

EG7 Tリンパ腫皮下移植マウスモデルを用いた ベツリン誘導体と抗PD-1抗体との併用効果の検討

小笠原勝, 榊崎浩亮, 濱田昌弘¹, 藤本亮太¹, 斎藤真冬¹, 松永孝之, 大戸幹也, 川筋透,
中島範行¹, 長井良憲², 高津聖志,

Combined effects of a betulin derivative and anti-PD-1 antibody in an EG7
T lymphoma subcutaneously inoculated mouse model.

¹ 富山県立大学工学部医薬品工学科製薬化学工学講座

² 富山大学大学院医学薬学研究部免疫バイオ・創薬探索研究講座

Masaru OGASAWARA, Hiroaki MASUZAKI, Masahiro HAMADA¹,
Ryota FUJIMOTO, Mafuyu SAITOH, Takayuki MATSUNAGA, Mikiya OHTO,
Toru KAWASUJI, Noriyuki NAKAJIMA¹, Yoshinori NAGAI², Kiyoshi TAKATSU

¹ Department of Pharmaceutical Engineering, Faculty of Engineering,
Toyama Prefectural University

² Department of Immunobiology and Pharmacological Genetics,
Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Science for Research, University of Toyama

要 約

我々はこれまでに、B16メラノーマの皮下移植マウスモデルにおいて顕著な抗腫瘍効果を示すベツリン誘導体（以下、誘導体A）を開発してきた。本研究では、EG7 Tリンパ腫の皮下移植マウスモデルを用いて誘導体Aの抗腫瘍効果を検討するとともに、抗PD-1抗体との併用効果について検討した。EG7 Tリンパ腫の皮下移植モデルにおいて誘導体Aを腫瘍内に直接投与すると、腫瘍の増殖は有意に抑制された。一方、CD8陽性T細胞を除去したマウスでは、誘導体Aの抗腫瘍効果は消失した。このことから、誘導体Aの抗腫瘍効果には腫瘍特異的なCD8陽性T細胞の関与が示唆された。そこで、抗PD-1抗体と誘導体Aとの併用効果について検討したところ、誘導体Aは抗PD-1抗体の抗腫瘍効果を有意に増強することが分かった。その増強メカニズムについて検討した結果、誘導体AはEG7細胞の増殖能を試験管内において顕著に抑制するとともに、細胞膜上におけるPD-L1分子の発現量を有意に増加させることが分かった。がん細胞におけるPD-L1分子の発現増加は、抗PD-1抗体の抗腫瘍効果の増強に繋がることが報告されている。これらのことから、誘導体AはEG7細胞に対してPD-L1分子の発現誘導することで、抗PD-1抗体の抗腫瘍効果を増強していると考えられた。

Summary

We have developed a betulin derivative (derivative A) which shows remarkable anti-tumor effects in a tumor-burden mouse model. In this study, we evaluated anti-tumor effects of derivative A in a EG7 subcutaneously inoculated mouse model and combined effects of derivative A administration and anti-PD-1 therapy. We found that intratumor injection of derivative A significantly inhibited EG7 growth in the mouse model. In contrast, its inhibitory effect was cancelled when used CD8⁺T cell-depleted mice. These results indicated that tumor-specific CD8⁺T cells may be involved in the derivative A's effect. Therefore, we evaluated combined effects of derivative A and anti-PD-1 and found that derivative A significantly increases anti-tumor effects of anti-PD-1 antibody. Through examination on the mechanism of action underlying the augmentation by derivative A administration, we found that derivative A inhibits markedly the *in vitro* growth of EG7 and increases expression of PD-L1 on EG7 cells *in vitro*. Induction of PD-L1 expression on cell surface is demonstrated to be responsible for augmentation of effectiveness of PD-1 therapy. These results suggest that derivative A potentiates the anti-tumor activity of anti-PD-1 antibody by both inhibiting growth of and increasing PD-L1 expression on EG7 cells.

