免疫チェックポイント

1) 免疫チェックポイントの機能と がん治療への応用 —ニボルマブの発明—

岩井 佳子

Key words 免疫チェックポイント, PD-1, ニボルマブ

はじめに

2018年12月にJames P. Allison博士（米国テキサス大学教授）と本庶佑博士（京都大学特別教授）が「免疫抑制の阻害によるがん療法の発見」の功績によりノーベル生理学・医学賞を共同受賞した。筆者は1998年から2004年まで本庶研究室に在籍し、免疫チェックポイント阻害剤PD-1抗体ニボルマブの開発に携わったので、本稿では、当時どのように研究開発が進んだのかを、現場の研究者の視点から振り返りたいと思う。

※講演時のタイトルは「免疫チェックポイントの機能とがん治療への応用」でしたが、著者の希望により、本原稿におきましてはタイトルを変更しております。

1. 1998年当時の状況

私は1998年に京都大学大学院医学研究科の博士課程に進学し、大学院生として本庶研究室に入門した。当時の本庶研は40～50名の研究者からなるビッグラボで、その大半が本庶教授のメインプロジェクトである抗体のクラススイッチの研究に従事していた。私はクラススイッチではなくて、PD-1グループに配属となった。といっても、わずか2名の小さなグループだった。

当時はまだ「免疫チェックポイント」という言葉も概念も存在せず、CD28ファミリーに属する2つの受容体（CD28とCTLA-4）が存在して、PD-1はCTLA-4と構造的に類似することぐらいしかわかっていなかった。CTLA-4遺伝子は1987年にGolsteinらによって発見され¹⁾、1991

日本医科大学大学院医学研究科細胞生物学分野

116th Scientific Meeting of the Japanese Society of Internal Medicine : Symposium : 2. Immune checkpoint inhibitors ; 1) The role of immune checkpoint and its clinical application for cancer therapy—a history of nivolumab—.

Yoshiko Iwai : Department of Cell Biology, Institute for Advanced Medical Sciences, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School, Japan.

本講演は、平成31年4月27日（土）名古屋市・ポートメッセなごやにて行われた。

図1 本庶研在籍中（1998～2004）に行った研究プロジェクト（一部抜粋）

*1 順天堂大学八木田博士らとの共同研究

*2 Harvard大学Freeman博士らとの共同研究

*3 京都大学湊博士らとの共同研究

年にCD80 (B7-1) およびCD86 (B7-2) がCTLA-4のリガンドであることがLinsleyらによって発見された²⁾。当初，CTLA-4は活性化受容体だと思われていたが，1994年にBluestoneら，1995年にAllisonらによって抑制性受容体であることが示された^{3,4)}。さらに1995年にはMakらによりCTLA-4欠損マウスがGVHD (graft-versus-host disease) 様の重篤な自己免疫症状を示すことが報告された⁵⁾。

一方，PD-1遺伝子は1992年に本庶研の石田靖雅博士によってクローニングされたが⁶⁾，長い間リガンドも機能も不明であった。その後，西村泰行博士がPD-1欠損マウスを作製して研究が大きく進展した^{7,8)}。PD-1欠損マウスは遺伝的背景によってさまざまな自己免疫疾患を発症することから，PD-1は免疫寛容に関与すること，すなわちPD-1は免疫系にブレーキをかけるnegative regulator（負の制御因子）であることが明らかとなった。長いトンネルをぬけて，ちょうど光が見え始めた時期に私は入学した。

2. リガンドの同定と抗ヒトPD-1抗体の作製

入学してすぐに取り組んだのは実験材料の準備で，PD-1蛋白質の大量精製を行った。私の研究テーマは，このPD-1蛋白質を用いて，1) リガンドを探索することと，2) 抗ヒトPD-1抗体を作製することに決まった（図1）。1998年から1999年にかけて作製した5種類の抗ヒトPD-1抗体（J105, J108, J110, J116, J121）の一つが，後のニボルマブの原型となった⁹⁾。

同じ時期に，PD-1蛋白質を用いてさまざまな細胞株におけるリガンド発現のスクリーニングを行った。ある腫瘍細胞にPD-1のリガンドが発現していることを発見して，あわてて実験結果を本庶教授に手紙で知らせると，鉛筆で大きく「おめでとう」と書かれたメモが戻ってきた。その後，ハーバード大学のFreeman博士，Genetics InstituteのWood博士らとの共同研究により，PD-1の2つのリガンド，PD-L1とPD-L2が同定された^{10,11)}。この共同研究では米国研究者との間で知的財産権の問題が発生し，研究開始早々に私は記録や契約の重要性を知ることとなっ

た。さらに不運が重なった。この研究の途中で持病の慢性肝炎が悪化して、1999年7月から2000年1月までの半年間休学することとなった。病気療養のため、私はPD-1とリガンド結合の決定的瞬間を見ることができず、このときの悔しさがもっと研究を続けたいという思いへとつながった。

