



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

肝細胞癌における抗 CTLA-4 抗体の薬理機序解析

大阪大学大学院薬学研究科 臨床薬効解析学分野

森原 瞳

略号

本文中には以下の略号を使用した。

Ab: antibody

α -SMA: alpha-smooth muscle actin

β 2m: beta-2 microglobulin

CTLA-4: cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4

FCM: flow cytometry

Gfi1: growth factor independent 1 transcriptional repressor

ICI: Immune Checkpoint inhibitor

IFN- γ : γ -interferon

IHC: Immunohistochemistry

KO: knocked out

MDSC: myeloid-derived suppressor cell

MHC: Major Histocompatibility Complex

NG2: neuron-glial antigen 2

NK: natural killer

SOCS-1: Suppressor of Cytokine Signaling-1

Th1: T-helper 1

Th2: T-helper 2

Th17: T-helper 17

TIL: Tumor Infiltrating Lymphocyte

TME: tumor microenvironment

Treg: regulatory T cell

概要

近年新たな治療法として抗 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おり、癌の治療形態を変えてきた。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きた。抗 CTLA-4 抗体は、T 細胞上の細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (CTLA-4) を阻害することで様々な癌の増殖を抑制するが、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。本研究では、単一クローニングの肝臓癌細胞株 (Hepa1-6#12) を樹立し、抗 CTLA-4 抗体の作用機序を解析した。結果、抗 CTLA-4 抗体は CD8 陽性 T 細胞ではなく CD4 陽性 T 細胞依存的に薬効を発揮した。そこで、CD4 陽性 T 細胞のサブセットを評価したところ、抗 CTLA-4 抗体投与により IFN- γ 産生 CD4 陽性 T 細胞 (T-helper 1 (Th1) 細胞) の腫瘍内浸潤が増加し、IFN- γ の中和によってその薬効はキャンセルされることが示された。またこの薬理機序に、癌細胞上の主要組織適合性複合体 (MHC) -I や MHC-II の発現は必要としなかった。最後に、*in vitro* における検討から、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可能性が示された。本研究により、抗 CTLA-4 抗体は Th1 による細胞周期停止とアポトーシスを介して抗腫瘍作用を発揮する可能性が示された。

序論

癌は世界中で研究され、次々と新薬が創出されているが、未だに世界の死亡原因のトップ10にランクインしており¹、十分な治療法は確立されていない。免疫療法は癌研究の焦点となっており、抗細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4（CTLA-4）抗体や抗プログラム細胞死1（PD-1）抗体などの免疫チェックポイント阻害剤（Immune Checkpoint inhibitors (ICI)）は、近年画期的な抗癌療法として注目を集めている。

T細胞上のCTLA-4を阻害するモノクローナル抗体であるイピリムマブは、2011年に進行性黒色腫の治療薬として世界で初めて承認されたICIであり、それ以降、転移性腎細胞癌、転移性結腸直腸癌、肝細胞癌など、他の様々な癌に適応が拡大してきた²。CTLA-4は、活性化T細胞の表面に発現するタンパク質で、抗原提示細胞上のCD80/86に結合することでT細胞の活性化を阻害する。CTLA-4の細胞外抑制機能のほとんどは制御性T細胞（Treg）によって媒介されるため³、CTLA-4の阻害はT細胞を直接活性化し、TregによるT細胞媒介免疫抑制を解除し、長期的な抗腫瘍効果をもたらすと考えられている。実際、抗CTLA-4抗体は前臨床研究で強力な有効性を示している。しかし、臨床では予期せぬ問題が引き起こされており、その有効性が一定数の患者にしか効果を示さないことが明らかとなってきた^{4,5}。さらに、重度の下痢、大腸炎、下垂体炎等の強い副作用のため、臨床使用は限られている^{4,6}。したがって、抗CTLA-4治療の根底にある詳細なメカニズムをより深く理解することで、副作用が小さく、かつ強力な抗腫瘍効果を備えた薬剤開発につながると考えた。

これまでに、抗CTLA-4抗体の抗腫瘍効果に対するCD8陽性T細胞の関与はいくつも報告されており、CD8陽性T細胞を標的とした創薬が世界的に進んでいる。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、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、その他の免疫反応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はっきりと解明されていない。一方で、臨床においても抗CTLA-4抗体によりCD4陽性T細胞の活性化が示唆された⁷。このような背景から、本研究では、CD4陽性T細胞の寄与が大きいHepa1-6に着目し⁸、マウスモデルを用いて抗CTLA-4抗体の薬理機序を解明することを目的に研究を行った。

本論

結果

抗 CTLA-4 抗体の薬効は CD4 陽性 T 細胞に依存する。

初めに、膀胱癌（MB49）、乳癌（EMT6）、大腸癌（CT26WT）および肝臓癌（Hepa1-6）、モデルマウスを作製し、抗 CTLA-4 抗体の薬理試験を実施した。その結果、すべてのマウスモデルにおいて、抗 CTLA-4 抗体は強力な薬効を示した（Figure 1A）。臨床において、抗 CTLA-4 抗体による CD4 陽性 T 細胞の活性化が示唆されていることから⁷、以降の解析では CD4 陽性 T 細胞感受性の Hepa1-6 に着目した⁸。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、単一クローニング細胞株を樹立、*in vitro* における増殖能と *in vivo* における生着能から#12 を選択した（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（Figure 1B）。抗 PD-1 抗体および抗 CTLA-4 抗体の単剤もしくは併用投与により T 細胞の増加や活性化が報告されていることから^{9,10}、本系における T 細胞の関与を検討するため、除去抗体により CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の除去を行った。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（Figure 1C）。このことから、抗 CTLA-4 抗体の薬効は CD4 陽性 T 細胞依存的であることが明らかとなった。

