実験技術

がん免疫療法の評価動物モデルの現状と課題

三重 元弥, 高橋 健

要約: 近年, ヒト型抗ヒト CTLA-4 モノクローナル抗体イピリムマブの米国での悪性黒色腫に対する承認を皮切りに, ヒト型抗ヒト PD-1 モノクローナル抗体のニボルマブあるいはペムブロリズマブが, 悪性黒色腫患者の他, 肺がん患者等を対象とした臨床試験で有効性を示すなど, がん免疫療法は目覚ましい進歩を遂げている。がん免疫療法は, 進行期のがん患者に生存期間の延長効果を示すのみならず, 長期に渡って治療効果を持続させることも明らかになり, 新しい治療法として脚光を浴びている。その一方で, 免疫の調節変動がもたらしたと考えられる自己免疫反応等の, 化学療法では認められにくい副作用が発現することも懸念される。新しいがん免疫療法の開発が, 今後増加していくことが予想されるが, 効果的な研究開発のためには, その有効性に加え, 安全性も適切に評価できるモデルが必要とされる。抗腫瘍活性を評価するモデルとしては, 従来から抗がん薬の評価に用いられているシンジェニックモデルや外来遺伝子導入株などの移植モデル, 化学発がんモデルや Genetically Engineered Mouse Model (GEMM) などの自然発症モデル, また, 近年開発がすすめられている免疫ヒト化マウスモデルなど多岐にわたるが, 免疫感受性の違いや異所性および異種性といった課題がある。ここでは, 免疫チェックポイント分子阻害薬の反応性を中心に, それぞれの特徴および課題等を紹介する。また, がん免疫療法では免疫関連有害事象 (irAE) が重篤な副作用として問題となるが, モデルを用いた予測についての現状も概説する。

1. はじめに

体の免疫系を利用してがんを攻撃するコンセプトに基づくがん免疫療法は, 1890 年代ニューヨークの外科

医ウィリアム・コーリーによる非特異的免疫療法に始まる。その後, 100 年にわたり長き低迷の時期が続いたが, 2011 年 3 月に米食品医薬品局 (FDA) によるヒト型抗ヒト CTLA-4 モノクローナル抗体 (イピリムマブ) の切除不能又は転移性悪性黒色腫に対する治療薬としての承認が, 大きなブレイクスルーとなった。現在, ヒト型抗ヒト PD-1 モノクローナル抗体であるニボルマブおよびペムブロリズマブが, 悪性黒色腫に対してイピリムマブよりも臨床的に有効性を示す (1, 2) など, がん免疫療法は目覚ましい進歩を遂げている。

がん免疫療法は進行期のがん患者に対して生存の延長効果を示すのみならず, 投薬中止後も長期に渡って治療効果を持続させることが明らかになり, 新しい治療法として脚光を浴びている。その一方で, 免疫関連有害事象のような自己免疫反応を引き起こす可能性が懸念される。新しいがん免疫療法の開発が, 今後も増加していくことが予想されるが, 効果的な研究開発のためには, その有効性および安全性を適切に評価できるモデルが必要とされる。

2. シンジェニックモデル

化学療法薬の開発における代表的な薬効評価モデルを表 1 に掲げる。ゼノグラフト (xenograft) と呼ばれる, ヒトのがん細胞株を免疫不全動物 (ヌードマウス, SCID マウス等) に移植した異種移植マウスは, がん細胞, 特にヒトがん細胞を標的とした抗がん薬 (化学療法剤, 分子標的薬剤等) の評価に用いられている。これらのモデルは免疫細胞である T 細胞および B 細胞等を欠損していることから, 獲得免疫を機序とした免疫療法の評価には適さない。したがって, これらの評価には免疫系を完全に保持しているシンジェニック (syngeneic) モデルが用いられる。シンジェニックモ

キーワード: がん, 免疫療法, 動物モデル, 免疫チェックポイント

協和発酵キリン株式会社 研究開発本部・がん R&D ユニット・がん研究所 (〒411-8731 静岡県駿東郡長泉町下土狩 1188)

E-mail: motoya.mie@kyowa-kirin.co.jp 原稿受領日: 2016 年 1 月 28 日, 依頼原稿

Title: Current condition and issues of animal evaluation models for cancer immunotherapy

