

筑波大学

博士（医学）学位論文

イミキモド塗布による抗腫瘍効果のメカニズムの解明と、
抗PD-1抗体との併用効果の検討

2 0 2 1

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

大矢和正

目次

1 序論	1
1-1 切除不能な皮膚悪性腫瘍の問題点.....	1
1-2 Toll様受容体とイミキモド	2
1-3 抗programmed death-1抗体.....	5
2 本研究の仮説と目的.....	7
3 材料と方法	9
3-1 マウス.....	9
3-2 細胞培養.....	9
3-3 担がんモデルマウス.....	10
3-4 免疫組織染色	11
3-5 免疫細胞単離.....	12
3-6 フローサイトメトリー解析.....	13
3-7 リアルタイム定量 polymerase chain reaction	15
3-8 フローサイトメトリーによるサイトカイン解析.....	15
3-9 細胞傷害性試験.....	16
3-10 統計解析.....	16
4 結果	17

4-1	イミキモドはMC38に対する免疫反応を増強し、抗腫瘍効果を示す。.....	17
4-2	イミキモドは骨髄球系細胞を活性化し、骨髄球系細胞上の共刺激分子と MHC クラス II の発現が増加する。	20
4-3	イミキモドの抗腫瘍効果は T 細胞に依存している。	22
4-4	イミキモドの抗腫瘍効果は IFN- γ の発現増加に依存している。	25
4-5	イミキモドは免疫細胞の PD-1,PD-L1/PD-L2 の発現を増加させる。	27
4-6	IFN- γ はイミキモドによる PD-L1 発現増加に関与していない。	31
4-7	イミキモドクリームと抗 PD-1 抗体の併用療法は、各々の単剤療法と比べて顕 著な抗腫瘍効果を示す。	32
5	考察	34
6	省略語.....	40
7	謝辞	42
8	出典	43
9	文献	44
10	要約図	54

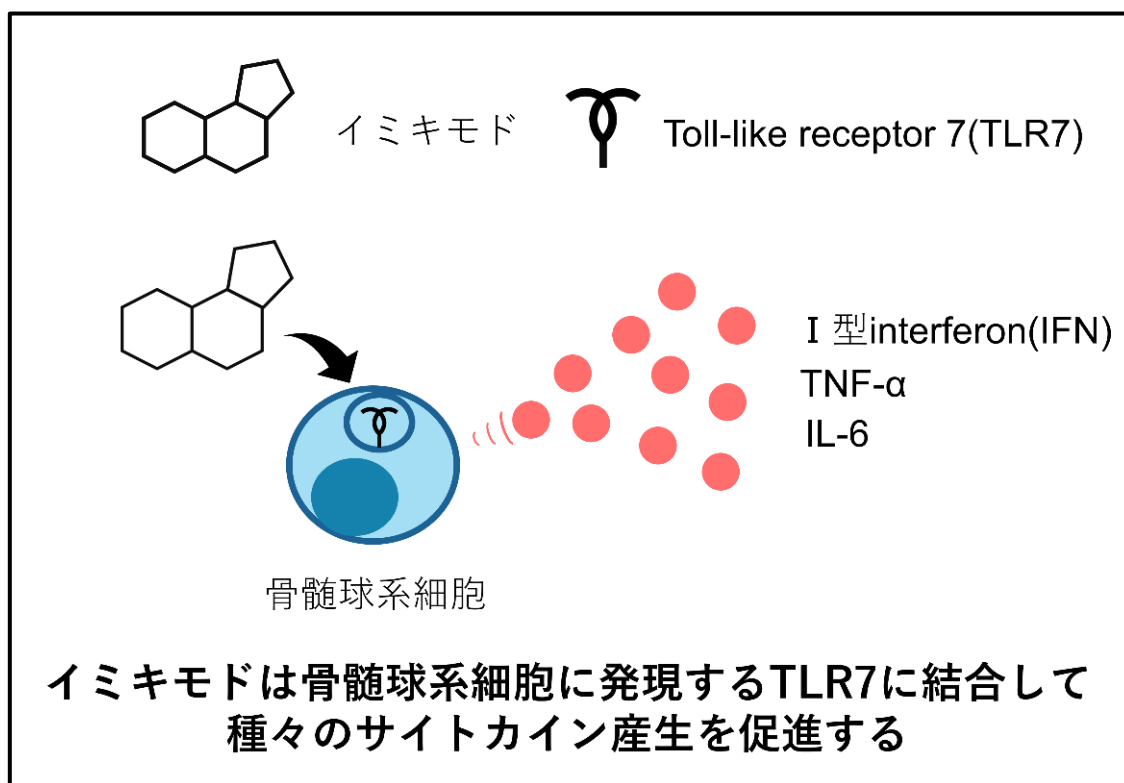
1 序論

1-1 切除不能な皮膚悪性腫瘍の問題点



皮膚は外界と直接接触するため紫外線や放射線、化学物質などに曝露されている。特に日光に含まれる紫外線が DNA 損傷を引き起こすことで遺伝子変異が生じ、有棘細胞癌や悪性黒色腫の発生に関与すると考えられている [1, 2]。また、化学物質や酸化ストレスにより生じる DNA の損傷や、ウイルスの感染が皮膚を原発とする悪性腫瘍の発生母地となる他 [1, 3]、多臓器で発生した悪性腫瘍が転移して皮膚に腫瘍病変を形成する [4, 5]。皮膚に生じた悪性腫瘍に対しては、切除による局所治療が基本であるものの神経周囲に浸潤する病変や、多発する病変、びまん性に広がる病変では機能面や整容面から切除が困難となる [1, 2, 6-8]。したがって、切除不能な皮膚悪性腫瘍に対し放射線療法や化学療法が用いられるが、これらの治療法に対し切除不能な皮膚悪性腫瘍が抵抗性を示すことがあり、病変からの出血や浸出液をしばしば伴って患者の quality of life を大きく損ねるため、新たな治療法が求められている [9-17]。

1-2 Toll 様受容体とイミキモド

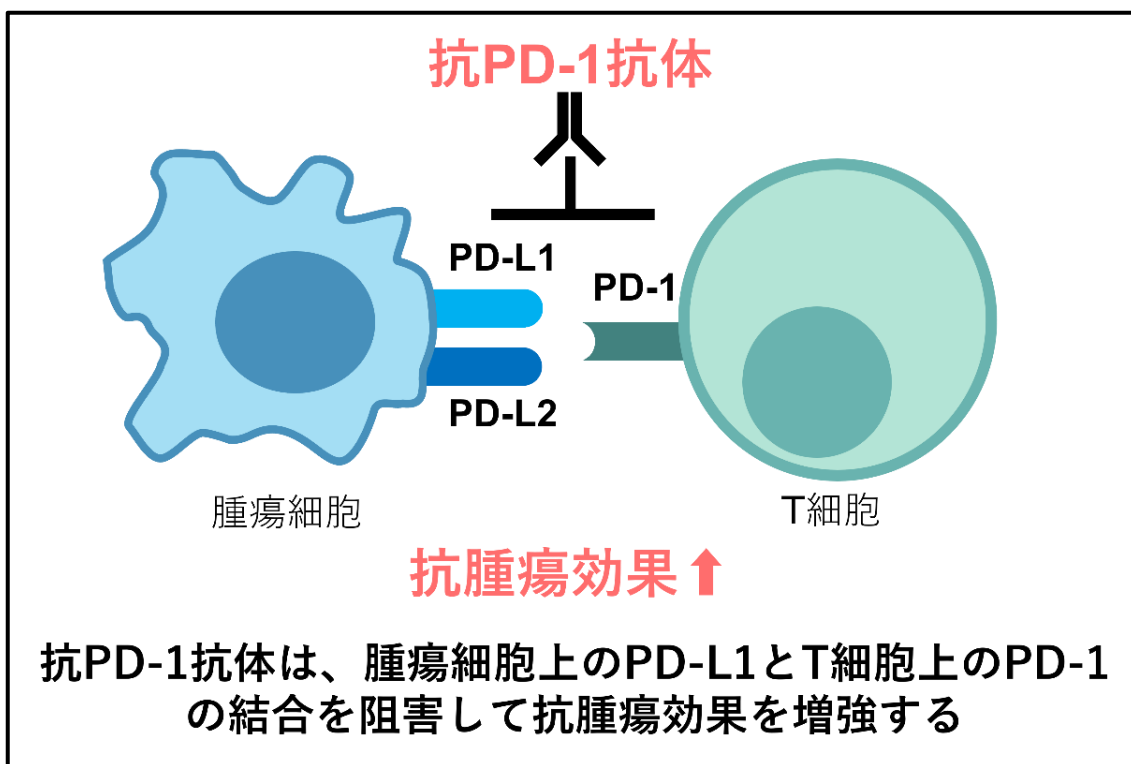


Toll 様受容体 (toll-like receptor: TLR)はパターン認識受容体として各微生物に特異的な構造物や核酸の分子構造を認識する [18]。TLR 7 は主に骨髄球系細胞に発現しており、一本鎖 RNA を認識することで MyD88 を介して NF-kB の活性化が生じる [19]。その結果、サイトカインの産生が増加することで自然免疫を賦活化する [19]。そのため、自然免疫の賦活化により抗腫瘍効果が期待され、悪性腫瘍に対していくつかの TLR リガンドの効果が検証されたが、実際に臨床応用された TLR リガンドは TLR 7 のアゴニストを含むイミキモドクリームのみである。 [20]。イミキモドは 3M Company が行った抗ウイルス剤開発プログラムの中で発見されたイミダゾキノリン系の化合物である [21]。3M Company

はイミキモドを含有するクリーム剤を開発し、1997年に米国で外性器又は肛門周囲の疣贅・尖圭コンジローマに対し認可され1998年に欧州、2007年にはアジアを含む75の国で承認を得た[21]。その後、2004年に米国と欧州で表在型基底細胞癌、米国では2004年、欧州では2006年に前がん病変である日光角化症に対し認可された[21]。本邦では2007年に尖圭コンジローマ、2011年に日光角化症に対する治療薬として承認を得ている[21]。イミキモドは自然免疫を賦活化させ抗腫瘍効果を示すことから、メラノーマにおける切除不能な原発巣や、多発する皮膚転移の治療にイミキモドの外用が試みられている[14, 22]。また、乳癌などの皮膚転移に対しても、イミキモドを用いて治療を行った症例が報告されている[23, 24]。しかしながら、これらの皮膚病変に対するイミキモド単体での効果は限定的であることから[14, 22-24]、新たな治療戦略が必要である。イミキモドにおける抗腫瘍効果の機序としてI型インターフェロン(interferon: IFN)、IFN- γ 、CCL2、IL-6、および腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand: TRAIL)などの分子が、TLR7/8アゴニストによって誘導され、抗腫瘍効果において重要な役割を担うと推測されている[25-31]。これまでの報告でも、イミキモドによる腫瘍関連マクロファージから産生されるCCL22の減少が抗腫瘍効果において重要な役割を果たす可能性が示されている[32]。しかしながら、イミキモドが示す抗腫瘍効