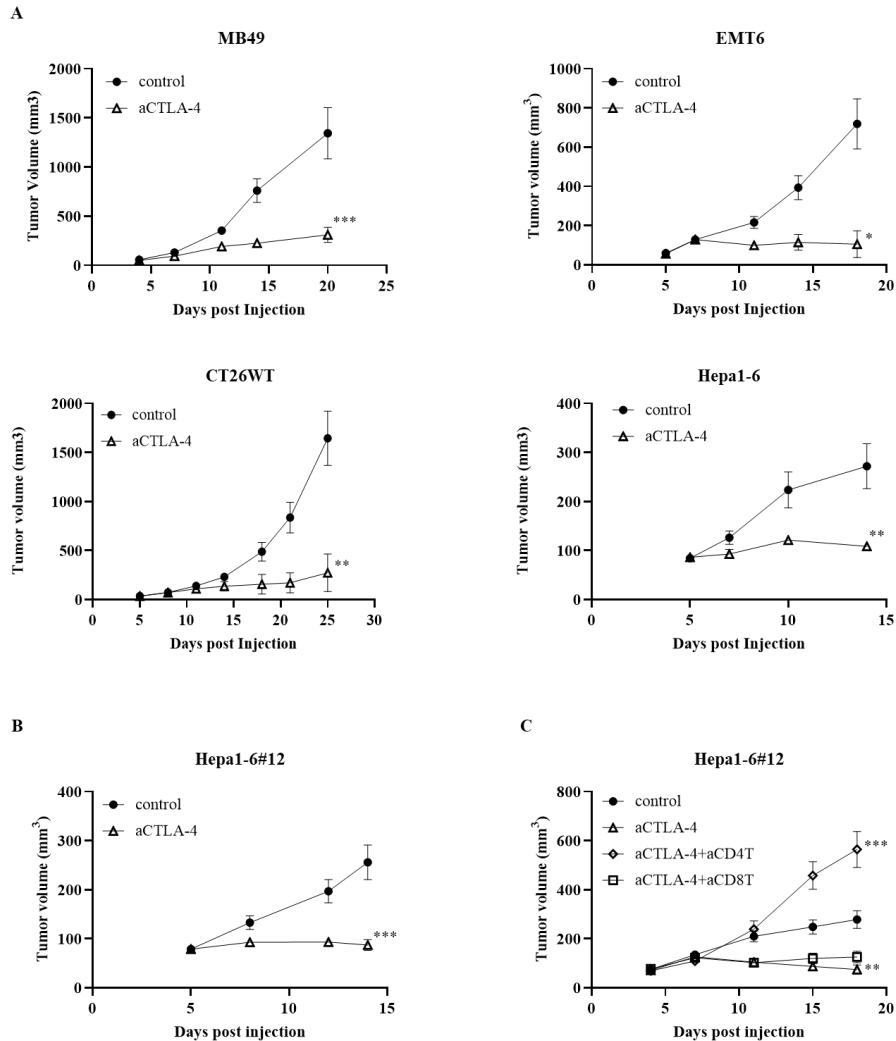
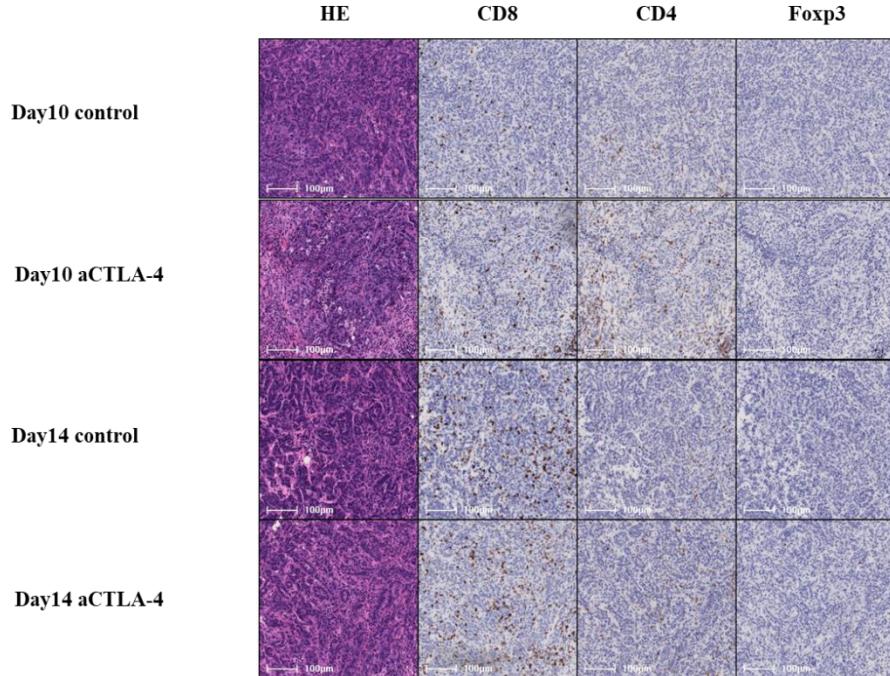
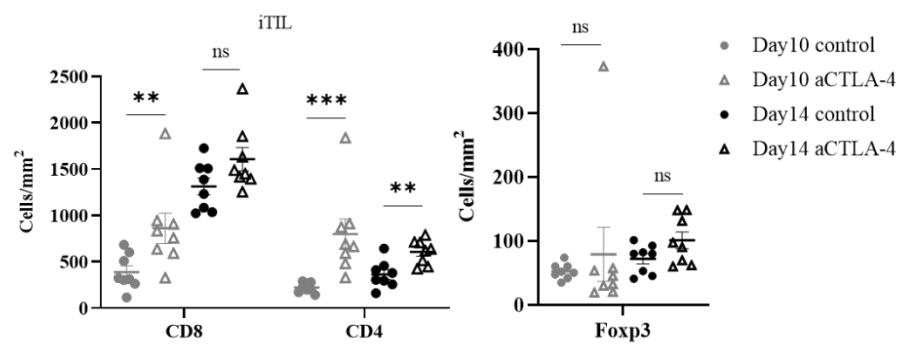


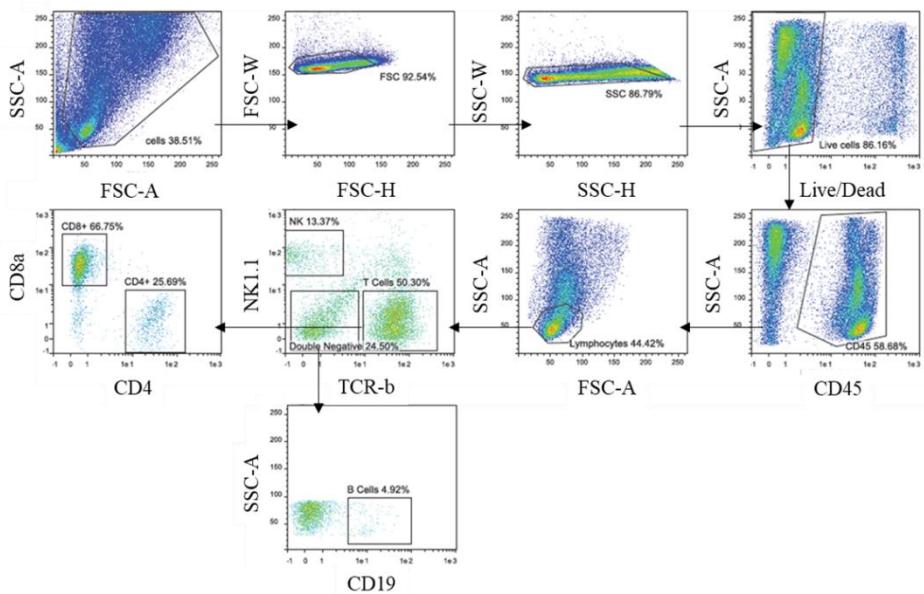
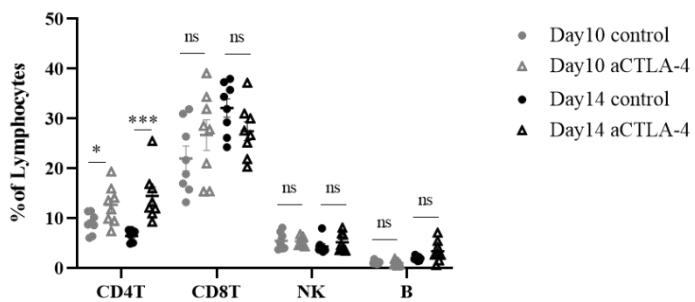
Fig 1. CD4⁺ T cells play a crucial role in anti-CTLA-4 Ab-mediated inhibition of tumor growth.

Tumor growth of (A) MB49, EMT-6, CT26WT, Hepa1-6 and (B) Hepa1-6#12 tumors with or without anti-CTLA-4 Ab treatment. The average tumor volume is shown as the mean \pm standard error of the mean (SEM) ($n=5-7$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ by Mann-Whitney test at the endpoint. (C) Tumor growth of Hepa1-6#12 tumor with or without anti-CTLA-4 Ab co-administered with a depleting Ab against CD4⁺ or CD8⁺ T cells. These depletion Abs were injected via intraperitoneal administration starting 2 days prior to tumor cell injection and continued weekly. The average tumor volume is shown as the mean \pm SEM ($n=7-8$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ by one-way ANOVA followed by Dunnett's test at the endpoint.

抗 CTLA-4 抗体は Th1 を誘導する。

抗 CTLA-4 抗体が CD4 陽性 T 細胞依存的に薬効を発揮したことから、T 細胞の腫瘍内浸潤を免疫組織化学（IHC）により検証した（Figures 2A and 2B）。腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を、癌細胞巣内に浸潤した腫瘍内 TIL（iTIL）として、画像解析ソフトウェア HALO（Indica Labs）を使用して分析した。その結果、抗 CTLA-4 抗体の投与により腫瘍内に CD4 陽性細胞が多く浸潤することが示された。さらに詳細に解析を行うため、TIL のフローサイトメトリー（FCM）を実施した。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明らかとなった。一方で、CD8 陽性 T 細胞やナチュラルキラー（NK）細胞、B 細胞の浸潤には変化が認められなかった（Figures 2C and 2D）。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 を放出する Th1 が多く腫瘍内へ浸潤することが明らかとなった（Figures 2E, 2F and 2G）。

