学位論文（博士）

Novel Immune Drug Combination Induces Tumour Microenvironment Remodelling and Reduces the Dosage of Anti-PD-1 Antibody

（新規複合免疫製剤は腫瘍微小環境の再構築を通じて、抗 PD-1 抗体の投与量を軽減する）

氏名　小佐々　貴博

所属　山口大学大学院医学系研究科

医学専攻　消化器・腫瘍外科学講座

令和 7 年 4 月

目　次

１．要旨

免疫チェックポイント阻害剤(Immune checkpoint inhibitors: ICIs)は様々な癌腫で治療効果が認められており、特にマイクロサテライト不安定性を持つ大腸癌(Microsatellite Instability High Colorectal Cancer: MSI-H CRC)に極めて高い治療効果を有する。一方、免疫関連有害事象(Immune-related Adverse Events: irAE)や経済的負担が課題である。我々はPoly(I:C)とLAG-3-Igの併用アジュバントに、3種のネオ抗原ペプチドを組み合わせた製剤(Novel combination immune drug: Comb)を開発し、減量した抗PD-1抗体(Reduced dose anti PD-1 monoclonal antibody: RD-αPD-1 mAb)との併用療法の治療効果を検討した。C57BL/6マウスにマウス大腸癌細胞株MC38を皮下移植し、抗PD-1抗体の通常量群(200 μg)と比較すると、RD-αPD-1 mAb群(100 μg)では抗腫瘍効果は認められない一方で、RD-αPD-1 mAbとCombの併用群では有意に高い抗腫瘍効果を認めた。摘出腫瘍の腫瘍浸潤免疫細胞の解析ではComb投与群で$CD8^+$ T細胞の増加、$CD11b^+$細胞の分画に変化がみられた。さらに、single cell RNA sequenceでは、併用群で細胞障害活性が上昇し疲弊が改善された$CD8^+$ T細胞のサブタイプが増加し、骨髄球の中では

形質細胞様樹状細胞の増加と抑制性免疫を示す腫瘍関連マクロファージの割合の低下を認めた。T 細胞受容体レパトア解析では $CD8^+$ T 細胞のレパトアのオリゴクローナルな増殖が確認された。本研究は、Comb の併用により ICI の用量を減らし、irAE および経済的負担を低減しうる可能性を示唆する。

２．研究の背景

免疫チェックポイント阻害剤(Immune Checkpoint Inhibitors: ICIs)、特にProgrammed Cell Death-1(PD-1)およびProgrammed Cell Death Ligand 1(PD-L1)抗体は、その著しい治療効果により様々な癌治療に大きな進歩をもたらした(1,2)。これらの抗体は、活性化されたT細胞のPD-1と、腫瘍および腫瘍微小環境(Tumor Microenvironment: TME)内の様々な免疫抑制細胞（腫瘍関連マクロファージ(Tumor Associated Macrophage: TAM)、制御性T細胞(Regulatory T cell: Treg)、Myeloid Derived Suppressor Cell: MDSCなど）に発現されるPD-L1との相互作用を阻害することで、T細胞に対する抑制効果を軽減する(2-4)。メラノーマ、非小細胞肺癌、腎細胞癌など、多くの癌腫に対し効果的で臨床現場で広く使用されている(5-7)。中でも、ペムブロリズマブはMicrosatellite Instability High(MSI-H)大腸癌(Colorectal cancer: CRC)に対して高い治療効果を示す(8)。

MSI-H CRCに対しICIは高い治療効果をもたらす一方で、免疫関連有害事象(immune related adverse events: irAEs)の発生や経済的負担が懸念されている(9,10)。特に、ICI治療の費用は2026年ま

でに倍増すると予想され、特定の癌に対してはコスト効率が低くなることが問題となっている(11,12)。ICI の投与量を調整することで、irAEs や経済的負担などの課題に対処できる可能性があるが、投与量を減量し治療効果を維持する臨床的エビデンスは乏しい(13)。前臨床モデルでは、ICI を分子標的薬、ワクチン、免疫アジュバント、放射線療法と組み合わせ ICI の治療効果が向上することを示されているが、減量した ICI と併用し効果が保持されるかどうかについての研究はまだ十分ではない(14-17)。

以前に、我々は Poly(I:C)と LAG-3-Ig の免疫アジュバントの併用が、TME の腫瘍抗原特異的 T 細胞の増殖を即し、さらに疲弊を軽減し抗腫瘍効果を強化することを示した(18)。Poly(I:C)は、B 細胞、マクロファージ、樹状細胞(Dendritic cell: DC)の Toll like receptor 3(TLR3)を活性化し、MDA5 および RIG-I などの細胞内タンパク質と相互作用する二本鎖 RNA で、自然免疫や適応免疫の活性化に関わる(19)。LAG-3-Ig は、LAG-3 の細胞外ドメインと IgG の Fc 領域を組み合わせた可溶性組換え融合タンパク質であり、T 細胞での LAG-3 抑制を減衰させる一方、MHC クラス II 分子の相互作用を通じて DC と単球を刺激する(20-24)。我々の研究は、これらの複合免

疫アジュバントをHSP70/GPC3抗原由来のペプチドと組み合わせ、CRCを含む様々な癌に対するペプチド特異的な免疫反応を誘導し、$CD8^+$腫瘍浸潤リンパ球(Tumor Infiltrating Lymphocyte: TIL) の増加させる可能性を示唆した(25,26)。