果における免疫原性の重要性や、骨髄球系細胞における共刺激分子の発現変化、
T細胞やB細胞といった獲得免疫の役割は明らかとなっていない。

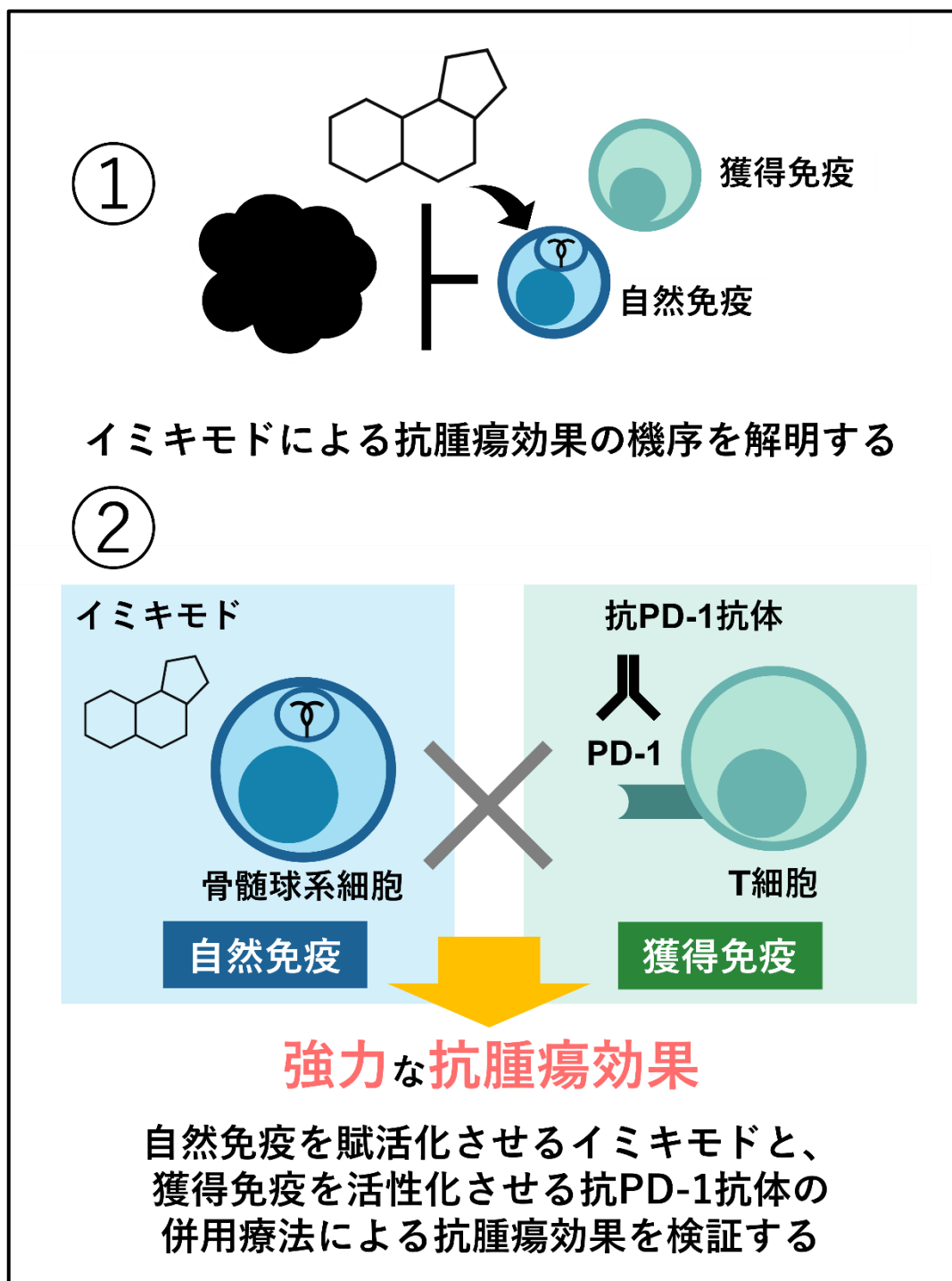
1 - 3 抗 programmed death-1 抗体



主に T 細胞に発現している programmed death-1 (PD-1)は、リガンドである programmed death-ligand 1 (PD-L1), programmed death-ligand 2 (PD-L2)と結合することで免疫寛容の誘導と維持に重要な役割を果たしている [33]。これまでの研究により、腫瘍細胞などに発現している PD-L1 と T 細胞上の PD-1 の結合を阻害することで免疫細胞における腫瘍細胞に対する免疫反応が強く促進されることが分かり [33]、過去の臨床研究から抗 PD-1 抗体はメラノーマ、肺癌、乳癌患者のなどの全生存期間を延長させることが明らかとなった [33]。しかしながら、メラノーマ患者における全奏効率は 30%程度であり、切除不能の原発病変や多発する皮膚転移を含む多くの病変で効果が十分とはいえない [34, 35]。

さらに、抗 PD-1 抗体で治療されたメラノーマ以外の悪性腫瘍患者の全奏効率はメラノーマよりも低いことが報告されており、新たな治療法が求められている[36, 37]。

2 本研究の仮説と目的



イミキモドは自然免疫を活性化することで、抗腫瘍効果を示すことが知られているが、その詳細な機序は明らかとなっていない。また、自然免疫を活性化する

ことにより、抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果を高めることが予測され、イミキモドと抗 PD-1 抗体の併用療法は優れた抗腫瘍効果を示すのではないかと仮説を立てた。そこで、本研究ではイミキモドによる抗腫瘍効果の機序を解明することとともに、抗 PD-1 抗体とイミキモドの併用療法の抗腫瘍効果を検証することを目的とした。

3 材料と方法

3-1 マウス

野生型である C57BL/6J マウスは CLEA Japan (Tokyo, Japan)より、IFN- γ 欠損マウス、Rag1 欠損マウス、および CD19-Cre トランスジェニックマウスは Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME, USA)から購入した。実験には 8 週齢から 12 週齢のマウスを用いた。いずれのマウスも筑波大学生命科学動物資源センターにおいて SPF(specific pathogen free)環境下で飼育した。いずれの実験も筑波大学生命科学動物資源センターの動物実験委員会の了承を得た後、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針(文部科学省)」および「筑波大学動物実験取扱規程」に従い行った。ヒト試料を用いた実験は筑波大学附属病院臨床研究倫理審査委員会の承認を得た後に行った。

3-2 細胞培養

B16F10 メラノーマ細胞は東北大学加齢医学研究所より取得した。Lewis lung carcinoma(LLC)細胞は坂田麻実子准教授(筑波大学血液内科)、MB49 膀胱癌細胞は W.T. Godbey 准教授(Departments of Chemical Engineering and Biomedical Engineering, Tulane University)、MC38 大腸癌細胞は田原 秀晃特任教授(東京大学医科学研究所がん生体分子治療社会連携研究部門、地方独立行政法人大

阪府立病院機構大阪国際がんセンターがん創薬部兼任)から供与された。細胞は 10% fetal bovine serum (FBS)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン(富士フィルム和光、大阪)、100mM ピルビン酸ナトリウム(富士フィルム和光、1%MEM 非必須アミノ酸溶液(富士フィルム和光)、100mM L-アラニル-L-グルタミン(富士フィルム和光)を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)(Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)を用いて、37°C、5%CO₂ 濃度の環境下の培養基で維持した。*In vitro* の実験において、6 穴細胞培養プレートに MC38 は 1.0×10^6 細胞/穴、脾臓細胞とヒト末梢血単核細胞は 1.5×10^6 細胞/穴で播種し、4 μ g/mL のイミキモド(InvivoGen, San Diego, CA, USA)または対照群として脱イオン蒸留水を含む DMEM を用いて培養した。JAK シグナル阻害実験では、最終濃度 300 μ mol/L のトファシチニブ(Selleck, Houston, TX, USA)を用いて脾臓細胞を培養し、対照群として PBS を用いた。NF- κ B 阻害実験では、最終濃度 2.5 μ mol/L の BMS-345541(Chemscene, Monmouth Junction, NJ, USA)を用いて脾臓細胞を培養し、対照として Dimethyl sulfoxide を用いた。それぞれ試薬を添加後 24 時間培養した後、細胞を回収して解析した。

3-3 担がんモデルマウス

MB49 および LLC は 1×10^6 個、B16F10 は 3×10^5 個、MC38 は 2×10^6 個の細

胞をマウスの背中に皮内注射し担がんモデルマウスとした。ノギスを用いて腫瘍径を測定し、次式により腫瘍体積を求めた：腫瘍体積(mm³)=(縦)×(横)²×0.5。5%IMQ クリーム(Beselna CreamTM)は持田製薬株式会社より提供され、腫瘍を皮内注射して2日目から18日目まで1日おきに83mgをマウスの背部に塗布した。抗PD-1抗体(クローン：4H2)は、小野薬品工業株式会社から提供され、4日目から16日目まで4日ごとに抗PD-1抗体(100μg/マウス)をマウスの腹腔内に注射した。

3-4 免疫組織染色

マウス腫瘍を採取し10%ホルムアルデヒド溶液に浸し固定した。その後、筑波大学組織標本作製室にパラフィン切片作製およびHematoxylin-eosin(HE)染色を依頼した。パラフィン包埋後、3μmの切片に染色を施した。CD4、CD8、FoxP3の免疫染色のため、パラフィン切片からキシレンでパラフィンを除去し、クエン酸ナトリウム緩衝液(0.01Mクエン酸塩、0.5%Tween20、pH6.0)に浸し121°C20分間のオートクレーブで抗原賦活化を行った。その後、切片を10%ウシ血清アルブミン(Bovine serum albumin: BSA)を含むPBSで1時間、室温で反応させてブロッキングを行った後、ラット抗CD4抗体(4SM95, 1:500希釈; eBioscience, San Diego, CA, USA)、抗CD8抗体(4SM15, 1:500希釈;

eBioscience)、または抗 FoxP3 抗体(FJK-16s, 1:200 希釈 ; Invitrogen, Waltham, MA, USA)を 4°Cで一晩反応させた。次に、ビオチン化抗ラット IgG 抗体(1 : 500 ; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)と Vectastain ABC 試薬(Vector Laboratories)を室温でそれぞれ 60 分、30 分反応させ、DAB Peroxidase Substrate Kit(Vector Laboratories)を用いて発色した。アポトーシス細胞の検出には、パラフィン切片からキシレンでパラフィンを除去した後に、TumorTACS In Situ Apoptosis Detection Kit (Trevigen, Gaithersburg, MD, USA)を使用してアポトーシス細胞を染色した。ランダムに選択した 5 箇所を、光学顕微鏡 (AX80, Olympus, Tokyo, Japan)を用いて強視野(×400 倍)で観察して細胞数を計測した。

3-5 免疫細胞単離

腫瘍組織から細胞を分離するため、剪刀を用いて採取した腫瘍を細切し 2 mg/mL の粗コラゲナーゼ(富士フイルム和光)と 2 KU/mL のデオキシリボヌクレアーゼ I(Sigma, St. Louis, MI, USA)を含む DMEM に懸濁し、gentleMACS C Tube (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach Germany)に入れて gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) を用いて 1 分間破碎した。その後、懸濁液を 37°C で 30 分間静置し再度 gentleMACS Dissociator (Miltenyi Biotec) を用いて 1 分間破碎して懸濁液を調製した。局所リンパ節から細胞を分離するため、鼠径リン

パ節をシリンジの柄を用いて押しつぶして細胞の懸濁液を調整した。ヒト末梢血単核細胞(Peripheral Blood Mononuclear Cells: PBMC)の分離のために、患者の血液をフィコール試薬(密度 1.077 ; GE Healthcare, Chicago, IL, USA)に加え 2,000 rpm、20 分間、室温にて遠心分離した後に回収した。

3-6 フローサイトメトリー解析

分離した細胞を、5%BSA と 0.01%NaN₃ を含む PBS に懸濁し FcR Blocking Reagent(Miltenyi Biotec)を 10 分間 4°Cで反応させた後、細胞を各種抗体で染色した。以下の抗体は、BioLegend 社から購入した:抗 CD4(GK1.5)、抗 CD8 α (53-6.7)、抗 CD11b(M1/70)、抗 CD11c(N418)、抗 CD19(6D5)、抗 CD45.2(104)、抗 CD69(H1.2F3)、抗 CD80(16-10A1)、an-ti-CD86(GL-1)、抗 PD-L2(TY25)、抗 PD-1(29F.1 A12)、抗 I-A/I-E(2G9)、抗 CD38(90)、抗 TRAIL(tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand)(N2B2)、抗 TLR7(Rabbit polyclonal)、抗グランザイム B(QA16A02)、抗パーフォリン(S16009A)、抗 IFN- γ (XMG1.2)マウス細胞染色用 mAb ; 抗 CD3 ϵ (UCHT1)、抗 CD4(OKT4)、an-ti-CD8 α (RPA-T8)、抗 CD11c(3.9)、抗 CD19(HIB19)、抗 CD45(HI30)、抗 CD80(2D10)、抗 CD86(clone : IT2.2)、抗 PD-L2(MIH18)、抗 PD-L1(29E.2 A3)、抗 PD-1(EH12.2H7)、ヒト細胞染色用の抗 HLA-DR, DP, DQ(Tu39)mAb ;