キーワード：ベツリン誘導体；抗PD-1抗体；PD-L1分子

Key words：betulin derivative；anti-PD-1 antibody；PD-L1

悪性黒色腫などのがん細胞は、免疫細胞からの攻撃を回避するために、PD-1/ PD-L1分子機構などの免疫チェックポイントを介した免疫逃避機構をもっている。現在、がんの免疫逃避機構を阻止する薬剤の研究開発が盛んに進められており、日本では2014年に抗PD-1抗体(nibolumab)が、2015年に抗CTLA-4抗体(ipilimumab)が悪性黒色腫に対する免疫チェックポイント阻害剤として承認された。これらは今後のがん治療に不可欠な医薬品の一つになりつつある。一方、がんの免疫逃避機構には、これら免疫チェックポイント以外にも様々な免疫抑制因子が複雑に絡み合っていることも明らかにされつつあり、免疫逃避機構を効果的に解除するには複数の抑制機構を同時に阻止する必要がある¹⁾。

我々は平成20年度より、ほくりく健康創造クラスター事業(～24年度)において「免疫抑制因子」の働きを解除(阻止)する物質の探索研究を進め、白樺成分のベツリンに目的とする有効性を見出した²⁾。さらに、その誘導体の開発を進め、B16メラノーマの皮下移植マウスモデルにおいて顕著な抑制作用を示すベツリン誘導体(以下、誘導体A)を見出した。本研究では、EG7 Tリンパ腫の皮下移植マウスモデルを用いて抗腫瘍効果を検討するとともに、抗PD-1抗体との併用効果について検討した。

実験方法

1. 実験試薬

ベツリンはExtrasyntheseより購入した。ベツリン誘導体(以下、誘導体A)は富山県立大学工学部医薬品工学科製薬化学工学講座において合成された。試験管内の実験では、いずれもジメチルスルホキシドに溶解して用いた。マウスに投与する場合は、いずれも0.1% Tween 80を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に懸濁して実験に供した。抗PD-1抗体及び抗CD8 α 抗体はBio X cellより購入し、PBSで希釈して実験に供した。

2. 細胞及び細胞培養

マウスEG7 Tリンパ腫はATCCより購入し、10%の非働化ウシ胎児血清、0.4 mg/mLのG418、100 U/mlのペニシリン、0.1 mg/mlのストレプトマイシン及び55 μ Mの2-メルカプトエタノールを含むRPMI-1640培地中にて継代、維持した。

3. がん移植マウスモデルを用いた評価

EG7細胞を 5×10^5 個/0.05 ml PBSに調製し、C57BL/6マウス(8週令、雌、5-6匹/群)にマウス当たり0.05 mlずつ下腹部皮下に接種した。化合物はがん接種後2日目から16日目まで1日1回、腫瘍内に投与した。対照群

には溶媒(0.1% Tween 80を含むPBS)を同様に投与した(50 μ l/マウス)。細胞傷害性T細胞の影響を検討する場合は、予め抗CD8 α 抗体を投与してCD8陽性T細胞を除去したマウスにEG7細胞(2.5×10^5 個/マウス)を移植した。抗PD-1抗体はEG7細胞を接種後、1週間に2回の間隔で腹腔内に投与した。腫瘍径は2日あるいは3日ごとに測定し、見かけの腫瘍体積は、長径 \times 短径 \times 短径/2で算出した。

4. OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞の検出

EG7細胞を皮下移植し、誘導体Aあるいは溶媒を投与したマウスより17日目に腫瘍組織を摘出し、酵素処理により細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液を蛍光標識されたOVAテトラマー(MBL)、抗CD8 α 抗体、及び、抗PD-1抗体で処置した。細胞を洗浄後、7AADを添加してフローサイトメーター(FACSCanto II、日本BD)により測定した。

