

# 悪性黒色腫モデルマウスにおける免疫 チェックポイント分子PD-L1の阻害

Miguel A. Tam, Jason Williams\*, Binggang Sun, Hong Zhang, Kelsey Swartz,  
Salvador Garcia-Mojica, Dzung Nguyen, Xifeng Yang  
\*University of Chicago, Chicago IL

## ハイライト

悪性黒色腫モデルマウスへの抗PD-L1抗体の投与により次の事象が観察されました:

- 脾臓のCD4+活性化T細胞が増加しました
- Thサイトカインの産生が刺激され、炎症性サイトカインが抑制されました
- 抗原特異的T細胞が増加し、腫瘍増殖が抑制されました。

# 要旨

免疫チェックポイント分子は免疫反応の調節や抑制に関与する因子です。腫瘍細胞は免疫チェックポイント機構を活用することにより免疫系から逃れて増殖し続けるため、最近のがん免疫療法では免疫チェックポイントを標的としています。今回私たちは、悪性黒色腫モデルマウスにおいてPD-L1の結合を阻害するためにモノクローナル抗体を用い、T細胞サブセットとサイトカインプロファイルを解析しました。抗PD-L1抗体の投与により、T細胞が活性化され、Thサイトカインとケモカインの産生が上昇することを見出しました。また、腫瘍特異的T細胞が増加し、その結果、腫瘍増殖が抑制されました。

## イントロダクション

がんの治療は従来、手術や放射線療法、化学療法を組み合わせられてきました。さらに最近、免疫療法を用いる戦略が、治療の選択肢の1つとして利用されつつあります。免疫療法は、私たちの体が持つ免疫系を、腫瘍細胞の認識や腫瘍細胞に対する攻撃に利用します。免疫療法は大きく2種類に分けられます。1つは細胞療法で、生体外で細胞を調整し、患者にその細胞を再導入します。もう1つは液性因子を用いる療法で、腫瘍に対する反応を起こさせるために患者にモノクローナル抗体やその他のタンパク質を投与します。

免疫療法に基づく治療法開発のアプローチの1つは、免疫チェックポイント分子の阻害を利用するものです (reviewed in 1)。免疫チェックポイントは免疫の恒常性を維持し、また、自己免疫を防ぐため、部分的に免疫反応を抑制します。腫瘍細胞は、通常であれば抗原提示細胞 (APCs) 上に見られる免疫チェックポイント分子を発現することによって、免疫チェックポイントを利用し、抗腫瘍反応から逃れることができます。免疫チェックポイント分子は受容体とリガンドから構成されることが多いため、モノクローナル抗体を用いて標的とすることが可能です。リガンドと受容体の結合を阻害可能な抗体を用いると、T細胞を活性化状態にさせておくことができ、腫瘍細胞に対する免疫反応を仕掛けることができます。

免疫療法に使用するために研究されてきた免疫チェックポイント分子の1つは、PD-1とそのリガンドであるPD-L1です (2)。PD-L1とPD-1が結合するとその下流のシグナル伝達経路が開始され、最終的にT細胞が死に至ります (3)。悪性黒色腫ではPD-L1の発現が上昇しているため、PD-L1の阻害は悪性黒色腫の治療に非常に有用であると考えられます。この報告では、悪性黒色腫モデルマウスにGoInVivo™ anti-mouse PD-L1 antibodyを投与し、腫瘍微小環境や流入領域リンパ節におけるT細胞や、抗原特異的T細胞応答、血清中サイトカインプロファイルについて解析しました。

# 材料と方法

## マウス生体への抗PD-L1抗体の投与

BALB/cマウスまたはC57BL/6マウスの側腹部に106個のB16F10悪性黒色腫細胞を注入しました。その後、100 µgまたは200 µgのGoInVivo™ anti-PD-L1 antibody clone 10F.9G2 (Cat. No. 124328) あるいはアイソタイプコントロール (Cat. No. 400666) を3日ごとに合計3回投与しました。投与スケジュールは図の説明に記載の通りに実施しました。組織及び血清は初回投与の14日後及び24日後に採取しました。脾臓採取後、フローサイトメトリー用染色のために細胞懸濁液を調整しました。