およびマウスとヒト細胞の両方の染色用の an-ti-CD11b(M1/70)mAb。マウス細胞染色用の抗 CD3 ϵ (145-2C11)および抗 PD-L1(MIH5)mAb は、それぞれ eBioscience 社および BD Biosciences 社から購入した。死細胞は、7-AAD Viability Staining Solution(eBioscience 社)を用いて染色した。細胞質内の TLR7, グランザイム B, パーフォリンを染色する際には、死細胞の検出に Zombie Fixable Viability Kit(BioLegend, San Diego, CA, USA)を用いた。TLR7 については BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit(Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NZ, USA)を、グランザイム B および パーフォリンについては True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set(BioLegend)を用いて細胞を処理して染色した。IFN- γ 染色には 25 ng/mL PMA (富士フイルム和光)、1 μ g/mL イオノマイシン(富士フイルム和光)および 2.0 μ M モネンシン(BioLegend)を含む RPMI1640 培地(富士フイルム和光)を用いて調整した細胞を刺激した。死細胞の染色には、Zombie Fixable Viability Kit(BioLegend)を用いた。IFN- γ は、True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set(BioLegend)を用いて細胞を処理して染色した。フローサイトメトリーは Beckman Coulter Gallios 装置(Beckman Coulter, Brea, CA, USA)で行い、データは Kaluza Flow Analysis ソフトウェア(Beckman Coulter)を用いて解析した。

3-7 リアルタイム定量 polymerase chain reaction

回収した細胞を TRIzol(Thermo Fisher)で溶解し、プロトコールに従い全 RNA を抽出した後、High-capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)を用いて、一本鎖 cDNA を合成した。リアルタイム定量 polymerase chain reaction(PCR)は PrimeTime® Gene Expression Master Mix(Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA)と Prime Time qPCR predesigned primers(Integrated DNA Technologies)を用いて QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System(Applied Biosystems)にて行った。各遺伝子の mRNA レベルは、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)の mRNA レベルで補正した。プライマーは以下を用いた。 *Ccl2*: Mm.PT.58.42151692, *Tnf- α* : Mm.PT.58.12575861; *Il-2*: Mm.PT.58.11478202; *Il-6*: Mm.PT.58.10005566; *Il-15*: Mm.PT.58.28815139

3-8 フローサイトメトリーによるサイトカイン解析

脾臓細胞を培養した上清中のサイトカイン濃度は、プロトコールに従い Mouse T Helper Cytokine Panel(BioLegend)を用いて測定し、Biolegend LEGENDplex™ データ解析ソフトウェア(BioLegend)を用いて解析した。

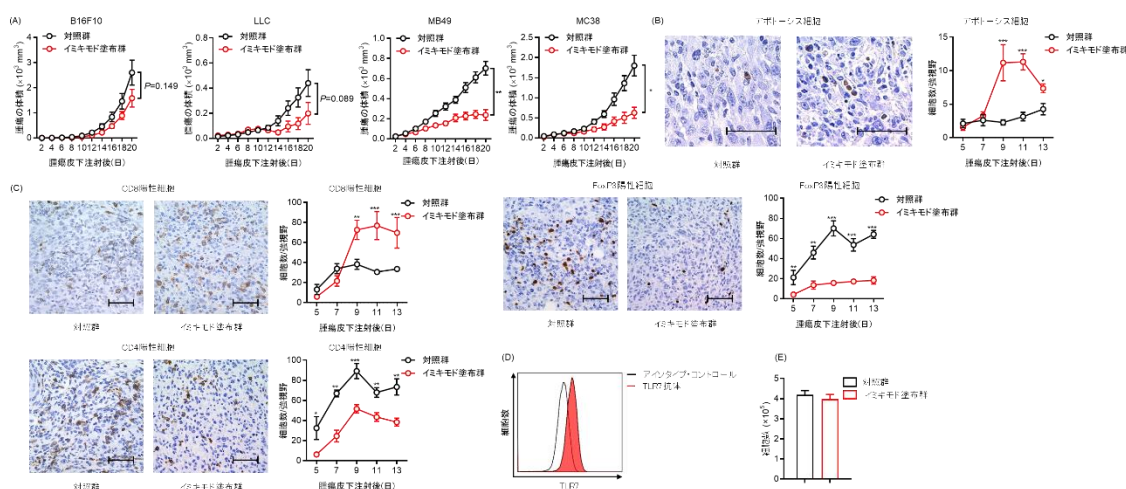
3-9 細胞傷害性試験

MC38 をカルセイン-AM 蛍光色素(Dojindo, Kumamoto, Japan)で標識しターゲット細胞とし、リンパ節から回収した細胞をエフェクター細胞とした。96 穴 V 底細胞培養プレート (Thermo Fisher)に 1.0×10^4 個のターゲット細胞と 1.28×10^6 個のエフェクター細胞を播種し、5%ウシ胎児血清を加えたカルシウムおよびマグネシウムを含まないハックス平衡塩溶液(富士フィルム Wako)を用いて 37°Cで 1.0 時間共培養した。50mM ホウ酸ナトリウムと 0.1% Triton X を加えた蒸留水を用いて、ターゲット細胞を全て溶解させて陽性対照群とし、標的細胞を単独で培養し陰性対照群とした。培養後に 4 °C、1,000 rpm、5 分間で遠心分離を行い、上清を回収して吸光度を Varioskan LUX(Thermo Fisher)を用いて測定した。以下の計算式から障害された細胞の割合を計算した。(実験群の吸光度-陰性対照群の吸光度)/(陽性対照群の吸光度-陰性対照群の) $\times 100$ 。

3-10 統計解析

統計学解析は、マウスを用いた実験では Mann-Whitney U 検定を使用し、ヒト PBMC を用いた実験では、ウイルコクソンの符号順位和検定を使用した。 $P < 0.05$ を有意差ありと判定し、Prism version 9 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)を用いて検定した。

結果



3-11 イミキモドはMC38に対する免疫反応を増強し、抗腫瘍効果を示す。

図1 イミキモドクリームはMC38に対する免疫反応を増強することで抗腫瘍効果を示す。

(A) 3×10^5 個のB16F10メラノーマ細胞、 1×10^6 個のLLC細胞、MB49膀胱がん細胞、または 2×10^6 個のMC38大腸がん細胞を野生型マウスの背部に皮下注射し腫瘍の体積を計測した。2日目から18日目まで1日おきに腫瘍を含む背部にイミキモドを塗布した($n=10$ [B16F10]、 6 [LLC、MB49、MC38])。

(B,C) 腫瘍を皮下注射して9日目のアポトーシスを起こした細胞(B)または免疫組織化学染色(C)の代表的な病理組織像を示す。また、各表示日における顕微鏡400倍(強視野)1視野あたりの腫瘍内の細胞数を計測した。マウス1匹あたりの組織からランダムに選択した5視野の平均値をプロットシテグラフ化した($n=6/5$ 日目と7日目の各群、 $n=7/9$ 日目、11日目、13日目の各群。スケールバーは $50 \mu\text{m}$ を示す)。

(D) 6穴細胞培養プレート内で培養したMC38におけるTLR7発現の代表的なフローサイトメトリーのヒストグラムを示す。

(E) 6穴細胞培養プレート内においてイミキモドを含む培地で3日間培養した後のMC38細胞の数を示す($n=6/各群$)。

エラーバーは $\pm 1\text{SEM}$ を表す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

イミキモドの抗腫瘍効果を検討するため、C57BL/6野生型マウスの背部にB16F10を皮下注射し、腫瘍の増殖に対するイミキモドの効果を調べた。B16F10に対するイミキモドの抗腫瘍効果を示した先行研究とは異なり[32, 38]、我々の実験ではイミキモドは腫瘍の成長を抑制しなかった(図1A)。また、LLCに対してもイミキモドは、腫瘍の成長を抑制する傾向が見られたものの有意な抑制効

果はなかった(図 1A)。B16F10 と LLC はともに免疫原性が低い腫瘍であることが知られている [39, 40]。一方、高い免疫原性を示す MB49 と MC38 に対しては、イミキモドは腫瘍の増殖を有意に抑制した [39-41](図 1A)。本研究ではイミキモドの抗腫瘍効果の機序を明らかにするため、抗腫瘍効果のみられた MC38 を用いて、さらなる解析を行った。アポトーシスを起こした腫瘍細胞と腫瘍内への T 細胞の浸潤を解析した結果、イミキモドによりアポトーシスを生じた腫瘍細胞の数が増加するとともに、腫瘍内の CD8 陽性 T 細胞が増加した(図 1B)。一方で、CD4 陽性 T 細胞と FoxP3 陽性制御性 T 細胞(Tregs)の数はイミキモドにより減少した(図 1C)。先行研究により TLR7 が一部の腫瘍細胞に発現しており、イミキモドが腫瘍細胞上の TLR7 に結合することで腫瘍細胞がアポトーシスを起こす事が示されている [16]。そこで MC38 における TLR7 の発現を解析したところ、MC38 にも TLR7 の発現がみられた(図 1D)。次に MC38 に対するイミキモドの直接的な細胞傷害性を検証するため、*in vitro* でイミキモドを添加した後、生存している MC38 細胞の数を計測した。その結果、MC38 の細胞数はイミキモドを添加して 3 日間培養しても対照群と差はみられず、イミキモドは MC38 の細胞増殖には直接影響を与えていないことが判明した(図 1E)。これらの結果から、イミキモドは腫瘍に対する免疫応答を増強することで抗腫瘍効果を示すことが示唆された。

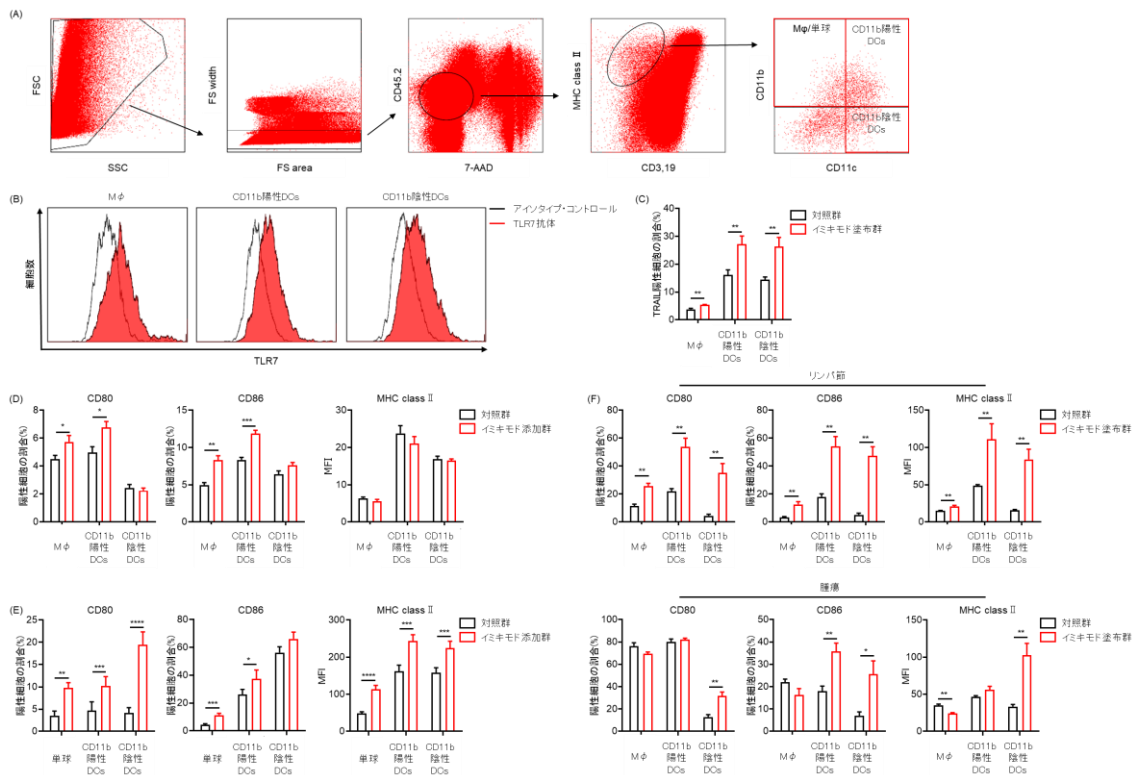


図2 イミキモドは骨髄球系細胞を活性化し、共刺激分子とMHCクラスIIの発現を増加させる。

(A) マウス脾臓細胞またはヒトPBMCのフローサイトメトリーにおけるゲーティング方法。回収した細胞はFSCとSSCを用いてダブルレットを除外した。死細胞を除外した後、CD45.2陽性細胞からCD3陰性CD19陰性MHCクラスII陽性細胞を選択し、これらの細胞をCD11bとCD11cの発現に基づいて、MHCクラスII陽性CD11b陽性CD11c陰性細胞(組織中のマクロファージ[Mφ]、ヒト血液中の単球)、MHCクラスII陽性CD11b陽性CD11c陽性細胞(CD11b陽性DCs)、MHCクラスII陽性CD11b陰性CD11c陽性細胞(CD11b陰性DCs)の3つの集団に分類した。

