

# 可溶性 PD-L1 の細胞傷害性 T 細胞および造血器腫瘍の予後への影響に関する研究

名古屋大学医学部附属病院  
血液内科 助教 西田徹也

## 1. 研究の背景・目的

腫瘍細胞に発現する programmed death-ligand 1 (PD-L1) は、細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) 上の programmed death-1 (PD-1) と結合することにより、CTL の疲弊化をもたらす。腫瘍の免疫監視機構からのエスケープの一因とされ、PD-1/PD-L1 の結合を阻害する抗 PD-1 抗体や抗 PD-L1 抗体は、再発・難治性古典的ホジキンリンパ腫をはじめとして様々な悪性腫瘍に対して臨床応用されている<sup>1)</sup>。PD-L1 は、高い抗原提示能を有する樹状細胞にも高発現していることから、我々は樹状細胞や K562 細胞株から作成した人工抗原提示細胞を用いて PD-L1 が CTL 誘導に促進的に作用していることを支持する結果を報告した<sup>2)</sup>。

PD-L1 は、細胞表面に発現しているだけでなく、血液中に可溶性 PD-L1 としても存在しており、悪性リンパ腫や多発性骨髄腫などの悪性腫瘍において血中可溶性 PD-L1 高値が予後不良因子になるとの報告がされており<sup>3,4)</sup>、可溶性 PD-L1 が抗原特異的 CTL など抗腫瘍免疫に対して影響を及ぼしている可能性があるが十分な検討はされていない。また、骨髄異形成症候群では CD34 陽性細胞において PD-L1 が高発現しており、メチル化阻害剤に対する治療抵抗性と関連があるとの報告<sup>5)</sup> があり、リンパ系腫瘍だけでなく、骨髄系腫瘍においても可溶性 PD-L1 が予後を予測するバイオマーカーとなる可能性がある。

本研究では、可溶性 PD-L1 の抗原特異的 CTL への影響を明らかにするとともに、骨髄系腫瘍における可溶性 PD-L1 のバイオマーカーとしての意義を検討する。

## 2. 研究の方法

### (1) 可溶性 PD-L1 の抗原特異的 CTL への影響

健常ドナーの末梢血単核球からマイクロビーズを用いて CD3 陽性 T 細胞を分離し、K562細胞株に HLA-A24+CD80/86±PD-L1 を遺伝子導入した人工抗原提示細胞 (K562+CD80/86, K562+CD80/86+PD-L1) に、サイトメガロウイルス (cytomegalovirus: CMV) pp65 由来の HLA-A24 拘束性ペプチド: QYDPVAALF をパルスした後 IL-2 存在下で共培養し、CMV 抗原特異的 CTL (CMV-CTL) を誘導した。K562+CD80/86 による誘導の際に、PD-L1 Fc キメラタンパクまたは IgG1 Fc タンパク (コントロール) を添加した。7 日毎にテトラマー法にて抗原

特異的T細胞の頻度を確認するとともに、人工抗原提示細胞によるT細胞の刺激を繰り返した。

(2) 可溶性PD-L1の造血器腫瘍における予後への影響

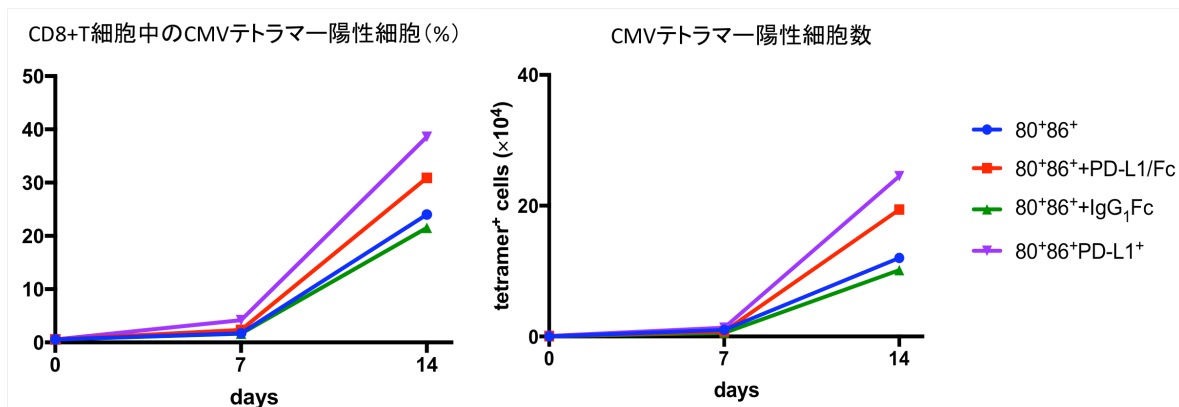
名古屋大学医学部倫理委員会で承認を受けた文書による同意を得て、骨髄異形成症候群の患者から診断時または治療開始前に採取、保存された血清または血漿を用いて、ELISA法にて可溶性PD-L1を測定した。