## フローサイトメトリーによる解析

細胞はanti-CD25 (Cat. No. 102033), CD69 (Cat. No. 135209), CD152 (CTLA-4) (Cat. No. 106305), CD279 (PD-1) (Cat. No. 135209), CD278 (ICOS) (Cat. No. 313531), I-A/I-E (MHC II) (Cat. No. 107605), CD11c (Cat. No. 117317), CD80 (Cat. No. 104729), CD86 (Cat. No. 105011), MHC pentamer (ProImmune), および7-AAD (Cat. No. 420403)で染色しました。細胞のデータ取得にはLSR Fortessa™ (BD Biosciences)を用い、解析にはFlowJo ソフトウェアを使用しました。

## 顕微鏡による解析

流入領域リンパ節を分離し、OCTコンパウンドに包埋および凍結後、7 µmの凍結切片を作製しました。切片は固定や抗原賦活化を行わずに、anti-CD4 (Cat. No. 100425), CD8 (Cat. No. 100727), CD11c (Cat. No. 117346) およびB220 (Cat. No. 103251)で染色しました。画像はOlympus IX83 倒立顕微鏡を用いて撮影しました。

## サイトカインとケモカインの測定

サイトカインおよびケモカインプロファイルは、BioLegendのLEGENDplex™ (Cat. Nos. 740740, 740134, 740007)を用いて解析しました。詳細なプロトコールは文献6をご確認ください。

LEGENDplex™に関する情報は、下記リンク先をご覧ください。  
<https://www.biolegend.com/legendplex>

特に記載がない限り、使用した試薬はBioLegendの製品です。

# 結果

悪性黒色腫モデルマウスにおいて、PD-L1の阻害にモノクローナル抗体が効果的です

腫瘍モデルマウスの一種、悪性黒色腫モデルマウスにおいて、PD-L1に対する抗体を治療に用いた場合の有効性を調べるため、マウス側腹部に106個のB16F10悪性黒色腫細胞を注入しました。その後、3日ごとに（あるいは示されているように）、GoInVivo™ anti-PD-L1 blocking antibodyをマウスに投与しました。投与後、免疫表現型解析のため、組織と血清を採取しました（図1）

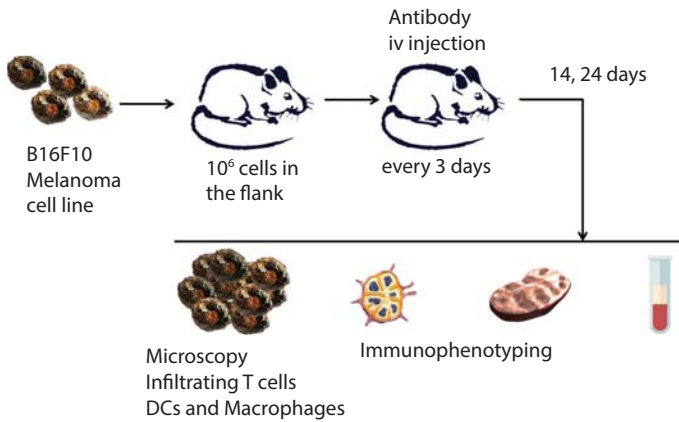


図1. 悪性黒色腫モデルにおける抗PD-L1抗体を用いた治療の実験概要

抗PD-L1抗体投与により活性化T細胞が増加しました

抗PD-L1抗体または対応するアイソタイプコントロールを投与してから14日後に、脾臓のCD4+細胞を回収し、一般的に用いられる活性化T細胞マーカーで染色しました。抗PD-L1抗体を投与したマウスでは、アイソタイプコントロールを投与したマウスと比較するとCD25, CD69, ICOS, CD279 (PD-1)の発現が上昇していることから明らかなように、活性化T細胞の表現型を示しました（図2）。重要なことに、別の免疫チェックポイント分子であり、免疫応答を負に調節するCTLA-4の発現レベルは低く、抗PD-L1抗体を投与したマウスでも変化は見られませんでした。