A**B**

C**D**

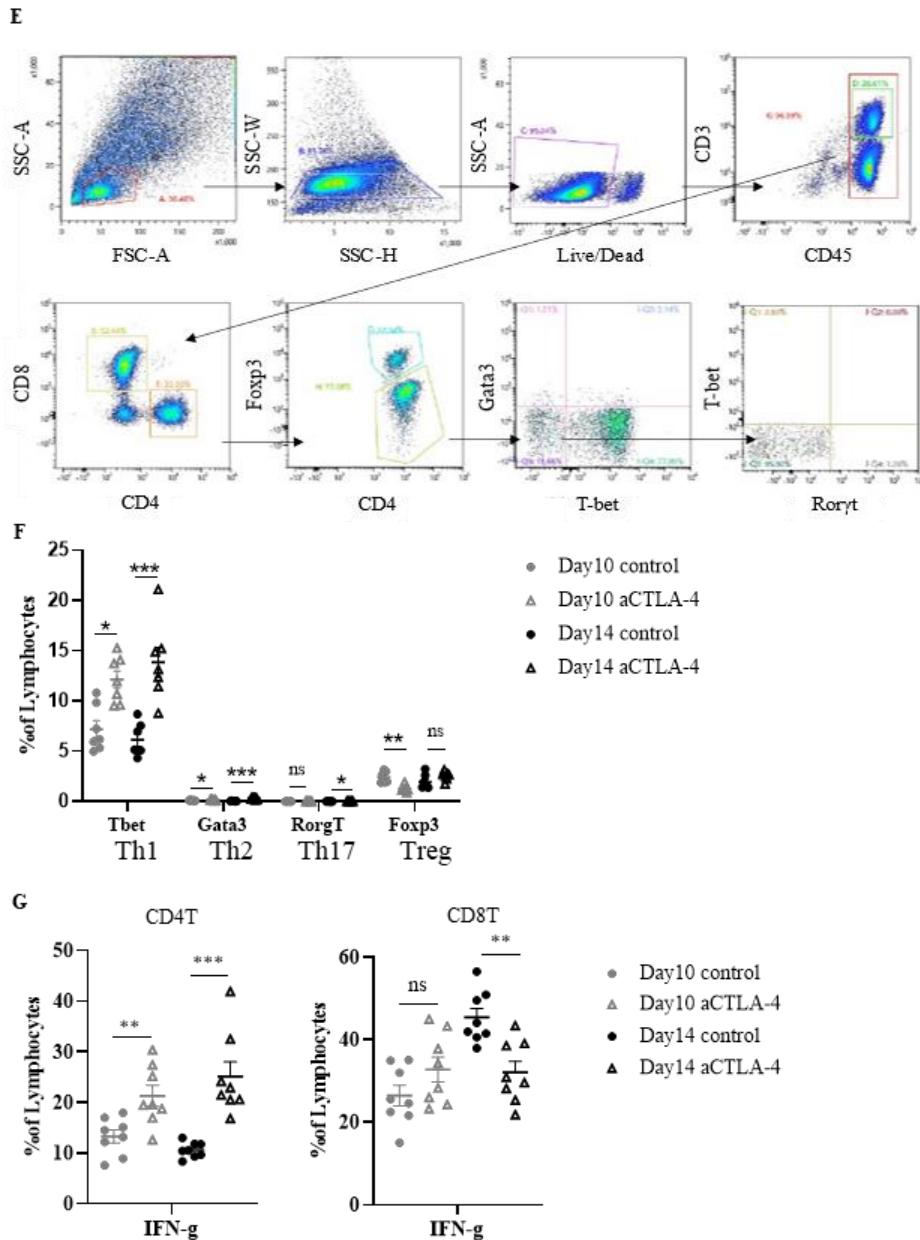


Figure 2. Anti-CTLA-4 Ab treatment induces Th1 cell infiltration. Tumors were treated with a mouse IgG2b control Ab or anti-CTLA-4 Ab on days 5, 8, and 11. (A, B) Murine tumor sections were prepared on days 10 and 14 after injection. The sections were histologically and immunohistochemically analyzed by staining for CD8⁺, CD4⁺, and Foxp3⁺ cells. Images were analyzed using HALO software. (A) Representative images are shown. (B) Quantification of TILs. Each cell density is shown as the mean ± SEM (n=8). *** $P < 0.001$ by Mann-Whitney test. (C-G) TILs were analyzed on days 10 and 14 by FCM. Percentage of each cell is shown as the mean ± SEM (n=7–8). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ by Mann-Whitney test.

癌細胞上の MHC-I、MHC-II の有無に関わらず、抗 CTLA-4 抗体は薬効を発揮する。

CD4 陽性 T 細胞を介した抗腫瘍メカニズムとして、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る¹¹。また、CD8 陽性 T 細胞が本系に関与しないことを再度確認するために、CRISPR/Cas9 により癌細胞上の MHC-I および MHC-II をノックアウト (KO) した Hepa1-6#12 (それぞれ、 β 2m KO Hepa1-6#12 および MHC-II KO Hepa1-6#12) を作製した (Figures 3A and 3B)。これらの KO 細胞を用いて薬理試験を行った結果、どちらの KO 細胞を移植したマウスにおいても、抗 CTLA-4 抗体は薬効を発揮した (Figure 3C and 3D)。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ないことが示された。なお、各 KO 細胞は親株と同等の腫瘍増殖を示した。

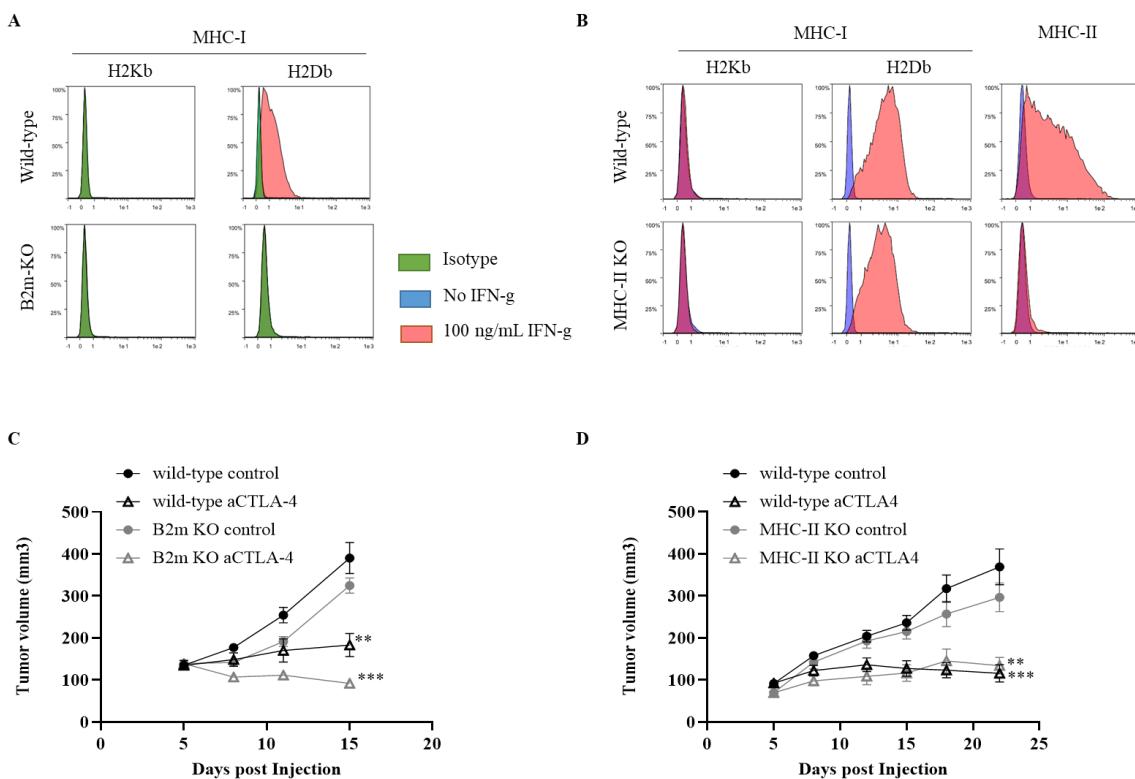
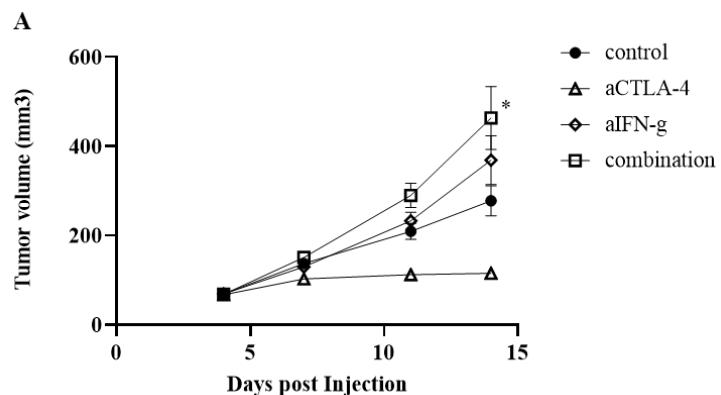


Figure 3. Hepa1-6 #12 tumor rejection induced by anti-CTLA-4 Ab treatment does not depend on MHC-I and MHC-II expression on tumor cells.

(A) In vitro expression of MHC-I on the parental or β 2m KO Hepa1-6 #12 tumor cells. (B) In vivo expression of MHC-I and MHC-II was evaluated 14 days after inoculation of parental or MHC-II KO Hepa1-6 #12 tumor cells. Tumor growth of (C) β 2m- or (D) MHC-II-KO Hepa1-6 #12 tumors with or without anti-CTLA-4 Ab treatment on days 5, 8, 11, and 15. The average tumor volume is shown as the mean \pm SEM ($n=7-8$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ by Mann-Whitney test. Data are representative of studies with two different KO clones.

