

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	上原治朗
<p>学位論文題目</p> <p>Intratumoral injection of IFN-β induces chemokine production in melanoma and augments the therapeutic efficacy of anti-PD-L1 mAb (インターフェロンβの腫瘍内局注は悪性黒色腫のケモカイン産生を誘導し、抗PD-L1抗体の治療効果を増強する)</p> <p>共著者名</p> <p>大栗敬幸、小坂明美、石橋 圭、平田 結、大原賢三、長門利純、及川賢輔、青木直子、原淵保明、山本明美、小林博也と共著</p> <p>Biochemical and Biophysical Research Communications 490巻：521頁-527頁、2017年6月</p> <p>研究目的</p> <p>近年の免疫チェックポイント阻害薬の使用による悪性黒色腫（メラノーマ）の治療の進歩にかかわらず、治療効果は未だ限界がありさらなる追加治療が探索されている。I型インターフェロン（IFN）の一つであるIFN-βは本邦でメラノーマの治療に使用されてきており、T細胞浸潤を強化する作用を含めた免疫調節作用を持つ薬剤¹⁾である。今回我々はメラノーマ細胞でIFN-βの腫瘍内局注が腫瘍内浸潤T細胞を誘導するケモカインであるCCL5とCXCR3リガンドを誘導するか、また、抗PD-L1抗体治療と併用した際の効果についてどのような作用があるのかを明らかにしたいと考えた。</p> <p>材料・方法</p> <p>皮膚転移を持つメラノーマ患者のIFN-β治療後提供検体を用いてCCL5、CXCR3リガンド（CXCL9, 10, 11）のmRNAの発現をRT-PCRで解析し、腫瘍内CD8細胞浸潤を免疫染色で観察した。また、治療前切除検体をIFN-β存在下で培養し、同様にmRNA発現を解析した。</p> <p>ヒトメラノーマ細胞株（624mel、697mel、888mel、SK-MEL-28）をIFN-β存在下で24時間培養し、組織を回収したのち、24時間後に培養上清を回収しCCL5、CXCR3リガンドのケモカイン産生を計測した。</p> <p>B16F10マウスメラノーマ細胞をIFN-β 2000単位/mlで60時間刺激して腫瘍細胞表面のPD-L1、マウスMHC class I, IIであるH2K^b, I-A^b解析をフローサイトメトリーで行った。B16F10マウスメラノーマ細胞をC57BL/6Jマウスに移植したマウスモデルを作成し、day7にIFN-βを腫瘍注（it）してday8に切除し、Ccl5, Cxcr3リガンドのmRNA発現と腫瘍浸潤T細胞（TIL）中のCD4、CD8陽性細胞、腫瘍細胞表面のPD-L1、H-2K^b, I-A^bをフローサイトメトリーで解析した。</p>			

同様のマウスモデルでday7, 9, 11にIFN- β it、day7, 9に抗PD-L1抗体を腹膜投与 (ip) し、腫瘍サイズと生存期間を解析した。同様の治療実験モデルにおいて抗CD8抗体をday6, 10にipして治療効果の変化を観察した。

マウスモデルを用いてday7にIFN- β it、抗PD-L1抗体 ipを行い、day10に所属リンパ節を摘出し、 2×10^5 個の細胞をB16F10マウスメラノーマ関連ネオアンチゲンであるTnp3、Plod3、Obs11の3つのペプチド存在下で培養し、ELISPOTでIFN- γ 産生細胞の割合の変化を観察した。

成 績

IFN- β 処置後の患者検体にはCD8陽性細胞浸潤がみられ、CCL5、CXCR3リガンドのmRNA発現増加を認めた。治療前検体をIFN- β で処置しても同様の結果が得られた。ヒトメラノーマ細胞株 (624mel、697mel、888mel、SK-MEL-28) をIFN- β 存在下で培養するとCCL5、CXCR3リガンドのケモカイン産生が増加した。

マウスモデルでもIFN- β itでCcl5、Cxc3リガンドのmRNA発現増加がみられ、TIL中のCD4、8陽性細胞の増加を認めた。腫瘍細胞表面のPD-L1発現は有意に増加し、マウスMHC class IであるH-2Kbの発現も増加した。

治療モデルにおいて、抗PD-L1抗体単独群、IFN- β 単独群に比べて併用治療群は腫瘍増殖抑制、生存期間延長において有意に優れていた。この併用治療効果は抗CD8抗体で無効化された。

ネオアンチゲンペプチド刺激試験では、IFN- β 単独群ではIFN- γ 産生細胞の割合は変化せず、抗PD-L1抗体単独群でTnp3ペプチドに反応、併用治療群では3つのペプチドに反応するIFN- γ 産生細胞の割合増加が見られた。

考 案

IFN- β は腫瘍微小環境内でT細胞浸潤を誘導、腫瘍増殖抑制、PD-L1発現、MHC class I発現など多彩な作用を持つが、我々の実験でもそれに矛盾しない結果が得られた。KakizakiらはIFN- β と抗PD-1抗体での治療実験モデルでTumor associated macrophageの変容を介した微小環境の変化で治療効果が増強されることを示している2) が、我々の実験結果から、メラノーマ細胞に直接的にCCL5、CXCR3ケモカインなどのケモカイン産生を促すことが確認され、抗PD-L1抗体との併用により、ネオアンチゲン特異的T細胞が活性化することが示唆された。我々はSTING (stimulator of IFN genes) リガンドitがCD8陽性T細胞とマクロファージを介した抗腫瘍効果を示すことで、cGAMP (cyclic [G(2' 5') pA(3' 5')])のようなSTINGリガンドはIFN- β を代替できる可能性も報告している3)。