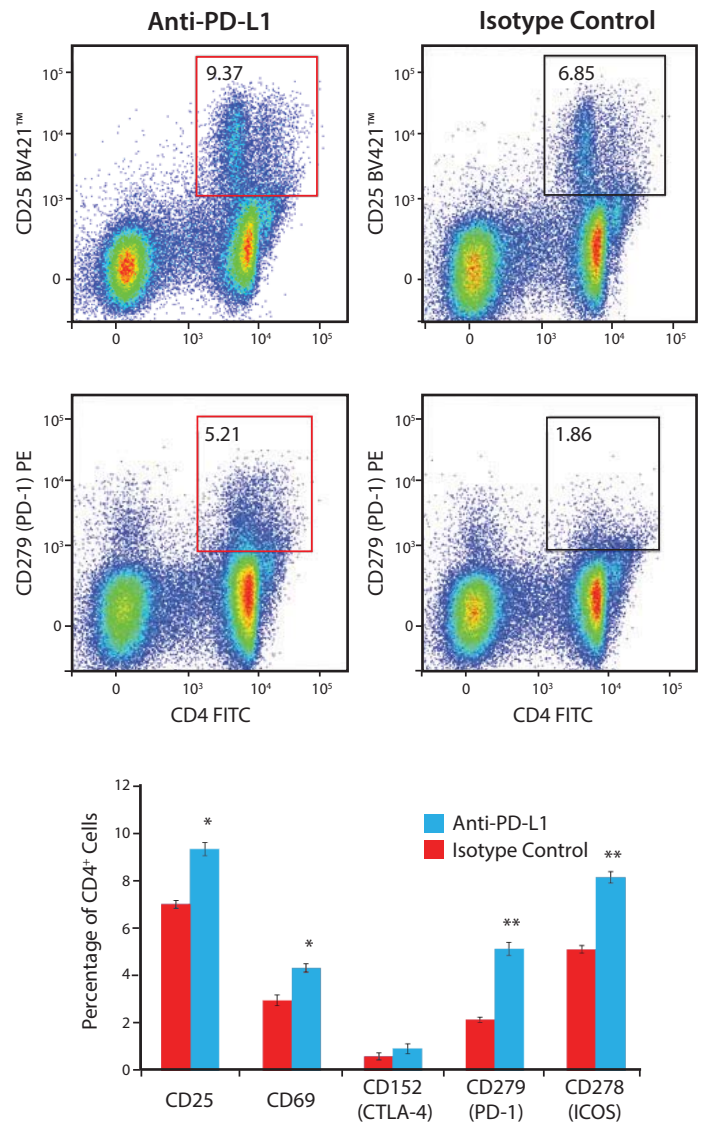


図2. 抗PD-L1抗体投与（day 0, 3, 6に200 µgの抗体を静脈へ注射）したマウスの脾臓CD4+ T細胞は活性化T細胞の表現型を示しました。細胞は腫瘍移植後14日目に回収しました。

## 抗PD-L1抗体投与後、脾臓の樹状細胞においてCD80の発現が減少しました

次に、活性化T細胞の増加がAPCs群の変化と関連性があるか調べるために、脾臓の樹状細胞を解析しました。この実験では、まず最初に古典的樹状細胞であるMHC II (high), CD11c (high)細胞にゲートを設定しました。抗PD-L1抗体を投与したマウス由来の樹状細胞 (DCs)では、CD80の発現が減少していました (図3)。この結果から、CD80が減少することによってCD86とCD28の相互作用が起こりやすくなり、また、CTLA-4の結合が減少するのではないかと仮定しました。