IFN- γ は癌の排除に重要な役割を担っている。

次に、Th1 の產生する IFN- γ が抗腫瘍作用に与える影響を検証したところ、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 (Figures 4A)。さらに、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 IHC により評価した結果、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 中和抗体を併用することでその浸潤量が大きく減少していた。一方で、IFN- γ 中和抗体だけでは、control と比べて CD4 陽性細胞の浸潤に差は認められなかった。CD8 陽性細胞や Foxp3 陽性細胞の腫瘍内浸潤に関しては、抗 CTLA-4 抗体および IFN- γ 中和抗体による影響は認められなかった (Figures 4B and 4C)。これらの結果から、腫瘍の排除には Th1 の產生する 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。



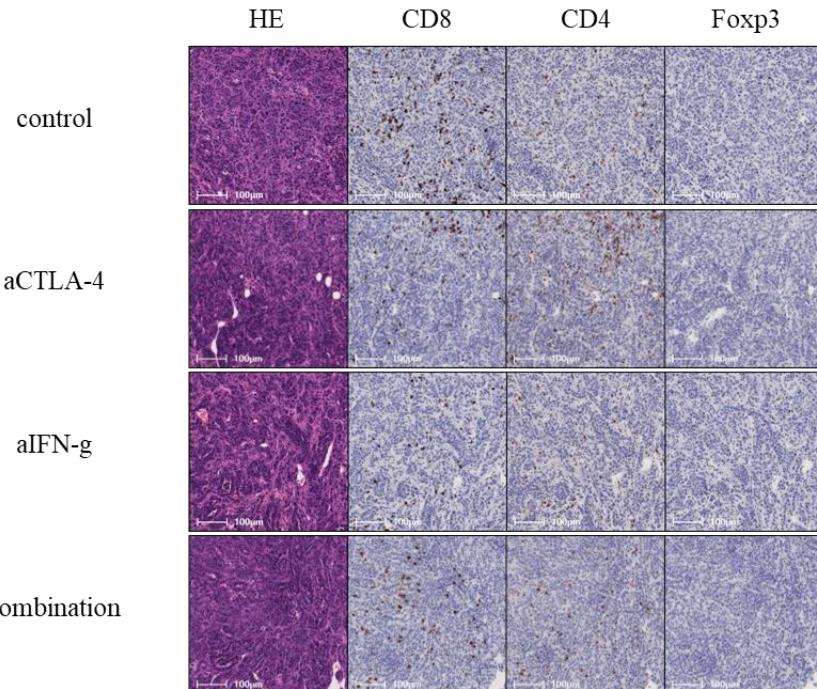
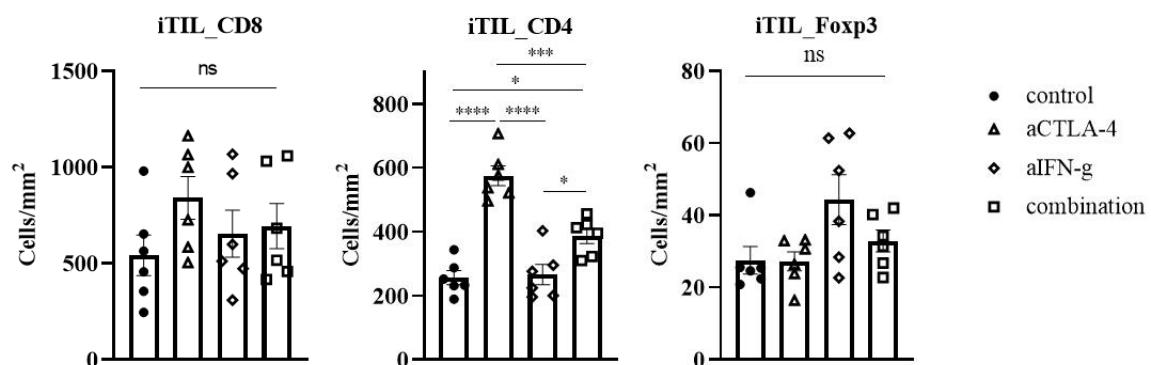
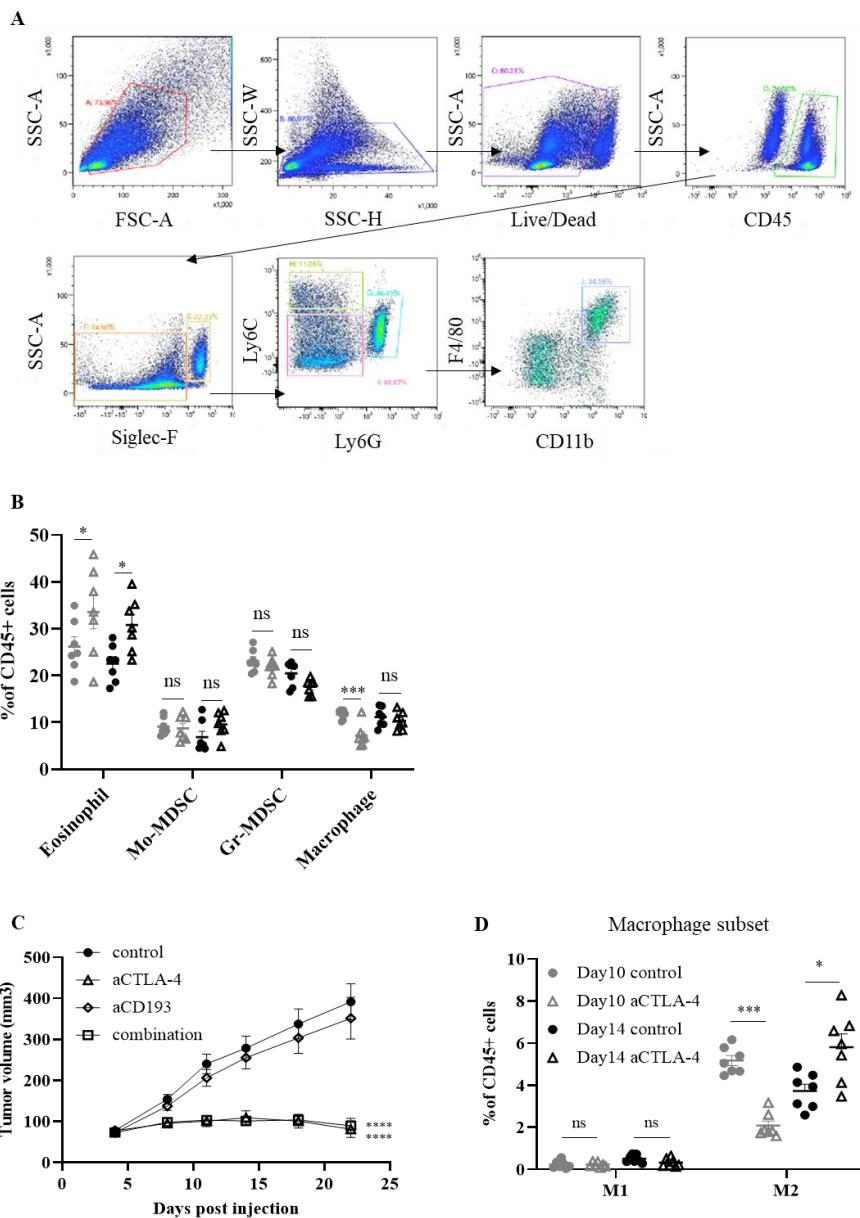
B**C**

Figure 4. IFN- γ is important for rejection of Hepa1-6 #12 tumors by anti-CTLA-4 Ab. (A) Tumor growth of Hepa1-6 #12 tumors with control or anti-CTLA-4 Ab treatment on days 5, 8, and 11 co-administered with IFN- γ neutralizing Ab on days 3, 7, and 10. The average tumor volume is shown as the mean \pm SEM ($n=8$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ by one-way ANOVA followed by Dunnett's test at the endpoint. (B, C) Murine tumor sections were prepared on day 11. The sections were histologically and immunohistochemically analyzed by staining for CD8⁺, CD4⁺, and Foxp3⁺ cells. Images were analyzed using HALO software. (B) Representative images are shown. (C) Quantification of TILs. Each cell density is shown as the mean \pm SEM ($n=6$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