本研究では、マウスCRC腫瘍モデルを用いて2種の免疫アジュバント (Poly(I:C)とLAG-3-Ig) と3種のネオ抗原ペプチドからなる複合免疫製剤(Novel Combination Immune Drug: Comb)が、減量した抗PD-1抗体(Reduced dose anti PD-1 monoclonal antibody: RD-αPD-1 mAb)の治療効果を増強しうるかを検討した。また、同併用療法によって誘導された腫瘍浸潤免疫細胞の変化に関して、Single cell RNA sequence(scRNA-seq)とSingle cell T cell receptor sequence (scTCR-seq)を組み合わせ解析し、併用療法の高い治療効果のメカニズムを検討した。

３．方法

マウスと細胞株

5〜7 週齢の雌の C57BL/6 マウスを日本 SLC(静岡、日本)より購入し、in vivo 実験に使用した。マウスは、以前の報告と同様に、特定病原体フリーの条件下で当施設にて飼育された(27,28)。高い免疫原性を有する大腸癌細胞株(MC38)は、和歌山医科大学の小島教授から提供を受け、10%胎牛血清（Gemini Bio Products、ウェストサクラメント、CA、USA）および 1%ペニシリン-ストレプトマイシン（Wako、大阪、日本）を補充した DMEM 培地で 37° C、5%CO2 の条件下で培養された。全ての動物実験は、関連するガイドラインおよび規制に従い、山口大学の動物実験施設利用委員会の承認を得て実施した。また本研究は ARRIVE ガイドライン（https://arriveguidelines.org）に準拠して実施した。

フローサイトメトリー

腫瘍浸潤免疫細胞は表 1 に示す細胞表面マーカーで染色された。フローサイトメトリーデータは、BD LSR Fortessa X-20 セルアナライザー（BD Biosciences）を使用して取得し、FlowJo ソフトウェア

（FlowJo、LLC）を使用して分析した。

マウスにおける抗腫瘍効果の評価

C57BL/6 マウスには、右側腹部に 1×10^6 細胞の MC38 を皮下移植し 0 日目とした。5 日目、12 日目、19 日目に、2 種のアジュバント(Poly(I:C)および LAG-3-Ig)と 3 種のネオ抗原ペプチドを含む複合免疫製剤(Comb)を右鼠径部に皮下注射し、抗 PD-1 モノクローナル抗体(Anti PD-1 monoclonal antibody: αPD-1 mAb)を 100 μg/回または 200 μg/回で腹腔内投与した。使用した試薬の詳細は表 1 に記載した。本研究で使用された 3 種のペプチドは、MC38 細胞株で以前にネオ抗原ペプチドとして同定されたものである(Adpgk ： ASMTNMELM、Dpagt1: SIIVFNLL、および Dpagt1: AQLANDVVL)(29)。腫瘍径およびマウスの生存は週に 2 回評価した。腫瘍径は電子ノギスで測定され、腫瘍容積は以下のように計算された(腫瘍の短径)^2×腫瘍の長径/2)。苦痛の徴候がみられた場合、腫瘍が 5,000 mm^3 を超えた場合、二酸化炭素吸入後に頸椎を脱臼しマウスを安楽死させた。

腫瘍浸潤免疫細胞の Single cell RNA sequence (scRNA-seq)

C57BL/6マウスにMC38細胞を皮下移植後、無治療、RD-αPD-1 mAb単剤、Comb単剤、αRD-PD-1 mAbとCombの併用群に分け治療介入を行った。14日目に腫瘍を採取し細断、BD Biosciences（東京、日本）製の Dri Tissue & Tumor Dissociation Reagent（カタログ番号661563）で 37° C、30 分間かけ調製した。scRNA-seq に使用されたマウスは、各グループの中央の腫瘍容積を持つ 2 匹のマウスから収穫された腫瘍を混合して準備した。調製した溶液を 100 μm の Cell Strainer でろ過し、Zombie Yellow viability dye および Anti mouse CD45 mAb BV421 で染色した。生存免疫細胞は、SONY(東京、日本)製のSH800細胞ソーターを使用し、蛍光陽性細胞を選別して分離された。その後のsingle cell libraryおよびTCRの分析は、既報の通りに行った(30)。T 細胞受容体αβレパトアの多様性は、逆シンプソン指数を用いて推定された(31)。scRNA-seq で分類したリンパ球のグループを、paratope hotspots (GLIPH)アルゴリズムを使用して、TCRβ鎖内の共通するCDR3アミノ酸配列から抗原特異的なグループ同定し対応させた(32,33)。CDR3 領域の 4 つ以上のアミノ酸配列の局所的類似性に基づき TCRβ clone type を分類した(34)。TCRβおよびGLIPH特異性に関連するT細胞プロファイルの可視化は、GLIPH

version 2 を使用し行った。

統計分析

群間比較には、Kruskal-Wallis 検定を用い、有意差が認められた場合はDunnの多重比較検定により群間の差を評価した。マウスの生存に関しては、Kaplan-Meier 曲線を作成し Log-rank 検定を用いて統計分析を行った。$P<0.05$ が統計的に有意とみなした。