5. CD8 陽性 T 細胞の調製

マウスから脾臓を採取し、フロストスライドグラスを使って、5 mlのFACS buffer(2% 非働化ウシ胎児血清、100 U/mlのペニシリン及び、0.1 mg/mlストレプトマイシンを含むHBSS溶液)中で磨り潰し、脾細胞を抽出した。脾細胞浮遊液をメッシュ(ポアサイズ:70 μ m)に通し、組織片を除去した。遠心分離後、上清を除去し、ACK bufferを加え十分に混合させた。そこに、FACS bufferを加え遠心分離し上清を除去した後、FACS bufferに懸濁してメッシュに通した。この脾細胞調製液に抗Fc γ 受容体抗体(2.4G2)を加え、氷上で15分間静置してFc γ 受容体をブロックした。さらに、以下のビオチン化抗体、抗マウスCD105、抗マウスCD19、抗マウスCD11b、抗マウスCD45R、抗マウスCD11c、抗マウスNK1.1、抗マウスMHC Class II、抗マウスCD4抗体を加え、氷上で30分間静置した。その後、余分な抗体を洗浄除去し、Streptavidin Particles Plus-DMを加え30分間静置後、IMag装置でNegative selectionを行った。吸着しなかった画分に対して、再度、negative selectionを行い、非吸着画分を回収した。RPMI培地で洗浄後、RPMI培地に懸濁して実験に供した。

6. PD-1 分子の FACS 解析

単離したCD8⁺T細胞(2×10^6 cells/ml)を予め抗CD3 ϵ 抗体を固相化した96ウェルプレートの各ウェルに0.1 mLずつ播種し、ベツリンあるいは誘導体Aを添加して3日間処置(5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C)した。処置した細胞を回収しFACS bufferで洗浄後、抗Fc γ 受容体抗体(2.4G2)を加え、氷上で15分間静置してFc γ 受容体をブロック

した。さらに、蛍光色素で標識された抗 PD-1 抗体で 30 分間処置した。余分な抗体を洗浄除去後、7AAD を添加してフローサイトメーター (FACSCanto II, 日本 BD) により測定した。

7. 細胞毒性の評価

10% FBS を含む DMEM 培地 (GIBCO) で B16F10 細胞を 4×10^4 個/ml に調製し、96 ウェルプレート (Corning) に各ウェル当たり 4×10^3 個を播種した。細胞がプレートに接着後、化合物を各濃度で添加し、インキュベーター内 (37°C, 5% CO₂) で 48 時間培養した。コントロールにはジメチルスルホキシドを同様に添加した。培養終了後、各ウェルの培地を、WST-1 (Wako) を 5% 含む 10% FBS - DMEM 培地に交換し、さらに 4 時間培養した後、波長 450 nm における吸光度を測定した。

8. PD-L1 分子の FACS 解析

試験管内で培養した EG7 細胞に種々の濃度で誘導体 A を添加し、37°C, 5% CO₂ 存在下で 1-3 日間処置した。細胞を洗浄後、蛍光色素で標識された抗 PD-L1 抗体で処置した。余分な抗体を洗浄除去後、7AAD を添加してフローサイトメーター (FACSCanto II, 日本 BD) により測定した。

9. 統計処理

測定値の有意差検定は、Student の t 検定により行った。

結 果

EG7 細胞の皮下移植モデルにおけるベツリン誘導体 A の抗腫瘍効果と抗 PD-1 抗体との併用効果

EG7 細胞の皮下移植モデルを用いて、ベツリン誘導体 A (以下、誘導体 A) の抗腫瘍効果について検討した (Fig. 1A)。EG7 移植後 2 日目より 16 日目まで誘導体 A を腫瘍内に直接投与したところ、対照群に比較して腫瘍の増殖が有意に抑制された。EG7 細胞は卵白アルブミン (OVA) をモデル抗原として細胞表面に発現するがん細胞であり、OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞が誘導されやすいと考えられる。そこで、抗 CD8 α 抗体により CD8 陽性 T 細胞を除去したマウスを用いて、誘導体 A の抗腫瘍効果における CD8 陽性 T 細胞の関与について検討した (Fig. 1B)。その結果、CD8 陽性 T 細胞を除去したマウスでは腫瘍の増殖が亢進し、誘導体 A の抗腫瘍効果は減弱した。このことから、誘導体 A の抗腫瘍効果には CD8 陽性 T 細胞が関与していることが示唆された。