IFN- γ はミエロイド系細胞の流入や血管の正常化に大きく影響しない。

CD4 陽性 T 細胞の産生する IFN- γ の作用として、1) CD8 陽性 T 細胞の活性化/抗疲弊作用を通じた抗腫瘍活性の増強¹² 2) マクロファージ等の免疫細胞を介した炎症性反応の亢進¹³ 3) 癌細胞に対する抗原提示能の増強、増殖抑制作用¹⁴ 4) 腫瘍血管の調節による抗腫瘍効果¹⁵ 等が報告されている。これまでの結果から、本系では、CD8 陽性 T 細胞への関与が小さいことが考えられるため、次に、マクロファージ等ミエロイド系細胞の関与を検討した。マクロファージ、単球性骨髓由来抑制細胞 (Mo-MDSC) 、顆粒球性 MDSC (Gr-MDSC) および好酸球について、FCM により抗 CTLA-4 抗体投与後の腫瘍内浸潤を評価したところ、抗 CTLA-4 抗体投与により好酸球が腫瘍内に浸潤することが示された (Figures 5A and 5B)。そこで、抗 CTLA-4 抗体と併用して除去抗体による好酸球除去を行ったが、抗 CTLA-4 抗体の薬効には変化が認められなかった (Figure 5C)。このことから、好酸球も薬効には関与しないことが示された。M1, M2 マクロファージの腫瘍内浸潤についても検証を行ったが、抗 CTLA-4 抗体の薬効に寄与するような変化は認められなかった (Figure 5D)。さらに、抗 CTLA-4 抗体と IFN- γ 中和抗体を併用し、腫瘍血管への影響を検証した。抗 CTLA-4 抗体が薬効を示し始める、投与後 6 日目 (移植後 11 日目) に腫瘍を回収し、蛍光免疫染色により血管の成熟度を検証したが、抗 CTLA-4 抗体の投薬による変化や IFN- γ を中和したことによる変化は認められなかった (Figures 5E, 5F and 5G)。これらの結果から、抗 CTLA-4 抗体の薬効は血管を起点に始まっていない可能性が示された。



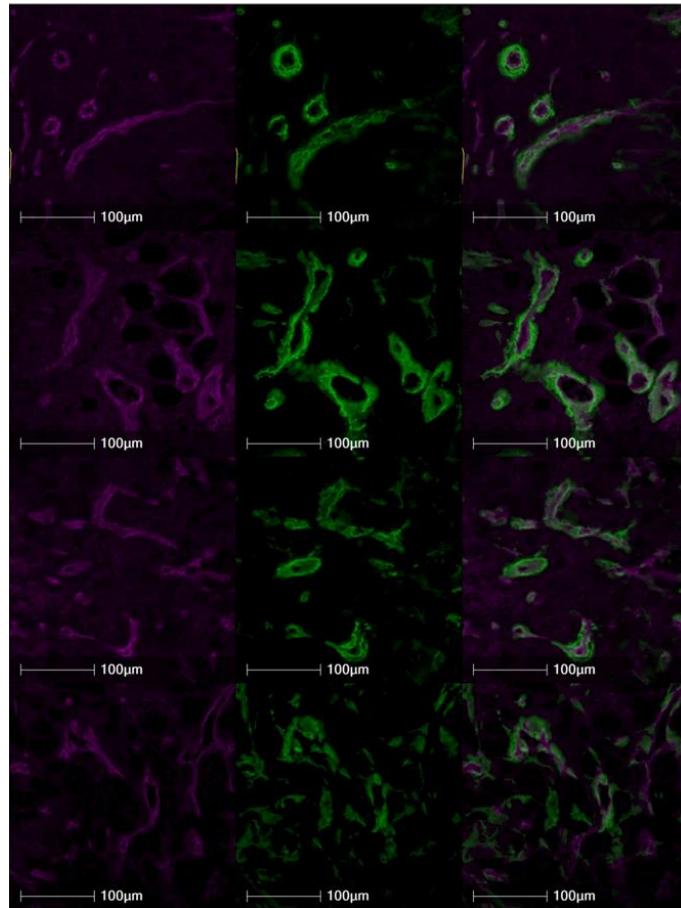
E

CD31

aSMA

Merge

control



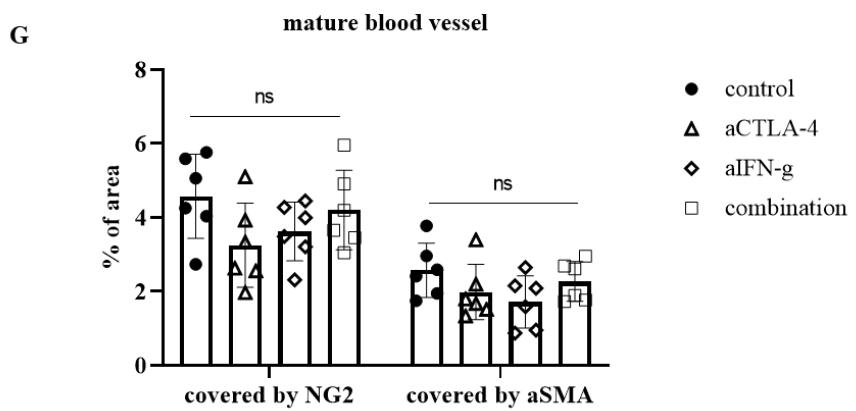
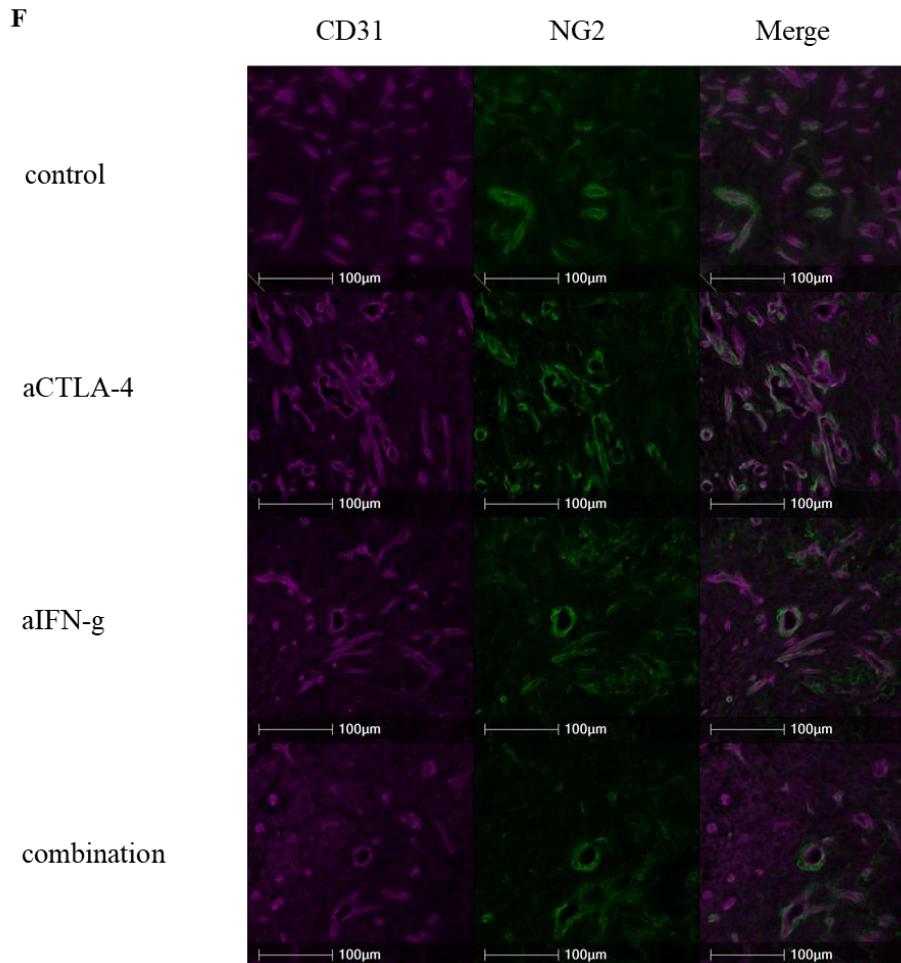
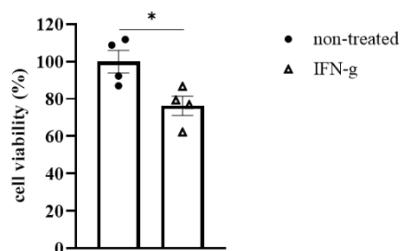


Figure 5. The anti-CTLA-4 Ab does not affect myeloid cells and blood vessel maturation. Tumors were treated with anti-CTLA-4 Ab or isotype control on days 5, 7, and 10. (A, B) TILs were analyzed on days 10 and 14 by FCM. Percentage of each cell is shown as the mean \pm SEM (n=7). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ by Mann-Whitney test. (C) Tumor growth of Hepa1-6 #12 with or without anti-CTLA-4 Ab treatment on days 5, 8, 11, 14, and 18 co-administered with an eosinophil depleting Ab on days 4, 11, and 18. The average tumor volume is shown as the mean \pm SEM (n=7). **** $P < 0.0001$ by one-way ANOVA followed by Dunnett's test at the endpoint. (D) M1 or M2 macrophages were analyzed on days 10 and 14 by FCM. Percentage of each cell is shown as the mean \pm SEM (n=7). * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ by Mann-Whitney test. (E-G) Tumors were treated with control or anti-CTLA-4 Ab treatment on days 5 and 8 co-administered with an IFN- γ blocking Ab on days 4 and 7. Murine tumor sections were prepared on day 11 and analyzed using immunofluorescence staining for CD31, alpha-smooth muscle actin (α -SMA), and neuron-glial antigen 2 (NG2). Images were analyzed using HALO software. (E, F) Representative images are shown. (G) Quantification of mature blood vessel. Data are shown as the mean \pm SEM (n=6). * $P < 0.05$ by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

