

PD-1/PD-L1 免疫チェックポイント阻害剤の 抗腫瘍活性を評価する新規試験法の開発

発表者：鈴木 康之 (安全性評価技術研究所)
共同研究者：前田 洋祐 (安全性評価技術研究所)
 広崎 春佳 (安全性評価技術研究所)
 武吉 正博 (安全性評価技術研究所)

1. 背景及び目的

2020 年の日本人の死因の第一位は「がん」¹⁾であり、がん治療薬は重要な創薬ターゲットとなっている。その中でも近年、免疫チェックポイント阻害剤が注目されている。体内でがん細胞ができると、免疫細胞によって、がん細胞が排除される仕組みがある（免疫細胞によってがん細胞が傷害・排除する活性：抗腫瘍活性）。免疫チェックポイントは、免疫チェックポイント分子を介して免疫機能を担う免疫細胞が敵と味方を識別し、過剰な免疫応答を制御する仕組みである。しかし、がん細胞の中には免疫細胞上の免疫チェックポイント分子である Programmed cell death-1 (PD-1) とがん細胞上の PD-1 ligand 1 (PD-L1) が相互作用することで生じる免疫抑制シグナルを利用して、免疫細胞による傷害から逃れる仕組みを持つものがあることがわかってきた²⁾。しかし、そのような場合も PD-1/PD-L1 の相互作用を阻害することでがん細胞への傷害活性の回復に有効であることが示されていることから^{3) 4) 5)}、この回復効果を期待した PD-1 や PD-L1 に結合する抗体等、がん治療を目的とする PD-1/PD-L1 免疫チェックポイント阻害剤の開発が盛んに行われている⁶⁾。PD-1/PD-L1 免疫チェックポイント阻害剤の活性を評価する既存の *in vitro* 試験法はあるが、それらは PD-1 と PD-L1 分子の結合性評価や PD-1/PD-L1 シグナルの伝達の評価であり、免疫細胞によるがん細胞への傷害活性回復効果を直接評価することはできない。そこで我々は免疫細胞によるがん細胞への傷害活性を指標とした PD-1/PD-L1 免疫チェックポイント阻害剤の傷害活性回復効果を評価する新規 *in vitro* 試験法を開発した。

2. 方法

2.1 開発コンセプト

まず、PD-1 を発現する免疫細胞（エフェクター細胞）と PD-L1 を発現するがん細胞（ターゲット細胞）をそれぞれ樹立し、それらを共培養することで免疫抑制シグナルによりがん細胞への傷害活性が抑制された状態を再現した実験系を構築することとした。次に、PD-1/PD-L1 免疫チェックポイント阻害剤の添加により傷害されたターゲット細胞

胞から放出されるユーロピウムを定量することにより、免疫抑制シグナルの阻害によるがん細胞への傷害活性の回復効果を評価する試験系を構築することとした (図 1)。

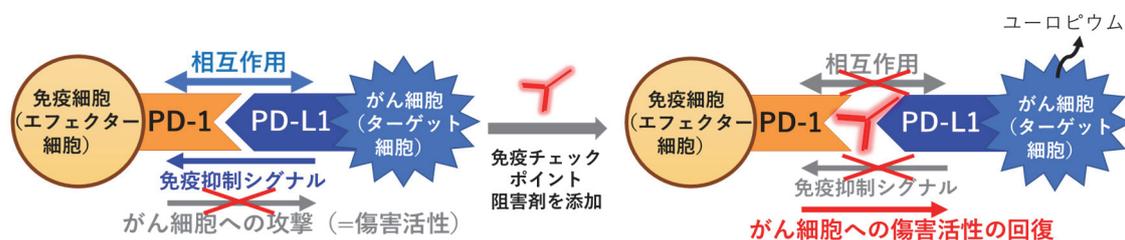


図 1 開発コンセプト

2.2 PD-1 発現エフェクター細胞及び PD-L1 発現ターゲット細胞の樹立

がん細胞への傷害活性を持つヒトナチュラルキラー細胞株である KHYG-1 に PD-1 及び Interleukin-2 (IL-2) 遺伝子を導入し、PD-1 及び IL-2 を安定発現するエフェクター細胞を樹立した。樹立したエフェクター細胞における PD-1 の発現はフローサイトメーター、IL-2 の発現は培養 24 時間後の培養液中の IL-2 を ELISA 法で確認した。また、免疫細胞に傷害されやすい性質を持つヒト慢性骨髄性白血病由来の細胞株である K562 に PD-L1 遺伝子を導入し、PD-L1 を安定発現するターゲット細胞を樹立した。樹立したターゲット細胞における PD-L1 の発現はフローサイトメーターで確認した。