3. 研究結果

(1) 可溶性PD-L1の抗原特異的CTLへの影響

K562+CD80/86+PD-L1のみを培養した際に、培養上清に可溶性PD-L1が検出されたことから、24wellプレート上でペプチドパルスしたK562+CD80/86とT細胞を共培養し、トランスウェル上でK562+CD80/86またはK562+CD80/86+PD-L1を培養することで、培養上清中の可溶性PD-L1の影響を検討したが、K562+CD80/86+PD-L1から遊離する可溶性PD-L1によるCMV-CTL誘導への促進的効果は認めなかった。培養上清中の可溶性PD-L1濃度が低い可能性を考え、PD-L1 Fcキメラタンパクを用いて、CMV-CTL誘導に対する効果を検討した。可溶性PD-L1はPD-1とCD80に結合することから、まず、PD-L1 Fcキメラタンパクが細胞表面上のPD-1とCD80のいずれにも結合することを確認した。次いで、ペプチドパルスしたK562+CD80/86、K562+CD80/86+PD-L1にてCMV-CTL誘導を行い、K562+CD80/86を抗原提示細胞として用いた場合に、PD-L1 Fcキメラタンパクを添加した。これまでの報告と同様に、K562+CD80/86+PD-L1を用いた場合に、CMV-CTL誘導が最も良好であった。K562+CD80/86にPD-L1 Fcキメラタンパクを添加したものでは、コントロールに比べて誘導効率はや良かったものの、K562+CD80/86+PD-L1よりは劣っていた(図1)。

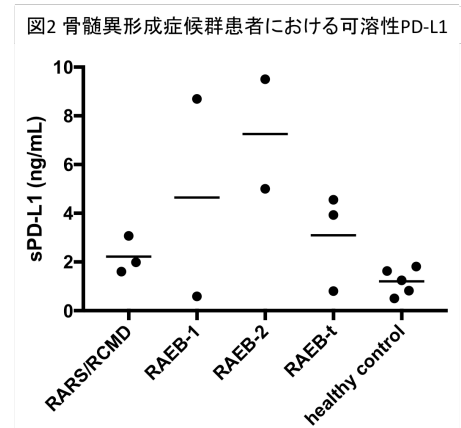
図1 CMV抗原特異的CTLの誘導



## (2) 可溶性PD-L1の造血器腫瘍における予後への影響

骨髄異形成症候群(RAEB-tを含む)の患者10人と健常人5人の保存血清または血漿を用いて可溶性PD-L1の測定を行い、骨髄異形成症候群患者では健常人に比べ、可溶性PD-L1が高値を示した(図2)。

ただし、採血後、血清分離まで室温静置した場合、時間経過に伴って可溶性PD-L1濃度が高くなっていったことから、細胞からPD-L1が遊離していることが示唆された。そのため、使用できる既存検体が少なく、予後への影響に関しては十分な検討ができなかった。



## 4. 考察

細胞表面上のPD-L1発現だけでなく、血中可溶性PD-L1も担癌患者の予後との関連が報告されているが<sup>3,4)</sup>、その機能については十分な検討はなされていない。我々は、抗原提示細胞上に発現するPD-L1がCTL誘導において促進的に作用していることを支持する結果を報告しており<sup>2)</sup>、今回の研究により、可溶性PD-L1も同様の効果を有する可能性が示唆された。PD-L1がCTL誘導において促進的に作用しているメカニズムについては、今後、解明する必要がある。また、長期にわたる刺激によるT細胞疲弊化が腫瘍の免疫監視機構からのエスケープの一因であり、CTL誘導時だけでなくT細胞疲弊化における可溶性PD-L1の関与についても検討を進める。

造血器腫瘍における可溶性PD-L1の予後との関連については、リンパ系腫瘍での報告がなされているが、骨髄系腫瘍での報告は見られない。少数例での検討ではあるが、骨髄異形成症候群患者で芽球の多い病型で可溶性PD-L1が高値であったことから、血中可溶性PD-L1高値が予後不良因子となる可能性が考えられる。現在、血清保存の条件を見直し、検体保存を行っており、今後、多数例での解析を行い、治療反応性や予後を予測するバイオマーカーとしての有効性について検討する。

## 5. 文献

- 1) Ansell SM, Lesokhin AM, Borrello I, Halwani A, Scott EC, Gutierrez M, Schuster SJ, Millenson MM, Cattray D, Freeman GJ, Rodig SJ, Chapuy B, Ligon AH, Zhu L, Grosso JF, Kim SY, Timmerman JM, Shipp MA, Armand P. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 372(4):311-9, 2015.
- 2) Goto T, Nishida T, Takagi E, Miyao K, Koyama D, Sakemura R, Hanajiri R, Watanabe K, Imahashi N, Terakura S, Murata M, Kiyoi H. Programmed Death-Ligand 1 on

Antigen-presenting Cells Facilitates the Induction of Antigen-specific Cytotoxic T Lymphocytes: Application to Adoptive T-Cell Immunotherapy. *J Immunother.* 39(8):306-15, 2016.

3) Rossille D, Gressier M, Damotte D, Maucort-Boulch D, Pangault C, Semana G, Le Guill S, Haioun C, Tarte K, Lamy T, Milpied N, Fest T. High level of soluble programmed cell death ligand 1 in blood impacts overall survival in aggressive diffuse large B-Cell lymphoma: results from a French multicenter clinical trial. *Leukemia.* 28(12):2367-75, 2014.

4) Wang L, Wang H, Chen H, Wang WD, Chen XQ, Geng QR, Xia ZJ, Lu Y. Serum levels of soluble programmed death ligand 1 predict treatment response and progression free survival in multiple myeloma *Oncotarget.* 6(38):41228-36, 2015.

5) Yang H, Bueso-Ramos C, DiNardo C, Estecio MR, Davanlou M, Geng QR, Fang Z, Nguyen M, Pierce S, Wei Y, Parmar S, Cortes J, Kantarjian H, Garcia-Manero G. Expression of PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA4 in myelodysplastic syndromes is enhanced by treatment with hypomethylating agents. *Leukemia.* 28(6):1280-8, 2014.