



Title	抗PD-1抗体の抗腫瘍効果を高める新規薬剤の同定及びその機能解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	竹田, 和彦
Citation	北海道大学. 博士(薬科学) 甲第14667号
Issue Date	2021-09-24
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/83332">http://hdl.handle.net/2115/83332</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Kazuhiko_Takeda_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士(薬科学) 氏名 竹田 和彦

## 学位論文題名

抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果を高める新規薬剤の同定及びその機能解析

### 【序論】

近年、免疫機能によってがんを排除することを目指した「がん免疫療法」が、従来の外科手術、放射線治療、薬物療法に続く、第4の治療法として期待されている。「がん免疫療法」のひとつである PD-1/PD-L1 リガンド経路を阻害する抗 PD-1 抗体及び抗 PD-L1 抗体は、悪性黒色腫、腎がん、及び非小細胞肺癌などの複数のがん腫において既存の薬物療法に優る有効性を示し、臨床応用されている。しかし、上述のがん腫に対してさえも奏効率は20~40%程度であり、抗 PD-1/PD-L1 抗体の効果を増強させる併用薬剤の開発が求められている。例えば、コラーゲン受容体型チロシンキナーゼである DDR2 やホスホチロシンホスファターゼである PTPN2 の阻害が抗 PD-1/PD-L1 抗体の抗腫瘍効果を増強するという報告がなされている。それらの報告はマウスモデルを用いて見出された標的であり、ヒトへの外挿性の低さや臨床応用へのスピードという点では問題がある。一方、ヒトプライマリー細胞は、生体内での細胞の性質が比較的良好に保たれているというメリットがあり、ヒトへの外挿性が高いと考えられる。これまでにヒトプライマリー細胞を用いた抗 PD-1/PD-L1 抗体の抗腫瘍効果を増強させる化合物のスクリーニングに関する報告はない。本研究では、ヒトプライマリー細胞を用いて、抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果を高める新規薬剤の同定及びその機能解析を行った。

### 【結果】

#### 1. 混合リンパ球反応 (MLR) を用いた化合物スクリーニングによるアンレキサノクスの同定

ヒトプライマリー細胞を用いた化合物スクリーニングの評価系として、樹状細胞と T 細胞の共培養系である MLR を用いた。抗腫瘍免疫応答には樹状細胞と T 細胞の相互作用が重要であり、本評価系を用いることで樹状細胞を介した T 細胞の活性化を制御する化合物を同定することができるという利点がある。本研究における MLR では培養5日後の培養上清中の IFN- $\gamma$  産生量を抗 PD-1 抗体による T 細胞の活性化の指標として測定した。評価する化合物としては、炎症・免疫疾患を対象とした化合物に加え、予期しない作用を期待し、中枢疾患を対象とした化合物や真菌やウイルスを対象とした化合物で、主に日本もしくは米国で上市済みの142個を選択した。上市済みの化合物を用いることで臨床応用へのスピードが高められると期待される。スクリーニングの結果、抗 PD-1 抗体単独と比較し、抗 PD-1 抗体と併用することにより IFN- $\gamma$  産生を1.5倍以上増加させる化合物として、アンレキサノクスを見出した。アンレキサノクスは、抗喘息薬であり、その作用メカニズムは十分には理解されていないが、肥満細胞でのヒスタミンやロイコトリエンなどのケミカルメディエーターの細胞外への放出を抑制することが知られている。次に、アンレキサノクスの用量反応性試験を単独、もしくは抗 PD-1 抗体との併用にて行った。その結果、抗 PD-1 抗体単独と比較し、6  $\mu$ M のアンレキサノクスと抗 PD-1 抗体の併用は IFN- $\gamma$  の産生を増加させた。一方で、アンレキサノクス単独ではいずれの濃度においても IFN- $\gamma$  の産生を増加させなかった。これらのことから、アンレキサノクスは、単独ではなく、抗 PD-1 抗体と併用することにより MLR での IFN- $\gamma$  産生を増強させることが示された。