## 抗PD-L1抗体投与により、流入領域リンパ節におけるCD8+DCs数が増加しました

APCsをさらに解析するため、抗PD-L1抗体またはアイソタイプコントロールを投与したマウスの流入領域リンパ節を解析しました。抗PD-L1抗体を投与したマウスでは、流入領域リンパ節のCD8a+DCsが増加していました。なお、CD8+ DCsはAPCsの一種で、CD8+T細胞に抗原提示することができる細胞です。また、CD8+T細胞に対するCD8a+ DCsの抗原提示は、腫瘍除去の際に一般的に起こる現象です (7)。

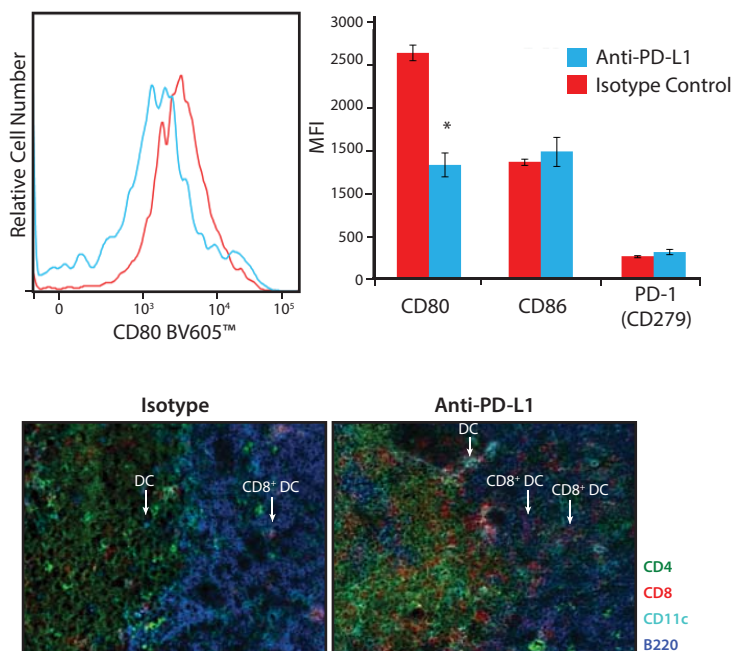


図3. 抗PD-L1抗体を投与したマウスの脾臓DCsにおいてCD80の発現が減少しました。細胞は古典的樹状細胞 (MHC II high, CD11c high)にゲートを設定しました (上)。抗PD-L1抗体を投与したマウスの流入領域リンパ節ではCD8+DCsが増加しました。組織はCD4 (緑)、CD8 (赤)、CD11c (シアン) およびB220 (青) で染色しました (下)。

## 悪性黒色腫モデルマウスへの抗PD-L1抗体投与によって、血清中サイトカインおよびケモカインプロファイルが変化しました

抗PD-L1抗体投与後の免疫反応をより詳細に解析するため、LEGENDplex™ を用いて血清中のケモカイン及びサイトカインプロファイルを分析しました（図4）。注目すべきことに、抗PD-L1抗体を投与したマウスでは、IFN- $\gamma$  やTNF- $\alpha$  などの通常はTh1応答に関連するサイトカインが増加することを見出しました。さらに、IL-9とIL-22といったそれぞれTh9表現型とTh22表現型に關与するサイトカインも上昇しました。しかしながら、これは可溶性メディエーターの全体的な増加には該当しませんでした。なぜならIL-12p70, IL-27, IL-33およびGM-CSFなど他の炎症性サイトカインの産生は同時に抑制されたからです。また、このようなサイトカイン反応は抗PD-L1抗体投与マウス特異的であることを示唆するものでした。最後に、抗PD-L1抗体の投与によって、MIP-3 $\alpha$ , Eotaxin, MIGおよびIP-10を含む重要なケモカインの産生が増加しました。これらのケモカインは、抗腫瘍免疫において他の細胞を結集させるという役割を担っているのかもしれない。