2.3 共培養による傷害活性抑制効果の確認

エフェクター細胞とターゲット細胞の共培養によって免疫抑制シグナルによるがん細胞への傷害活性抑制効果が再現できているか否かを確認するために、「PD-1 発現エフェクター細胞」又は「PD-1 を発現していないエフェクター細胞の親細胞」と、「PD-L1 発現ターゲット細胞」又は「PD-L1 を発現していないターゲット細胞の親細胞」の 4 種類の組み合わせで共培養し、ターゲット細胞への傷害活性を比較した。

2.4 モデル抗体医薬品を用いたがん細胞への傷害活性回復効果の確認

エフェクター細胞/ターゲット細胞共培養系に市販の抗 PD-1 抗体薬又は抗 PD-L1 抗体薬をモデル抗体医薬品として添加し、ターゲット細胞への傷害活性を確認した。陰性対照にはヒト IgG 抗体を使用した。

3. 結果

3.1 PD-1 発現エフェクター細胞及び PD-L1 発現ターゲット細胞の樹立

フローサイトメーターによる測定において、樹立したエフェクター細胞では、PD-1 の発現を示す強い蛍光が認められたことから、PD-1 を発現していることが確認された (図 2a)。また、PD-1 遺伝子のみを導入した KHYG-1 では培養液から IL-2 が検出されなかったが、樹立したエフェクター細胞では培養上清中に IL-2 が検出されたことから、

IL-2 を発現していることが確認された。以上の結果から目的とするエフェクター細胞を樹立できたことが示された。樹立したターゲット細胞も同様に、フローサイトメーターによる測定において PD-L1 の発現を示す強い蛍光が認められたことから、PD-L1 を発現していることが確認され、目的とするターゲット細胞を樹立できたことが示された (図 2b)。

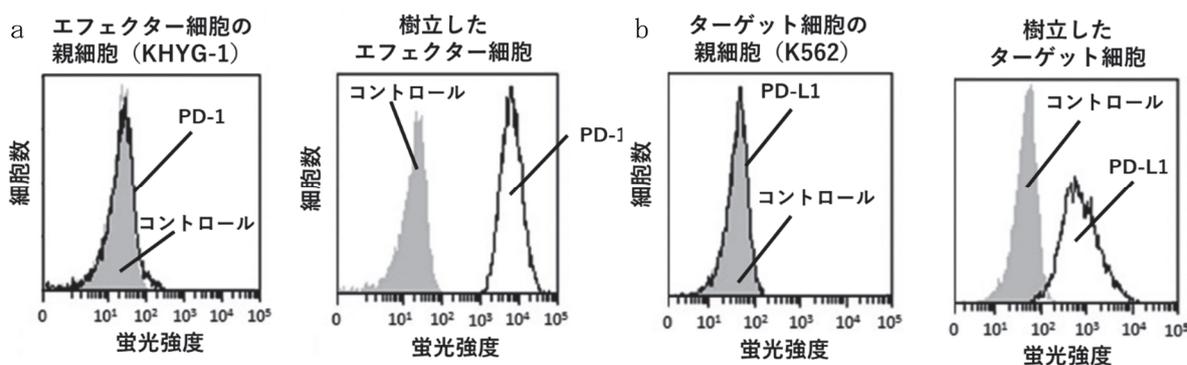


図 2 フローサイトメーターによる樹立した細胞における目的タンパクの発現確認 (グレーのヒストグラムが目的分子を発現していない状態を示す)

3.2 共培養による傷害活性抑制効果の確認

PD-1 を発現していないエフェクター細胞の親細胞 (KHYG-1) を用いた場合、ターゲット細胞の PD-L1 発現の有無にかかわらず同程度の傷害活性を示し、ターゲット細胞への傷害活性の十分な抑制効果は認められなかった。一方、今回樹立した PD-1 発現エフェクター細胞を用いた場合、PD-L1 を発現していないターゲット細胞に対する傷害活性に比べ、PD-L1 発現ターゲット細胞に対する傷害活性は有意に低く、PD-1/PD-L1 の相互作用により傷害活性が抑制されることが確認された (図 3)。以上の結果から、PD-1/PD-L1 免疫チェックポイントによりがん細胞への傷害活性が抑制された状態を再現した共培養系を構築できたことが示された。