４．結果

Comb は低用量のαPD-1 mAb の抗腫瘍効果を増強する

C57BL/6 マウスに MC38 細胞を皮下移植し、αPD-1 mAb を 100 μg(RD-αPD-1 mAb)または 200 μg で投与した(図 1a)。腫瘍移植後 32 日目に、200 μg/回のαPD-1 mAb 投与群は、無治療群と比較して有意な抗腫瘍効果を示した(P<0.05)。一方、RD-αPD-1 mAb 単剤群では、無治療群と比較して腫瘍増殖に差は認められなかった (図 1b)。生存期間においては、RD-αPD-1 mAb 群および 200 μg/回αPD-1 mAb 投与群のいずれも、無治療群と比較して延長していた。また、200 μg/回 αPD-1 mAb 投与群は、RD-αPD-1 mAb 群と比較し生存期間が有意に長かった(P<0.05) (図 1c)。免疫関連有害事象 (irAE) に関して、3 群間で体重に差は認められなかった(図 S1a)。以上より、RD-αPD-1 mAb では抗腫瘍効果が低下することが示唆された。C57BL/6 マウスに MC38 細胞を皮下移植後、RD-αPD-1 mAb 単剤、Comb 単剤、RD-αPD-1 mAb と Comb の併用療法を行った(図 1d)。無治療群と比較して、RD-αPD-1 mAb と Comb の併用群 (以下、併用群) のみが、腫瘍増殖を抑制した(腫瘍移植後 28 日目)。また、併用群は、無治療群および各単剤群と比較して生存期間が有意に延長した(P<0.05)(図 1e、

f)。28 日目における 4 群間で体重の変化に差は認められなかった(図 S1b)。以上より、RD-αPD-1 mAb に Comb を併用することで、RD-αPD-1 mAb 単剤の抗腫瘍効果を増強し、MC38 に対する治療効果を向上させることが示唆された。

RD-αPD-1 mAb と Comb の併用は $CD8^+$ T 細胞を増加させ、Comb は TME の骨髄細胞の変化を誘導する

C57BL/6 マウスに MC38 細胞を皮下移植し、RD-αPD-1 mAb 単剤、Comb 単剤および、RD-αPD-1 mAb と Comb の併用療法を行った。腫瘍組織から $CD45^+$免疫細胞を採取しフローサイトメトリー解析を行った (図 2a)。併用群では、$CD45^+$ 細胞中の $CD3^+$ 腫瘍浸潤リンパ球(TILs)の割合が無治療群と比較して有意に増加していた($P<0.05$)(図 2b)。また、$CD8^+$ TILs の割合も Comb 単剤群および併用群で増加していたが、RD-αPD-1 mAb 単剤群と無治療群との比較では差は認められなかった($P<0.05$)(図 2b)。さらに、$CD11b^+$ 骨髄細胞の総数は、併用群で無治療群と比較して有意に減少していた($P<0.05$) (図 2c)。加えて、$CD11b^+$ $CD11c^-$ 骨髄細胞のうち、$Gr\text{-}1^-$ $MHCII^+$ 細胞の割合は、併用群で無治療群と比較して有意に低下していた($P<0.05$)。一方、

Gr-1^{+} MHCII^{-} 細胞の割合は、Comb 単剤群で無治療群と比較して有意に増加していた(P<0.05)。以上の結果から、Comb は T 細胞および骨髄細胞の TME への浸潤を変化させることが示唆された。なお、CD4^{+} および CD8^{+} T 細胞における CD40L、TIGIT、TIM3 の発現には変化は認められなかった(図 S2)。

RD-αPD-1 mAb と Comb の併用は CD8^{+} TILs の疲弊プロファイルに影響を与える

TME 内の T 細胞および骨髄細胞の詳細な解析を行うため、フローサイトメトリー解析に用いた同一のマウスモデルを用いて scRNA-seq 解析を実施した(図 3a)。UMAP 解析のフローチャートは図 S3 に示した(図 S3)。CD8^{+} T 細胞は、それぞれの細胞の特異的遺伝子の発現に基づき、以下の４つのクラスターに分類された（図 3b-e)。Effector/Exhausted T 細胞（抗原発現関連遺伝子 CD44 および pdcd1、疲弊関連遺伝子 Harcv2、Lag3、Tigit、Ctla4、Il2rb、細胞傷害関連遺伝子 Ifng、Gzmb、Gzme、Prf1 を発現)、Effector memory T 細胞(Sell および細胞傷害関連遺伝子 Gzma、Gzmb、Gzmc、Prf1 を発現)、Resident memory T 細胞（CD69 および細胞傷害関連遺伝子 Gzma、

Gzmc、Gzme、Prf1を発現）および、Central memory T細胞（Sell および Tcf7 を発現し、活性化・疲弊関連遺伝子は発現しない）(35,36)。UMAP解析において各群間でEffector /Exhausted T細胞の分布が異なっていたことから、さらにクラスタリングを行い解析した。その結果、$CD8^+$ Effector/Exhausted T細胞内でさらに以下の4 つのサブタイプに分類しえた（図 3f-i)。つまり Precursor effector（CD69 を発現し、細胞傷害関連遺伝子および疲弊関連遺伝子の発現が低い)、Effector 群（細胞傷害関連遺伝子 Gzma、Gzmb、Gzmkを発現し、疲弊関連遺伝子の発現が低い)、Exhausted群（細胞傷害関連遺伝子 Gzma、Ifng および疲弊関連遺伝子 Lag3、Tigit、Ctla4を発現するが、Havcr2を発現しない)、Terminal exhausted群（細胞傷害関連遺伝子Gzmb、Gzmc、Prf1、Ifngおよび疲弊関連遺伝子Havcr2を発現）である(37)。

