



Title	肝細胞癌における抗CTLA-4抗体の薬理機序解析
Author(s)	森原, 瞳
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/98674
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (森 原 瞳)

論文題名 肝細胞癌における抗CTLA-4抗体の薬理機序解析

論文内容の要旨

近年新たながん薬物治療として抗CTLA-4抗体等の免疫チェックポイント阻害剤が注目を浴びている。一方で、約20%の患者にしか奏効性を示さないことも明らかとなっており課題も多い。これまでに、抗CTLA-4抗体の抗腫瘍効果に対するCD8陽性T細胞の関与については数多く報告されており、CD8陽性T細胞を標的とした創薬は飛躍的に進んでいる。しかしながら、抗CTLA-4療法におけるCD4陽性T細胞の病態生理学的役割については、いまだ十分に解明されていない。CD4陽性T細胞には複数のサブセットが報告されており、それぞれを規定する転写因子が同定されている。各サブセットは、感染症やアレルギー等の免疫応答において異なる役割が報告されているものの、腫瘍免疫における各サブセットの重要性は明確にされていない。臨床においては抗CTLA-4抗体によるCD4陽性T細胞の活性化が示唆されており、このような背景から、本研究では、抗CTLA-4抗体のCD4陽性T細胞を介した抗腫瘍メカニズムの解明を目的に研究を行った。

まず初めに、CD4陽性T細胞の寄与が大きい肝細胞癌 (Hepa1-6) モデルマウスを用いて抗CTLA-4抗体の薬理試験を実施した。その結果、Hepa1-6担癌モデルにおいて抗CTLA-4抗体は強力な抗腫瘍作用を示した。Hepa1-6の不均質性は今後の詳細なメカニズム解析には不適であることが考えられたため、単一クローン細胞株を樹立した (Hepa1-6#12)。親株と同様に薬理試験を実施したところ、抗CTLA-4抗体はこの亜株に対しても強力な有効性を示した。この抗腫瘍作用におけるT細胞の関与を検討するため、抗CTLA-4抗体と併用してCD4もしくはCD8陽性T細胞除去抗体を投与した結果、CD8陽性T細胞除去による抗CTLA-4抗体の抗腫瘍作用への影響は軽微であったが、CD4陽性T細胞の除去は抗CTLA-4抗体の薬効を完全に打ち消した。このことから、抗CTLA-4抗体の肝細胞癌に対する薬効はCD4陽性T細胞依存的事であることが明らかとなった。次に、免疫組織化学染色およびflow cytometryにより、腫瘍内浸潤免疫細胞の同定を行った。その結果、抗CTLA-4抗体の投与でCD4陽性T細胞が腫瘍内に多く浸潤することが示された。一方で、CD8陽性T細胞やナチュラルキラー細胞、B細胞の浸潤には変化が認められなかった。CD4陽性T細胞の腫瘍内浸潤が上昇したことから、CD4陽性T細胞のサブセット解析を実施した結果、IFN- γ を産生するT-helper 1 (Th1) 細胞が腫瘍内へ多く浸潤することが明らかとなった。既報より、CD4陽性T細胞が癌細胞上のMHC-IIを認識して腫瘍を排除することが考えられたため、CD4陽性T細胞を介した抗腫瘍メカニズムにおいて、T細胞による癌細胞の直接認識が必要か否かを検証した。CRISPR/Cas9により癌細胞上のMHC-IまたはMHC-IIをノックアウト (KO) したHepa1-6#12を作製した。これらのKO細胞を用いて薬理試験を行った結果、MHC-I-KO、MHC-II-KO-Hepa1-6#12のどちらに対しても抗CTLA-4抗体は野生型Hepa1-6#12と同等の抗腫瘍作用を示した。このことから、癌細胞上のMHC-IおよびMHC-IIの発現は抗CTLA-4抗体による腫瘍の排除に必要がないこと、つまり、抗CTLA-4抗体の薬理機序にT細胞による癌細胞の直接認識は必要ないことが示された。次に、Th1の産生するIFN- γ が抗腫瘍作用に与える影響を検証するために、IFN- γ 中和抗体と抗CTLA-4抗体の併用試験を実施した。その結果、IFN- γ の中和は抗CTLA-4抗体の薬効をキャンセルすることが明らかとなった。その際、CD4陽性細胞、CD8陽性細胞およびFoxp3陽性細胞の腫瘍内浸潤を免疫組織化学染色により評価したところ、抗CTLA-4抗体投与により腫瘍内に浸潤していたCD4陽性細胞は、IFN- γ の中和によりその浸潤量が大きく減少していた。以上のことから、腫瘍の排除にはTh1の産生するIFN- γ が重要な役割を果たしており、癌細胞除去過程においてCD4陽性T細胞の浸潤を促進することが示された。最後に、*in vitro*においてIFN- γ の癌細胞への直接作用を検証した。Hepa1-6#12にIFN- γ を100 ng/mL添加し、96時間後にcell viability assayを行ったところ、IFN- γ 添加群において癌細胞の生存数が減少していた。さらに、IFN- γ は癌細胞の細胞周期停止とアポトーシスを誘導することが明らかとなった。以上の結果から、抗CTLA-4抗体により活性化したTh1は、IFN- γ を介して癌細胞の細胞周期停止とアポトーシスを誘導することで抗腫瘍作用を発揮することが示唆された。