(B) マウスの脾臓におけるMφならびにCD11b陽性DCs、CD11b陰性DCsにおけるTLR7発現の代表的なフローサイトメトリーのヒストグラムを示す。

(C) 6穴培養プレート内でイミキモドを含んだ培地で24時間培養したマウスの脾臓細胞の骨髄球系細胞におけるTRAILをフローサイトメトリーで解析した($n=6$ /各群)。

(D,E) 6穴細胞培養プレート内で、イミキモドを含む培地で24時間刺激したマウスの脾臓細胞(D)およびヒトPBMC(E)の骨髄球系細胞におけるCD80、CD86、MHCクラスIIの発現をフローサイトメトリーで解析した($n=8$ /各群 [D]、 $n=18$ /各群 [E])。

(F) マウスに腫瘍を皮下注射し4日目にイミキモドを塗布し、腫瘍皮下注射5日後のリンパ節および腫瘍における骨髄球系細胞のCD80、CD86およびMHCクラスIIの発現をフローサイトメトリーで解析した($n=6$ /各群)。

Mφ: マクロファージ、DCs: 樹状細胞、PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells 末梢血単核細胞、TRAIL: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand 腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガ

ンド、FSC : forward scatter 前方散乱光、SSC : forward scatter 側方散乱光。

エラーバーは±1SEMを表す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

3-12 イミキモドは骨髄球系細胞を活性化し、骨髄球系細胞上の共刺激分子と MHC クラス II の発現が増加する。

これまでの研究で、TLR 7 アゴニストが骨髄球系細胞を活性化することが報告されていたため[42-44]、骨髄球系細胞における TLR 7 の発現を解析した。骨髄球系細胞を MHC クラス II 陽性 CD11b 陽性 CD11c 陰性細胞(マクロファージ: M ϕ またはヒト血液中の単球)、MHC クラス II 陽性 CD11b 陽性 CD11c 陽性細胞(CD11b 陽性樹状細胞 [Dendritic cells: DCs])、MHC クラス II 陽性 CD11b 陰性 CD11c 陽性細胞(CD11b 陰性 DCs)の3つの集団に分類し解析したところ(図 2A)、マウスの脾臓に含まれる3つの集団全てにおいて TLR 7 が発現していることを確認した(図 2B)。次に、*in vitro* においてイミキモドで刺激後の骨髄球系細胞における腫瘍細胞のアポトーシスを引き起こす TRAIL の発現を解析したところ、すべての骨髄系細胞集団における TRAIL の発現は有意に増加していた(図 2C)。さらに、活性化マーカーとして知られる CD80, CD86, MHC クラス II の発現を *in vitro* において解析した結果、マウスの脾臓に含まれる M ϕ および CD11b 陽性 DCs における CD80 および CD86 の発現は、イミキモドの刺激によって有意に増加したが、MHC クラス II の発現は同等であった(図 2D)。また、ヒト PBMC におけるこれらの分子の発現を解析したところ、全て

の集団における CD80 と MHC クラス II の発現、および単球と CD11b 陽性 DC における CD86 の発現が、イミキモドの刺激によって増加した(図 2E)。生体におけるイミキモドの効果を検討するため、マウスに MC38 細胞を皮下注射した後にイミキモドクリームを塗布し、リンパ節および腫瘍内の骨髓球系細胞における活性化マーカーの発現を解析した。その結果、イミキモドクリームの塗布によりリンパ節における全ての集団で CD80, CD86, MHC クラス II の発現が有意に増加した(図 2F)。さらに、CD11b 陰性 DCs における CD80 の発現、CD11b 陽性 DCs および CD11b 陰性 DCs における CD86 の発現、M ϕ および腫瘍内の CD11b 陰性 DCs における MHC クラス II の発現が、イミキモドにより有意に増加した(図 2F)。これらの結果から、イミキモドが骨髓球系細胞を活性化し、共刺激分子や MHC クラス II の発現を上昇させることが示唆された。

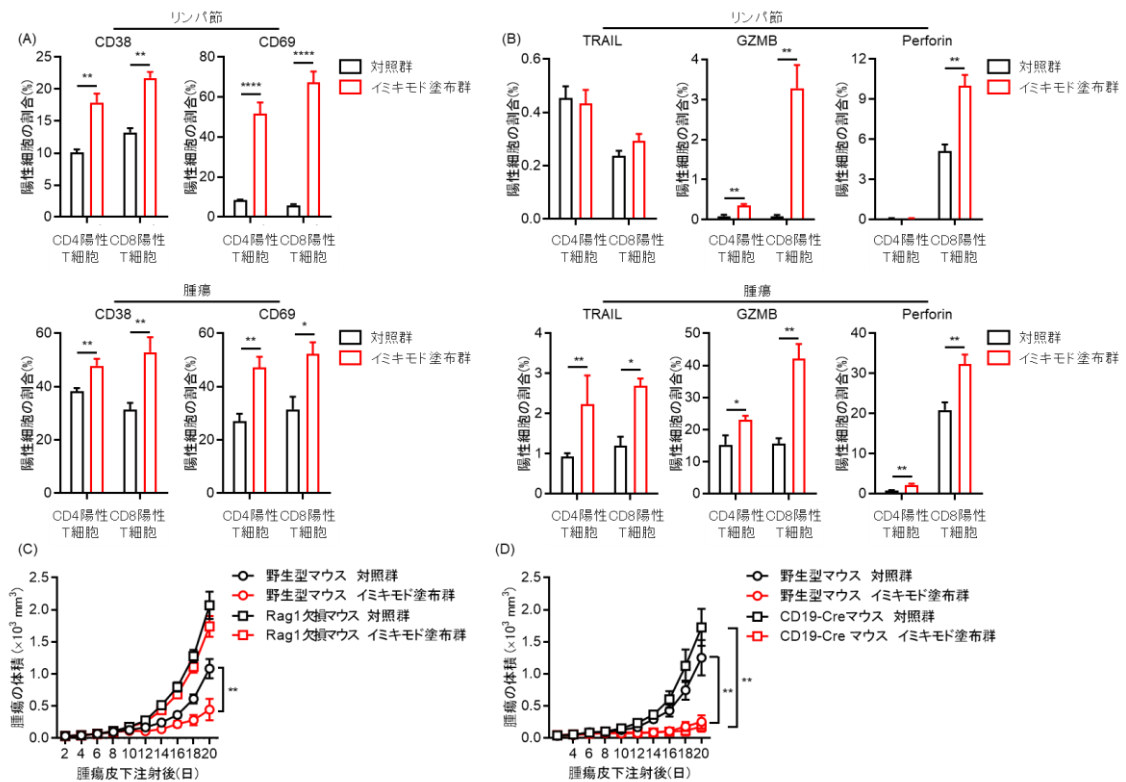


図3 イミキモドの抗腫瘍効果は獲得免疫に依存する。

(A,B)腫瘍を皮下注射して4日目にイミキモドを塗布し、腫瘍皮下注射5日目(CD69)または7日目(CD38、TRAIL、GZMB、perforin)のリンパ節および腫瘍におけるCD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞におけるCD38、CD69(A)、TRAIL、GZMB、perforin(B)の発現をフローサイトメトリーで解析した($n=12$ [CD69]/各群または $n=6$ [CD38、TRAIL、GZMB、perforin]/各群)。

(C,D) Rag1欠損マウス(B)またはCD19-Creトランスジェニックマウス(C)の背部に 2×10^6 個のMC38大腸がん細胞を皮下注射し、イミキモドを塗布し腫瘍の体積を計測した。 $(n=11$ イミキモドを塗布したRag1欠損マウス、 $n=12$ 対照群のRag1欠損マウス、イミキモドを塗布または対照群のCD19-Creトランスジェニックマウス)。

TRAIL: 腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド、GZMB: グランザイムB。

エラーバーは ± 1 SEMを表す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$

3-13 イミキモドの抗腫瘍効果はT細胞に依存している。

イミキモドはT細胞の活性化に重要な役割を果たす骨髄球系細胞の共刺激分子の発現を増加させることから[45]、担がんモデルマウスにおいてイミキモドを塗布し、T細胞の活性化を解析した。その結果、リンパ節および腫瘍内のCD4

陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞において、T 細胞の活性化マーカーである CD38 および CD69 の発現が、イミキモドの塗布により有意に増加した(図 3A)。

さらに、イミキモドは腫瘍内の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞において、TRAIL、グランザイム B、およびパーフォリンの発現も促進した(図 3B)。

また、イミキモドはリンパ節の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞のグランザイム B の発現を、CD8 陽性 T 細胞のパーフォリンの発現を増加させた(図 3B)。これらの結果からイミキモドの塗布により活性化された骨髄球系細胞が、T 細胞の活性化を介して抗腫瘍効果を示すと考えられた。イミキモドの抗腫瘍効果における獲得免疫の役割を明らかにするため、T 細胞と B 細胞を欠損した Rag1 欠損マウスでイミキモドによる抗腫瘍効果を解析した。その結果、Rag1 欠損マウスにおいてイミキモドの塗布は腫瘍の成長を抑制せず(図 3C)、イミキモドの抗腫瘍効果が獲得免疫に依存していることが示された。次に、B 細胞の活性化が著しく損なわれている CD19-Cre トランスジェニックマウス[46]を用いてイミキモドの抗腫瘍効果を検討した。その結果、CD19-Cre トランスジェニックマウスにおける抗腫瘍効果は、野生型マウスと同等であった(図 3D)。これらの結果はイミキモドによる抗腫瘍効果に T 細胞が主要な役割を果たしていることを示していた。

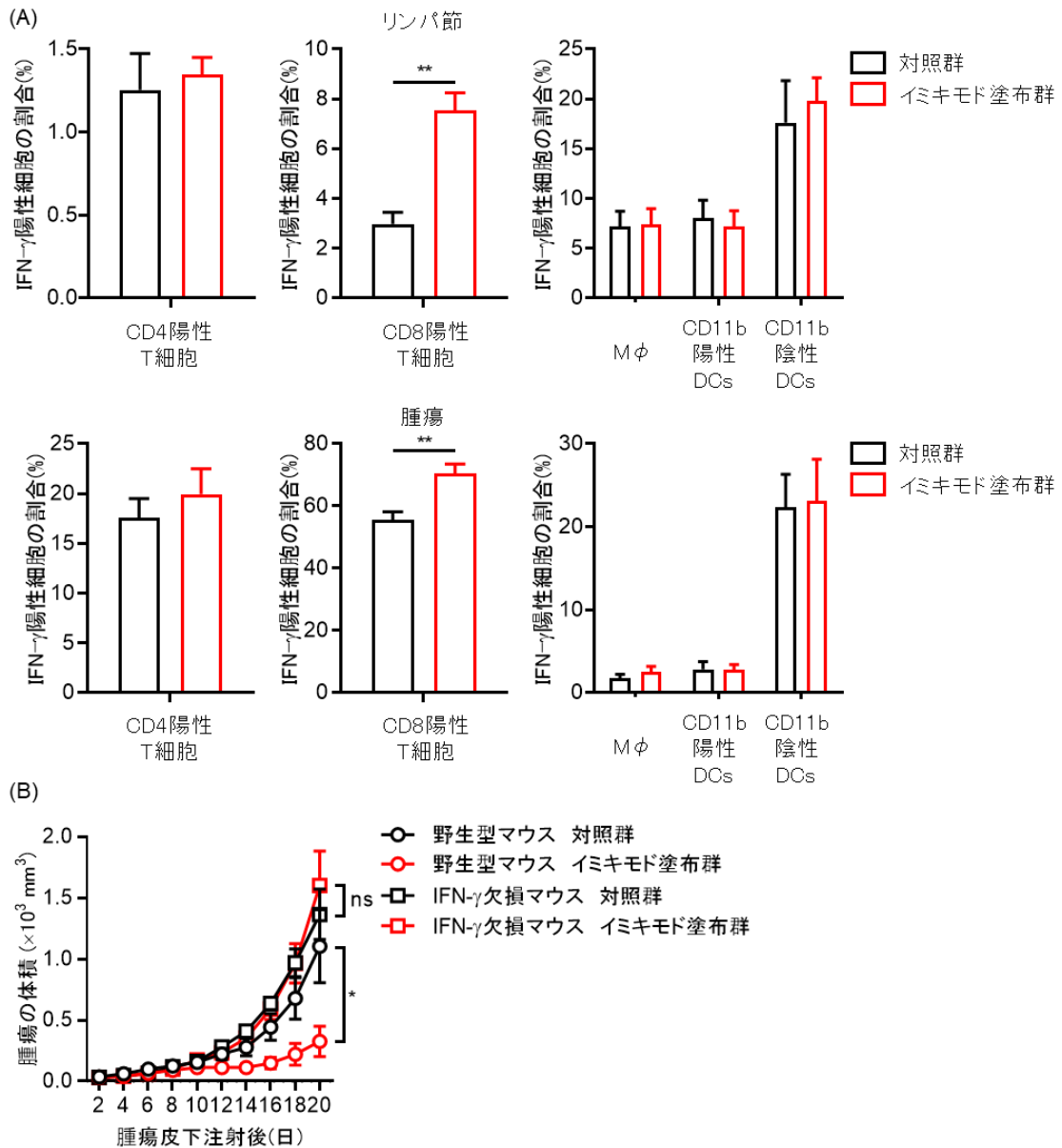


図4 イミキモドの抗腫瘍効果はIFN- γ に依存する。

(A) 腫瘍を皮下注射してから7日目にイミキモドを塗布し、腫瘍皮下注射8日目のリンパ節および腫瘍におけるCD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、M ϕ 、CD11b陽性DC、およびCD11b陰性DCにおけるIFN- γ の発現をフローサイトメトリーで解析した($n=5$ /各群)。

