

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

A combination of check-point blockade and α -galactosylceramide elicits long-lasting suppressive effects on murine hepatoma cell growth in vivo

チェックポイント阻害薬と α -ガラクトシルセラミドの併用療法による
マウスモデルにおける肝細胞癌の長期抑制効果

日本医科大学大学院医学研究科 微生物学・免疫学分野
大学院生 石井 一史
Immunobiology (2019年) 掲載予定
DOI: 10.1016/j.imbio.2019.10.009.

癌治療において最も重要な免疫細胞は、癌細胞を特異的に認識排除する細胞障害性 T 細胞 (CTL) である。CTL による癌治療を阻害する因子として、癌細胞上に発現している PD-L1 分子と CTL 上に発現している PD-1 分子による相互抑制機構がある。この相互抑制は抗 PD-1 抗体あるいは抗 PD-L1 抗体により解除され、CTL は腫瘍細胞を攻撃排除することが可能となるが、実際は必ずしも治療が奏効するとは限らない。その要因の一つとして、申請者は以前、マウス肝細胞癌細胞株 (Hepa1-6-1) を移植したマウスにおいて、腫瘍内の樹状細胞 (DC) が特異的 CTL を誘導できない寛容状態 (tolerogenic DC) になっていることを報告した (Harimoto *et al.*, 2013)。

一方、申請者は DC 上に発現する脂質抗原提示分子 CD1d の特異的リガンドである α -galactosylceramide (α -GalCer) により DC を活性化できることを報告した (Kogo *et al.*, 2017)。本研究では、 α -GalCer と抗 PD-1 抗体の併用により DC の機能がさらに向上し、抗腫瘍効果が増強するか検討した。

野生型あるいは CD1d 欠損 (CD1d^{-/-}) マウスに同系腫瘍細胞株 Hepa1-6-1 (1×10^7 細胞) を腹部に皮下移植し、腫瘍内、所属リンパ節、脾臓の免疫細胞を各々 flow cytometry, CTL assay, ELISA にて解析した。また抗 PD-1 抗体や α -GalCer、これらの併用療法による腫瘍抑制効果を比較検討した。

腫瘍移植 7 日後に腫瘍浸潤 NK 細胞数は減少したが、PD-1⁺CD8⁺CTL は経時的に増加した。一方、移植 5, 10, 15 日後に抗 PD-1 抗体を投与したところ、抗 PD-1 抗体 100 μ g/body にて腫瘍抑制効果が確認できたが、CD8 β ⁺T 細胞を除去したマウスモデルでは腫瘍抑制効果を認め

ないことから、CD8⁺CTL 依存性の腫瘍抑制効果であることを確認した。

次に tolerogenic DC に与える α -GalCer の効果を検討した。Hepa1-6-1 細胞との共培養により tolerogenic 化した DC を α -GalCer 存在下で培養したところ、DC 上の CD80 と CD86 の発現が増加し大量の IL-12 が産生されたことから、 α -GalCer は tolerogenic DC を免疫原性樹状細胞 (immunogenic DC) に変換することが明らかとなった。一方、抗 PD-1 抗体ではこのような転換は認められなかった。

また、申請者は Hepa1-6-1 移植マウスモデルを用いて、 α -GalCer の *in vivo* 腫瘍抑制効果を検討した。 α -GalCer 単独投与による腫瘍抑制効果は一過性であり、腫瘍は移植 40 日後に再び増大傾向を示したが、抗 PD-1 抗体と α -GalCer の併用では移植 36 日後以降には腫瘍は消失し、その効果は長期に亘り続いた。さらに、この併用効果は抗 PD-1 抗体の投与量を 1/10 に減量しても認められた。

一方、上記の α -GalCer の効果は CD1d^{-/-}マウスでは認められなかったことから、 α -GalCer は CD1d を介して樹状細胞を活性化することが示された。

これら一連の結果から、NK 細胞は初期の腫瘍抑制に関与するが、長期の抗腫瘍抑制効果を得るには、腫瘍に浸潤した tolerogenic DC を immunogenic DC に変換し、腫瘍特異的 CD8⁺CTL を誘導することが必須であると示された。さらに腫瘍特異的 CD8⁺CTL 上の PD-1 分子と Hepa1-6-1 細胞上の PD-L1 分子の相互関係を断ち切ることで、より効率の良い腫瘍抑制効果が示されたことから、抗 PD-1 抗体と α -GalCer の併用療法の優位性が示された。しかも、 α -GalCer の併用では抗 PD-1 抗体の投与量を 90%まで減量できることが判明した。

加えて、メラノーマ細胞株に対しても抗 PD-1 抗体と α -GalCer の併用療法の優位性を示すことができた。以上より、CD1d を介した脂質抗原分子による DC の活性化は癌治療における新たな治療戦略の一つとして提案できる。

論文の二次審査では α -GalCer および抗 PD-1 抗体の副作用、PD-1 発現上昇の分子メカニズム、CD1d の下流分子シグナル経路、抗 PD-1 抗体と抗 PD-L1 抗体の差異など多岐にわたる質問がなされたが、的確な解答が得られ、申請者が本研究に関連する科学的知識を十分に有していることが示された。以上のことから本論文は学位論文として価値あるものと認定した。