癌抗原特異的な CD8 陽性 T 細胞による腫瘍傷害作用は、極めて特異的かつ強力であることが知られているが、

がん細胞は PD-1/PD-L1 経路などを介して CD8 陽性 T 細胞からの攻撃を回避している³⁾。実際、EG7 皮下移植マウスモデルにおいて高用量の抗 PD-1 抗体を投与すると腫瘍の増殖は顕著に抑制された (データ省略)。そこで、抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果に及ぼす誘導体 A の影響を明らかにするため、EG7 皮下移植マウスモデルを用いて両者の併用効果について検討した (Fig. 2)。その結果、両者を併用することにより腫瘍の増殖は顕著に抑制されることが明らかとなった。

OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞に対する誘導体 A の影響

誘導体 A が OVA 特異的な CD8 陽性 T 細胞の誘導に影響を与えているのかを明らかにするため、腫瘍移植後 17 日目に腫瘍を摘出して細胞懸濁液を調製し、OVA テトラマーを用いて OVA 特異的な CD8 陽性 T 細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。その結果、誘導体 A の投与により OVA 特異的な CD8 陽性 T 細胞の割合は増加したが、誘導体 A 投与群では腫瘍内に浸潤した CD8 陽性 T 細胞の腫瘍重量当たりの絶対数が対照群に比較して顕著に減少した。このため腫瘍重量当たりで比較すると、対照群と誘導体 A 投与群との間で OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞の数に明らかな差は認められなかった (データ省略)。

そこで、誘導体 A の抗腫瘍メカニズムについて、免疫抑制解除の視点から OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞における PD-1 分子に着目し、その発現量をフローサイトメトリーにより解析した (Fig. 3A)。その結果、誘導体 A 投与群では腫瘍内に浸潤した OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞における PD-1 分子の発現量が低下している傾向が認められた (Fig. 3B)。

この PD-1 分子の発現低下が誘導体 A の直接的な作用に依るのかを明らかにするため、マウス脾臓から調製した CD8 陽性 T 細胞を用いて、抗 CD3 ϵ 抗体及び抗 CD28 抗体で刺激した際の PD-1 分子の発現誘導に対する誘導体 A の影響を検討した (Fig. 4)。その結果、誘導体 A は検討した濃度範囲において PD-1 分子の発現を有意に抑制しなかった。これらのことから、誘導体 A 投与群で認められた OVA 特異的 CD8 陽性 T 細胞における PD-1 分子の発現量の低下は、CD8 陽性 T 細胞に対する誘導体 A の直接的な作用に依るものではないと考えられた。

EG7 細胞における PD-L1 分子の発現に対する誘導体 A の影響

抗 PD-1 抗体の抗腫瘍効果は、がん細胞上に PD-1 分子のリガンドである PD-L1 分子が増加することで増強されることが報告されている⁴⁾。そこで、EG7 細胞上の

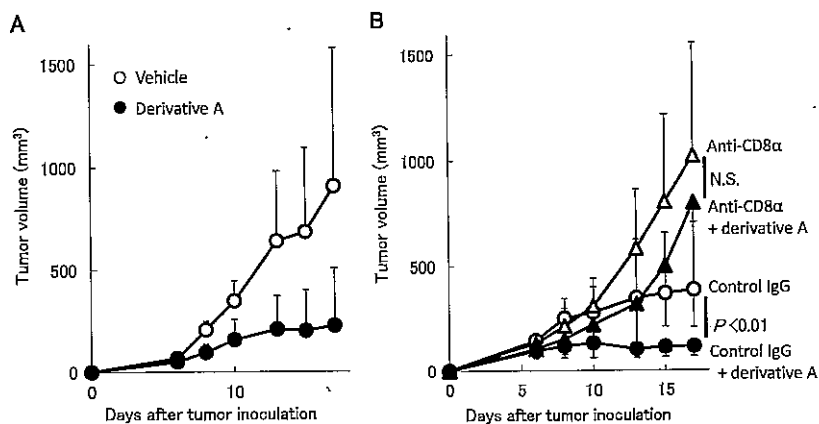


Figure 1 Effects of a derivative A on the growth of EG7 T lymphoma in mice.