休学している間にPD-1の研究は進み、リガンドの同定は、PD-1による免疫抑制機構の解明へとつながった。岡崎拓博士は、生理的リガンド(PD-L1およびPD-L2)が結合するとPD-1の細胞質領域に脱リン酸化酵素SHP2が会合して、ZAP70を脱リン酸化することによって、T細胞の活性化を抑制することを示した¹²⁾。その結果、PD-1シグナルはT細胞の増殖やエフェクター機能(サイトカイン産生や細胞傷害活性)を抑制することが明らかとなった。

3. がん免疫におけるPD-1シグナルの役割

免疫抑制のしくみがわかると、次に研究者として知りたいのは、PD-1が病気の治療に役立つか、という問題だった。私は臨床医をやめて研究者を志したので、実際の医療に役立つ研究をしたいという思いがあった。人の病気は、がんや感染症のように免疫力を高めると治る病気と、アレルギーや自己免疫疾患のように免疫力を抑えると治る病気に分けられる。理論的には、免疫系を抑制するPD-1の働きを強めれば後者の治療に、逆にPD-1の働きを弱めれば前者の治療に、応用できることが予想された。個人的には自分も苦しんできたウイルスの研究に興味があったが、まずはがんの研究に集中することにした。

研究に復帰した2000年1月当時、すでにCTLA-4抗体による抗腫瘍効果がAllison博士によって報告されていて¹³⁾、PD-1研究は何をやっても二番煎じの状態だった。ただCTLA-4抗体では治らないがんがあること、CTLA-4抗体は副作用

が大きく、転移における効果はわからないことから、このあたりにねらいを定めて挑戦することにした¹⁴⁾。

実験系の構築では、CTLA-4抗体単剤では治療効果のないB16メラノーマ細胞の使用にこだわった。特に思い出に残っている3つの実験を紹介したい。

1) 発明に関わる実験

まず一つ目は、2000年夏に行った発明に関わる実験で、PD-1シグナルががん免疫に関与することをはじめて示した。私はお正月とお盆には殺生しないことを決めていて、お盆までになんとか結果を出そうとスケジューリングに苦労した。この実験では、B16細胞とPD-L1発現B16細胞を野生型マウスの皮下に移植して腫瘍増殖を比較した。PD-L1を発現させると腫瘍は増大することから、PD-1シグナルが抗腫瘍免疫を抑制していることが示唆された。本庶教授とともに京都大学の湊教授を訪ねて、この実験データを見せて相談したことがきっかけとなり、湊研との共同研究がスタートした¹⁵⁾。

2) PD-1ノックアウトおよび トランスジェニックマウスを用いた実験

この実験では、PD-L1発現B16細胞を、野生型マウス、PD-1欠損マウス、PD-1トランスジェニック(Tg)マウスの皮下に移植して腫瘍増殖を比較した。野生型マウスにくらべてPD-1欠損マウスでは腫瘍の増殖が抑えられ、PD-1Tgマウスでは腫瘍が増大したことから、PD-1阻害による抗腫瘍効果が示唆された。この実験ではノックアウトマウスとトランスジェニックマウスの結果がきれいに逆転したので、自分の仮説が正しいことを確信した。後にPD-L1を発現していないB16細胞でも、同様の結果を得た¹⁶⁾。

3) がん転移モデルを用いた実験

私は腫瘍の皮下移植実験では満足できず、「転

コントロール PD-1 抗体

図2 PD-1 抗体による抗腫瘍効果

A：肝転移モデル PD-1抗体を投与するとがんの転移が著しく抑制された。

B：ノーベル財団による発表（2018年10月1日）

移を抑制できなければよい薬にはならない」という信念のもと，“がん転移”の実験にこだわって、実験モデルを探していた。2001年に参加した国際免疫学会（ストックホルムにて開催）のポスター会場で、B16メラノーマの肝転移モデルを見つけて、帰国後すぐに試した。結果は驚くべきものだった¹⁶⁾。メラノーマが肝臓に転移すると、肝臓は黒く腫大するが、PD-1抗体を投与すると、転移は起こらず、肝臓は白いままだった（図2A）。この白い肝臓を見て、これはひょっとしたらすごい薬になるかもしれないと思った。

本庶教授からは常々独創的な研究を目指すように言われたが、私はoriginalityを別の部分に発揮し、紫色の画用紙の上に肝臓を並べて写真を撮った。この独特な色彩感覚のおかげで、2018年10月1日に行われたノーベル財団による記者会見で映し出された写真が、自分の実験データだと一目でわかり、とても嬉しかった（図2B）。

この研究で、2つの重要なことがわかった。一つは、PD-1抗体はCTLA-4抗体よりも抗がん作用が強く、副作用が小さいこと、もう一つは、がん細胞にPD-L1が発現していなくても、PD-1抗体は治療効果を有することである。これらの現象は、実際に患者さんでもよく観察される。