(B) 2×10^6 個のMC38大腸がん細胞を野生型またはIFN- γ 欠損マウスの背部に皮下注射し、イミキモドを塗布し腫瘍の体積を計測した($n=8$ /各群)。

M ϕ :マクロファージ、DCs:樹状細胞、IFN- γ :インターフェロン γ 、ns: not significant 有意差なし。エラーバーは ± 1 SEMを示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3-14 イミキモドの抗腫瘍効果は IFN- γ の発現増加に依存している。

IFN- γ は強い抗腫瘍効果を発揮することから[47]、担がんモデルマウスを用いてイミキモドを塗布した後の IFN- γ 発現を解析した。その結果、イミキモドの塗布によりリンパ節と腫瘍ともに、CD8 陽性 T 細胞における IFN- γ の発現が有意に増加したが、CD4 陽性 T 細胞、M ϕ 、DC を含む他の免疫細胞の IFN- γ の発現には有意な差はみられなかった(図 4A)。イミキモドの抗腫瘍効果における IFN- γ の影響を調べるため、IFN- γ 欠損マウスを用いて実験を行った。その結果、IFN- γ 欠損マウスではイミキモドによる抗腫瘍効果が見られず(図 4B)、IFN- γ がイミキモドの抗腫瘍効果に重要であることが示された。

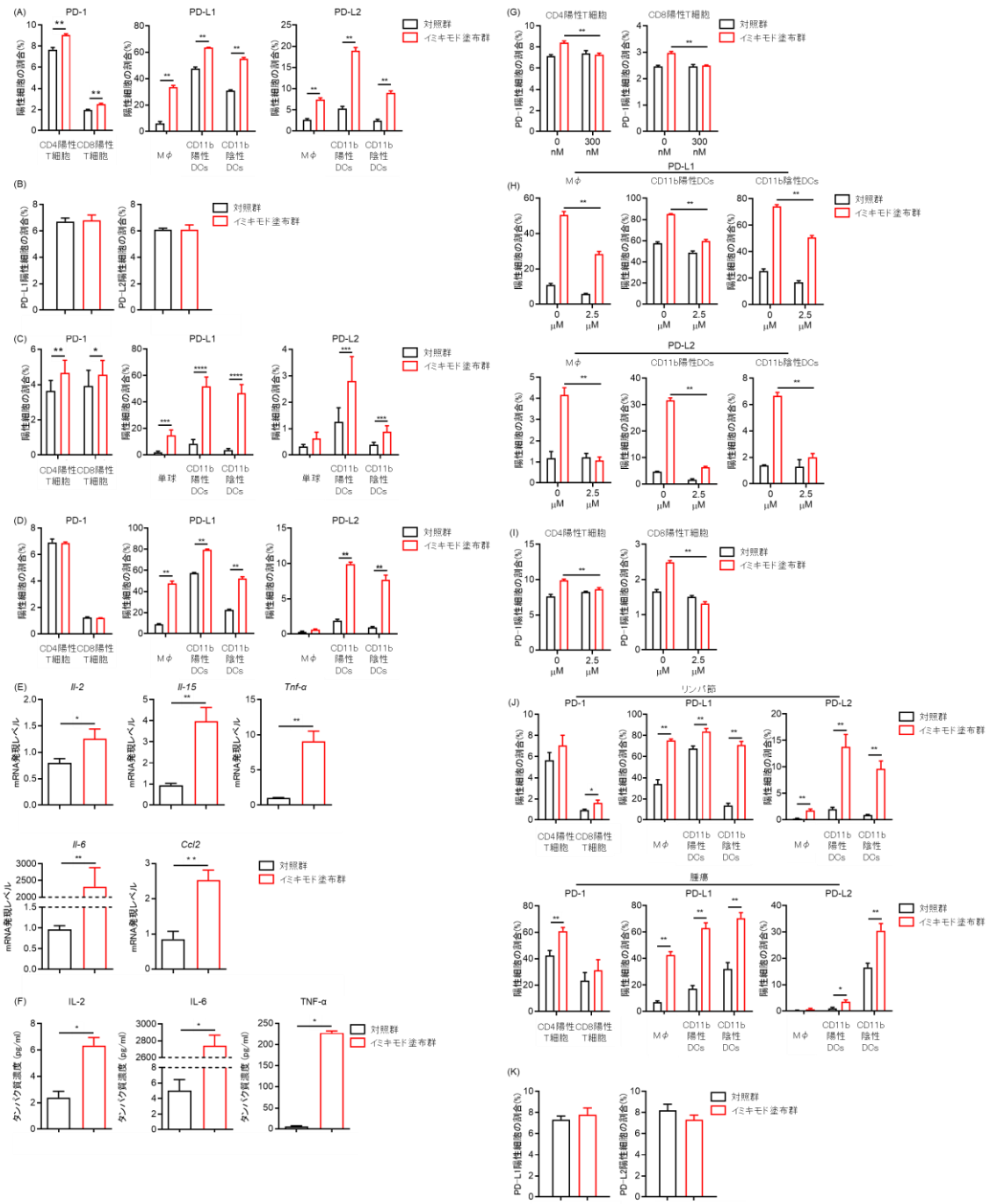


図5 イミキモドは免疫細胞におけるPD-1,PD-L1/PD-L2の発現を増加させる。

(A) 6穴培養プレート内でイミキモドを含んだ培地で24時間培養したマウスの脾臓細胞のCD4陽性T細胞およびCD8陽性T細胞におけるPD-1の発現、ならびに骨髓球系細胞におけるPD-L1およびPD-L2の発現をフローサイトメトリーで解析した ($n=6$ /各群)。

(B) 6穴細胞培養プレート内で、イミキモドを含む培地で24時間刺激したMC38におけるPD-L1およびPD-L2の発現をフローサイトメトリーで解析した ($n=3$ /各群)。

(C,D) 6穴培養プレート内でイミキモドを含んだ培地で24時間 (C) または6時間 (D) 培養したマウス

の脾臓細胞 (C) およびヒト PBMC (D) の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞における PD-1 の発現、ならびに骨髄球系細胞における PD-L1 および PD-L2 の発現をフローサイトメトリーで解析した ($n=6$ /各群 [C]、 $n=18$ /各群 [D])。

(E) 6 穴培養プレート内でイミキモドを含んだ培地で 6 時間培養したマウス脾臓細胞におけるサイトカイン遺伝子の発現を rt-PCR で解析した ($n=6$ /各群)。

(F) 6 穴培養プレート内でイミキモドを含んだ培地でマウス脾臓細胞を 24 時間培養した上清中のサイトカイン濃度 ($n=4$ /各群)。

(G) 300 μ M のトファシチニブを添加しイミキモドを含む培地で 24 時間培養した CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞における PD-1 の発現をフローサイトメトリーで解析した ($n=6$ /各群)。

(H,I) 2.5 μ M の BMS-345541 を添加しイミキモドを含む培地で 24 時間培養した骨髄球系細胞における PD-L1 および PD-L2 の発現(H)、ならびに CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞における PD-1 の発現(I)をフローサイトメトリーで解析した($n=6$ /各群)。

(J) 腫瘍細胞を皮下注射して 4 日目にイミキモドを塗布し、腫瘍皮下注射して 5 日後のリンパ節および腫瘍の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞における PD-1 の発現、ならびに骨髄球系細胞における PD-L1 および PD-L2 の発現をフローサイトメトリーで解析した ($n=6$ /各群)。

(K) マウスに MC38 を皮下注射してから 4 日目にイミキモドを塗布し、腫瘍皮下注射 5 日後の腫瘍における MC38 の PD-L1 および PD-L2 の発現をフローサイトメトリーで解析した ($n=6$ /PD-L1 を解析した各群、 $n=5$ /PD-L2 を解析した各群)。

M ϕ : マクロファージ、DCs : 樹状細胞。

エラーバーは ± 1 SEM を表す。; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

3-15 イミキモドは免疫細胞の PD-1,PD-L1/PD-L2 の発現を増加させる。

次に *in vitro* においてイミキモドで刺激した際の、マウスの脾臓に含まれる T 細胞の PD-1 および骨髄球系細胞の PD-L1/PD-L2 の発現の変化を解析した。

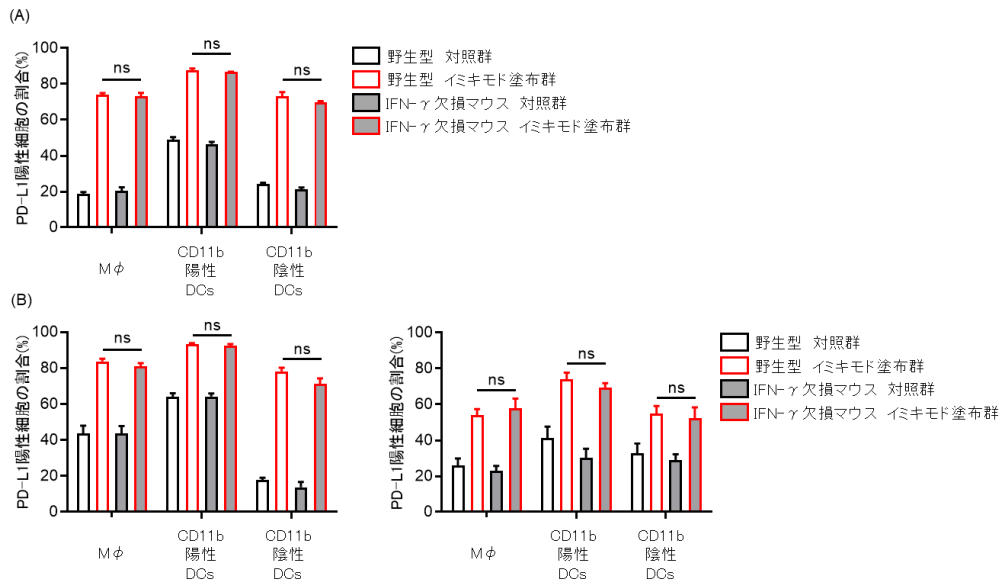
イミキモドで 24 時間刺激後の発現を解析すると、CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の PD-1 と、全ての骨髄球系細胞集団における PD-L1/PD-L2 の発現が増加していた(図 5A)。一方、MC38 細胞における PD-L1/PD-L2 の発現は、*in vitro* においてイミキモドで刺激しても変化しなかった(図 5B)。イミキモドで 24 時間刺激後のヒト PBMC の PD-1 および PD-L1/PD-L2 の発現変化を解析