本研究は、抗CTLA-4抗体による抗腫瘍作用の新たな機序として、CD8陽性T細胞には依存せず、CD4陽性T細胞に依存するメカニズムが存在することを明らかにした。そのメカニズムとして、抗CTLA-4抗体がTh1 / IFN- γ 軸を介して抗腫瘍効果を発揮することが実証された。IFN- γ は、癌細胞の細胞周期停止とアポトーシスを誘導するだけでなく、CD4

陽性T細胞の腫瘍内へのさらなる浸潤を促進する可能性を示しており、Th1/IFN- γ 経路の制御が、癌に対する新しい治療戦略となる可能性を提唱した。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (森原 瞳)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	藤尾 慈
	副 査	教授	辻川 和丈
	副 査	教授	齊藤 達哉

論文審査の結果の要旨

癌に対する薬物治療として、免疫チェックポイント阻害薬に期待が寄せられているが、レスポンド率が低いことや重篤な副作用がおりうることなど、依然、多くの問題を抱えている。また、免疫チェックポイント阻害薬の作用機序は複雑で、臨床的には症例ごとに、また、基礎研究としては実験条件ごとに多彩な側面を示す。本研究は、免疫チェックポイント阻害薬抗CTLA-4抗体に着目し、肝細胞癌モデルを用いて、その抗腫瘍効果の薬理機序の解析を行ったものである。

学位申請者は、まず、大腸癌、乳癌、膀胱癌、肝細胞癌などさまざま癌細胞の移植モデルを作製し、抗CTLA-4抗体の有効性を示した。本研究では、それらの癌の中で特に肝細胞癌を対象に、抗腫瘍効果の薬理作用の解析を進め、抗CD4抗体および抗CD8抗体を用いた細胞除去実験により、抗CTLA-4抗体の腫瘍増大抑制効果はCD4陽性T細胞に依存することを見出した。また、抗CTLA-4抗体を処理した担癌マウスでは腫瘍内にCD4陽性細胞、特にTh1細胞の増加が認められることを確認した。

次に、抗CTLA-4抗体の抗腫瘍効果に、癌細胞上のMHC-IまたはMHC-IIが必要かどうかを検討したが、いずれの分子を欠損した癌細胞も、担癌モデルにおいて抗CTLA-4抗体に対する感受性を示したことから、抗CTLA-4抗体の抗腫瘍効果には、T細胞による癌細胞の直接的な認識は必要ではないと考えられた。

一方、上述のように、抗CTLA-4抗体を投与した担癌マウスの腫瘍内でTh1細胞が増加することから、Th1細胞が産生する代表的なサイトカインであるインターフェロン- γ (IFN- γ) の抗CTLA-4抗体の抗腫瘍効果における重要性を検討した。その結果、抗CTLA-4抗体を投与した担癌マウスに抗IFN- γ 抗体を投与したところ、抗CTLA-4抗体の抗腫瘍効果はキャンセルされ、抗CTLA-4抗体の薬理作用にIFN- γ が必須であることが明らかになった。IFN- γ は、腫瘍内のCD4陽性細胞の増加を促進するものの、マクロファージやB細胞の数には影響を与えず、また、腫瘍血管に占める正常血管の割合も変化させなかった。そこで、IFN- γ の癌細胞への直接作用を検討し、IFN- γ は抗腫瘍細胞の細胞増殖を抑制するとともにアポトーシスを誘導することを明らかにした。

以上、本研究は、免疫チェックポイント阻害剤抗CTLA-4抗体による抗腫瘍効果におけるTh1細胞/IFN- γ 軸の重要性を示したものである。Th1細胞/IFN- γ 経路の調節が、癌に対する新しい治療戦略になりうることを提案することにより、創薬科学の発展に貢献することが期待されることから、博士(薬科学)の学位論文に値するものと認める。