

主論文の要約

Programmed Death-Ligand 1 on Antigen-presenting Cells Facilitates the Induction of Antigen-specific Cytotoxic T Lymphocytes: Application to Adoptive T-Cell Immunotherapy

〔抗原提示細胞上に発現する PD-L1 は抗原特異的細胞傷害性 T 細胞の
誘導を促進する：T 細胞を用いた養子免疫療法への応用〕

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻
病態内科学講座 血液・腫瘍内科学分野

(指導：清井 仁 教授)

後藤 辰徳

【背景】

慢性的な抗原刺激による細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の疲弊化には、活性化した T 細胞上に発現する免疫抑制受容体 programmed death-1 (PD-1) と、そのリガンドである programmed death-ligand 1 (PD-L1) との結合が関与している。この機序として、疲弊化した CTL が標的細胞に対してエフェクター機能を発揮する段階において、標的細胞上の PD-L1 が CTL に対して抑制的に作用することが明らかにされている。一方で、T 細胞への抗原提示能が強く、プロフェッショナルな抗原提示細胞と呼ばれる樹状細胞には、正の共刺激分子である CD80/86 とともに、抑制性のリガンドである PD-L1 も高発現している。しかしながら、T 細胞が抗原刺激を受けて抗原特異的 CTL が誘導される段階において、抗原提示細胞上の PD-L1 が CTL の誘導に対してどのように作用しているかは明らかにされていない。そこで、本研究では、抗原特異的 CTL を誘導する際の抗原提示細胞上に発現する PD-L1 の役割に関して検討を行った。

【方法】

サイトメガロウイルス (CMV) 既感染で、HLA-A*02:01、HLA-A*24:02 または HLA-B*07:02 のいずれかを有する健常ドナー由来 CD3 陽性 T 細胞を、それぞれの HLA 拘束性 CMV pp65 由来ペプチドをパルスした抗原提示細胞で刺激をすることで CMV 抗原特異的 CTL (CMV-CTL) を誘導し、抗原提示細胞に発現する PD-L1 の役割について検討を行った。抗原提示細胞として樹状細胞、もしくは K562 細胞株に HLA クラス I 分子及び、CD80/86、PD-L1 をレトロウイルスにより遺伝子導入して作成した人工抗原提示細胞を用いた。誘導された CTL の分化段階を CD45RA および CD62L の発現パターンをもとに比較した。また、CTL の疲弊化マーカーである PD-1 および TIM-3 の発現を比較するとともに、CTL のエフェクター機能として、細胞内サイトカイン染色によるサイトカイン産生能と細胞表面の脱顆粒マーカーである CD107a の発現検出による細胞傷害活性の解析を行った。

さらには、腫瘍抗原である Wilms tumor 1 (WT1) 抗原ペプチドをパルスした人工抗原提示細胞を用いて、HLA-A*24:02 を有する健常ドナー由来 CD3 陽性 T 細胞より WT1 特異的 CTL (WT1-CTL) の誘導を試みた。

【結果】

健常ドナー由来 CD3 陽性 T 細胞を、CMV pp65 由来ペプチドをパルスした樹状細胞で刺激をしたのち、抗 PD-L1 ブロッキング抗体存在下で 14 日間培養して CMV-CTL の誘導を行ったところ、抗 PD-L1 抗体を加えた場合に CMV-CTL の誘導能が低下した (Figure 1A, B)。この結果から、樹状細胞に発現する抑制性のリガンドである PD-L1 は、CTL の誘導においてむしろ促進的に作用している可能性が示唆された。

次に、抗原提示細胞上の PD-L1 の役割を詳細に検討するために、抗原提示細胞のモデルとして CD80/86 と PD-L1 を様々な組み合わせで遺伝子導入して人工抗原提示細胞を作成した (Figure 2A)。CD3 陽性 T 細胞を、CMV pp65 由来ペプチドをパルスした人工抗原提示細胞で 7 日毎に繰り返し刺激を行い、28 日間培養したところ、CD80/86 とともに

PD-L1 を発現させた人工抗原提示細胞 (K562/HLA+CD80/86+PD-L1) を用いた場合に、CD80/86 のみを発現させた人工抗原提示細胞 (K562/HLA+CD80/86) に比べて多くの CMV-CTL を誘導した (Figure 2B)。K562 細胞には CD80 がわずかに発現しており、その影響を排除するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて CD80 の発現をノックアウトした上で、CD80/86、PD-L1 を遺伝子導入した人工抗原提示細胞を用いて CMV-CTL の誘導を行ったところ、PD-L1 のみを発現させた K562 では誘導される CMV-CTL は増加せず、CD80/86 とともに PD-L1 を発現させた場合にのみ有意な増加を認めた (Figure 2C)。このことから、PD-L1 自体は CTL の誘導に促進的に働いておらず、CD80/86 とともに PD-L1 が抗原提示細胞上に発現していることで抗原特異的 CTL の誘導が促進されると考えられた。また、人工抗原提示細胞に発現する PD-L1 は、誘導される CMV-CTL のセントラルメモリー表現型の維持を妨げず、さらにはエフェクター機能の低下などをきたさなかった。

今回作成した K562 人工抗原提示細胞を用いて、HLA-A*24:02 を有する健常ドナー由来 CD3 陽性 T 細胞から WT1-CTL の誘導を試みたところ、K562/HLA+CD80/86+PD-L1 のみが誘導を試みた健常ドナー3名全てから WT1-CTL を誘導することが可能であった (Figure 3A, B)。

【考察】

本研究では、抗原提示細胞上に CD80/86 とともに発現する PD-L1 が、抗原特異的 CTL の誘導を促進することを示した。この機序として、CD80/86 による過剰な刺激を PD-L1 が適度にチューニングすることによって CTL の誘導を促進している可能性が考えられた。しかし、この点に関してはまだ解明できておらず、PD-L1 が促進的に働く詳細な機序を明らかにすることが今後の課題であると考えられる。

また、CD80/86 とともに PD-L1 を遺伝子導入して作成した K562 人工抗原提示細胞 (K562/HLA+CD80/86+PD-L1) は、疲弊化させることなく、セントラルメモリー表現型を示す T 細胞を多く含む CMV-CTL を数多く誘導可能であった。さらには、健常人の末梢血より分離したナイーブ T 細胞から腫瘍抗原である WT1 特異的 CTL を誘導することが可能であった。このことから、K562/HLA+CD80/86+PD-L1 は、養子免疫療法に用いる抗原特異的 CTL を誘導するための有用な人工抗原提示細胞となりうると考えられた。

【結語】

抗原提示細胞上に CD80/86 とともに発現する PD-L1 は、抗原特異的 CTL の誘導において促進的に作用している。また、K562/HLA+CD80/86+PD-L1 は、CTL を用いた養子免疫療法において有用な人工抗原提示細胞となる可能性がある。