Author: Motoya Mie, Takeshi Takahashi

表1 主要ながんモデル

移植モデル		自然発がん	
異種移植	同種移植モデル	化学発がんモデル	遺伝子改変
Xenograft transplantation	Syngeneic transplantation	Chemically-induced tumor	Genetically Engineered Mouse Model (GEMM)
ヒトがん細胞を免疫不全動物に移植	マウスがん細胞を同種同系マウスに移植	発がん物質による発がん誘導	遺伝子改変による発がん誘導

表2 マウスがん細胞株の免疫原性

免疫原性が高い			免疫原性が低い	
CT26	4T1	RENCA	LLC	B16
大腸がん	乳がん	腎細胞がん	肺がん	悪性黒色腫

デルは、マウス由来のがん細胞株を同系のマウスに移植したものであり、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) が同一であるため、拒絶されることなく生着する。

大腸がん細胞 CT26、乳がん細胞 4T1、腎細胞がん RENCA、肺がん細胞 LLC、悪性黒色腫 B16 等が、シンジェニックモデルとしてよく用いられる腫瘍である。これらのモデルは腫瘍微小環境における免疫状態の違いから、免疫原性の高いモデル (highly immunogenic) と低いモデル (poorly immunogenic) の2種類に分けられる(3) (表2)。免疫原性が高いと分類される CT26、RENCA および 4T1 モデルの腫瘍環境では、MHC class I 分子および免疫関連遺伝子発現が上昇している。逆に、免疫原性が低いと分類される LLC および B16 はこれらの発現が低い。これらの免疫原性因子の発現と腫瘍増殖の速度は逆相関し、免疫療法に対する反応性に大きく寄与することが報告されている(4)。この他にも免疫原性は遺伝子変異との関連も報告されている。腫瘍では多数の体細胞変異が認められるが、このような変異を含むエピトープは免疫原性を有する(5-7)。がん免疫療法薬の作用機序解析あるいは免疫療法の研究開発といった、種々の目的に応じて、また、それぞれの特性に応じてモデルの使いわけがされている。

シンジェニックモデルは、凍結することにより腫瘍組織、細胞を維持することが可能なことから、動物への皮下移植という簡便な方法によりモデル構築が可能である。また、がん形成までの期間が、後述する発がんモデル等に比べ短期間であることが利点である。一方、皮下移植モデルはがん本来の臓器におけるがん形成を解析できないという異所性の課題がある。また、マウス由来のがん細胞をマウスに移植することから、がんおよび免疫系がマウス由来であるというヒト・マウスといった異種性の課題がある。

シンジェニックモデルを用いた CTLA-4 および PD-1 などの免疫チェックポイント分子阻害薬の評価では、ワクチンとの併用効果が多数報告されている(8-11)。CTLA-4 および PD-1 は T 細胞上に発現し、抑制性シグナルを伝達することで免疫抑制機能を発揮する。抗 CTLA-4 抗体および抗 PD-1 抗体は、これらの分子を阻害することで、腫瘍微小環境の免疫抑制状態を解除し、腫瘍を退縮させる。例えば、悪性黒色腫 B16 皮下移植モデルの腫瘍増殖に対して、抗 CTLA-4 抗体は腫瘍ワクチン GVAX (B16 に GM-CSF を遺伝子導入し X 線照射した腫瘍) を併用することにより腫瘍を完全に拒絶する(9)。一方、本モデルを含め多くのシンジェニックモデルで、抗体単独では効果を示さないが、ヒトでは抗 CTLA-4 抗体イピリムマブが、単独でも効果を示していることから(12)、より適切なモデルが求められる。

3. 外来遺伝子導入株

がん細胞に外来抗原を導入したモデルは、古くから用いられている卵白アルブミン (OVA) を導入したモデル(13)、最近ではヒト精巣抗原 NY-ESO-1 を導入したモデルが知られる(14, 15)。これら特定の抗原を導入したモデルの利点は、抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) やヘルパー T 細胞のエピトープが決定されていることにある。これにより抗原特異的 CTL の検出や活性の測定が可能となり、抗腫瘍免疫応答の解析が容易となる (図1)。