(A) EG7 cells were subcutaneously inoculated into mice on day 0. Derivative A was intratumorally administered once daily until day 16 starting 2 days after tumor inoculation. Tumor volume was evaluated 2 or 3 times in a week. Data are expressed as mean \pm S.D. of 6 mice. (B) EG7 cells were subcutaneously inoculated into naïve or CD8T cell-depleted mice on day 0. Derivative A was administered in the same way as in (A). Data are expressed as mean \pm S.D. of 10 mice of sum of two independent experiments. N.S.: not significant.

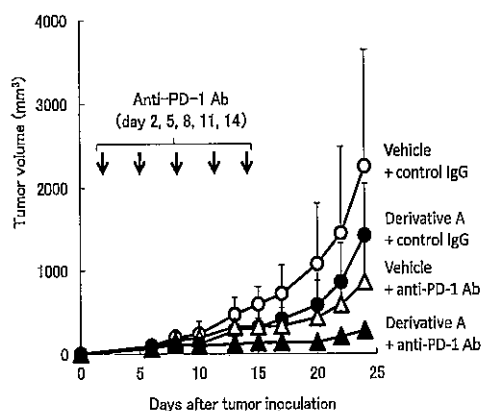


Figure 2 Combined effects of derivative A and anti-PD-1 antibody on the growth of EG7 T lymphoma in mice.

EG7 cells were subcutaneously inoculated into mice on day 0. Derivative A was intratumorally administered once daily until day 16 starting 2 days after tumor inoculation. Anti-PD-1 antibody or control IgG was injected intravenously on the indicated days. Tumor volume was evaluated 2 or 3 times in a week. Data are expressed as mean \pm S.D. of 6 mice.

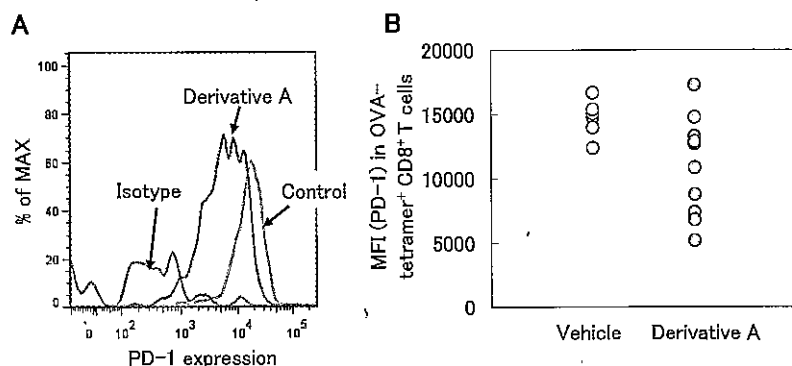


Figure 3 Effects of derivative A on expression of PD-1 on OVA-specific CD8⁺ T cells.

EG7 cells were subcutaneously inoculated into mice on day 0. Derivative A was intratumorally administered once daily until day 16 starting 2 days after tumor inoculation. On day 17, tumor nodules were resected and digested with collagenase to prepare tumor infiltrated lymphocytes. The prepared cells were treated with fluorescence-labeled OVA tetramer, anti-CD8 α Ab and anti-PD-1 Ab, and then, analyzed with flow cytometer. (A) A representative histogram of PD-1 expression. (B) Mean fluorescent intensity of PD-1 expression on OVA-tetramer⁺CD8 α ⁺PD-1⁺ cells from vehicle- or derivative A-treated mice. Data are expressed as mean \pm S.D. of 7 or 10 mice.

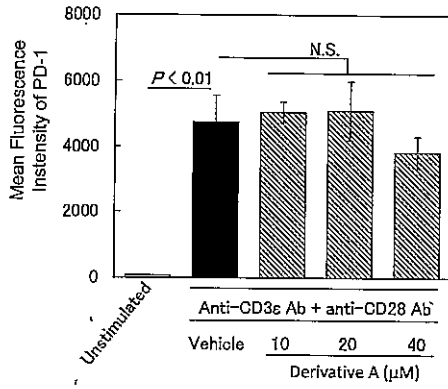


Figure 4 Effects of derivative A on expression of PD-1 on OVA-specific CD8⁺ T cells *in vitro*.

