

氏 名	いし だ まさ よし 石 田 昌 義
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学位記番号	生 博 第 36 号
学位授与の日付	平 成 17 年 3 月 23 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	生 命 科 学 研 究 科 高 次 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	Involvement of PD-L1 Expressed on Tumor Cells in the Escape from Host Immune System and Tumor Immunotherapy by Blockade of PD-1/PD-L1 system (腫瘍細胞上に発現される PD-L1 分子の宿主免疫系からの回避機構への関与と PD-1/PD-L1 システム遮断による腫瘍免疫療法)
論文調査委員	(主 査) 教 授 湊 長 博 教 授 稲 葉 カ ヨ 教 授 清 水 章

論 文 内 容 の 要 旨

免疫系は生体を維持する上で重要な役割を果たしており、その中でも T 細胞が中心的な働きをしている。この T 細胞による抗原認識において、主経路として上記の T 細胞受容体による抗原性ペプチド／主要組織適合遺伝子複合体の認識があるが、それを様々な副刺激経路が正あるいは負に制御している。最近になってこれら受容体／リガンドシステムのひとつとして PD-1/PD-L1/PD-L2 システムが同定されたが、その生理的役割・意義・制御機構に関しては統一の見解が得られておらず、その解釈をめぐり、種々の混乱があった。

そこで、申請者は、PD-1/PD-L1/PD-L2 システムを免疫学および細胞生物学的に系統的に解析するために抗体の調製から研究を開始した。まず、マウス PD-L1 に対する 2 種のモノクローナル抗体、1-111, 1-167, マウス PD-L2 に対する 2 種のモノクローナル抗体、54-1, 122-1 を樹立した。これらの抗体を用いることにより、PD-L1, PD-L2 分子の細胞表面発現パターンをフローサイトメトリー法により解析した結果、PD-L1 分子に関しては、脾細胞において一部の T 細胞、NK 細胞、B 細胞、単球系細胞に発現がみられ、また、インターフェロン- γ で処理すると非免疫系上皮細胞上においてもその発現が亢進したことから、末梢での炎症反応を終結する役割を果たしていることが示唆された。胸腺細胞に関しては、CD4 陽性画分、CD8 陽性画分、また一部の CD4CD8 陰性画分に発現がみられたが、CD4CD8 陽性画分上には全く発現が認められなかった。このことから、胸腺内における T 細胞分化過程において、PD-1 受容体と協調して PD-L1 が何らかの役割を果たしている可能性がある。骨髄細胞に関しては、分化のごく初期の造血系幹細胞上にも認められ、リンパ球分化の過程においても重要な役割を果たしている可能性が考えられる。一方、PD-L2 に関しては、リンパ組織の非常に限られた画分にのみ発現されていることが示唆されたが、その生理学的意義はこれからの研究課題となっている。

以上のように PD-1/PD-L1 /PD-L2 システムが免疫系細胞において何らかの役割を果たしていることが示唆されたため、細胞障害性 T 細胞に焦点を絞り、詳細な機能解析を行った。まず、PD-L1 および PD-L2 分子陰性の肥満細胞腫 P815 に PD-L1, あるいは、PD-L2(PD-L)分子を遺伝子導入し、PD-L 分子をその細胞表面上に発現する細胞株 P815/PD-L1 および、P815/PD-L2 を樹立した。この細胞株と野生型 P815 細胞株とを標的細胞とし、遺伝的に異種のキラー細胞をエフェクター細胞として、試験管内で細胞障害性を検討した結果、PD-L の発現により著しくその細胞障害活性が抑制されることが明らかとなった。さらに、この系に抗 PD-L1 抗体 (1-111) あるいは、抗 PD-L2 抗体 (54-1) を添加したところその抑制作用が消失したことから、PD-L 分子はともに PD-1 受容体を介して、細胞障害性 T 細胞に抑制シグナルを送ることが示唆された。この PD-1/PD-L1/PD-L2 システムの抑制作用をさらに確認するために、遺伝的に同種の P815 特異的キラー細胞を樹立し、試験管内で同様の検討を行った結果、同様に PD-L 分子が抑制性シグナルを惹起していることが確かめられた。さらに、P815 の宿主マウスにも接種し、生体内でもその抑制作用を解析した。すなわち、P815 あるいは P815/PD-L1 もしくは P815/PD-L2 細胞株を DBA/2マウスに接種し腫瘍増殖速度を測定した結果、P815/PD-L1

(PD-L2) 細胞株の方が圧倒的に腫瘍増殖速度は速く、抗 PD-L1 もしくは PD-L2 抗体投与により抗腫瘍効果が増大したことから PD-L1/PD-L2 分子が宿主の細胞障害性 T 細胞に抑制シグナルを送ることにより、腫瘍の免疫監視システムからの回避機構において重要な役割を果たしていることを示唆している。

