を分離し、PD-L1ペプチドに対する反応性を検討し、担癌患者末梢血中におけるPD-L1反応性T細胞の存在を評価した。
手術検体の免疫染色および担癌患者末梢血患者の評価は旭川医科大学倫理委員会の承認を得て行った (承認番号16040)。

成 績

1. 2010年から2014年に当科で治療を行なった24例の新規中咽頭癌患者において、手術・生検検体を免疫組織化学的に調べたところ、PD-L1は66.7%(16/24例)の症例に陽性であった。またHLA-DR分子は33.3%(8/24例)の症例に陽性であった。各分子の発現と予後との有意な相関はみられなかった。
2. コンピューターアルゴリズム解析の結果をもとに、PD-L1₂₄₁₋₂₆₅のエピトープペプチドを作成した。健常人末梢血から分離されたCD4陽性T細胞をこのエピトープペプチドで刺激し、複数人の末梢血からPD-L1特異的HTLクローンを樹立した。これらのT細胞クローンのPD-L1ペプチドに対する反応は抗HLA-DR抗体によって抑制されたことから、HLA-DR分子拘束性であることが示された。
3. 樹立したPD-L1特異的HTLクローンは共培養したPD-L1陽性腫瘍細胞株を認識しIFN- γ を産生した。siRNAでPD-L1発現を抑制した腫瘍細胞株との共培養でT細胞からのIFN- γ 産生が抑制され、PD-L1特異的HTLクローンは腫瘍細胞に発現しているPD-L1を特異的に認識し反応する

ことが示された。またPD-L1陽性の樹状細胞との共培養ではIFN- γ 産生がごくわずかであり、PD-L1特異的HTLクローンの正常組織への反応性は低いことが示された。

4. PD-L1陽性腫瘍細胞株と共培養したPD-L1特異的HTLクローンから、Granzyme Bが産生され、高い細胞傷害活性を有することがわかった。
5. PD-L1陽性ヒト腫瘍細胞株をnude mouseに移植し、PD-L1特異的HTLクローンを静注したところ、コントロール群に比べて有意に腫瘍の増殖能が抑制され抗腫瘍効果が認められた。
6. 頭頸部扁平上皮癌患者末梢血から分離したPBMCをPD-L1エピトープペプチドで刺激したところ、5例中4例においてPD-L1ペプチド特異的サイトカイン産生能が認められた。このことから、頭頸部扁平上皮癌患者の末梢血中に本研究で同定されたPD-L1ペプチド反応性を有するT細胞分画が存在することが示された。

考 案

悪性腫瘍の新たな治療法として免疫療法が注目されており、様々な癌腫で免疫チェックポイント分子阻害薬の適応が拡大されてきている。本邦においても2017年から再発または遠隔転移を有する頭頸部癌が抗PD-1抗体製剤の適応となり、今後ますます頭頸部癌治療における免疫療法の重要性が高まると考えられる。

PD-1/PD-L1経路は免疫チェックポイント分子の一つとして知られ、一般的に悪性腫瘍においてはPD-L1陽性が予後不良因子の一つとして知られている。本研究では中咽頭癌症例24例中16例(66.7%)でPD-L1陽性であった。症例数が少なく予後との相関は認められなかったものの、PD-L1は頭頸部癌に対する新たな免疫療法の標的分子になり得るものと考えられる。

PD-L1特異的CTLクローンの誘導に成功した報告はすでにあるが、HTLクローンの誘導については本研究が初めてである。一般的に腫瘍免疫で中心役割を果たすのはCTLとされており、HTLはその補助的な役割を果たしているとされてきた。しかし、近年HTLはCTLの産生や維持に重要であるだけでなく、HTL自体が細胞傷害活性を持ち直接的な抗腫瘍効果を有することが知られている。本研究においても、PD-L1特異的HTLクローンが腫瘍細胞を傷害するGranzyme Bを産生していることが示され、直接的に腫瘍細胞を傷害する高い細胞傷害活性を有することがわかった。またヒト腫瘍細胞を移植したnude mouseモデルにおいて、PD-L1特異的HTLクローンの抗腫瘍効果が示された。

PD-L1は腫瘍細胞だけでなく、樹状細胞といった正常な免疫細胞にも発現しており、PD-L1特異的HTLクローンによる自己免疫有害事象発症の可能性も考慮せねばならない。本研究では誘導されたHTLクローンの樹状細胞に対する反応性は腫瘍細胞に対する反応性比較して低かった。これは今回誘導されたT細胞クローンがHTLであり、CTLに比べて細胞傷害活性が高くないことが正常組織への低反応性の一因になったと考えられる。

PD-L1をはじめとする免疫チェックポイント分子阻害薬の臨床効果は効患者群では非常に高く、PD-L1が腫瘍免疫系での非常に重要な分子であることを示唆するものである。また、実際の頭頸部扁平上皮癌患者の末梢血中に本研究で同定したPD-L1ペプチドに反応する前駆T細胞が存在することも確認された。今後、頭頸部扁平上皮癌治療においてPD-L1を標的としたペプチドワクチン療法が臨床応用可能な治療法となり得ることが示唆された。

引 用 文 献

1. Munir S, Andersen GH, Met O, Donia M, Frosig TM, Larsen SK, Klausen TW, Svane IM, Andersen MH. HLA-restricted CTL that are specific for the immune checkpoint ligand PD-L1 occur with high frequency in cancer patients. *Cancer Res.* 2013;73:1764–76.
2. Minami T, Minami T, Shimizu N, Yamamoto Y, De Velasco M, Nozawa M, Yoshimura K, Harashima N, Harada M, Uemura H. Identification of programmed death ligand 1-derived peptides capable of inducing cancer-reactive cytotoxic T lymphocytes from HLA-A24+ patients with renal cell carcinoma. *J Immunother.* 2015;38:285–91.

参 考 論 文

1. Kumai T, Matsuda Y, Ohkuri T, Oikawa K, Ishibashi K, Aoki N, Kimura S, Harabuchi Y, Celis E, Kobayashi H. c-Met is a novel tumor associated antigen for T-cell based immunotherapy against NK/T cell lymphoma. *Oncoimmunology.* 2015;4:e976077.