CD8⁺T cells were prepared from spleen cells of mice and treated with derivative A in a multiwell plate coated with anti-CD3 ϵ and anti-CD28 Abs for 3 days. Then, cells were collected and stained with fluorescence-labeled anti-PD-1 Ab and analyzed with flow cytometer. Data are expressed as mean \pm S.D. of triplicate wells. N.S.: not significant.

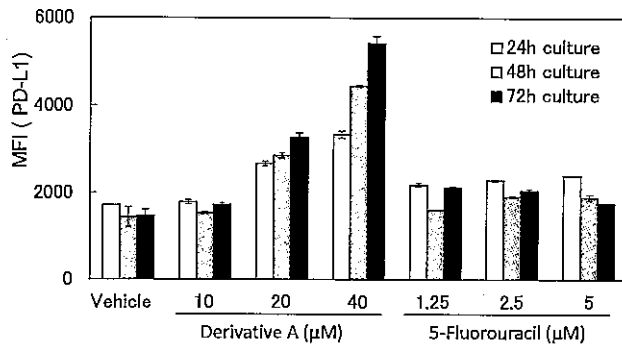


Figure 5 Effects of derivative A on expression of PD-L1 on EG7 cells *in vitro*.

EG7 cells were treated with derivative A or 5-fluorouracil for 24 to 72 h, and then, stained with fluorescence-labeled anti-PD-L1 Ab and analyzed with flow cytometer. Data are expressed as mean \pm S.D. of triplicate wells.

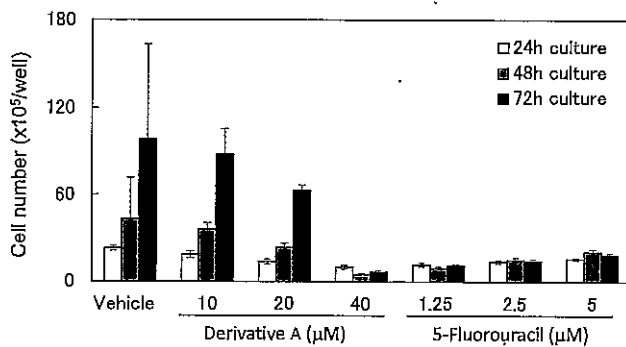


Figure 6 Effects of derivative A on proliferation of EG7 cells *in vitro*.

EG7 cells were treated with derivative A or 5-fluorouracil for 24 to 72 h. Then, cell were collected and counted with a hemocytometer. Data are expressed as mean \pm S.D. of triplicate wells.

PD-L1分子の発現に与える誘導体Aの影響について検討した (Fig.5). 試験管内で培養したEG7細胞に誘導体Aを添加し1~3日間処置したところ、処置した濃度に依存してEG7細胞膜上にPD-L1分子の発現が誘導されることが分かった。

一方、作用が認められた濃度範囲においてEG7細胞の増殖能も有意に抑制された (Fig.6). このことから、PD-L1分子の発現抑制が細胞増殖阻害の結果である可能性が考えられた。そこで、5-フルオロウラシルを用いてEG7細胞の増殖能を強く抑制する濃度においてPD-L1分子の発現に及ぼす影響を検討した (Fig.5). その結果、5-フルオロウラシルはPD-L1分子の発現には影響を与えなかった。これらのことから、誘導体AはEG7細胞の増殖能を阻害するとともに、PD-L1分子の発現を顕著に増強することが明らかとなった。

考 察

我々はこれまで、白樺成分のベツリンが免疫系の増強作用を介して抗腫瘍効果を発揮する可能性を見出し、その有効性の増強を図る目的で種々の誘導体合成と担癌マウスを用いた薬効評価を進めてきた。その結果、ベツリンにカルバメート構造やアミノ酸を付加させた誘導体に、顕著な抗腫瘍効果が認められることを報告してきた^{5,6)}。しかし、それら誘導体は強い炎症誘導作用や正常細胞に対する毒性を示したことから、より副作用が少なく、かつ、高い抗腫瘍効果を示す化合物を開発する必要があった。