IFN- β は単独でT細胞浸潤を誘導し抗腫瘍効果を示した。一方でIFN- β と抗PD-L1抗体併用群ではネオアンチゲン特異的T細胞の活性化が認められたが、IFN- β 単独群では認められなかった。このことからIFN- β は単独ではエフェクターT細胞機能を誘導するには不十分であり、抗PD-L1抗体によるT細胞の機能回復を受けることで、ネオアンチゲン特異的T細胞を活性化させ抗腫瘍効果を発揮できるようになると考えられた。

結 論

この研究を通してIFN- β はPD-1/L1阻害治療を以下の2点を通して改善していることを示し、IFN- β はメラノーマに対するPD-1/L1阻害治療の有用な追加治療の一つであると結論した。

①T細胞の腫瘍内浸潤

②ネオアンチゲン特異的T細胞の誘導




引 用 文 献

1. A. Ismail, N. Yusuf, Type I interferons: key players in normal skin and select cutaneous malignancies, *Dermatology Res. Pract.* 2014 (2014) 847545.
2. A. Kakizaki, T. Fujimura, S. Furudate, et al., Immunomodulatory effect of peritumorally administered interferon-beta on melanoma through tumor-associated macrophages, *Oncoimmunology* 4(2015) e1047584.
3. T. Ohkuri, A. Kosaka, K. Ishibashi, et al., Intratumoral administration of cGAMP transiently accumulates potent macrophages for anti-tumor immunity at a mouse tumor site, *Cancer Immunol. Immunother.* 66(6) (2017) 705-716.

参 考 論 文

1. Jiro Uehara, Y. Ito, I. Takahashi, M. Honma, A. Ishida-Yamamoto, S. Matsuo, H. Iizuka, Sequential acral lentiginous melanomas of the foot, *Case Rep Dermatol.* 2 (2010) 201-206.
2. Jiro Uehara, M. Honma, Y. Ohishi, A. Ishida-Yamamoto, Successful combination therapy of low-dose vorinostat, etretinate, and narrowband ultraviolet B irradiation for Sézary syndrome, *J. Dermatol.* 44(2017) e30-31

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	上原 治朗
審査委員長 <u>大崎能伸</u>  審査委員 <u>柿崎秀宏</u>  審査委員 <u>奥村利明</u> 			
学 位 論 文 題 目			
<p>Intertuoral injection of IFN-β induces chemokine production in melanoma and augments the therapeutic efficacy of anti-PD-L1 mAb.</p> <p>(インターフェロンβの腫瘍内局注は悪性黒色腫のケモカイン産生を誘導し、抗PD-L1抗体の治療効果を増強する)</p>			
<p>免疫チェックポイント阻害薬であるPD-1阻害薬は、悪性黒色腫の予後を劇的に改善した。悪性黒色腫に対しては、インターフェロンαとβの腫瘍内投与が有効な例があり、わが国ではインターフェロンβの投与が保険診療として行われている。論文提出者は、インターフェロンβの腫瘍内投与が、腫瘍内にリンパ球を誘導することに着目し、免疫チェックポイント阻害薬がインターフェロンβの腫瘍内投与の抗腫瘍効果を高めることを明らかにし、悪性黒色腫の治療をさらに改善するために本研究を行った。</p>			

インターフェロン β を腫瘍内に投与すると、腫瘍内に T 細胞が浸潤する。これらの T 細胞は CCL5 や CXCR3 などのケモカインで誘導される。論文提出者は、インターフェロン β の腫瘍内投与で、悪性黒色腫細胞が CCL5 や CXCR3 を産生するとともに、腫瘍に CD-8 陽性 T 細胞を誘導することを示した。担癌マウスモデルによる検討では、インターフェロン β の腫瘍内投与は抗腫瘍効果を示したが、この抗腫瘍効果は PD-1 のリガンドである PD-L1 に対する抗体の併用により有意に増強した。この抗腫瘍効果の増強は、CD-8 に対する抗体を添加することで減弱した。さらに、インターフェロン β は、抗 PD-L1 抗体の存在下で、悪性黒色腫細胞が提示する腫瘍特異的抗原に対する T 細胞の反応を増強した。

これらの検討により、論文提出者はインターフェロン β の腫瘍内投与は、腫瘍からの CCL5 や CXCR3 などのケモカインの産生を誘導することで CD-8 陽性 T 細胞を腫瘍内に誘導し、免疫チェックポイント阻害薬の存在下で腫瘍抗原に特異的な細胞性免疫を増強することを示した。

この成果は、悪性黒色腫に対するインターフェロン β と免疫チェックポイント阻害薬の併用療法に強い科学的な根拠を付与するものであり、本論文は学術論文としての価値が高い。また、論文提出者は研究者としての知識と素養が十分であると判断された。以上から、本論文は医学博士論文にふさわしいと判断した。