無治療群およびRD-αPD-1 mAb単剤群では、大部分の$CD8^+$ T細胞がExhausted群に属していた。一方、Comb単剤群および併用群では、Precursor effector T細胞およびTerminal exhausted T細胞の割合が高かった。特に、併用群では、Effector T細胞が最も多く認められた（図3j)。以上より、RD-αPD-1 mAbとCombの併用は$CD8^+$ TILs

の疲弊に関する遺伝子発現を大きく変化させる可能性が示唆された。

Comb は TME を再構築する

遺伝子発現に基づき骨髄細胞（itgam^{+}）をさらにクラスタリングしたところ、11 種類の骨髄細胞のクラスターが同定された(図 S4a)。簡略化のためこれらのクラスターを遺伝子発現の関係に基づき 5 つのメタクラスターに分類した(図 S4b)。特異的遺伝子発現に基づき、マクロファージ(CD68 を発現し、MHC クラス II 関連遺伝子 H2-Aa、H2-Ab1、Trem2、C1qb、Apoe を発現)、古典的樹状細胞(conventional dendritic cell(cDC)；itgax および MHC クラス II 関連遺伝子 Sirpa、CD83 を発現)、形質細胞様樹状細胞(plasmacytoid dendritic cell(pDC)；Ly6c、Bst2、Irf8 を発現)、好中球(Gsr を発現し、MHC クラス II 関連遺伝子の発現が低く、Arg1 を発現)、および骨髄由来抑制細胞(MDSC；Gsr、Arg1 を発現し、MHC クラス II 関連遺伝子の発現が低い)の 5 つに分類した(図 4a、b)(38)。

Comb 単剤および併用群では、マクロファージの割合が減少し、pDC の割合が増加していた(図 4c)。さらに、マクロファージをさらにクラスタリングした結果、7 つのクラスターが同定され(図 S4c)、

5つのメタクラスターに分類した(図S4d)。特異的遺伝子の発現に基づき、M1様マクロファージ、3種類のTAM サブタイプ、およびその他の群に分類された（図4d、e）(39)。

3種類のTAMサブタイプは、TAM-M2（Arg1、Tgfb1、Fn1を発現)、TAM-1（CD74、Apoe、Ctsz を発現)、TAM-2（Ctsz、Spp1 を発現）とした。M1 様マクロファージは、M1 関連遺伝子（Tlr2、Adgre1、Tnf、Il1b）の発現が高く、M2 関連および免疫抑制関連遺伝子の発現が低かった。Comb を投与した群では、ほぼ全てのマクロファージが M1 様マクロファージであった。一方、無治療群およびRD-αPD-1 mAb単剤群では、TAM-M2, TAM-1, TAM-2が主要なサブタイプとして認められた(図4f)。以上より、CombはM2様マクロファージからM1様マクロファージへの分極を促進し TME を再構築する可能性が示唆された。また、PD-L1 を発現する TAM の割合は、Comb 単剤群および併用群で、無治療群およびRD-αPD-1 mAb単剤群と比較して低かった(図4g, h)。pDC の解析において、特異的遺伝子の発現に基づきさらにクラスタリングを行い、5つのクラスターが同定された(図4i, j)。これらのうち、2つのクラスターは抗原提示能を有するpDCサブタイプ(pDC-AP)であり、MHCクラスIおよびII関連遺伝子（H2-K1, H2-Q4, H2-

Q6, H2-Ab1, H2-Eb1, H2-Aa, CD83, IRF7, Tnf) を高発現していた。[40] 残りの 3 つのクラスターは抗原提示能を持たない pDC サブタイプであった。抗原提示能を有する pDC サブタイプのうち、pDC-AP1 は共刺激分子(CD86)および T 細胞のリクルートに関連するケモカイン遺伝子(Cxcl9, Cxcl10)を高発現していた。一方で、抗原提示能を持たない pDC サブタイプのうち、pDC3 は免疫抑制関連遺伝子(IRF5, Tgfb1)を高発現し、I 型インターフェロン関連遺伝子(IRF7, Tnf)の発現が低かった。Comb 単剤群および併用群では、ほとんどの pDC が pDC-AP に分類されたのに対し、無治療群および RD-αPD-1 mAb 単剤群では、ほぼ全ての pDC が pDC3 に分類された(図 4k)。

RD-αPD-1 mAb と Comb の併用は、多様な memory・effector・exhausted profile を示す CD8$^+$ TILs のオリゴクローナルな拡大を誘導する

CD8$^+$ TILs の遺伝子発現および clone の変化を解析するため、5′-scRNA-seq および scTCR-seq ライブラリーを作製した。併用群では、5 細胞以上で構成される TCR clone の数が 24 clone であり、無治療群(9 clone)、RD-αPD-1 mAb 単剤群(11 clone)、Comb 単剤群(9

clone)と比較して増加していた（図 5a, 表 2)。また、TCR レパトアの diversity を評価したところ、RD-αPD-1 mAb 単剤群では、無治療群（24.70）と比較して約 2 倍（62.71）に増加していた（図 5b)。一方、Comb 単剤群および併用群では、無治療群（24.70）と比較して増加し、それぞれ 30.84 および 37.67 を示した。