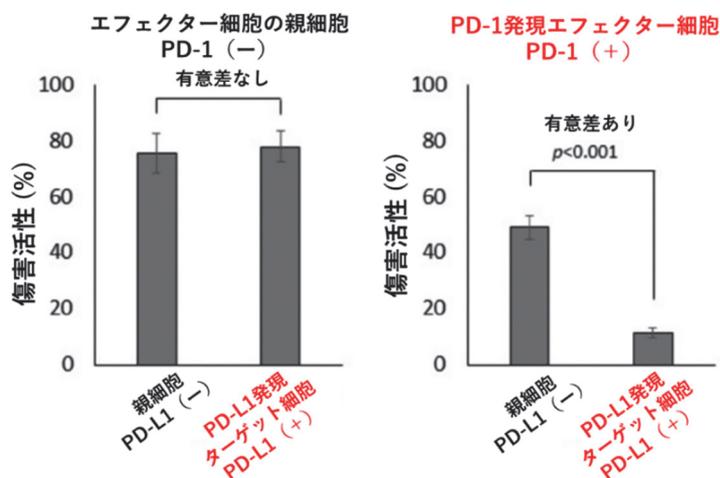


図 3 各細胞の組合せにおける傷害活性抑制効果の確認

3.3 モデル抗体医薬品を用いたがん細胞への傷害活性回復効果の確認

陰性対照のヒト IgG 抗体では傷害活性の回復は認められなかった。一方、抗 PD-1 抗体薬及び抗 PD-L1 抗体薬では濃度依存的なターゲット細胞への傷害活性の回復が確認されたことから、本研究で開発したエフェクター細胞/ターゲット細胞の共培養系は、免疫チェックポイント阻害剤である抗 PD-1 又は抗 PD-L1 抗体によるがん細胞への傷害活性回復効果の評価可能であることが示された (図 4)。

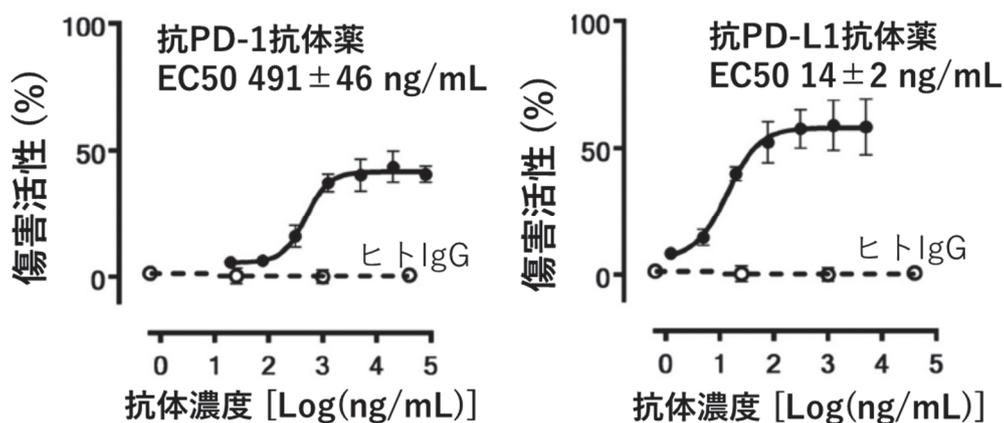


図 4 モデル抗体医薬品の活性測定結果

4. 結論

本研究で開発した試験法は、既存の *in vitro* 試験法では直接評価することができない免疫細胞によるがん細胞への傷害活性を指標とした、PD-1/PD-L1 免疫チェックポイント阻害剤によるがん細胞への傷害活性回復効果を簡便かつ定量的に評価可能な画期的な *in vitro* 試験法であり⁷⁾、今後、開発中の薬剤の薬効評価への活用が期待される。

5. 参考文献

- 1) 厚生労働省 令和 2 年 (2020) 人口動態統計月報年計 (概数)
- 2) Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(19):12293-12297 (2002)
- 3) Blank C, Brown I, Peterson AC, Spiotto M, Iwai Y, Honjo T, Gajewski TF. Cancer Res. 64(3):1140-1145 (2004)
- 4) Blank C, Kuball J, Voelkl S, Wiendl H, Becker B, Walter B, Majdic O, Gajewski TF, Theobald M, Andreesen R, Mackensen A. Int J Cancer. 119(2):317-327 (2006)
- 5) McDermott DF and Atkins MB. Cancer Med. 2(5): 662-673 (2013)
- 6) Lin X, Lu X, Luo G, Xiang H. Eur J Med Chem. 186:111876 (2020)
- 7) Hirosaki H, Maeda Y, Takeyoshi M. Immunol Invest. DOI: 10.1080/08820139.2023.2174442 (2023)