したところ、同様に CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞における PD-1、全ての骨髄球系細胞集団における PD-L1 の発現、および CD11b 陽性 DCs および CD11b 陰性 DCs における PD-L2 の発現が上昇した(図 5C)。次にイミキモドで 6 時間刺激した後のマウス脾臓細胞における PD-1 および PD-L1/PD-L2 の発現を解析した。その結果、T 細胞における PD-1 の発現は刺激後 6 時間経過しても増加していなかったが、すべての骨髄球系細胞集団における PD-L1、CD11b 陽性 DC および CD11b 陰性 DC における PD-L2 の発現はすでに増加していた(図 5D)。骨髄球系細胞と比較して T 細胞は TLR 7 の発現が乏しいことが知られている[48, 49]。そのため、イミキモドにより引き起こされた T 細胞上の PD-1 の発現上昇は、イミキモドが T 細胞に直接作用したのではなく、イミキモドが骨髄球系細胞などを活性化させ、骨髄球系細胞におけるサイトカインの産生が亢進した結果であると仮説を立てた。この仮説を検証するため、脾臓細胞を *in vitro* においてイミキモドで刺激し、各種サイトカインの遺伝子発現を解析した。その結果、イミキモドの刺激 6 時間後には、脾臓細胞における *Il2*、*Il15*、*TNF α* 、*Il6*、*Ccl2* の mRNA の発現が増加していた(図 5E)。また、イミキモドで刺激し 24 時間後の培養上清中の IL-2, IL-6, TNF- α の濃度も有意に上昇していた(図 5F)。さらに、イミキモドによる T 細胞の PD-1 の発現増加は、JAK 阻害剤であるトファシチニブによって消失したことから(図 5G)、イミキモ

ドによる T 細胞の PD-1 の発現増加には IL-2 や IL-15 などの JAK シグナルを活性化するサイトカインが関与していることが示唆された。

NF- κ B はサイトカインや TLR のシグナルを伝達する重要な分子である。そのため、イミキモドによる PD-1 および PD-L1/PD-L2 の発現上昇における NF- κ B の役割を明らかにするため、I κ B キナーゼの阻害剤である BMS-345541 を用いた。イミキモドで刺激して 24 時間後に解析したところ、BMS-345541 は全ての骨髄球系細胞集団における PD-L1/PD-L2 発現の上昇を有意に抑制した(図 5H)。このことから、骨髄系球細胞におけるイミキモドによる PD-L1/PD-L2 発現の上昇は、NF- κ B シグナルに大きく依存していることが示唆された。また、イミキモドによる刺激から 24 時間後の T 細胞における PD-1 の発現上昇が、BMS-345541 によって有意に抑制された (図 5I)。したがって、BMS-345541 は他の免疫細胞からのサイトカイン産生を抑制することで、イミキモド刺激で生じた T 細胞の PD-1 発現上昇を抑制することが示唆された。以上の結果から、イミキモドによる PD-1 および PD-L1/PD-L2 の発現増加には、NF- κ B が重要な役割を果たしていることが明らかになった。次に、担がんモデルマウスにおいて、イミキモドによる PD-1 および PD-L1/PD-L2 の発現を解析した。 *in vitro* の結果と同様に、イミキモドクリームの塗布は、リンパ節および腫瘍中の CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞において、PD-1 の発現を有意に増加させた

(図 5J)。さらに、リンパ節と腫瘍ともに、多くの骨髄球系細胞集団において PD-L1/PD-L2 の発現が有意に上昇した(図 5J)。一方、MC38 細胞における PD-L1/PD-L2 の発現は変化しなかった(図 5K)。これらの結果を統合すると、イミキモドは *in vitro* および *in vivo* ともに免疫細胞の PD-1 および PD-L1/PD-L2 の発現を増加させることが示唆された。



3-16 IFN- γ はイミキモドによる PD-L1 発現増加に関与していない。

IFN- γ は PD-L1 の発現を増加させる最も重要な因子と報告されている [50, 51]。そこで、*in vitro* においてイミキモドで刺激したマウス脾臓の骨髄球系細胞における PD-L1 の発現を解析したところ、野生型マウスと IFN- γ 欠損マウスで有意な差はみられなかった(図 6A)。同様に、イミキモドを塗布した担がんモデルマウスのリンパ節と腫瘍中の骨髄系球細胞における PD-L1 の発現量も、野生型マウスと IFN- γ 欠損マウスで有意な差はみられなかった(図 6B)。これらの結果から、イミキモドによる PD-L1 の発現増加に IFN- γ が関与していないことが示唆された。

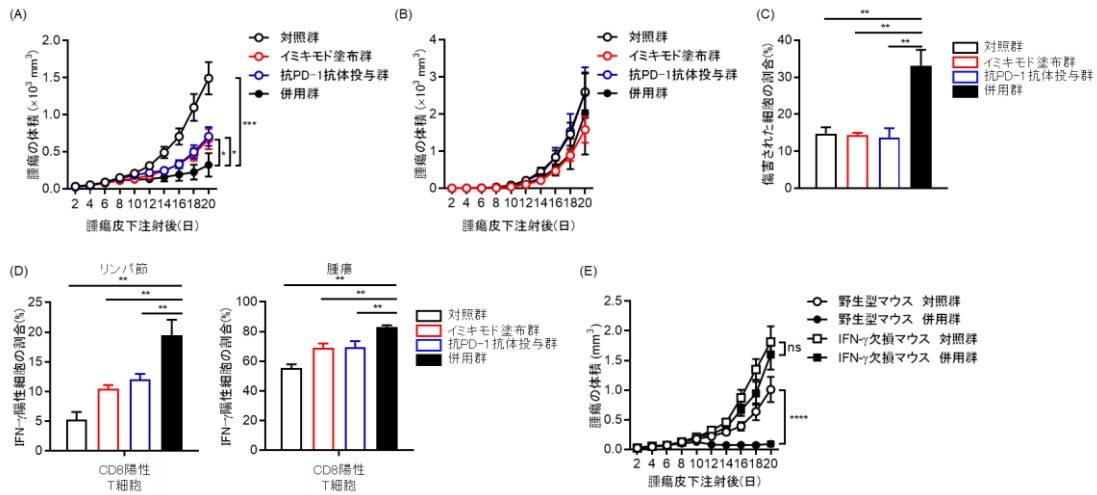


図7 MC38 に対しイミキモドクリームと抗 PD-1 抗体の併用療法は、各々の単剤療法と比べて顕著な抗腫瘍効果を示す。

(A,B) 2×10^6 個の MC38 大腸がん細胞(A)、および 3×10^5 個の B16F10(B)を野生型マウスの背部に皮下注射し、対照群、イミキモド塗布群、抗 PD-1 抗体投与群、イミキモドと抗 PD-1 抗体を併用した群の 4 群に分けて腫瘍の体積を計測した ($n=12$ /各群[A], $n=11$ /対照群, $n=12$ /イミキモド塗布群, $n=6$ /抗 PD-1 抗体投与群および併用群[B])。

(C) 野生型マウスに MC38 大腸がん細胞を皮下注射し、対照群、イミキモド塗布群、抗 PD-1 抗体投与群、イミキモドと抗 PD-1 抗体を併用した群の 4 群に分けて治療し、腫瘍皮下注射 9 日目にリンパ節から回収した細胞の MC38 大腸がん細胞に対する細胞傷害性を解析した ($n=6$ /各群)。

(D) 野生型マウスに MC38 大腸がん細胞を皮下注射し、対照群、イミキモド塗布群、抗 PD-1 抗体投与群、イミキモドと抗 PD-1 抗体を併用した群の 4 群に分け、腫瘍皮下注射 8 日目にイミキモドの塗布と抗 PD-1 抗体の投与を行い、2 日後にリンパ節および腫瘍における CD8 陽性 T 細胞の IFN- γ の発現をフローサイトメトリーで解析した ($n=5$ /各群)。

(E) 2×10^6 個の MC38 大腸がん細胞を野生型マウスまたは IFN- γ 欠損マウスの背部に皮下注射し、対照群とイミキモドと抗 PD-1 抗体を併用した群の 2 群に分けて腫瘍の体積を計測した。($n=11$ 野生型マウス対照群, $n=10$ 野生型マウスの併用群, $n=10$ IFN- γ 欠損マウス対照群および併用群)。

IFN- γ : インターフェロン γ 、ns : not significant 有意差なし。

エラーバーは ± 1 SEM を表す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

3-17 イミキモドクリームと抗 PD-1 抗体の併用療法は、各々の単剤療法と比

べて顕著な抗腫瘍効果を示す。

これまでの実験結果から、イミキモドは *in vitro* および *in vivo* において、T 細

胞の PD-1 および骨髄球系細胞の PD-L1/PD-L2 の発現を増加させることが明らかとなり、イミキモドが T 細胞の活性化だけでなく、T 細胞の免疫寛容を誘導し、イミキモドによる抗腫瘍効果を潜在的に減弱させている可能性が示唆された。そのため、イミキモドと抗 PD-1 抗体の併用療法により抗腫瘍効果が増強されるか検討しところ、イミキモドと抗 PD-1 抗体の併用療法は、それぞれの単剤療法と比較して MC38 の腫瘍増殖を有意に抑制した(図 7A)。しかしながら B16F10 には抗 PD-1 抗体の単剤療法も併用療法も有効ではなかった(図 7B)。さらに、併用療法はそれぞれの単剤療法および無治療と比較して、リンパ球における MC38 に対する細胞傷害活性を増強させた(図 7C)。IFN- γ の発現を検討した結果、イミキモド外用や抗 PD-1 抗体単剤療法群と比較し併用療法群では、リンパ節と腫瘍内ともに CD8 陽性 T 細胞における IFN- γ の発現が有意に増加していた(図 7D)。一方、IFN- γ 欠損マウスでは、併用療法の抗腫瘍効果が消失したことから、イミキモドの外用と抗 PD-1 抗体療法はともに、その抗腫瘍効果が IFN- γ に依存していることが示された(図 7E)。これらの結果から、イミキモドと抗 PD-1 抗体の併用療法は、IFN- γ 産生の増大を介して強い抗腫瘍効果を示すことが示唆された。

4 考察

今回の研究では、イミキモドの塗布は B16F10 や LLC に対して有意な抗腫瘍効果を示さなかった一方で、MB49 および MC38 の腫瘍増殖を有意に抑制した。MB49 および MC38 はともに高い免疫原性を示すことが報告されているのに対し、B16F10 および LLC は免疫原性が低い腫瘍であることが知られている[39-41]。したがって、イミキモドの塗布による抗腫瘍効果は、腫瘍細胞に対する免疫反応の強さに依存していると考えられる。イミキモドの塗布により B16F10 に対する有意な抗腫瘍効果が示した報告もある一方で[32, 38]、我々の研究と同様に、イミキモドに対する B16F10 の抗腫瘍効果は乏しいことを示した報告もある[52, 53]。このような研究結果の差異は、各研究で使用した腫瘍細胞数、塗布したイミキモドの一回量や塗布回数など、実験手法の差異に起因するのではないかと考えられる。一方で、腫瘍細胞株とヒトの腫瘍検体では、遺伝子変異および転写プロファイルが異なるため、腫瘍細胞株が必ずしもヒトの腫瘍細胞を再現しているとは限らない[54]。メラノーマ細胞株の中には、ヒトのメラノーマと類似した遺伝子発現パターンを示すものもあるが、免疫機能の制御に関連する多くの遺伝子の発現が著しく異なることが示されている[54]。さらに、ヒトのメラノーマの免疫原性も、それぞれの症例で大きく異なっている[55]。Superficial Spreading Melanoma は、Acral Lentiginous Melanoma や Mucosal Melanoma よ

りも有意に高い免疫原性を示しており、これは遺伝子異常の蓄積を示す mutational burden と関連していると考えられている [56, 57]。したがって、今回の研究ではイミキモドの塗布は B16F10 の腫瘍増殖を抑制しなかったものの、免疫原性が高いタイプのヒトのメラノーマに対しては抗腫瘍効果を有する可能性があると考えられる。

TLR 7/8 リガンドによって誘導される抗腫瘍効果の詳細な機序は十分に解明されていないが、これまで動物およびヒトを対象とした研究では、TLR 7/8 リガンドによって産生される様々なサイトカインがその効果に関与していることが示唆されている [25, 26, 28, 29]。Aspord らは、ヒト化モデルマウスにおいて、イミキモドが I 型 IFN に関連する遺伝子群の発現の亢進を介してメラノーマ細胞株の増殖を抑制することを報告した [28]。Wang らは、TLR7 リガンドの 1 つである loxoribine が、DC からの IL-6 産生を増加させることで制御性 T 細胞の機能を抑制し抗腫瘍効果を有するのではないかと推察している [29]。Huang らはヒトの有棘細胞癌にイミキモドを使用し腫瘍内の T 細胞を解析したところ、イミキモドを投与した腫瘍内に浸潤した T 細胞は、イミキモドを使用していない腫瘍に浸潤した T 細胞と比較して IFN- γ 、グランザイム、パーフォリンを多く産生することを報告している [26]。また、Singh らは B16F10 メラノーマ細胞を用いたモデルマウスにおいて、TLR 7/8 アゴニストである 3M-052 を腫瘍内