さらに、PD-1/PD-L1 の抑制システムをより確実に明らかにするために、もともと PD-L1 分子を発現しているミエローマ細胞株 J558L を BALB/c マウスに接種し、抗 PD-L1 抗体の投与有無による腫瘍細胞増殖効果と PD-1 受容体欠損マウスにおける生体内での腫瘍細胞増殖効果を検討した。その結果、PD-1/PD-L1 経路を遮断すると腫瘍増殖速度が著しく低下することより、ここでも PD-1/PD-L1 システムの抑制的性格がより確実になり、抗腫瘍免疫療法開発のための基盤が確立された。

論文審査の結果の要旨

PD-1 受容体は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属しており、T 細胞受容体からの刺激とともに、抗原提示細胞に限らず、多くの体細胞・腫瘍細胞上に発現した 2 つのリガンド (PD-L1 および PD-L2) と相互作用することにより、T 細胞に負のシグナルを入れることができる。このようにして自己応答性反応を制御して寛容を維持しているといわれている。このように PD-1/PD-L1 (PD-L2) システムが近年同定されたが、その生理的役割・意義・制御機構に関しては統一的理解が得られておらず、その解釈をめぐり、種々の混乱があった。

そこで申請者は、PD-1/PD-L1 (PD-L2) システムを免疫学的および細胞生物学的に系統的に解析するためにマウス PD-L1 および PD-L2 に対するモノクローナル抗体を作製し、リンパ系組織由来細胞における PD-L1・PD-L2 の発現分布を解析している。その結果、脾細胞には、一部の B 細胞、T 細胞、樹状細胞、マクロファージ、NK 細胞に PD-L1 の発現が認められ、胸腺細胞においては、CD4CD8 両陰性、CD4 陽性、CD8 陽性の細胞の一部に弱い PD-L1 の発現を確認している。骨髓細胞においても、IgM 陽性 B220 陽性の B 細胞にも強い発現が認められ、CD11b 陽性の単球、Gr-1 弱陽性、強陽性の顆粒球にも強い発現を確認しており、さらに、分化のごく初期の造血系幹細胞にも PD-L1 分子の有意な発現を確認している。このように、リンパ造血系組織由来細胞に PD-L1 分子の発現を見出しており、PD-1/PD-L1 シグナル系がリンパ球の分化、および末梢のリンパ球応答制御に関与している可能性を提示している。しかしながら、PD-1 の第二のリガンドである PD-L2 は、脾細胞、胸腺細胞、骨髓細胞、いずれにおいても顕著な発現が認められず、PD-L2 分子の発現は厳密に調節されていることを示唆しており、PD-1/PD-L2 システムの生理的意義に関しては、今後の研究課題となっている。また、一連のマウス腫瘍細胞の発現パターンから、T 細胞腫株の一部に PD-1 受容体が、5 例中 5 例の B 細胞腫株、5 例中 5 例のミエローマ細胞株、一部の線維肉腫細胞株に PD-L1 分子の発現を確認し、5 例中 1 例のみの成熟 B 細胞腫株に PD-L2 の発現を確認している。また、試験管内でインターフェロン- γ 存在下により、脾細胞はもとより、マウス悪性黒色腫、線維肉腫細胞上においても PD-L1 分子の発現が亢進することも確かめており、末梢での炎症反応の抑制作用により、腫瘍細胞の宿主免疫系からの逃避にも何らかの関与を示唆している。

次に申請者は、これらの結果を踏まえて、抗腫瘍免疫応答と PD-1/PD-L1 (PD-L2) システムの関係を調べている。具体的には、PD-L1 および PD-L2 を発現していない腫瘍細胞株の P815 肥満細胞腫に PD-L1 および PD-L2 遺伝子を強制発現させて樹立した腫瘍細胞株を用いて、試験管内で PD-1/PD-L1 (PD-L2) のシグナル経路が細胞障害性 T 細胞の活性を抑制的に制御することを報告している。さらに、これらの腫瘍細胞をマウスに接種させると PD-L1 もしくは、PD-L2 を発現させた腫瘍細胞の方が著しい腫瘍の形成、転移、および生存率の低下が確認され、樹立した抗 PD-L1 (または、PD-L2) モノクローナル抗体をマウスに投与することにより、腫瘍塊縮退と延命効果が認められた。また、PD-L1 を内在的に発現している J558L ミエローマ細胞株をマウスに接種し、抗体を投与すると上記と同様の治療効果を確認している。最終的にこの現象が PD-1/PD-L1 の抑制系が機能していることを明らかにするために、PD-1 欠損マウスにも腫瘍細胞の接種を行い、生体内での腫瘍増殖を検討したところ、野生型マウスでは拒絶できないのに対し、PD-1 欠損マウスは腫瘍を完全に拒絶した。

以上の結果は、腫瘍細胞は PD-1/PD-L1 シグナル経路を利用し、宿主の免疫監視機構から回避していることが示唆され、このシグナル経路の効率的な遮断により新しい抗腫瘍免疫療法開発のための基盤を確立するものであり、本論文は、博士

(生命科学)の学位論文として価値あるものと認め、平成17年2月2日論文内容とそれに関連した口頭試問を申請者に対して行った結果、調査委員全員一致で合格と認められたものである。