

主論文の要旨

**Spatiotemporal depletion of tumor-associated immune
checkpoint PD-L1 with near-infrared
photoimmunotherapy promotes antitumor immunity**

〔 近赤外線光免疫療法で腫瘍関連免疫チェックポイントPD-L1を
時空間的に減少させると抗腫瘍免疫が促進される 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 呼吸器内科学分野

(指導：石井 誠 教授)

滝 俊一

【緒言】

近赤外光免疫療法(NIR-PIT)は、近赤外光照射によって活性化される光吸収性フタロシアニン色素 IRDye700Dx (IR700)とモノクローナル抗体(mAb)の複合体を用いた、新規の癌分子標的治療である。癌細胞と mAb-IR700 の反応後に、690nm の近赤外光を照射することにより IR700 が励起されると、mAb-IR700 付加体が表面タンパクを介して細胞膜が破壊される。手術不能な再発頭頸部癌を対象に、上皮成長因子受容体(EGFR)を標的とする、NIR-PIT の第 III 相試験が進行中である。2020 年 9 月、IR700 を結合させた EGFR モノクローナル抗体(mAb)である cetuximab-IR700(ASP1929)が、医薬品医療機器総合機構(PMDA)より条件付きで臨床使用の承認・登録を受け、医療保険収載されている。

PD-L1 は、がん細胞の膜上に存在し、エフェクターT 細胞の PD-1 分子に結合することで免疫反応を低下させ、免疫監視の回避に働き腫瘍の成長促進に寄与する免疫チェックポイント分子である。近年、制御性 T 細胞(Tregs)、骨髄系由来抑制細胞(MDSCs)など、さまざまな抑制性免疫細胞が T 細胞の活性化を抑制することが明らかになっている。MDSCs は腫瘍微小環境においてエフェクターT 細胞の活性を低下させ、腫瘍細胞の免疫回避を促進する。従って、腫瘍微小環境における MDSC の数を減らすように腫瘍微小環境を編集することは、有望ながん免疫療法戦略となりうる。MDSC は PD-L1 を高発現していることが報告されており、PD-L1 を治療の標的とすることは、がん細胞のみならず、腫瘍微小環境の免疫チェックポイントに対しての阻害効果や MDSC にも影響を与える可能性がある。

今回、低発現のがん細胞表面分子を標的とした新たな NIR-PIT 手法を実現するために、光照射によって時空間的に腫瘍微小環境から PD-L1 を標的として近赤外光線免疫療法により誘導される抗腫瘍効果を、同種マウス腫瘍モデルで評価した。

【方法】

抗マウス PD-L1 抗体(10F.9G2, 抗 PD-L1-F(ab')₂)およびラット IgG2b(control-F(ab')₂)の F(ab')₂ を、4 mM システインおよび 5mM EDTA を含む 10 mM クエン酸緩衝液(pH 6.0)中で、固定化フィシンを用い消化することにより作製し、高速液体クロマトグラフィーにより F(ab')₂ を精製した。Fc 部位を除去することで、非特異的な結合に寄る効果を削除し、また分子量をへらす効果で腫瘍微小環境への浸透性がよくなる効果が考えられた。panitumumab、抗 PD-L1-F(ab')₂ および control F(ab')₂ をそれぞれ、Na₂HPO₄、IR700 と共にインキュベートし、混合物を Sephadex G50 カラムで分離精製した。結合を確認するために、フローサイトメトリー解析を A431-Luc-GFP(ヒト皮膚がん)、MC38-luc(マウス大腸がん)、LL/2-luc(マウス肺がん)、TRAMP-C2-luc(マウス前立腺がん)、B16F0-luc(マウスメラノーマ)を用いて行った。これらの腫瘍細胞にはレポーターとして、luciferase 遺伝子ないしは luciferase-GFP 遺伝子導入を行い、*in vitro* と *in vivo* でその活性を評価できるようにした。

共焦点蛍光顕微鏡での観察を行うために、MC38-luc、LL/2-luc、TRAMP C2-luc (2×10⁴)