PD-L1が腫瘍に発現していなくてもPD-1抗体が効くメカニズムとしては、PD-L1はがん以外のさまざまな正常細胞（免疫細胞や血管細胞、実質細胞など）にも発現しており、これらのPD-L1も免疫抑制に関与していることが考えられる（図3）。免疫チェックポイント阻害剤のバイオマーカーとして、がんにおけるPD-L1発現は不十分で、その他の細胞におけるPD-L1発現の有無も考慮に入れる必要がある。

4. 臨床への応用

その後、私はどうしてもやりたかったウイルスの研究を行う機会を得た。PD-1シグナルはがんだけでなくウイルスに対する免疫も抑制し、PD-1阻害は感染症の治療にも有効であることを示した¹⁷⁾。クラススイッチではなく、PD-1グループに配属されたおかげで、好奇心のおもむくままに自由に研究を進めることができ、研究者として幸福な6年間を過ごして、2004年春に本庶研を卒業した。

以上の基礎医学的研究から生じた知財に基づき、臨床応用が進んだ。私の作製した抗ヒトPD-1抗体は、完全ヒト化され、ニボルマブ（商

図3 PD-1抗体の作用機序

2002年の論文では、がん細胞のPD-L1がT細胞上のPD-1に結合してブレーキをかけることにより、宿主の免疫監視から逃れることを示した (PNASに発表)。

2005年の論文では、がん細胞にPD-L1が発現していなくてもPD-1阻害による抗腫瘍効果があることを報告した。PD-L1はがん以外の正常な細胞にも発現してT細胞活性化を抑制する (Int Immunolに発表)。この論文はノーベル賞key publicationに引用された。

品名：オプジーボ®)となった。2006年に進行性がん(悪性黒色腫, 非小細胞肺がん, 腎細胞がんなど)に対する第1相臨床試験が米国で開始され¹⁸⁾, 2014年にニボルマブは, 世界に先駆けて本邦で悪性黒色腫の治療薬として承認された。

今後の課題としては、薬価が下がったとはいえ、依然として高額医療費の問題がある。またPD-1阻害剤の奏効率は約2割で、有効例を見分ける診断法や、無効例に対する新たな治療法の開発が望まれる。

5. 今後の課題

PD-1を標的としたがん免疫療法の利点としては、標的ががん細胞ではなく、リンパ球なので、がん細胞が突然変異を起こしても効果が長く持続するという特徴がある。またがん抗原の特異性によらない治療法なので、さまざまな種類のがんに適応が可能である。現在、PD-1抗体は悪性黒色腫に続いて、肺がん、腎細胞がん、頭頸部がん、ホジキンリンパ腫、胃がんなどが適応となり、さらにさまざまな種類のがんに適応が拡大しつつある。

おわりに

いつか自分の研究が医療の役に立つことを夢見て研究の道に進んだが、思いがけなく早く夢が実現して驚いている。留学先の恩師であるRalph M. Steinman教授に続いて、本庶教授もノーベル生理学・医学賞を受賞され、不思議なご縁を感じたが、それ以上に、開発した薬によって多くのがん患者さんの命が救われるのを見て、研究者としてこの上ない幸運と喜びを感じている。

近い将来、がんは不治の病ではなく、慢性疾

患の一つになる時代が来る。これまでは病気が治り長生きできれば幸せになると信じて研究を進めてきたが、超高齢社会においては長生きすることが本当に幸福につながるのか、考えていく必要がある。薬の研究開発だけではなく、社

会保障や尊厳死等の法整備など、さまざまな社会的問題についても真剣に考える時期にきているように思う。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文献

- 1) Brunet JF, et al : A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 328 : 267-270, 1987.
- 2) Linsley PS, et al : CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 174 : 561-569, 1991.
- 3) Walunas TL, et al : CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1 : 405-413, 1994.
- 4) Krummel MF, Allison JP : CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med* 182 : 459-465, 1995.
- 5) Waterhouse P, et al : Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science* 270 : 985-988, 1995.
- 6) Ishida Y, et al : Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* 11 : 3887-3895, 1992.
- 7) Nishimura H, et al : Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 11 : 141-151, 1999.
- 8) Nishimura H, et al : Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291 : 319-322, 2001.
- 9) Iwai Y, et al : Microanatomical localization of PD-1 in human tonsils. *Immunol Lett* 83 : 215-220, 2002.
- 10) Freeman GJ, et al : Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192 : 1027-1034, 2000.
- 11) Latchman Y, et al : PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* 2 : 261-268, 2001.
- 12) Okazaki T, et al : PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 : 13866-13871, 2001.
- 13) Leach DR, et al : Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271 : 1734-1736, 1996.
- 14) van Elsas A, et al : Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *J Exp Med* 190 : 355-366, 1999.
- 15) Iwai Y, et al : Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 : 12293-12297, 2002.
- 16) Iwai Y, et al : PD-1 blockade inhibits hematogenous spread of poorly immunogenic tumor cells by enhanced recruitment of effector T cells. *Int Immunol* 17 : 133-144, 2005.
- 17) Iwai Y, et al : PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med* 198 : 39-50, 2003.
- 18) Topalian SL, et al : Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 366 : 2443-2454, 2012.