に投与することで腫瘍の増殖が抑制されることを報告した[25]。彼らのモデルでは、3M-052 によって生じた腫瘍内の CCL2 の産生亢進が抗腫瘍効果に重要である一方で、I 型 IFN と IFN- γ はいずれも抗腫瘍効果には寄与しなかった[25]。Wu らは、TRAIL の発現上昇がイミキモドによる抗腫瘍効果に関与している可能性を報告している[30]。このように、TLR 7/8 アゴニストにおける抗腫瘍効果において、どの因子が重要であるかは各研究の手法に依存すると考えられる。

今回の研究では、Rag1 欠損マウスではイミキモドの塗布で腫瘍の増殖を抑制できなかったことから、イミキモドによる抗腫瘍効果は獲得免疫に依存していることが示唆された。一方、CD19-Cre トランスジェニックマウスでは、イミキモドによる抗腫瘍効果は野生型マウスと同程度であったことから、イミキモドの抗腫瘍効果に T 細胞が重要な役割を果たしていると考えられる。さらに、今回の研究では抗腫瘍効果が IFN- γ に依存することも示された。IFN- γ は細胞性免疫を司るサイトカインであり、抗腫瘍免疫においても重要な役割を果たしていることが知られている[58, 59]。IFN- γ は CD8 陽性 T 細胞を活性化させ腫瘍細胞のアポトーシスを促進するだけでなく、樹状細胞などの抗原提示細胞を活性化する[59]。我々の研究では、担がんモデルマウスにおいてイミキモドを塗布すると、リンパ節および腫瘍中の CD8 陽性 T 細胞における IFN- γ の発現が有

意に増加したが、CD4 陽性 T 細胞、マクロファージ、DC などの他の免疫細胞では IFN- γ の発現は変化しなかった。これらの結果は、CD8 陽性 T 細胞が産生する IFN- γ が、イミキモドの抗腫瘍効果に重要な役割を果たしていると考えられた。

PD-1 シグナルは T 細胞の免疫寛容を誘導するが、PD-1 とそのリガンドである PD-L1 および PD-L2 の発現が亢進している症例では、抗 PD-1 抗体療法の反応性が高く、予後が良好であると示されている [60, 61]。一方で、様々な炎症性サイトカインが PD-L1 および PD-L2 の発現が亢進させることが知られている [62-64]。Meier らは、HIV 由来の TLR 7/8 リガンドがヒト DCs および単球における PD-L1 の発現を増加させることを明らかにした [65]。我々の研究では、イミキモドはマウス脾臓の骨髄球系細胞およびヒト PBMC において、PD-L1 および PD-L2 の発現も有意に増加させた。このマウス脾臓の骨髄球系細胞における PD-L1/PD-L2 の発現上昇は、イミキモドによる刺激後、比較的短時間 (6 時間後) にすでに観察された。このことは TLR7 の下流に連なるシグナルが直接 PD-L1/PD-L2 の発現を上昇させていると考えられる。NF- κ B は TLR 7 のシグナル伝達における主要な分子であり、我々は NF- κ B を阻害することでイミキモドによる PD-L1/PD-L2 の発現増加が抑制されることを示した。これまでの報告では、NF- κ B の活性化が PD-L1/PD-L2 の発現を亢進させることが示さ

れているため[64, 66, 67]、イミキモドによる PD-L1/PD-L2 の発現増加には、NF- κ B を介したシグナル伝達が重要な役割を果たしていると考えられる。IFN- γ は PD-L1 の発現を強く亢進させるサイトカインとしてよく知られているが[51]、*in vitro* および *in vivo* の実験において、イミキモドで刺激した後の骨髄球系細胞における PD-L1 の発現は、野生型マウスと IFN- γ 欠損マウスの間で同等であった。したがって、今回の研究では、イミキモドにより IFN- γ の産生は亢進するものの、イミキモドによる骨髄球系細胞の PD-L1 発現の増加には IFN- γ は関与しないことが明らかになった。

T 細胞受容体を介した活性化に伴い、T 細胞における PD-1 の発現が増加することが知られている[68, 69]。これまでの研究により、骨髄球系細胞や B 細胞で産生される IL-2 や IL-15 など、受容体の一部が common γ -chain で構成されるサイトカインも、T 細胞の PD-1 発現を上昇させることが報告されている[68]。我々の研究では *in vitro* の実験において、T 細胞の PD-1 の発現は、イミキモドによる刺激 6 時間後には増加しなかったが、24 時間後には増加していた。一方でサイトカインに関しては、イミキモドによる刺激 6 時間後に脾臓細胞における IL2 や IL15 などの mRNA の発現が増加し、刺激 24 時間後の培養上清中の IL-2 の濃度が増加していた。さらに、JAK 阻害剤によってイミキモドによる T 細胞の PD-1 の発現増加が抑制された。JAK は common γ -chain を持つサイトカ

イン受容体のシグナル伝達に必須であることから、IL-2 や IL-15 などの受容体の一部が common γ -chain で構成されるサイトカイン産生の増加が、イミキモドによる T 細胞の PD-1 発現増加の一因と考えられる。

本研究では、イミキモドと抗 PD-1 抗体の併用療法が顕著な抗腫瘍効果を示した。この効果は、イミキモドと抗 PD-1 抗体による相加効果ではなく、イミキモドと抗 PD-1 抗体によって活性化された自然免疫と適応免疫の相乗効果によるものであると考えられる。イミキモドが PD-1, PD-L1/PD-L2 の発現を有意に上昇させ、イミキモドによる抗腫瘍効果を減弱させている可能性を考慮すると、抗 PD-1 抗体を用いてイミキモドにより増加した PD-1 シグナルを阻害することが、本研究でみられた併用療法の顕著な抗腫瘍効果に寄与している可能性がある。本研究の結果から、イミキモドクリーム塗布と抗 PD-1 抗体の併用療法はメラノーマを含めた皮膚癌の切除不能の原発病変や ITM、および様々ながんの皮膚転移に対して有望な治療であると考えられた。

5 省略語

BSA	Bovine serum albumin
DC	Dendritic cell
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMQ	Imiquimod
ITM	In-transit metastasis
LN	Lymph node
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
M ϕ	Macrophage
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PD-1	Programmed death-1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PD-L2	Programmed death-ligand 2
qRT-PCR	Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

TLR	Toll-like receptor
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
MFI	Mean Fluorescence Intensity
MHC	Major histocompatibility complex
SPF	Specific pathogen free

6 謝辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、多くのご指導とご支援を承りました乃村俊史教授、藤澤康弘准教授、中村貴之病院講師(筑波大学医学医療系皮膚科)、藤本学教授(大阪大学大学院医学系研究科皮膚科)に心より感謝申し上げます。

また、本研究をサポートしていただきました筑波大学皮膚科技術職員の廣田ゆり子さんに心より感謝申し上げます。

最後に、討論を通じて貴重なご意見、ご支援を頂戴いたしました筑波大学皮膚科の皆様心より感謝申し上げます。

7 出典

本学位論文では Combination Treatment of Topical Imiquimod Plus Anti-PD-1 Antibody Exerts Significantly Potent Antitumor Effect. Kazumasa Oya, Yoshiyuki Nakamura, Zhu Zhenjie, Ryota Tanaka, Naoko Okiyama, Yuki Ichimura, Yosuke Ishitsuka, Akimasa Saito, Noriko Kubota, Rei Watanabe, Hideaki Tahara, Manabu Fujimoto, Yasuhiro Fujisawa. *Cancers*. 13(16), 3948, 2021. doi.org/10.3390/cancers13163948 の内容を、MDPI 社の規定にしたがって再利用している。

8 文献

1. 安齋 眞一.,ら., *皮膚悪性腫瘍ガイドライン第3版 有棘細胞癌診療ガイドライン2020*.
日本皮膚科学会雑誌, 2020. **130**(12): p. 2501-2533.
2. 中村 泰大.,ら., *日本皮膚科学会ガイドライン 皮膚悪性腫瘍ガイドライン第3版 メ
ラノーマ診療ガイドライン2019*. 日本皮膚科学会雑誌, 2019. **129**(9): p. 1759-1843.
3. 中村 智之, 片野 清隆, *メルケル細胞ポリオーマウイルスとメルケル細胞癌*. ウイル
ス, 2009. **59**(1): p. 37-42.
4. Hu, S.C., et al., *Cutaneous metastases from different internal malignancies: a clinical and
prognostic appraisal*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2008. **22**(6): p. 735-40.
5. Bijan, S., *Cancers of the skin*. De Vita V, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer. Principles E
Practice of Oncology*. 1993, Philadelphia: Lippincott Company.
6. Arrabal-Polo, M.A., et al., *Cutaneous metastases in renal cell carcinoma: a case report*.
Cases J, 2009. **2**: p. 7948.
7. 古賀 公二.,ら., *内臓悪性腫瘍の皮膚転移132例の臨床病理学的検討*. 日本皮膚科学会
雑誌, 2010. **120**(11): p. 2213-2217.
8. 吉野 公二.,ら., *皮膚悪性腫瘍ガイドライン第3版 乳房外パジェット病診療ガイド
ライン2021*. 日本皮膚科学会雑誌, 2021. **131**(2): p. 225-244.
9. Murshed, K.A., et al., *Primary mediastinal choriocarcinoma presenting as cutaneous*

- metastasis with resistance to chemotherapy: case report and literature review.* J Cutan Pathol, 2021. **48**(1): p. 81-85.
10. McCord, M.W., et al., *Skin cancer of the head and neck with clinical perineural invasion.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2000. **47**(1): p. 89-93.
 11. Audet, N., et al., *Cutaneous metastatic squamous cell carcinoma to the parotid gland: analysis and outcome.* Head Neck, 2004. **26**(8): p. 727-32.
 12. Jarkowski, A., 3rd, et al., *Systemic Therapy in Advanced Cutaneous Squamous Cell Carcinoma (CSCC): The Roswell Park Experience and a Review of the Literature.* Am J Clin Oncol, 2016. **39**(6): p. 545-548.
 13. Hosseinpour, R. and M.J. Yavari Barhaghtalab, *Cutaneous Metastasis vs. Isolated Skin Recurrence of Invasive Breast Carcinoma after Modified Radical Mastectomy.* Case Rep Dermatol Med, 2021. **2021**: p. 6673289.
 14. Kowalzick, L. and L. Eickenscheidt, *Progress of multiple cutaneous and subcutaneous melanoma metastases of the face during imiquimod treatment.* J Dtsch Dermatol Ges, 2009. **7**(6): p. 538-40.
 15. Stahlie, E.H.A., et al., *A systematic review and meta-analysis of locoregional treatments for in-transit melanoma.* J Surg Oncol, 2019. **120**(6): p. 1056-1057.
 16. Dika, E., et al., *In transit melanoma and imiquimod: A case of disease progression.*

- Dermatol Ther, 2020. **33**(4): p. e13512.
17. Read, R.L. and J.F. Thompson, *Managing in-transit melanoma metastases in the new era of effective systemic therapies for melanoma*. Expert Rev Clin Pharmacol, 2019. **12**(12): p. 1107-1119.
 18. Kobold, S., et al., *Modes of action of TLR7 agonists in cancer therapy*. Immunotherapy, 2014. **6**(10): p. 1085-95.
 19. Kawai, T. and S. Akira, *Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors*. Trends Mol Med, 2007. **13**(11): p. 460-9.
 20. Urban-Wojciuk, Z., et al., *The Role of TLRs in Anti-cancer Immunity and Tumor Rejection*. Frontiers in immunology, 2019. **10**: p. 2388-2388.
 21. 津田敏彦, 今田和則, and 水口清, *新薬紹介総説 イミキモド・クリーム剤(販売名:ベセルナクリーム 5%)の薬理作用と臨床効果*. 日本薬理学雑誌, 2008. **132**(1): p. 55-63.
 22. Read, T., et al., *A systematic review and meta-analysis of locoregional treatments for in-transit melanoma*. J Surg Oncol, 2019. **119**(7): p. 887-896.
 23. Salazar, L.G., et al., *Topical Imiquimod Plus Nab-paclitaxel for Breast Cancer Cutaneous Metastases: A Phase 2 Clinical Trial*. JAMA Oncol, 2017. **3**(7): p. 969-973.
 24. Rozenblit, M., et al., *Transcriptomic profiles conducive to immune-mediated tumor rejection in human breast cancer skin metastases treated with Imiquimod*. Sci Rep, 2019.