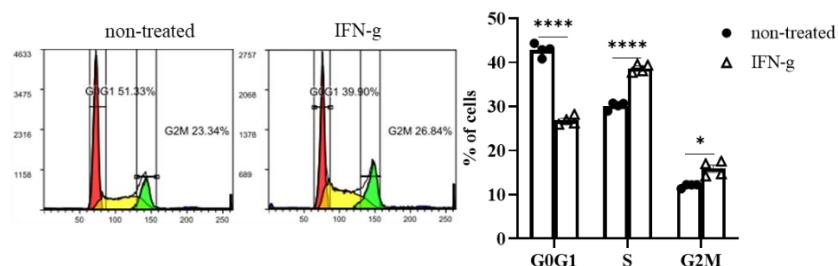
IFN- γ は癌細胞の細胞周期の停止とアポトーシスを誘導する。

最後に、*in vitro* にて癌細胞への直接作用を検証した。Hepa1-6#12 に IFN- γ を 100ng/mL 添加し、96 時間後に cell viability assay を行ったところ、IFN- γ 添加群で生細胞数が減少していた (Figure 6A)。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した (Figures 6B and 6C)。以上の結果から、抗 CTLA-4 抗体により活性化した Th1 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で抗腫瘍作用を発揮している可能性が示された。

A



B



C

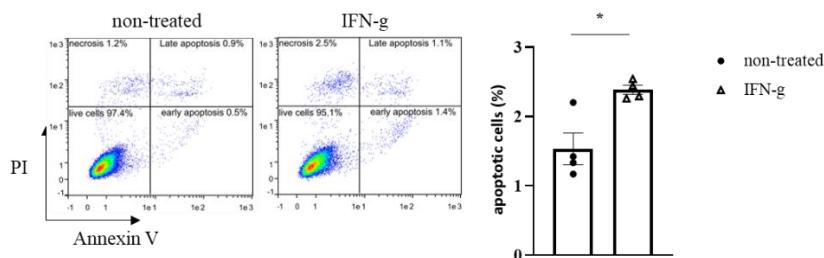


Figure 6. IFN- γ can induce cell cycle arrest and apoptosis in Hepa1-6 #12 tumors.

(A) Analysis of cell viability was performed by WST-8 assays after IFN- γ addition. (B) Cell cycle progression was evaluated by FCM after IFN- γ addition. (C) Apoptotic cells were evaluated by FCM using an Apoptosis detection kit after IFN- γ addition. Data are shown as the mean \pm SEM ($n=4$). * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ by one-way ANOVA followed by Welch's t-test.

考察

抗 CTLA-4 抗体は、免疫チェックポイント阻害薬として広く使用されているが、その抗腫瘍効果は多彩なメカニズムを介して発揮されると考えられている。本研究では、特に CD4 陽性 T 細胞に焦点を当て抗 CTLA-4 抗体の薬理機序を検証するために、CD4 陽性 T 細胞感受性の Hepa1-6 モデルを用いて詳細な解析を行った。その結果、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。このメカニズムでは、抗 CTLA-4 抗体により Th1 細胞が腫瘍内に集積し、Th1 細胞の產生する IFN- γ が抗腫瘍作用に必須であることを示した。また本作用機序では、癌細胞上の MHC-I や MHC-II 発現を必要とせず、このことは、抗 CTLA-4 抗体の Th1 を介する抗腫瘍作用は CD4 陽性 T 細胞による癌細胞の直接認識が必要ではないことを示した。さらに、*in vitro* の検討により、IFN- γ の抗腫瘍メカニズムは細胞周期停止とアポトーシスを誘導することが重要であることを示唆するデータを得た。

抗 CTLA-4 抗体による Treg の枯渇は腫瘍の除去に寄与する可能性があるとされているにもかかわらず^{16, 17}、我々の実験では Treg の減少は観察されなかった。このことは、本研究で用いた系では、抗 CTLA-4 抗体は、Treg を枯渇させ CD8 陽性 T 細胞や NK 細胞などの細胞傷害性細胞の機能を活性化させて抗腫瘍効果を増強することにより、抗腫瘍効果を示すのではないことを示している。臨床で使用される抗 CTLA-4 抗体トレメリムマブとイピリムマブは異なる抗体アイソタイプを持ち、トレメリムマブは完全ヒト IgG2 抗体、イピリムマブは完全ヒト IgG1 抗体である。IgG1 抗体は、ヒト Fc 受容体に対する結合親和性に基づいて、IgG2 抗体よりも効果的に抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を媒介することが知られているが、トレメリムマブとイピリムマブは同様の応答率を示す。したがって、Wei らは、抗 CTLA-4 抗体の有効性が Treg 細胞の枯渇ではなくエフェクター機能の増強に由来すると論じており³、これは我々の発見と一致する。

近年、乳癌モデルマウスにおいて、抗 CTLA-4 抗体投与により好酸球が集積し、血管を正常化させることで抗腫瘍効果を発揮することが報告された¹⁸。本研究でも、抗 CTLA-4 抗体投与により好酸球が腫瘍内に集積する様子は捉えたが、薬効には関与していないかった。今回認められた好酸球の集積は、抗 CTLA-4 抗体投与による Th2 細胞の微増が関与した可能性が考えられる。また腫瘍血管に関する IFN- γ の報告は多く、血管新生を阻害すること^{19, 20}、血管系を退縮させること²¹、または血管を正常化させること¹⁵で腫瘍を排除するなど様々な議論がなされている。本研究でも、血管密度や血管の正常化の評価を行ったが、変化は認められていない。

現時点では、我々の結果が以前の報告と完全に一致していない理由を完全に説明することはできない。ただし、抗 CTLA-4 抗体は、特定の実験条件に依存する複数のメカニズムを通じて抗腫瘍効果を示す可能性がある。本研究では Hepa1-6 を使用しているが、MCB6C でも同様に ICI による薬効には CD8 陽性 T 細胞ではなく CD4 陽性 T 細胞、特に Th1 細胞が重要であることが示されている¹⁰。マウスモデルをそのままヒトの肝臓癌や膀胱癌に当てはめることはでき

ないが、少なくとも CD4 陽性 T 細胞が腫瘍排除機構の主要メンバーとなる免疫環境が存在することが示された。免疫療法における CD4 陽性 T 細胞の臨床データは限られているが、胆管癌やメラノーマにおいて CD4 陽性 T 細胞の治療的可能性が示されている²²。これらの癌腫では本研究で得られた機構が働き、治療効果が期待できる可能性がある。

抗 CTLA-4 抗体の副作用の原因として、B7-CTLA-4 相互作用の遮断による自己免疫合併症の誘発が挙げられている⁶。本研究から、肝臓癌マウスモデルに対する抗 CTLA-4 抗体の薬理機序として、Th1 細胞が重要な役割を示すことが明らかとなった。そのため、B7-CTLA-4 相互作用を遮断せず、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を Th1 細胞へ分化させることができれば、強力な薬効を維持しながらも臨床で認められる副作用を軽減できるのではないかと考えている。ナイーブ CD4 陽性 T 細胞の Th1 細胞への分化に関しては、IL-12 や IFN- γ 等のサイトカインを介したもの²³ や Gfi1 や SOCS-1 の抑制を介したもの²⁴⁻²⁶ が報告されており、これらはより安全で有効な標的となり得るかもしれない。一方で、本研究も含め抗 CTLA-4 抗体投与により Th1 細胞が増加することは報告されているものの、なぜ Th1 細胞が特異的に選択されるのかは明らかとなっておらず、詳細なメカニズム解明は今後の検討課題である。IFN- γ の中和は、抗 CTLA-4 抗体による CD4 陽性 T 細胞の腫瘍内浸潤を抑制した。このことは、腫瘍浸潤 Th1 細胞から產生された IFN- γ が CD4 陽性 T 細胞の浸潤を促進しうることを示す結果であり注目に値する。

本研究の結果として、肝癌細胞移植モデルを使用することにより、抗 CTLA-4 抗体が Th1/IFN- γ 軸を介して抗腫瘍効果を発揮できることが実証された。IFN- γ は、腫瘍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 細胞のさらなる浸潤を促進する可能性がある。したがって、Th1/IFN- γ 経路の調節は、癌に対する新しい治療戦略となる可能性がある。