さらに、各群において 5 細胞以上で構成される TCR clone に属する $CD8^+$ T 細胞の遺伝子発現プロファイルを解析した。図 3 に示した 7 つのクラスターを基に解析を行ったところ、無治療群および RD-αPD-1 mAb 単剤群では、TCR clone の大部分が Exhausted プロファイルを有していた(図 5c)。一方、Comb 単剤群では、TCR clone の大部分が Precursor effector T 細胞、Terminal exhausted T 細胞、または Effector memory T 細胞で構成されていた。併用群では、Precursor effector T 細胞、Effector T 細胞、Terminal exhausted T 細胞、Effector memory T 細胞を含む多様なプロファイルを示していた。

最後に、GLIPH アルゴリズムを用いて、TCR clone の CDR3 配列の共通のアミノ酸配列に基づき、特定の TCR をもつ T 細胞を分類しサブタイプを同定した(表 2)。7 種類の主要な TCRβ CDR3 配列が確認さ

れた中で、3 種類の特異的 TCR グループがみられたのは、併用群のみであった。

５．考察

αPD-1 mAb の最適な投与量は、従来の化学療法とは異なる ICI の独自の作用機序を考慮すると、依然として明確ではない。さらに、ICI の投与量に依存して irAEs が発生することが報告されている。一方で、irAEs の軽減を目的として ICI の投与量を減少させると、治療効果が低下する可能性がある(41,42)。前臨床モデルでは、200 μg から 100 μg へ ICI を減量すると抗腫瘍効果が低下し、その主な要因として腫瘍微小環境(TME)におけるαPD-1 mAb の濃度不足が指摘されている(13)。本研究では、RD-αPD-1 mAb 単剤では大腸癌(CRC)に対する治療効果が限定的であることを確認し、RD-αPD-1 mAb に Comb を併用することで、体重減少を伴う重篤な irAE を引き起こすことなく、抗腫瘍効果が増強されることを明らかにした。さらに、Comb は臨床において 1 回あたり約 30 ドルで使用可能であり、RD-αPD-1 mAb と併用することで、αPD-1 mAb を通常量投与するよりも費用対効果が高い可能性がある(25,26)。

scRNA-seq 解析により、本研究で観察された治療効果の背景にあるいくつかの機序が示唆された。Comb は TME のマクロファージの極性を変化させる可能性がある。固形腫瘍の TME は M2 マクロファージ

優位に偏っており、これらの細胞はサイトカイン分泌、エクソソーム放出、免疫チェックポイントリガンドの発現を介して T 細胞の活性化を抑制することが知られている(43-47)。Poly(I:C)は抗 PD-L1 抗体やフェルモキシトール(ferumoxytol)との併用により、TME のマクロファージを M1 型へ誘導することが報告されている。また、pDC はⅠ型インターフェロンを分泌し、$CD8^+$ T 細胞を活性化する役割を果たす(48-51)。本研究において、Comb を投与したマウスでは、Ⅰ型インターフェロン関連遺伝子(Irf7、Tnf)を発現する pDC が増加していた。Poly(I:C)および LAG-3-Ig は MHC クラス II を介して pDC を活性化することが知られており、Comb がマクロファージおよび pDC に対して相乗的に作用した可能性が考えられる(52,53)。

ICI の治療効果は、TME における抑制性免疫の影響を強く受ける。特に M2 マクロファージは T 細胞の活性化を抑制し、ICI の効果を減弱させる要因の一つとされている(54)。本研究では、ICI 単剤群の骨髄系細胞中に M2 マクロファージが高頻度で認められたことから、低用量 ICI では T 細胞の活性化を十分に誘導できない可能性が示唆された。さらに、PD-L1 を発現する腫瘍関連マクロファージ(TAMs)は、PD-1/PD-L1 経路を介して T 細胞を抑制する(46,47)。Comb 投与

後、PD-L1^{+} TAMs の割合が減少しており、Comb による TME の再構築を介し腫瘍反応性 T 細胞の細胞傷害活性が増強されたと考えられる。ICI の抗腫瘍効果は、疲弊の少ない CD8^{+} T 細胞の存在に依存する(4,55,56)。本研究では、Comb 投与群では、疲弊関連遺伝子の発現が低い Precursor effector T 細胞が増加していた。LAG-3-Ig は T 細胞の疲弊を部分的に改善する作用を持つことが報告されており、Comb がこの機序を介して T 細胞の機能を維持した可能性がある(18)。さらに、RD-αPD-1 mAb と Comb 併用群では、細胞傷害活性が高く、疲弊関連遺伝子の発現が少ない CD8^{+} T 細胞が増加していた。以上の結果は、RD-αPD-1 mAb が Comb によって誘導された腫瘍反応性 T 細胞の細胞傷害活性を増強し、αPD-1 mAb の必要投与量を低減できる可能性を示唆している。一方で、無治療群および RD-αPD-1 mAb 単剤群では、疲弊した CD8^{+} T 細胞における pdcd1 の発現が高かった。これは、これらの細胞を完全に活性化するためには、より高用量の αPD-1 mAb が必要となることを示唆している。

