

研究報告書
2019年度:A課題

2021年5月31日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 千葉県がんセンター研究所

住 所 千葉市中央区仁戸名町 666-2

研究者氏名 富樫庸介



(研究課題)

HLA class I/class II とがん免疫療法の効果と耐性への影響の解明と新たな治療開発

2020年2月28日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【研究背景・目的】

抗 PD-1/PD-L1 抗体を代表とするがん免疫療法の有効性は証明されているが単剤での効果は 50%以下と不十分で、効果予測バイオマーカーやより有効性の高い治療が求められている。そのためにも耐性機序の解明が不可欠であるが、代表的な機序として HLA class I (HLA-I)の欠損が報告されている(Chowell D, et al. Science 2017; Gettinger S, et al. Cancer Discov 2017)。申請者も HLA-I 欠損による耐性化症例で、患者由来の細胞株に HLA-I を発現させたところ実験系で感受性が回復することを証明した(Inozume T and Togashi Y, et al. J Invest Dermatol 2019)。一方で HLA class II (HLA-II)については抗腫瘍免疫応答への重要性はあまり報告がされていないが、がん免疫療法の効果が証明されているメラノーマ、リンパ腫、非小細胞肺癌などでは HLA-II の発現が報告されている。そこで HLA-I/II とがん免疫療法の効果・耐性との関係性について実験的、臨床的に解明し、がん免疫療法の新たな効果予測バイオマーカーや HLA を標的するような新たながん免疫療法の開発に繋げる目的で本研究を計画した。

【方法】

マウス腫瘍細胞株に CRISPR/Cas9 システムで B2M 遺伝子という MHC class I (MHC-I)の構成要素をノックアウトし、MHC-I 欠損株を作成し、抗 PD-1 抗体等による抗腫瘍効果を検証した。さらに CIITA 遺伝子という MHC class II (MHC-II)の発現を誘導する遺伝子を導入し、MHC-II 発現

株も作成し、同様に抗腫瘍効果を検証した。またそれらマウスモデルの腫瘍浸潤リンパ球(TIL)をフローサイトメトリーで解析し、効果に重要な細胞を明らかにする。さらに、マウスからその重要な細胞を除去することで抗腫瘍効果への影響も検証した。

最後に HLA-I と HLA-II の発現が特徴的であり、抗 PD-1 抗体が臨床応用されているホジキンリンパ腫の臨床検体を免疫染色し、HLA-I/II や免疫細胞との比較、臨床病理学的な特徴を明らかにした。

【結果】

マウスリンパ腫細胞株 A20、EG7、大腸癌細胞株 MC-38 に関して、B2M 遺伝子をノックアウトし MHC-I 欠損株を作成して、抗腫瘍効果を検証した。既報にあるように、抗 PD-1 抗体は EG7 と MC-38 に関しては耐性化したが、一方で A20 に関してはノックアウトにも拘わらず、抗 PD-1 抗体は有効なままであった。EG7 と MC-38 は MHC-II を発現していないが、A20 は MHC-II を発現しているため、MHC-II の影響による耐性化の解除を考えた。そこで MHC-I を欠損させた EG7/B2MKO と MC-38/B2MKO に CIITA 遺伝子を強制発現し、MHC-II が発現した腫瘍を作成し、同様の実験を行ったところ、抗 PD-1 抗体への耐性が A20 のように解除された。次にこれらの TIL 解析をフローサイトメトリーで行ったところ MHC-II 発現株では、CD8 陽性 T 細胞よりも CD4 陽性 T 細胞の浸潤が優位で、その CD4 陽性 T 細胞はグランザイムといった細胞傷害性の分子を発現し、細胞傷害性 CD4 陽性 T 細胞と考えられた。そこで MHC-II 発現腫瘍で CD4 陽性 T 細胞を除去したうえで抗 PD-1 抗体治療を行ったところ、その耐性化が観察された。以上より MHC-II 発現腫瘍では細胞傷害性 CD4 陽性 T 細胞が抗 PD-1 抗体の効果に重要であることが明らかになった。さらにこの MHC-II 発現腫瘍の TIL で MHC-II と結合する抑制性の免疫チェックポイント分子 LAG-3 の発現を調べたところ、CD4 陽性 T 細胞に LAG-3 が PD-1 と共に高発現しており、抗 PD-1 抗体に抗 LAG-3 抗体を併用することでさらに効果が高まることを証明した。

最後に 85 例のホジキンリンパ腫で HLA-I/II と CD4/8 で免疫染色を行ったところ、HLA-I は 49 例で欠損しており、逆に HLA-II は 54 例で発現していた。特に HLA-II に関しては CD4 陽性 T 細胞の浸潤と関連し、そのような患者では予後が良好であった。そして、その中には抗 PD-1 抗体が著効した患者がいて、マウスモデルと矛盾しない結果であった。

【考察】

一般的に HLA-I が欠損しているような場合にはがん免疫療法は耐性化することが知られているが、本研究からは欠損していても HLA-II が発現していれば耐性化しないことが示唆された。特に細胞傷害性 CD4 陽性 T 細胞による抗腫瘍免疫応答が重要と考えられた。さらにそのような場合に抗 LAG-3 抗体を併用することの有効性も示唆され、今後の展開が期待される。今後は MHC-I と II に対する個々の免疫細胞の応答が抗腫瘍免疫応答に果たす役割に関して、明らかにしていく予定である。

【発表】

Nagasaki J, Togashi Y (corresponding author), Sugawara T, Itami M, Yamauchi N, Yuda J, Sugano M, Ohara Y, Minami Y, Nakamae H, Hino M, Takeuchi M, Nishikawa H. The critical role of CD4⁺ T cells in PD-1 blockade against MHC-II-expressing tumors such as classical Hodgkin lymphoma. *Blood Adv* 4: 4069-4082, 2020.