方法

1. 実験動物の取り扱い

動物実験は、塩野義製薬株式会社 動物実験委員会の承認のもと施行した。実験動物の取り扱いは、「塩野義製薬株式会社 動物実験の適正な実施に関する規則」に基づいて行った。

2. 細胞培養

マウス腫瘍細胞株 Hepa1-6、CT26.WT、およびEMT6 は American Type Culture Collection から購入し、MB49 細胞は EMD Millipore Corporation から購入した。これらの細胞株は、10%ウシ胎児血清（FBS）、100 U/mL ペニシリソ、100 μ g/mL ストレプトマイシン（Nacalai tesque）を含む DMEM（Sigma-Aldrich）を用い、5% CO₂、37°Cのインキュベーター内で培養した。

3. Hepa1-6#12 の樹立

1-2E6 個の Hepa1-6 をマウスに皮下注射した。2ヶ月後腫瘍を回収し、別のマウスに皮下注射した。さらに2ヶ月間腫瘍を増殖させ、vivo に安定して生着する腫瘍を作製した。回収した腫瘍はコラゲナーゼで処理した。亜株は、前述の細胞を 96 well plate に限界希釈し、シングルコロニーから樹立した。本試験では、*in vivo* 生着の安定性や *in vitro* での増殖能が最も優れた #12 を選択した。なお、培養条件は方法の 2. 細胞培養に記載の通りである。

4. *In vivo* 実験

Hepa1-6 #12 を採取し、1-2E6 個の細胞を PBS に懸濁した後、等容量の成長因子減少マトリゲル（Corning）に再懸濁した。調製した細胞懸濁液をマウスの右背部に皮下注射した（0 日目）。腫瘍体積はデジタルノギスで少なくとも週に 2 回測定した。腫瘍体積が 2,000 mm³に到達した時点でマウスは安樂死した。すべての試験において、マウスに 200 μ g の抗 CTLA-4 抗体（9D9; BioXcell）を移植後 5 日目から 3-4 日間隔で投与した。アイソタイプコントロールには、200 μ g のマウス IgG2b（MPC-11; BioXcell）を用いた。T 細胞除去には、250 μ g の抗 CD4 抗体（GK1.5; BioXcell）または 250 μ g の抗 CD8 β 抗体（53-5.8; BioXcell）を用い、好酸球除去には 200 μ g の抗 CD193 抗体（6S2-19-4; BioXcell）を用いた。IFN- γ の中和には、250 μ g の抗 IFN- γ 抗体（H22; Leinco Technologies）またはアイソタイプコントロール（PIP; Leinco Technologies）を用いた。すべての抗体は、Figure Legend に従って腹腔内に投与した。

5. 抗体

FCMまたはIHC用の抗体は、BioLegend、eBioscience、Thermo Fisher Scientific、BD BiosciencesおよびCell Signaling Technologyから購入した。抗体リストを以下に示す。

Antibodies for FCM			
Protein	Clone	Manufacturer	Concentration
Arg1	A1exF5	Invitrogen	1:100
CD3	145-2C11	BioLegend	1:200
CD4	RM4-5	BioLegend	1:100
CD8α	53-6.7	BioLegend	1:200
CD8α	53-6.7	BioLegend	1:200
CD11b	M1/70	eBioscience	1:200
CD19	6D5	BioLegend	1:200
CD45	30F-11	BioLegend	1:200
CD193	J073E5	BioLegend	1:200
CD326	G8.8	BioLegend	1:200
F4/80	BM8	BioLegend	1:200
Foxp3	FJK-16s	eBioscience	1:100
Gata3	TWAJ	eBioscience	1:100
H-2Db	KH95	BioLegend	1:200
H-2Kb	AF6-88.5	BioLegend	1:200
I-A/I-E	M5/114.15.2	BioLegend	1:200
IFNγ	XMG1.2	BioLegend	1:100
Ly6C	HK1.4	BioLegend	1:200
Ly6G	1A8	BioLegend	1:200
NK1.1	PK136	BioLegend	1:200
NOS2	CXNFT	eBioscience	1:100
Roryt	B2D	eBioscience	1:100
Siglec-F	E50-2440	BD Biosciences	1:200
T-bet	4B10	BioLegend	1:100
TCR-β	H57-597	BioLegend	1:200

Antibodies for IHC			
Protein	Clone	Manufacturer	Concentration
CD4	D7D2Z	Cell Signaling Technology	1:400
CD8α	D4W2Z	Cell Signaling Technology	1:1600
CD31	MEC13.3	BioLegend	1:100

Foxp3	D6O8R	Cell Signaling Technology	1:1600
NG2	polyclonal	Merck Millipore	1:200
αSMA	D4K9N	Cell Signaling Technology	1:100

6. Flow cytometry (FCM)

マウスから腫瘍組織を回収し、ハサミでミンスした。その後、1mLの腫瘍分散溶液 (50U/mL DNase I (Worthington Biochemical)、100μg/mL Collagenase type IA (Sigma-Aldrich) in RPMI) 中で、回転させながら37°Cで40~60分間インキュベートした。細胞をFCM buffer (2%FBS、5mM EDTA、5mM HEPES in Phenol red Hank's (Sigma-Aldrich)) で洗浄し、100μmのナイロンメッシュで濾過した。Red blood lysis buffer solutionで処理した後、細胞を20% Percoll Plus (GE Healthcare) に再懸濁し、腫瘍細胞とTILを分離した。FcRブロッキング液 (Miltenyi Biotec) でブロッキング後、各抗体を上記「5. 抗体」に記載の濃度で添加し、暗所 4°Cで30分間インキュベートした。細胞内染色にはFoxp3染色キット (eBioscience) を用いた。死細胞の染色には、DAPI (Dojindo) 、eBioscience™ Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (Invitrogen) 、またはZombie NIR Fixable Viability kit (BioLegend) を用いた。サイトカイン産生を解析するため、FcRブロッキングの前に、細胞を2μL/mL Cell Stimulation Cocktail (Thermo Fisher Scientific) とBD Golgistop (BD Bioscience) を処置し、37°Cで4時間刺激した。Hepa1-6 #12細胞株におけるMHC-Iの発現を*in vitro*で検出するために、細胞を100 ng/mL Recombinant Mouse IFN- g (carrier-free) (rMuIFN- g : BioLegend)で37°Cにて48時間刺激した。データは、MACSQuant (Miltenyi Biotec) 、NovoCyte (Agilent Technologies) 、または Spectral Cell Analyzer ID7000 (Sony) を用いて取得した。

7. Immunohistochemistry (IHC)

癌微小環境を解析するため、腫瘍組織を採取し、4%パラホルムアルデヒド (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) で4°Cにて一晩固定した。切片の作製とCD4、CD8、FOXP3の染色はApplied Medical Research Laboratoryが行った。凍結切片の分析では、スライドをPBSで洗浄してOCT compoundを除去し、ブロッキング液 (5%ヤギ血清、0.3%TritonX-100 in PBS) で1時間ブロッキングした後、一次抗体と4°Cで一晩インキュベートした。洗浄後、切片を二次抗体と室温、暗所で1時間インキュベートし、DAPI入りProLong Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific) でカバースリップした。すべての切片をHALO Image Analysisソフトウェア (Indica Labs, Albuquerque, NM, USA) で解析した。

8. CRISPR/Cas9 システムを用いた β2m、MHC-II-KO Hepa1-6#12 細胞株の樹立

β 2mまたはMHC-IIを発現しないHepa1-6 #12細胞株を作製するため、既報のsingle-guide RNAs (sgRNAs) を使用した^{10, 27}。このsgRNAsをGeneArt® CRISPR Nuclease OFP Vector (Invitrogen) にサブクローニングした。細胞は、Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を用いて、培養プレート内で2.5 μ gのプラスミドDNAでトランسفェクトした。2日後、OFPベクター陽性細胞をFACSAria-II Cell Sorter (Becton, Dickinson and Company) を用いてシングルセルソーティングし、さらに拡大した。用いたsgRNAsの配列を以下に示す。

sgRNAs for CRISPR/Cas9	
Gene	Sequence
β 2m	5'-TCGGCTTCCCATTCTCCGGT-3'
H2-Aa1	5'-GGAGGTGAAGACGACATTGA-3'

9. RNA-sequencing

RNAはRNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて単離し、PrimeSTAR MAX DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いてcDNAに変換した。その後、ExoSap-IT Express (Thermo Fisher Scientific) を用いてcDNAをクリーンアップし、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて精製した。3130xl genetic analyzer (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) を用いて配列を検証し、標的遺伝子座の破壊を確認した。プライマーリストを以下に示す。