- 9(1): p. 8572.
25. Singh, M., et al., *Effective innate and adaptive antimelanoma immunity through localized TLR7/8 activation*. J Immunol, 2014. **193**(9): p. 4722-31.
26. Huang, S.J., et al., *Imiquimod enhances IFN-gamma production and effector function of T cells infiltrating human squamous cell carcinomas of the skin*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(11): p. 2676-85.
27. Yokogawa, M., et al., *Imiquimod attenuates the growth of UVB-induced SCC in mice through Th1/Th17 cells*. Mol Carcinog, 2013. **52**(10): p. 760-9.
28. Aspord, C., et al., *Imiquimod inhibits melanoma development by promoting pDC cytotoxic functions and impeding tumor vascularization*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(10): p. 2551-2561.
29. Wang, C., et al., *The TLR7 agonist induces tumor regression both by promoting CD4⁺T cells proliferation and by reversing T regulatory cell-mediated suppression via dendritic cells*. Oncotarget, 2015. **6**(3): p. 1779-89.
30. Wu, J., et al., *TLR-activated plasmacytoid dendritic cells inhibit breast cancer cell growth in vitro and in vivo*. Oncotarget, 2017. **8**(7): p. 11708-11718.
31. Strydom, G., et al., *Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells*. J Exp Med, 2007. **204**(6): p. 1441-51.

32. Furudate, S., et al., *Immunomodulatory Effect of Imiquimod Through CCL22 Produced by Tumor-associated Macrophages in B16F10 Melanomas*. *Anticancer Res*, 2017. **37**(7): p. 3461-3471.
33. Han, Y., D. Liu, and L. Li, *PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer*. *Am J Cancer Res*, 2020. **10**(3): p. 727-742.
34. Robert, C., et al., *Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(4): p. 320-30.
35. Gabriel, E. and J. Skitzki, *The Role of Regional Therapies for in-Transit Melanoma in the Era of Improved Systemic Options*. *Cancers (Basel)*, 2015. **7**(3): p. 1154-77.
36. Antonia, S.J., et al., *Four-year survival with nivolumab in patients with previously treated advanced non-small-cell lung cancer: a pooled analysis*. *Lancet Oncol*, 2019. **20**(10): p. 1395-1408.
37. Planes-Laine, G., et al., *PD-1/PD-L1 Targeting in Breast Cancer: The First Clinical Evidences Are Emerging. A Literature Review*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(7).
38. van den Boorn, J.G., et al., *Effective melanoma immunotherapy in mice by the skin-depigmenting agent monobenzone and the adjuvants imiquimod and CpG*. *PLoS One*, 2010. **5**(5): p. e10626.
39. Zhong, W., et al., *Comparison of the molecular and cellular phenotypes of common mouse*

- syngeneic models with human tumors*. BMC Genomics, 2020. **21**(1): p. 2.
40. Mosely, S.I., et al., *Rational Selection of Syngeneic Preclinical Tumor Models for Immunotherapeutic Drug Discovery*. Cancer Immunol Res, 2017. **5**(1): p. 29-41.
41. Coe, D., et al., *The roles of antigen-specificity, responsiveness to transforming growth factor- β and antigen-presenting cell subsets in tumour-induced expansion of regulatory T cells*. Immunology, 2010. **131**(4): p. 556-69.
42. Lee, J., et al., *Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6646-51.
43. Fukui, R., A. Kanno, and K. Miyake, *Type I IFN Contributes to the Phenotype of *Unc93b1D34A/D34A* Mice by Regulating TLR7 Expression in B Cells and Dendritic Cells*. J Immunol, 2016. **196**(1): p. 416-27.
44. Schön, M.P. and M. Schön, *TLR7 and TLR8 as targets in cancer therapy*. Oncogene, 2008. **27**(2): p. 190-9.
45. Porciello, N. and L. Tuosto, *CD28 costimulatory signals in T lymphocyte activation: Emerging functions beyond a qualitative and quantitative support to TCR signalling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2016. **28**: p. 11-9.
46. Rickert, R.C., K. Rajewsky, and J. Roes, *Impairment of T-cell-dependent B-cell responses*

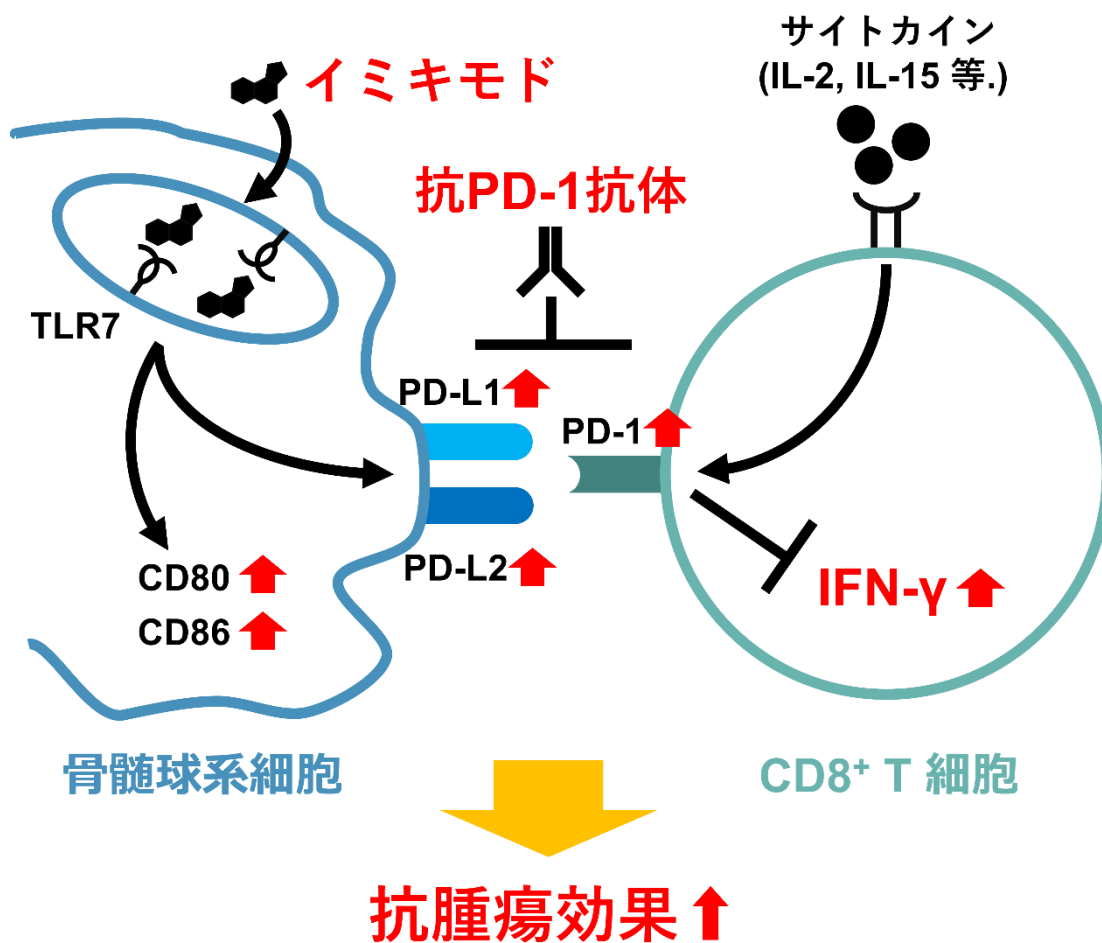
- and B-1 cell development in CD19-deficient mice. Nature, 1995. 376(6538): p. 352-5.*
47. Shankaran, V., et al., *Pillars Article: IFN γ and Lymphocytes Prevent Primary Tumour Development and Shape Tumour Immunogenicity. Nature. 2001. 410: 1107-1111. J Immunol, 2018. 201(3): p. 827-831.*
48. Hornung, V., et al., *Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. J Immunol, 2002. 168(9): p. 4531-7.*
49. Zarembek, K.A. and P.J. Godowski, *Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. J Immunol, 2002. 168(2): p. 554-61.*
50. Loke, P. and J.P. Allison, *PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(9): p. 5336-41.*
51. Sun, C., R. Mezzadra, and T.N. Schumacher, *Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. Immunity, 2018. 48(3): p. 434-452.*
52. Greay, S.J., et al., *Inhibition of established subcutaneous murine tumour growth with topical Melaleuca alternifolia (tea tree) oil. Cancer Chemother Pharmacol, 2010. 66(6): p. 1095-102.*
53. Benonisson, H., et al., *High Fc γ R Expression on Intratumoral Macrophages*

- Enhances Tumor-Targeting Antibody Therapy.* J Immunol, 2018. **201**(12): p. 3741-3749.
54. Vincent, K.M. and L.M. Postovit, *Investigating the utility of human melanoma cell lines as tumour models.* Oncotarget, 2017. **8**(6): p. 10498-10509.
55. Rothermel, L.D., et al., *Identification of an Immunogenic Subset of Metastatic Uveal Melanoma.* Clin Cancer Res, 2016. **22**(9): p. 2237-49.
56. Nakamura, Y., *Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitor-Mediated Tumor Response and Adverse Events.* Front Med (Lausanne), 2019. **6**: p. 119.
57. Hayward, N.K., et al., *Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes.* Nature, 2017. **545**(7653): p. 175-180.
58. Castro, F., et al., *Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 847.
59. Zhou, F., *Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation.* Int Rev Immunol, 2009. **28**(3-4): p. 239-60.
60. Tunger, A., et al., *The Evolving Landscape of Biomarkers for Anti-PD-1 or Anti-PD-L1 Therapy.* J Clin Med, 2019. **8**(10).
61. Lin, X., et al., *Prognostic and clinicopathological utility of PD-L2 expression in patients with digestive system cancers: A meta-analysis.* Int Immunopharmacol, 2020. **88**: p. 106946.

62. Sun, C., et al., *Expression of PD-1 and PD-L1 on Tumor-Infiltrating Lymphocytes Predicts Prognosis in Patients with Small-Cell Lung Cancer*. *Onco Targets Ther*, 2020. **13**: p. 6475-6483.
63. Curran, C.S., et al., *PD-1 immunobiology in systemic lupus erythematosus*. *J Autoimmun*, 2019. **97**: p. 1-9.
64. Liang, S.C., et al., *Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses*. *Eur J Immunol*, 2003. **33**(10): p. 2706-16.
65. Meier, A., et al., *Upregulation of PD-L1 on monocytes and dendritic cells by HIV-1 derived TLR ligands*. *Aids*, 2008. **22**(5): p. 655-8.
66. Cai, H., et al., *IFI16 promotes cervical cancer progression by upregulating PD-L1 in immunomicroenvironment through STING-TBK1-NF-kB pathway*. *Biomed Pharmacother*, 2020. **123**: p. 109790.
67. Ju, X., et al., *Tumor-associated macrophages induce PD-L1 expression in gastric cancer cells through IL-6 and TNF- α signaling*. *Exp Cell Res*, 2020. **396**(2): p. 112315.
68. Kinter, A.L., et al., *The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands*. *J Immunol*, 2008. **181**(10): p. 6738-46.
69. Bally, A.P.R., et al., *PD-1 Expression during Acute Infection Is Repressed through an*

LSD1-Blimp-1 Axis. J Immunol, 2020. **204**(2): p. 449-458.

10 要約図



骨髄球系細胞の TLR7 にイミキモドが結合することで、骨髄球系細胞における CD80 と CD86 の発現や各種サイトカインの産生が増加する。それに伴い T 細胞も活性化し IFN γ の発現が増加する。一方で、イミキモドにより骨髄球系細胞における PD-L1/PD-L2 の発現が増加する。また、イミキモドにより産生された IL-2 などのサイトカインが T 細胞における PD-1 の発現を増加させることで、イミキモドによる抗腫瘍効果が潜在的に減弱する。イミキモドに抗 PD-1 抗体を併用することにより、T 細胞における腫瘍細胞に対する細胞障害活性や IFN γ の産生が増加することで、併用療法は各々の単剤療法と比較して顕著な腫瘍効果を示す。