をガラスボトムディッシュに播種し、24 時間培養した後、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗 PD-L1-F(ab')₂-IR700 を培養液に加え 6 時間インキュベートした。PBS で 2 回洗浄し、死細胞染色である SYTOX Blue を添加した。細胞に近赤外光 (20 J/cm²) を照射し、その前後を撮像し検討した。また、*in vitro* で NIR-PIT の効果を定量的に評価した。EGFR を標的とした NIR-PIT では、A431-luc-GFP 細胞 (1 \times 10⁵) を 12 ウェルプレートに播種し、panitumumab-IR700 (pan-IR700) を含む培地と共に 12 時間インキュベートした。PD-L1 を標的とした NIR-PIT では、MC-38-luc、LL/2-luc、Tramp-C2-luc、B16F0 細胞 (1 \times 10⁵) を 12 ウェルプレートに播種し、抗 PD-L1-IR700 を含む培地と共に 12 時間インキュベートした。PBS で 2 回洗浄した後、近赤外光を照射した。NIR-PIT の光細胞毒性効果は、プレートリーダー (Powerscan4) でのルシフェラーゼ活性評価と、フローサイトメトリー (FACS Calibur) での死細胞染色ヨウ化プロピジウム (PI) 染色評価で測定した。

In vivo 実験は、名古屋大学の動物実験委員会の許可を得て規則に従って行われた。約 10~15 週齢の C57BL/6 マウスに、MC38-luc、LL/2-luc、TRAMP-C2-luc のいずれかの細胞 (2 \times 10⁶ 個) を右、左、または両方の臀部に皮下移植し、NIR-PIT を行った。効果判定はルシフェラーゼ活性と腫瘍体積で行った。ルシフェラーゼ活性は IVIS イメージングシステムを用いて測定し、腫瘍体積評価は、最大径と幅を体表から測定し、最大径 \times 幅² \times 0.5 と算出した。NIR-PIT 前日に、マウスに 100 μg の抗 PD-L1-F(ab')₂-IR700 または control-F(ab')₂-IR700 を注射し、特に指定のない限り 75 J/cm² の近赤外光を腫瘍接種後 4 日目に右腫瘍に照射した。NIR-PIT 後に血液と脾臓を採取し、リンパ球を分析した。CD3e、CD8a、CD25、NK1.1、CD11c、CD11b、Ly-6G、CD45、F4/80、CD69、Foxp3、IFN- γ 、IL-2 の染色を行い、染色した細胞をフローサイトメトリー (FACS CantoII) で分析した。

ATP と high mobility group box protein 1 (HMGB-1) の発現定量のために、それぞれ MC38 (5 \times 10⁵) と MC38-luc (1 \times 10⁵) を 12 ウェルプレートに播種し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗 PD-L1-IR700 と 37 $^{\circ}\text{C}$ で 12 時間インキュベートした。培地を PBS で置換した後、128 J/cm² の NIR 光を照射した。ATP の発現は FF2000 ENLITEN ATP Assay System により、HMGB1 の発現は ELISA (ARG81310) により、それぞれ処理後 1 時間で定量した。

【結果】

1. PD-L1 を標的とした *in vitro* NIR-PIT の効果

フローサイトメトリーを用いて、A431-luc-GFP 細胞で EGFR の発現を、MC38-luc で PD-L1 の発現を解析した (図 1A、B)。MC38-luc 細胞上の PD-L1 は、細胞表面の IR700-蛍光を用いて評価すると、A431-luc-GFP 細胞上の過剰発現した EGFR と比較して約 100 分の 1 程度の発現量しか無いことが判明した。また、LL/2-luc、Tramp-C2-luc、B16F0-luc の各細胞でも、MC38-luc と同程度の PD-L1 の発現が確認された。A431-luc-GFP 細胞に対する EGFR を標的とした *in vitro* での NIR-PIT の細胞傷害効果は、MC38-luc 細胞に対する PD-L1 を標的とした NIR-PIT よりも有意に高かった (図 1A、B)。他のマウス腫瘍細胞 (LL/2-luc、Tramp-C2-luc、B16F0-luc) に対する PD-L1 を標的とした