#### 2. マウス担がんモデルにおいてアンレキサノクスは抗 PD-1 抗体による抗腫瘍効果を増強する

アンレキサノクスの抗 PD-1 抗体との併用効果を *in vivo* において調べるために、マウス大腸が

ん細胞株である MC38 を移植したマウス担がんモデルを利用した。MC38 をマウスの皮下に移植し、腫瘍体積が約 100 mm<sup>3</sup> の大きさになった後に、アンレキサノクス及び抗 PD-1 抗体の投与を開始した。その結果、抗 PD-1 抗体とアンレキサノクスを併用することで、溶媒群及び抗 PD-1 抗体単独群と比較して腫瘍増殖抑制作用が見られた。薬剤の投与開始後 13 日目の腫瘍増殖抑制率は、抗 PD-1 抗体単独では 67.5%であったのに対し、併用群では 87.6%であった。この結果から、*in vivo* においてもアンレキサノクスと抗 PD-1 抗体との併用が高い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。

### 3. アンレキサノクスは樹状細胞上の PD-L1 の発現を誘導する

MLR は樹状細胞と T 細胞の共培養系であるため、アンレキサノクスの抗 PD-1 抗体との併用の効果が、樹状細胞と T 細胞のどちらに作用した結果であるのか不明であった。そこで、このことを明らかにするため、まず、樹状細胞に着目し、IFN- $\gamma$  による発現誘導が知られている PD-L1 の発現への影響を調べた。その結果、抗 PD-1 抗体もしくはアンレキサノクス単独では、PD-L1 の発現増加が確認されなかったものの、アンレキサノクスと抗 PD-1 抗体との併用では発現増加が観察された。次に、アンレキサノクスが T 細胞に作用するか調べるために、ヒト T 細胞リンパ腫細胞株である Jurkat T 細胞を用いて、抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体刺激に依存した IL-2 の産生量を測定した。その結果、陽性対照のレナリドミドは IL-2 の産生を増加させたものの、アンレキサノクスは産生量に影響を与えなかった。これらのことから、アンレキサノクスは T 細胞ではなく、樹状細胞に作用することが示された。

### 4. アンレキサノクスと抗 PD-1 抗体の併用は腫瘍中の IFN- $\gamma$ 関連遺伝子及び PD-L1 の発現を増加させる

アンレキサノクスの *in vivo* における抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果を増強するメカニズムを調べるため、腫瘍組織中の遺伝子の発現解析を行った。この解析には、がん免疫および腫瘍微小環境に関連した遺伝子が 770 種類同時に測定可能なマウスがん免疫パネルと NanoString Technologies 社が開発したデジタル分子バーコード技術を用いた。MC38 担がんモデルにおいて、抗 PD-1 抗体、アンレキサノクス単独、あるいは併用投与した腫瘍組織の遺伝子発現量を測定した結果、抗 PD-1 抗体単独群及び併用群中で臨床試験において抗 PD-1 抗体の有効性に非常に関連が高いことが報告されている IFN- $\gamma$  関連遺伝子、PD-L1、細胞傷害性 T 細胞関連遺伝子の発現増加が見られた。抗 PD-1 抗体単独群及び併用群において発現増加が見られた IFN- $\gamma$  関連遺伝子には、T 細胞の遊走に重要なケモカインをコードする CXCL10 及び CXCL9 が含まれていた。また、*in vitro* の MLR において、アンレキサノクスと抗 PD-1 抗体の併用により発現増加がみられた IFN- $\gamma$  及び PD-L1 は、*in vivo* においても発現増加がみられた。以上のように、アンレキサノクスと抗 PD-1 抗体の併用により、腫瘍免疫の活性化に重要な遺伝子群の発現が増加することが示された。

#### 【総括】

本研究では、MLR を用いたスクリーニングによってアンレキサノクスを見出し、マウス担がんモデルにおいて抗 PD-1 抗体との併用により、高い抗腫瘍効果を有することを示した。また、アンレキサノクスが樹状細胞に作用することにより、腫瘍中において腫瘍免疫の活性化に關与する遺伝子群の発現を誘導することを明らかとした。