腫瘍細胞の完全な拒絶には、適切な clonality と多様なプロファイルを有する腫瘍浸潤リンパ球が必要である(34,57,58)。scRNA-seq および scTCR-seq を併用した解析により、RD-αPD-1 mAb と Comb

の併用群でのみ、異なるプロファイルを持つ $CD8^+$ T 細胞の Oligo clonal な拡大が確認された。TCR レパトアの Oligo clonal な拡大は、臨床的な治療効果および患者の予後と相関することが報告されている(59-61)。さらに、拡大した TCR クローンにおいて、GLIPH 解析により 7 種類の TCR が RD-αPD-1 mAb と Comb の併用群において 3 つの同一抗原を認識する可能性が示唆された。そのうち 2 つの TCR グループ(CDR3 配列に QVQG および SLELGGE の配列が一致)は、Comb 単剤群にも存在していたが、1 つの TCR グループ(CDR3 配列に SAGANSD の配列が一致)は無治療群にも存在していた。これは、治療前から存在していた抗原特異的 TILs が、RD-αPD-1 mAb により増幅された可能性を示唆する。一方で、RD-αPD-1 mAb と Comb の併用群において拡大した TCR のうち 17 種類は、他の治療群の TCR と一致せず、異なる抗原を認識している可能性がある。これらの TCR clone は、Effector T 細胞を含む多様なプロファイルを持っており、本併用療法によりさまざまな内因性の腫瘍抗原に特異的な免疫応答が誘導された可能性が高い。

本研究の結果は、RD-αPD-1 mAb と Comb の併用が、antigen spreading や clonal replacement を誘導する可能性を示唆している。

すなわち、RD-αPD-1 mAb と Comb の併用により、T 細胞が複数の腫瘍抗原に対する応答を誘導される可能性がある(62-65)。また、併用治療群では抗原提示能を有する pDC の増加が認められたことから、腫瘍局所における抗原提示能力の向上が、antigen spreading の一因となる可能性が示唆された(66,67)。これらの仮説を実証するためには、さらなる in vitro および in vivo での検証が求められる。本研究にはいくつかの limitation が存在する。第一に、RD-αPD-1 mAb と Comb の併用が、標準用量の抗 PD-1 抗体単剤と同等の効果を示すかどうかを、同一の実験条件下で直接比較していない点である。図 1b および図 1e の結果は、両者が類似した抗腫瘍効果を示唆しているものの、それぞれ独立した実験から得られたデータであり、慎重に解釈する必要がある。第二に、Comb の投与による TME の変化について、scRNA-seq 解析により明らかになった所見は、さらなる解析を通じてその分子機構を詳細に解明する必要がある。第三に、irAE の評価に関して、マウスモデルには限界があり、カニクイザルなどの前臨床モデルを用いた詳細な検討が求められる。第四に、本研究では 1 種類の細胞株(MC38)およびそのネオ抗原ペプチドを用いた解析を行ったため、本研究の成果が他のネオ抗原ペプチドや一般

的な腫瘍関連抗原にも適用可能かどうかは未解明である。今後、さらなる細胞株やネオ抗原を用いた追加研究が必要であるが、ICI は腫瘍非特異的治療として使用されていることから、他の腫瘍種にも適用可能である可能性が示唆される。

６．結語

本研究は、2 種の免疫アジュバント（Poly(I:C)、LAG-3-Ig）と 3 種のネオ抗原ペプチドを含む新規複合免疫製剤(Comb)が、TME を再構築し、治療効果を維持しつつ抗 PD-1 抗体の投与量を減量できる可能性を示した。

７．謝辞

本研究の遂行にあたり、ご指導いただいた中島正夫先生、恒富亮一先生、永野浩昭教授に深く感謝申し上げる。

８．参考文献

1. Ribas, A. & Wolchok, J. D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science.* **359**, 1350-1355 (2018).
2. 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).
3. Wu, T. *et al.* Single-cell sequencing reveals the immune microenvironment landscape related to anti-PD-1 resistance in metastatic colorectal cancer with high microsatellite instability. *BMC Med.* **21**, 161 (2023).
4. Liu, Y. *et al.* Identification of a tumour immune barrier in the HCC microenvironment that determines the efficacy of immunotherapy. *J Hepatol.* **78**, 770-782 (2023).
5. Robert, C. *et al.* Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* **372**, 320-330 (2015).
6. Brahmer, J. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine.* **373**, 123-135 (2015).
7. Motzer, R. J. *et al.* Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* **373**, 1803-1813 (2015).
8. Andre, T. *et al.* Health-related quality of life in patients with microsatellite instability-high or mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer treated with first-line pembrolizumab versus chemotherapy (KEYNOTE-177): an open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **22**, 665-677 (2021).
9. Haratani, K. *et al.* Association of Immune-Related Adverse Events With Nivolumab Efficacy in Non-Small-Cell Lung Cancer. *JAMA Oncol.* **4**, 374-378 (2018).
10. Wang, D. Y. *et al.* Fatal Toxic Effects Associated With Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol.* **4**, 1721-1728 (2018).
11. Verma, V. *et al.* A systematic review of the cost and cost-effectiveness studies of immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer.* **6**, 128 (2018).
12. Malmberg, R. *et al.* Alternative dosing strategies for immune checkpoint inhibitors to improve cost-effectiveness: a special focus on nivolumab and pembrolizumab. *Lancet Oncol.* **23**, e552-e561 (2022).
13. Kurino, T. *et al.* Poor outcome with anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) antibody due to poor pharmacokinetic properties in PD-1/PD-L1 blockade-sensitive mouse models. *J Immunother Cancer.* **8** (2020).
14. Yang, S. F. *et al.* Neoantigen vaccination augments antitumor effects of anti-PD-1 on mouse hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **563**, 216192 (2023).