NIR-PIT の有効性は、MC38-luc 細胞に対するものと同程度であった。これらのことから、EGFR を標的とした NIR-PIT に比べて発現量が極端に低い PD-L1 を標的とした NIR-PIT の効果はかなり限定的であった。

MC38-luc の蛍光顕微鏡観察を NIR-PIT の前後 に行った。NIR-PIT 後、細胞の膨張と破裂、および死細胞蛍光染色が観察された(図 1C)。LL/2-luc, Tramp-C2-luc でも同様の所見が観察された。十分な光量を当てれば、発現量が低くとも NIR-PIT により細胞死を誘導することが可能であると確認できた。

2. PD-L1 を標的とした *in vivo* NIR-PIT の効果とそのメカニズム解析

MC38-luc を臀部に移植したマウスに対し、抗 PD-L1-F(ab')₂-IR700 を投与し、1 日後に近赤外線光照射(75J/cm²)を行った(図 2A、B)。PIT 群では control 群、control-F(ab')₂-IR700 投与後 NIR-PIT 照射群、抗 PD-L1-F(ab')₂-IR700 投与のみ群と比して腫瘍増大抑制効果が得られ(図 2C、D、E)、生存期間も有意に延長した(図 2F)。同様の結果は、LL/2-luc および TRAMP C2-luc においても見られた。

NIR-PIT 後の腫瘍浸潤リンパ球をフローサイトメトリー解析したところ、MDSC(CD11b+Gr1+)の数は有意に減少したが(図 2G)、末梢血では、CD8+T 細胞数に有意な増加が見られた(図 2H)。

3. PD-L1 を標的とした NIR-PIT による腫瘍微小環境の編集効果

NIR-PIT 後 1.5 時間で、腫瘍内の CD8 T と NK 細胞の活性化が見られた(図 3A)。また、末梢血中の CD8 T 細胞および NK 細胞も同様に活性化されていた(図 3B)。PD-L1 を標的とした NIR-PIT は、*in vitro* で ATP と HMGB1 のレベルも上昇させた(図 3C、D)。

4. PD-L1 を標的とした NIR-PIT の遠隔腫瘍への効果

PD-L1 を標的とした NIR-PIT を、両臀部に MC38-luc を移植したマウスの右側の腫瘍にのみ行った(図 4A および B)。ルシフェラーゼ活性、腫瘍体積の評価で、control F(ab')₂ 群に比して、非照射側でも腫瘍増大抑制効果がみられ、(図 4C、D)生存期間の延長効果が得られた(図 4E)。右側腫瘍への治療後 6 時間で、対側腫瘍内の CD8 T 細胞、NK 細胞の活性化が見られた(図 4F)。

【考察】

PD-L1 を標的とした NIR-PIT による腫瘍に対する新規の治療法を前臨床の同種マウス腫瘍モデルで検討した。PD-L1 を標的とした NIR-PIT は、*in vitro* では限られた治療効果しか示さなかったが、*in vivo* では強い治療効果を示し、また、近赤外光線照射部位のみならず、転移腫瘍にも抗腫瘍効果を示した。PD-L1 を標的とした NIR-PIT は、DAMPs の放出、腫瘍微小環境の変化、抗 PD-L1 抗体による免疫チェックポイント効果によって腫瘍局所および全身性の抗腫瘍効果を亢進させたと考えられた(図 5)。PD-L1 は各臓器の腫瘍に横断的に発現していることが知られているので、PD-L1 標的 NIR-

PIT は、臓器横断的に使用できる。また、本研究で示されたように、腫瘍の PD-L1 発現が低くても有効であり、近赤外光が照射されていない遠隔腫瘍にも有効である。多くの抗 PD-L1 抗体薬がすでに承認され、臨床に適用されており、PD-L1 を標的とした NIR-PIT は容易に臨床応用が可能であると考えられる。

【結語】

PD-L1 を標的とした NIR-PIT は、様々な腫瘍に対する有効な全身治療法となる可能性がある。