悪性黒色腫 B16 は 1970 年代に樹立され、固形腫瘍の形成と転移のモデルとして古くから用いられているモデルであるが、上述したように免疫原性の低いモデルとして知られている(16, 17)。B16 に人工的な外来抗原 SIY を導入した B16-SIY モデルでは、抗 CTLA-4 抗体が単独では部分的な抗腫瘍効果を示し、抗 PD-1

図1 抗腫瘍免疫応答の解析

抗体を併用することでほぼ完全な腫瘍退縮が認められる(18). ヒトでも抗 CTLA-4 抗体および抗 PD-1 抗体の併用は進行性悪性黒色腫患者の約半数で, 長期間の腫瘍縮小効果が得られることから(19), ヒトの一面面を反映したモデルといえる.

B16-SIY モデルでは, 抗 CTLA-4 抗体および抗 PD-1 抗体の併用により CTL が増加し, さらに抗原ペプチドに対する反応性が全身性に上昇していることから, 抗腫瘍効果とともに抗原特異的免疫応答が成立していることが示されている(18). OVA を導入した B16 は, 野生株に比較して, 腫瘍内の CD8⁺T 細胞の浸潤の増加と IFN- γ や granzyme などのエフェクター分子の発現の亢進が認められ, T-cell-inflamed な腫瘍環境となっている(20). 外来抗原の導入により免疫原性が向上したことが, 免疫療法の評価に適したモデルとなっている要因のひとつと考えられる.

4. 発がんモデル

1) 化学発がんモデル

化学発がんモデルは, 非遺伝毒性的な発がん機構の解析に用いられるモデルである. がんの形成過程における相反する免疫応答, すなわち, がんの進展やこれに対抗しがんの排除を司る 2 つの異なる免疫システムの解析に有用なモデルのひとつと考えられる. また, 化学物質が暴露された臓器における発がん解析および形成したがんに対する薬物の評価等が可能であり, 異所性の課題はない. メチルコラントレン (MCA) を用いたマウスの繊維肉腫モデル(21), AOM/DSS による大腸発がんモデル(22) や, DMBA/TPA 塗布による 2 段階皮膚腫瘍形成モデル(23) などが知られる.

2) Genetically Engineered Mouse Model (GEMM)

よりヒト病態に近づくことを意図したモデルとして, 臨床的にみられる遺伝子異常やシグナルの異常をマウスに導入した GEMM と呼ばれる遺伝子改変モデルが報告されている.

サルポリオーマウイルスである SV40 の T 抗原は, がん抑制経路に参与する p53 や Rb を不活化することにより細胞をがん化する. これを利用して, 組織特異

的に SV40 を導入したトランスジェニックマウスを作成することにより, 前立腺がん, 膵臓がん, 卵巣がんやメラノーマといった多様なモデルが開発されている(24-28). これらのモデルは, 臓器特異的に腫瘍を形成し, しばしば転移を誘発することから, がんの発生が本来みられる臓器, また原発巣からの転移を解析できる点で皮下移植モデルに比較して有用である.

臓器特異的にがん遺伝子を導入あるいは欠失させたモデルも開発されている. $\text{Braf}^{\text{V600E}}/\text{Pten}^{-/-}$ モデルはマウスのメラノサイト特異的に $\text{Braf}^{\text{V600E}}$ 変異が発現し, かつ, がん抑制遺伝子である Pten を欠失するように設計され, 悪性黒色腫の自然発生およびリンパ節転移や肺転移が認められる(29). BRAF 遺伝子は, 細胞増殖および細胞内のシグナル伝達に参与する因子であるが, 転移性悪性黒色腫患者の約半数で BRAF 遺伝子に V600E 変異がみられ, この変異体のがんの増殖および生存を促進していると考えられている(30). 同様のモデルに多くの腫瘍組織で蓄積が観察される β -カテニンを安定化させる遺伝子操作を施すと, 興味深いことに腫瘍内のリンパ球浸潤が認められなくなる(31). 実際, β -カテニンシグナルが活性化している悪性黒色腫患者の腫瘍では, リンパ球の浸潤が認められない. 最近このような腫瘍状態を non-T-cell-inflamed と呼ぶことがある. このような患者では, 抗 CTLA-4 抗体あるいは抗 PD-1 抗体の効果が期待できないが, non-T-cell-inflamed の機序を解析することで, 免疫療法に対する感受性を高める治療法の開発が可能になると考えられる. $\text{Braf}^{\text{V600E}}/\text{Pten}^{-/-}$ のような GEMM はこのような研究の一つ手段として有効であると考えられる.