今回新たに開発した誘導体Aは、本研究で示したEG7リンパ腫の皮下移植マウスモデルに加えて、B16メラノーマの皮下移植マウスモデルにおいても顕著な腫瘍増殖抑制作用を示す一方で、これまでの誘導体で認められたような明らかな炎症誘導作用は認められていない(データ省略)。この点については副作用がある程度は改善されたと考えている。しかし、正常細胞に対する毒性の評価は今後の課題であることから、引き続き注意深く検討を進めたい。

本研究で用いたEG7細胞はOVAをモデル抗原として発現するがん細胞であることから、EG7細胞の皮下移植モデルではOVA特異的なCD8陽性T細胞が誘導されやすいと考えられる。実際、当該モデルではCD8陽性T細胞を除去することにより腫瘍の増殖は顕著に亢進すること、また抗PD-1抗体の治療効果が強く認められることから、腫瘍の排除におけるCD8陽性T細胞の関与を検出しやすい評価系と言える。これらのことから、本研究では、誘導体Aに抗PD-1抗体の治療効果に対する増強作用を認めたが、当該モデルの特徴を考慮すると、他の担がんマウスモデルを用いた検討がさらに必要であ

ると考える。

一方、誘導体AがEG7細胞に対してPD-L1分子の発現を強く誘導した点については興味深い。PD-L1分子の発現増加が抗PD-1抗体の治療効果の増強に繋がる可能性があることが報告されていることを考えると、他のがん種に対しても誘導体Aが同様の作用を示すのか検討を進める必要がある。今後、その分子メカニズムも含めて、誘導体Aの有用性について詳細に検討を進める予定である。

謝 辞

本研究の一部はJSPS科研費15K08041の助成を受けて実施された。

文 献

- 1) Kawakami Y., Yaguchi T., Sumimoto T., Kudo-Saito C., Iwata-Kajihara T., Nakamura S., Tsujikawa T., Park J. H., Popivanova B. K., Miyazaki J., Kawamura N., Improvement of cancer immunotherapy by combining molecular targeted therapy., *Front Oncol.*, **28**(3), 136-143 (2013)
- 2) 高津聖志、小笠原勝、松永孝之：発明の名称「がん免疫抑制解除剤及びがん免疫治療用組成物」(特許第5548874号、平成26年5月30日登録)
- 3) Robert C., Long G. V., Brady B., Dutriaux C., Maio M., Mortier L., Hassel J. C., Rutkowski P., McNeil C., Kalinka-Warzocha E., Savage K. J., Hernberg M. M., Lebbé C., Charles J., Mihalciou C., Chiarion-Sileni V., Mauch C., Cognetti F., Arance A., Schmidt H., Schadendorf D., Gogas H., Lundgren-Eriksson L., Horak C., Sharkey B., Waxman I. M., Atkinson V., Ascierto P. A., Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without *BRAF* Mutation. *N. Engl. J. Med.*, **372**, 320-330 (2015).
- 4) Zhang J., Bu X., Wang H., Zhu Y., Geng Y., Nihira N. T., Tan Y., Ci Y., Wu F., Dai X., Guo J., Huang Y. H., Fan C., Ren S., Sun Y., Freeman G. J., Sicinski P., Wei W., Cyclin D-CDK4 kinase destabilizes PD-L1 via cullin 3-SPOP to control cancer immune surveillance., *Nature.*, **553**(7686), 91-95 (2018)
- 5) 小笠原勝、松永孝之、大戸幹也、川筋透、長井良憲、高津聖志：ベツリン誘導体の抗腫瘍効果の検討、富山県薬事研究所年報、**43**, 17-21 (2016)
- 6) 小笠原勝、松永孝之、大戸幹也、川筋透、長井良憲、高津聖志：アミノ酸付加ベツリン誘導体の抗腫瘍効果

の検討, 富山県薬事研究所年報, 44, 17-20 (2017)