Primers for RNA-sequencing		
Gene	Direction	Sequence
β 2m	Forward	5'-TGTGCAGAATGGGATGTGAC-3'
	Reverse	5'-GGCACCAACAGATCAGTCTTTGG-3
H2-Aa1	Forward	5'-CTGGCAACTTGACGTCATC-3'
	Reverse	5'-TTCTTCCTCCCTCACTGG-3'

10. Cell viability assay

Hepa1-6#12 (1E3 cells/well) に 100 ng/mL rMuIFN- γ を添加し、96 時間後に WST-8 アッセイ (キシダ化学) により生細胞率を測定した。アポトーシスの検出には Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (eBioscience) を用い、Hepa1-6#12 (1E4 cells/well) に 100 ng/mL rMuIFN- γ 添加 96 時間後に実施した。

11. Cell cycle analysis

Hepa1-6 # 12 (1E5 cells/dish) に 100 ng/mL rMuIFN- γ を添加し、37°Cで 96 時間インキュベー $\ddot{\text{t}}$ した。PBS 洗浄後、細胞を冷 70%エタノール中で 4°Cにて 2-3 日間固定した。PBS 洗浄を 3

回行った後、細胞を 250 μ g/mL リボヌクレアーゼ（ニッポンジーン）中で 37°Cにて 1 時間処理した。50 μ g/mL のヨウ化プロピジウム（PI; Sigma-Aldrich）を加え、30 分間遮光し、MACSQuant で測定した。

12. 統計解析

統計解析には GraphPad Prism 8 ソフトウェア（GraphPad Software, Inc.）を用い、*in vivo* 比較には One-way ANOVA followed by Dunnett's test, One-way ANOVA followed by Tukey's test もしくは Mann-Whitney test を、*in vitro* 比較には Welch's t-test を用いた。P<0.05 を統計的に有意とした。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科教授、藤尾 慶先生に厚く御礼申し上げます。

本研究は、塩野義製薬株式会社に所属する著者が大阪大学の社会人大学院生として行ったものである。機会を与えてくださった塩野義製薬株式会社に感謝いたします。また、遂行するにあたり多大なる御指導、御鞭撻を賜りました塩野義製薬株式会社 バイオ創薬研究所 がんグループの皆様に心より感謝いたします。

参考文献

1. World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. WHO; 2020. Accessed December 11, 2020.
<https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>.
2. Sreya Bagchi, Robert Yuan & Edgar G Engleman. Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance. *Annu Rev Pathol.* 2021 Jan 24;16:223-249. doi: 10.1146/annurev-pathol-042020-042741.
3. Spencer C Wei, Colm R Duffy & James P Allison. Fundamental Mechanisms of Immune Checkpoint Blockade Therapy. *Cancer Discov.* 2018 Sep; 8(9): 1069-86. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-0367.
4. Judith A Seidel, Atsushi Otsuka & Kenji Kabashima. Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. *Front Oncol.* 2018 Mar 28;8:86. doi: 10.3389/fonc.2018.00086.
5. Lillian L Siu. *et al.* Challenges and Opportunities in Adapting Clinical Trial Design for Immunotherapies. *Clin Cancer Res;* 2017 Sep 1;23(17); 4950-8. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3079.
6. Amiral Karimi, Sanam Alilou & Hamid Reza Mirzaei. Adverse Events Following Administration of Anti-CTLA4 Antibody Ipilimumab. *Front Oncol.* 2021 Mar 9;11:624780. doi: 10.3389/fonc.2021.624780.
7. Chrysoula I Liakou. *et al.* CTLA-4 blockade increases IFNgamma-producing CD4+ICOShi cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 30;105(39):14987-92. doi: 10.1073/pnas.0806075105. Epub 2008 Sep 25.
8. Ying Jin. *et al.* Different syngeneic tumors show distinctive intrinsic tumor-immunity and mechanisms of actions (MOA) of anti-PD-1 treatment. *Sci Rep.* 2022 Feb 28;12(1):3278. doi: 10.1038/s41598-022-07153-z.
9. Spencer C Wei. *et al.* Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. *Cell.* 2017 Sep 7;170(6):1120-1133.e17. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.024.
10. Yuji Sato. *et al.* CD4⁺ T cells induce rejection of urothelial tumors after immune checkpoint blockade. *JCI Insight.* 2018 Dec 6;3(23):e121062. doi: 10.1172/jci.insight.121062.
11. Ole Audun Werner Haabeth. *et al.* How Do CD4(+) T Cells Detect and Eliminate Tumor Cells That Either Lack or Express MHC Class II Molecules? *Front Immunol.* 2014 Apr 15;5:174. doi: 10.3389/fimmu.2014.00174.
12. Rachael D Aubert. *et al.* Antigen-specific CD4 T-cell help rescues exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Dec 27;108(52):21182-7. doi: 10.1073/pnas.1118450109.
13. Subhra K Biswas & Alberto Mantovani. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol.* 2010 Oct;11(10):889-96. doi: 10.1038/ni.1937.
14. Heidi Braumüller. *et al.* T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature.* 2013 Feb 21;494(7437):361-5. doi: 10.1038/nature11824.
15. Lin Tian. *et al.* Mutual Regulation of Tumor Vessel Normalization and Immunostimulatory Reprogramming. *Nature.* 2017 Apr 13;544(7649):250-254. doi: 10.1038/nature21724
16. Xuexiang Du. *et al.* A reappraisal of CTLA-4 checkpoint blockade in cancer immunotherapy. *Cell Res.* 2018 Apr; 28(4): 416–432. doi: 10.1038/s41422-018-0011-0
17. Zena N. Willsmore. *et al.* Combined anti-PD-1 and anti-CTLA-4 checkpoint blockade: Treatment of melanoma and immune mechanisms of action. *Eur J Immunol.* 2021 Mar;51(3):544-556. doi: 10.1002/eji.202048747.
18. Xichen Zheng. *et al.* CTLA4 blockade promotes vessel normalization in breast tumors via the accumulation of eosinophils. *Int J Cancer.* 2020 Mar 15;146(6):1730-1740. doi: 10.1002/ijc.32829.
19. Z Qin & T Blankenstein. CD4⁺ T Cell-Mediated Tumor Rejection Involves Inhibition of

- Angiogenesis that Is Dependent on IFN γ Receptor Expression by Nonhematopoietic Cells. *Immunity*. 2000 Jun;12(6):677-86. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80218-6.
- 20. G Beatty & Y Paterson. IFN- γ -Dependent Inhibition of Tumor Angiogenesis by Tumor-Infiltrating CD4 $^{+}$ T Cells Requires Tumor Responsiveness to IFN- γ . *J Immunol*. 2001 Feb 15;166(4):2276-82. doi: 10.4049/jimmunol.166.4.2276.
 - 21. Thomas Kammerlorens. *et al.* Tumour ischaemia by interferon- γ resembles physiological blood vessel regression. *Nature*. 2017 May 4;545(7652):98-102. doi: 10.1038/nature22311.
 - 22. Lucia Poncette, Julia Bluhm & Thomas Blankenstein. The role of CD4 T cells in rejection of solid tumors. *Curr Opin Immunol*. 2022 Feb; 74: 18–24. doi: 10.1016/j.coim.2021.09.005
 - 23. Susan L Swain, K Kai McKinstry & Tara M Strutt. Expanding roles for CD4 $^{+}$ T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol*. 2012 Jan 20;12(2):136-48. doi: 10.1038/nri3152.
 - 24. Junpei Suzuki. *et al.* Gfi1, a transcriptional repressor, inhibits the induction of the T helper type 1 programme in activated CD4 T cells. *Immunology*. 2016 Apr;147(4):476-87. doi: 10.1111/imm.12580.
 - 25. Kentaro Tanaka. *et al.* Loss of Suppressor of Cytokine Signaling 1 in Helper T Cells Leads to Defective Th17 Differentiation by Enhancing Antagonistic Effects of IFN- γ on STAT3 and Smads. *J Immunol*. 2008 Mar 15;180(6):3746-56. doi: 10.4049/jimmunol.180.6.3746.
 - 26. Akihiko Yoshimura, Mayu Suzuki, Ryota Sakaguchi, Toshikatsu Hanada & Hideo Yasukawa. SOCS, inflammation, and autoimmunity. *Front Immunol*. 2012 Mar 12;3:20. doi: 10.3389/fimmu.2012.00020.
 - 27. Andrew J. Freeman, Stephin J. Vervoort, Kelly M. Ramsbottom, Madison J. Kelly, Jessica Michie, Lizzy Pijpers, *et al*: Natural Killer Cells Suppress T Cell-Associated Tumor Immune Evasion. *Cell Rep*: 28(11):2784-2794, 2019. doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.017.