5. 免疫系ヒト化マウス

シンジェニックモデルおよび GEMM は, マウスの免疫系の上に成り立つモデルであるため, 免疫チェックポイント分子を標的とした抗体の評価には, マウスに対する抗体をサロゲート抗体として用いて評価されるのが一般的である. 抗ヒト CTLA-4 抗体であるイビリムマブあるいは抗ヒト PD-1 抗体であるニボルマブを用いて評価するためには, 免疫系ヒト化マウスの利用が考えられる. ヒト造血幹細胞あるいは末梢血単核球 (PBMC) をマウスに移植することにより, ヒトの免疫系をマウスに再構築したヒト化マウスが, 免疫学研究に利用されている(32).

免疫不全マウス ($\text{Rag2}^{-/-}\text{IL2R}\gamma$ null) に胃がん患者の PBMC を移植したマウスに, 同一患者の胃がん組織を移植したモデルでは, ニボルマブ投与により有意な抗腫瘍効果を示すことが報告されている(33). このよ

表3 免疫チェックポイント分子阻害で障害をうける臓器

種	CTLA-4		PD-1	
	マウス	ヒト	マウス	ヒト
阻害方法	ノックアウト	イピリムマブ	ノックアウト	ニボルマブ
障害が報告される臓器	肝臓 心臓 肺 脾臓	皮膚* 消化管* 肝臓* 内分泌腺* 神経系*	腎臓	皮膚 消化管* 肺* 内分泌腺 肝臓* 腎臓
文献	37	35	41	36

* : Grade 3 以上

うなマウスにヒトの免疫系と腫瘍微小環境を再構築したモデルを用いることにより、他のモデルに比べて、ヒトを反映した評価が可能であると思われる。しかし、微量の臨床検体を用いた評価には自ずと限界がある。

HLA (human leukocyte antigen) class I 分子を強制発現したマウスを用いたヒト化マウスは、この問題を解決する可能性がある。通常のヒト化マウスでは、ヒト T 細胞がマウスの体内で分化することから HLA 拘束性に免疫応答を誘導できない。このため、CTL 誘導を機序とした免疫応答の解析には使えない。欧米人に多い A2 型の HLA class I を発現する免疫不全マウスに造血幹細胞を移植したモデルでは、EB ウイルスの感染に対し、HLA 拘束性の CTL の機能的かつ持続的な産生が認められることが報告されている (34)。今後の研究の進展が期待される。

6. 有害事象の予測

抗腫瘍活性と自己免疫様の有害事象は、両刃の剣である。イピリムマブの副作用として腸炎、皮膚炎および肝障害といった重症の免疫関連有害事象 (irAE) が報告されている (35)。一方、抗 PD-1 抗体の有害事象は、比較的軽微といわれる (36)。動物モデルを用いて、これらを予測可能にすることが、今後の新たな免疫療法薬の開発に重要になってくる。

CTLA-4 KO マウスは、広範な自己免疫症状と T 細胞の活性化を示し (37)、抗マウス CTLA-4 抗体投与によって、自己免疫病態が増悪することが報告されているが (38, 39)、担がんマウスを用いた抗腫瘍効果を検討した報告では、有害事象に関する記述はほとんど見当たらない。免疫ヒト化マウスにイピリムマブを処置すると、組織への T 細胞浸潤を伴った肝障害や副腎炎など自己免疫症状が惹起される (40)。PD-1 KO マウスは自己免疫疾患を発症するが (41)、抗体投与による副作用の報告はない。

このように自己免疫様の症状は、動物モデルでも発

現するが、ヒトにおける有害事象のリスクは、発現する部位や程度に関して完全に予測可能とは言えない (表 3)。今なお、新たな免疫チェックポイント分子阻害薬の臨床試験は進行中である。今後、ヒト情報および動物モデルを用いた体系的な評価が待たれる。