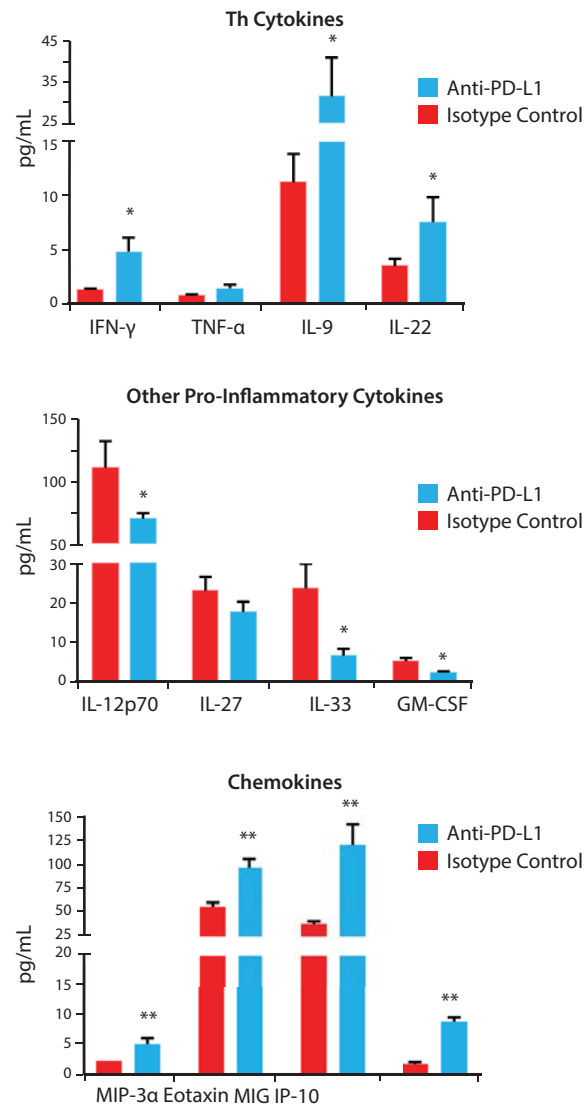


図4. 抗PD-L1抗体投与マウスの血清ではThサイトカインとケモカインが増加しました。同マウスでは同時に他の炎症性サイトカインが減少しました。

## 抗PD-L1抗体投与後に抗原特異的CD8+腫瘍浸潤Tリンパ球（TIL）が増加しました

腫瘍増殖における抗原特異的T細胞について調べるため、B16悪性黒色腫細胞株をマウスへ移植し、移植および抗体投与の24日後に解析しました。この細胞株は、水疱性口内炎ウイルスの核タンパク質由来ペプチドSIYRYYYGL (498-505)を発現しています。MHCとSIYペプチド複合体の五量体を用いることで、CD8+ TILを追跡することが可能です。予想通り、抗PD-L1抗体を投与したマウスでは、アイソタイプコントロールを投与したマウスと比較して抗原特異的TILが増加しました（図5）。最後に、他の報告（4, 5）で発表されている腫瘍モデルに基づく知見の確認として、これらのマウスの腫瘍面積を測定したところ、抗PD-L1抗体投与マウスでは腫瘍増殖が大幅に減少しました。

