

氏 名	寺 正 剛
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3154 号
学位授与の日付	平 成 19 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Specific and high-affinity binding of tetramerized PD-L1 extracellular domain to PD-1 expressing cells: possible application to enhance T cell function (PD-L1 細胞外領域の四量体タンパクは特異的かつ高親和性にPD-1を発現する細胞に結合する:T細胞機能増強への適用可能性)
論文調査委員	(主 査) 教 授 清 水 章 教 授 長 田 重 一 教 授 坂 口 志 文

論 文 内 容 の 要 旨

PD-1 受容体は CD28 ファミリーに属する I 型膜タンパクで、おもに T 細胞、B 細胞の活性化にともない、発現が誘導される副刺激受容体である。PD-1 欠損マウスは、BALB/c 背景においては自己抗体の産生を伴う拡張性心筋炎、C57/BL6 背景では関節炎や糸球体腎炎などループス様の自己免疫病を自然発症することから、PD-1 は免疫系を負に制御し、自己免疫応答を回避するために必要な分子であると考えられている。しかし、T 細胞を介した実際の免疫反応に対し、PD-1 がどのような機能を持っているかについては詳しく検討されていなかった。

そこで、LacZ を組み込んだアデノウィルスによる急性ウィルス感染モデルにおいて PD-1 シグナルの影響を検討したところ、野生型マウスと比較し、PD-1 欠損マウスにおいては T 細胞が強い増殖応答と IFN- γ 産生能を示し、より効率的にウィルスが駆除されることを明らかにした。これは、エフェクター相にある CD8 陽性 T 細胞が PD-1 を発現しており、類洞内皮細胞や Kupffer 細胞などの肝非実質細胞が発現する PD リガンドとの結合によって、その機能が減弱させられたためであると考えられた。(参考論文 1)

また PD-L1 を発現する腫瘍を皮下移植したマウスの癌モデルにおいても、PD-1 の欠損や PD-1 シグナルの遮断抗体によって T 細胞機能が亢進し、その結果原発巣の腫瘍の増大が抑制され、生存率が改善することが報告されている。そこで、B16 メラノーマ細胞を脾臓に接種し、その血行性肝転移を野生型マウスと PD-1 欠損マウスで比較したところ、PD-1 欠損マウスでは顕著にメラノーマ細胞の転移が抑制された。同様に CT26 大腸癌細胞の肺転移についても検討したところ、顕著な転移抑制が認められた。これにより、PD-1 シグナルの遮断効果は、原発巣における腫瘍の増殖のみならず、血行性転移に対しても抑制的に働くことを明らかにした。(参考論文 2)

以上の結果は、PD-1 は自己免疫応答を抑制する一方で、抗ウィルス免疫や癌免疫において、必要な T 細胞のエフェクター機能まで減弱させている可能性を強く示唆している。逆に、PD-1 とリガンドの結合を遮断することによって、慢性ウィルス感染や悪性腫瘍に対する効果的な免疫療法の開発が期待できることが予想された。そこで、ヒトの治療に適用可能な遮断薬を開発するため、PD-1 および PD-L1 タンパクの細胞外ドメインを、大腸菌発現系によって大量発現させ、不溶性画分より機能性分子を大量調製する系の確立を試みた。しかし、その結果得られた可溶性 PD-1、PD-L1 単量体タンパクは親和性が非常に低く、十分なシグナル阻害効果が得られなかった。そこで、これらのタンパクに特異的ビオチン転移配列を付加し、ストレプトアビジンによって四量体化することで、親和性の改善を試みた。その結果 PD-1、PD-L1 ともに可溶性四量体分子として回収され、それぞれ PD リガンド、PD-1 に対する親和性が、単量体と比較して 100 倍以上向上した。またこれらの分子の特異性は非常に高く、抗原刺激によって活性化したマウス T 細胞、および B 細胞に誘導された PD-1 分子は、PD-L1 テトラマーによって定量的に染色された。この過程で、これまでに PD-1 が誘導されると考えられていた骨髓系単球には PD-1 は 発現しないことが確認された。さらに PD-L1 テトラマーは CD8 拘束性のアロ反応における T 細胞の初期増

殖能、および細胞傷害活性を PD-1 シグナル遮断抗体とほぼ同程度に増強した。これらの結果より、PD-1、PD-L1 の多量体化タンパクは、PD-1 シグナルの遮断薬として適用しうることが示された。また、このような手法による遮断薬作製のストラテジーは同様の膜タンパク全般に対して適用可能であり、イムノグロブリン Fc キメラタンパクに代わる、特異性と親和性の高い生物製剤遮断薬として発展させうると考えられる。(主論文)

論文審査の結果の要旨

当学位授与申請者は、マウスを用いたアデノウイルス急性感染モデルにおいて、免疫抑制性受容体 PD-1 の存在下では肝臓に浸潤したエフェクターT 細胞の増殖が顕著に減衰しており、逆に PD-1 欠損マウスにおいては効率よくウイルスが排除されることを示した。また、すでに PD-1 シグナルの遮断が PD-1 リガンドを発現する腫瘍原発巣に対して免疫治療効果があることが報告されているが、腫瘍の転移に対しても PD-1 シグナルの遮断が有効であることを示した。申請者はこれらの知見の臨床応用を目指し、従来の方法によるアゴニスト作製方法の欠点を補うべく、PD-1 および PD-L1 細胞外領域の多量体化によるあらたなデコイ型受容体阻害分子の作製を試み、その多量体分子の高い特異性と結合親和性、およびマウス免疫細胞を用いた *in vitro* の実験系により、その T 細胞機能亢進作用の有効性を実証した。以上の研究は、ウイルス感染やがん状態における T 細胞機能低下の分子機序解明に貢献している。また、PD-1 シグナルのみならず細胞上に発現するあらゆるタンパク分子に対して応用可能な新規遮断薬の作製手法の基礎を開拓したといえる。PD-1 の生理学的、病理学的意義を明らかにするにとどまらず、ウイルス感染症や悪性腫瘍に対する新規治療法の基礎を確立したという点において、基礎及び臨床医学の双方に対し、その発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものとみとめる。

なお、本学位授与申請者は、平成 19 年 8 月 8 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。