15. Wen, L. *et al.* An Efficient Combination Immunotherapy for Primary Liver Cancer by Harmonized Activation of Innate and Adaptive Immunity in Mice. *Hepatology.* **69**, 2518-2532 (2019).

16. Twyman-Saint Victor, C. *et al.* Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature.* **520**, 373-377 (2015).

17. Fu, Y. *et al.* Combination Foretinib and Anti-PD-1 Antibody Immunotherapy for Colorectal Carcinoma. *Front Cell Dev Biol.* **9**, 689727 (2021).

18. Kano, Y. *et al.* Combined adjuvants of poly(I:C) plus LAG-3-Ig improve antitumor effects of tumor-specific T cells, preventing their exhaustion. *Cancer Sci.* **107**, 398-406 (2016).

19. Kato, H. *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature.* **441**, 101-105 (2006).

20. Andreae, S., Piras, F., Burdin, N. & Triebel, F. Maturation and activation of dendritic cells induced by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol.* **168**, 3874-3880 (2002).

21. El Mir, S. & Triebel, F. A soluble lymphocyte activation gene-3 molecule used as a vaccine adjuvant elicits greater humoral and cellular immune responses to both particulate and soluble antigens. *J Immunol.* **164**, 5583-5589 (2000).

22. Triebel, F. LAG-3: a regulator of T-cell and DC responses and its use in therapeutic vaccination. *Trends Immunol.* **24**, 619-622 (2003).

23. Maeda, T. K., Sugiura, D., Okazaki, I. M., Maruhashi, T. & Okazaki, T. Atypical motifs in the cytoplasmic region of the inhibitory immune co-receptor LAG-3 inhibit T cell activation. *J Biol Chem.* **294**, 6017-6026 (2019).

24. . F Triebel, S Jitsukawa, E Baixeras, et al. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med.* 1990;171:1393-1405.

25. Nakajima, M. *et al.* A phase I study of multi-HLA-binding peptides derived from heat shock protein 70/glypican-3 and a novel combination adjuvant of hLAG-3Ig and Poly-ICLC for patients with metastatic gastrointestinal cancers: YNP01 trial. *Cancer Immunol Immunother.* **69**, 1651-1662 (2020).

26. Nakajima, M. *et al.* Phase I study of a novel therapeutic vaccine as perioperative treatment for patients with surgically resectable hepatocellular carcinoma: The YCP02 trial. *Hepatol Res.* **53**, 649-660 (2023).

27. Adachi, K. *et al.* IL-7 and CCL19 expression in CAR-T cells improves immune cell infiltration and CAR-T cell survival in the tumor. *Nat Biotechnol.* **36**, 346-351 (2018).

28. Nakajima, M., Sakoda, Y., Adachi, K., Nagano, H. & Tamada, K. Improved survival of chimeric antigen receptor-engineered T (CAR-T) and tumor-specific T cells caused by anti-programmed cell death protein 1 single-chain variable fragment-producing CAR-T cells. *Cancer Sci.* **110**, 3079-3088 (2019).

29. Yadav, M. *et al.* Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature.* **515**, 572-576 (2014).

30. Nambara, M. *et al.* The Optimal Definition of Sarcopenia for Predicting Postoperative Pneumonia after Esophagectomy in Patients with Esophageal Cancer. *World J Surg.* **45**, 3108-3118 (2021).

31. . Vinay S Mahajan, Ilya B Leskov, Jian Zhu Chen. Homeostasis of T cell diversity. *Cell Mol Immunol.* 2005; 21-10.

32. . *GROUPING OF LYMPHOCYTE INTERACTIONS BY PARATOPE HOTSPOT - GLIPH version 2* http://50.255.35.37:8080/ (Accessed 2024, 3.15).

33. Glanville, J. *et al.* Identifying specificity groups in the T cell receptor repertoire. *Nature.* **547**, 94-98 (2017).

34. Spassova, I. *et al.* Predominance of Central Memory T Cells with High T-Cell Receptor Repertoire Diversity is Associated with Response to PD-1/PD-L1 Inhibition in Merkel Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* **26**, 2257-2267 (2020).

35. Mueller, S. N. & Mackay, L. K. Tissue-resident memory T cells: local specialists in immune defence. *Nat Rev Immunol.* **16**, 79-89 (2016).

36. Pais Ferreira, D. *et al.* Central memory CD8(+) T cells derive from stem-like Tcf7(hi) effector cells in the absence of cytotoxic differentiation. *Immunity.* **53**, 985-1000 e1011 (2020).

37. Andreatta, M. *et al.* Interpretation of T cell states from single-cell transcriptomics data using reference atlases. *Nat Commun.* **12**, 2965 (2021).

38. Baharom, F. *et al.* Systemic vaccination induces CD8(+) T cells and remodels the tumor microenvironment. *Cell.* **185**, 4317-4332 e4315 (2022).