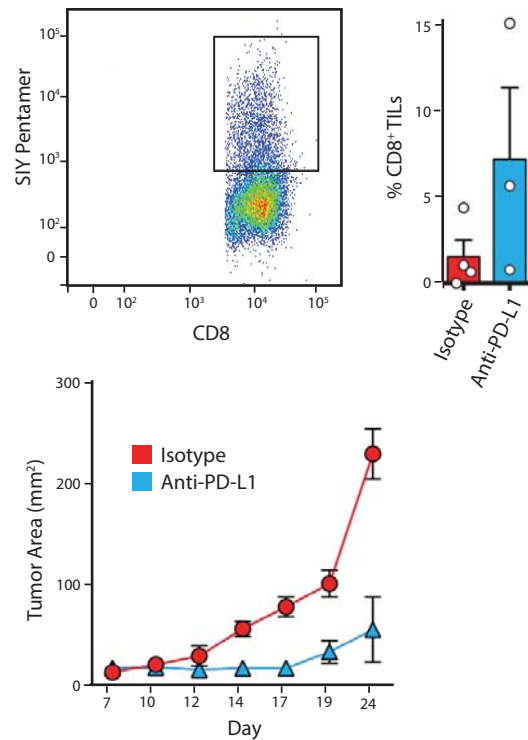


図5. 抗PD-L1抗体投与マウス（100  $\mu$ gの抗体を悪性黒色腫細胞株移植後7,13,16日目に腹腔内投与）では、抗原特異的TILの増加と総腫瘍面積の減少が見られました。



# 結論

免疫チェックポイント分子はがんの治療にとって非常に有用なターゲットです。免疫チェックポイントの阻害によって免疫応答が増強し、さらに、この経路はしばしばリガンドと受容体の相互作用に依存しています。弊社のGoInVivo™ シリーズ抗体のような生物学的活性を有する抗体を使用することで、免疫チェックポイントの阻害を簡単に行うことが可能です。悪性黒色腫はPD-L1を発現しており、これにより抗腫瘍反応を回避できます。そこで私たちは、悪性黒色腫モデルマウスにおいて、PD-L1の阻害による特異的な細胞表現型を理解したいと考えました。

予想したように、PD-L1の阻害によって活性化T細胞が増加することが、CD25やCD69など一般的なT細胞活性化マーカーの測定によって明らかになりました。興味深いことに、この活性化の表現型は、APCsに発現している別のT細胞共刺激分子であるCD80の減少に対応していました。この結果から、CD80の発現減少は、他の免疫チェックポイント分子との相互作用（例えばCTLA-4への結合の減少）を変化させ、そしてCD80とCD28間の相互作用を増加させるのではないかと仮定しました。

重要なことには、抗PD-L1抗体投与によってCD8+腫瘍特異的T細胞が増加し、これは腫瘍サイズの減少とも相関していました。総括として、これらの結果は悪性黒色腫モデルマウスにおけるPD-L1の阻害に対する細胞の反応を表しており、抗PD-L1モノクローナル抗体の投与が悪性黒色腫に対する効果的な治療法となり得ることを示唆しています。

## References:

1. Pardoll DM. 2012. *Nat. Rev. Cancer*. 12: 252-264.
2. Zou W, et al. 2016. *Sci. Transl. Med.* 8: 328.
3. Jin HT, et al. 2011. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 350: 17-37.
4. Tsai KK, et al. 2014. *Hum. Vaccin. Immunother.* 10 (11):3111-3116.
5. Hodi FS, et al. 2010. *N. Engl. J. Med.* 363: 711.
6. Lehmann, JS, et al. 2017. *J. Vis. Exp.* 9:129.
7. Fu, C. and Jiang A. 2018. *Front. Immunol.* 9: 3059.

San Diego, CA 92121  
1.877.246.5343 (877-BIOLEGEND) | International: 1.858.768.5800

BioLegend products are manufactured in an ISO 13485:2016 certified facility following GMP compliant procedures, ensuring the highest quality and stability.

biolegend.com

17-0002-00

製品輸入販売元



**Digital Biology**®

トミーデジタルバイオロジー株式会社  
〒112-0002 東京都文京区小石川1-1-17  
日本生命春日駅前ビル 3階  
email: info-ap@digital-biology.co.jp  
phone: 03-6240-0843