7. おわりに

がん免疫療法を評価するモデルは、数多く報告されており、今回その一部を紹介した。モデル作製に要する技術、期間およびスルプットも考慮すれば、画一したモデルは、今なお存在せず、目的に応じた最適なモデルを種々選択する必要があると考えられる。また、移植モデルでは、異所性およびヒト・マウスの違いによる異種性の課題も残されており、さらに改良されたモデルが、開発されていくことが期待される。

これらのモデルを用いた薬の評価および機序解析が、精力的に行われ、新しい免疫療法の開発に貢献し、多くの患者に恩恵がもたらされることを期待したい。

著者の利益相反：三重元弥，高橋 健（協和発酵キリン株式会社）。

文 献

- 1) Larkin J, et al. N Engl J Med. 2015;373:23-34.
- 2) Robert C, et al. N Engl J Med. 2015;372:2521-2532.
- 3) Chen L, et al. J Exp Med. 1994;179:523-532.
- 4) Lechner MG, et al. J Immunother. 2013;36:477-489.
- 5) Yadav M, et al. Nature. 2014;515:572-576.
- 6) Kim K, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111:11774-11779.
- 7) Kreiter S, et al. Nature. 2015;520:692-696.
- 8) Hurwitz AA, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:10067-10071.
- 9) van Elsas A, et al. J Exp Med. 1999;190:355-366.
- 10) Hurwitz AA, et al. Cancer Res. 2000;60:2444-2448.
- 11) Williams EL, et al. Clin Cancer Res. 2013;19:3545-3555.
- 12) Hodi FS, et al. N Engl J Med. 2010;363:711-723.
- 13) Klimuk SK, et al. J Invest Dermatol. 2004;122:1042-1049.
- 14) Nishikawa H, et al. J Clin Invest. 2006;116:1946-1954.
- 15) Junqueira C, et al. PLoS One. 2012;7:e36245.
- 16) Celik C, et al. Cancer Res. 1983;43:3507-3510.
- 17) Porgador A, et al. Cancer Res. 1995;55:4941-4949.
- 18) Spranger S, et al. J Immunother Cancer. 2014;2:3.

- 19) Wolchok JD, et al. *N Engl J Med*. 2013;369:122-133.
- 20) LeMercier I, et al. *Cancer Res*. 2014;74:1933-1944.
- 21) Gubin MM, et al. *Nature*. 2014;515:577-581.
- 22) Tang RJ, et al. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6:71.
- 23) Winkler AE, et al. *Cancer Res*. 2011;71:5707-5716.
- 24) Masumori N, et al. *Cancer Res*. 2001;61:2239-2249.
- 25) Guy CT, et al. *Mol Cell Biol*. 1992;12:954-961.
- 26) Mukherjee P, et al. *J Immunol*. 2000;165:3451-3460.
- 27) Connolly DC, et al. *Cancer Res*. 2003;63:1389-1397.
- 28) Bradl M, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:164-168.
- 29) Dankort D, et al. *Nat Genet*. 2009;41:544-552.
- 30) Chapman PB, et al. *N Engl J Med*. 2011;364:2507-2516.
- 31) Spranger S, et al. *Nature*. 2015;523:231-235.
- 32) Shultz LD, et al. *Nat Rev Immunol*. 2007;7:118-130.
- 33) Sanmamed MF, et al. *Cancer Res*. 2015;75:3466-3478.
- 34) Shultz LD, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:13022-13027.
- 35) Tarhini A, et al. *Scientifica (Cairo)*. 2013;2013:857519.
- 36) Gettinger SN, et al. *J Clin Oncol*. 2015;33:2004-2012.
- 37) Waterhouse P, et al. *Science*. 1995;270:985-988.
- 38) Wang HB, et al. *J Immunol*. 2001;166:6430-6436.
- 39) Luhder F, et al. *J Exp Med*. 1998;187:427-432.
- 40) Vudattu NK, et al. *J Immunol*. 2014;193:587-596.
- 41) Nishimura H, et al. *Immunity*. 1999;11:141-151.