39. Rajendran, S. *et al.* Single-cell RNA sequencing reveals immunosuppressive myeloid cell diversity during malignant progression in a murine model of glioma. *Cell Rep.* **42**, 112197 (2023).

40. Wculek, S. K. *et al.* Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* **20**, 7-24 (2020).

41. Rahma, O. E. *et al.* Early 3+3 Trial Dose-Escalation Phase I Clinical Trial Design and Suitability for Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Cancer Res.* **27**, 485-491 (2021).

42. Ascierto, P. A. *et al.* Ipilimumab 10 mg/kg versus ipilimumab 3 mg/kg in patients with unresectable or metastatic melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **18**, 611-622 (2017).

43. Roszer, T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* **2015**, 816460 (2015).

44. Yang, L. *et al.* IL-10 derived from M2 macrophage promotes cancer stemness via

JAK1/STAT1/NF-kappaB/Notch1 pathway in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer.* **145**, 1099-1110 (2019).

45. Weng, Y. S. *et al.* MCT-1/miR-34a/IL-6/IL-6R signaling axis promotes EMT progression, cancer stemness and M2 macrophage polarization in triple-negative breast cancer. *Mol Cancer.* **18**, 42 (2019).
46. Prima, V., Kaliberova, L. N., Kaliberov, S., Curiel, D. T. & Kusmartsev, S. COX2/mPGES1/PGE2 pathway regulates PD-L1 expression in tumor-associated macrophages and myeloid-derived suppressor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **114**, 1117-1122 (2017).
47. Li, W. *et al.* Correlation between PD-1/PD-L1 expression and polarization in tumor-associated macrophages: A key player in tumor immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **67**, 49-57 (2022).
48. Zhao, J. *et al.* Anti-tumor macrophages activated by ferumoxytol combined or surface-functionalized with the TLR3 agonist poly (I : C) promote melanoma regression. *Theranostics.* **8**, 6307-6321 (2018).
49. Anfray, C. *et al.* Intratumoral combination therapy with poly(I:C) and resiquimod synergistically triggers tumor-associated macrophages for effective systemic antitumoral immunity. *J Immunother Cancer.* **9** (2021).
50. Zhong, C. *et al.* Poly(I:C) enhances the efficacy of phagocytosis checkpoint blockade immunotherapy by inducing IL-6 production. *J Leukoc Biol.* **110**, 1197-1208 (2021).
51. Xin, B. *et al.* Enhancing the therapeutic efficacy of programmed death ligand 1 antibody for metastasized liver cancer by overcoming hepatic immunotolerance in mice. *Hepatology.* **76**, 630-645 (2022).
52. Hanel, G., Angerer, C., Petry, K., Lichtenegger, F. S. & Subklewe, M. Blood DCs activated with R848 and poly(I:C) induce antigen-specific immune responses against viral and tumor-associated antigens. *Cancer Immunol Immunother.* **71**, 1705-1718 (2022).
53. Workman, C. J. *et al.* LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis. *J Immunol.* **182**, 1885-1891 (2009).
54. Choo, Y. W. *et al.* M1 Macrophage-Derived Nanovesicles Potentiate the Anticancer Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors. *ACS Nano.* **12**, 8977-8993 (2018).
55. Miller, B. C. *et al.* Subsets of exhausted CD8(+) T cells differentially mediate tumor control and respond to checkpoint blockade. *Nat Immunol.* **20**, 326-336 (2019).
56. Nagasaki, J., Ishino, T. & Togashi, Y. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Cancer Sci.* **113**, 3303-3312 (2022).
57. Reuben, A. *et al.* TCR Repertoire Intratumor Heterogeneity in Localized Lung Adenocarcinomas: An Association with Predicted Neoantigen Heterogeneity and

Postsurgical Recurrence. *Cancer Discov.* **7**, 1088-1097 (2017).

58. Bortone, D. S., Woodcock, M. G., Parker, J. S. & Vincent, B. G. Improved T-cell Receptor Diversity Estimates Associate with Survival and Response to Anti–PD-1 Therapy. *Cancer Immunology Research.* **9**, 103-112 (2021).
59. Hosoi, A. *et al.* Increased diversity with reduced "diversity evenness" of tumor infiltrating T-cells for the successful cancer immunotherapy. *Sci Rep.* **8**, 1058 (2018).
60. Tumeh, P. C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature.* **515**, 568-571 (2014).
61. Zhang, J. *et al.* Compartmental Analysis of T-cell Clonal Dynamics as a Function of Pathologic Response to Neoadjuvant PD-1 Blockade in Resectable Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* **26**, 1327-1337 (2020).
62. Awad, M. M. *et al.* Personalized neoantigen vaccine NEO-PV-01 with chemotherapy and anti-PD-1 as first-line treatment for non-squamous non-small cell lung cancer. *Cancer Cell.* **40**, 1010-1026 e1011 (2022).
63. Brossart, P. The Role of Antigen Spreading in the Efficacy of Immunotherapies. *Clin Cancer Res.* **26**, 4442-4447 (2020).
64. Gulley, J. L. *et al.* Role of Antigen Spread and Distinctive Characteristics of Immunotherapy in Cancer Treatment. *J Natl Cancer Inst.* **109** (2017).
65. Yost, K. E. *et al.* Clonal replacement of tumor-specific T cells following PD-1 blockade. *Nat Med.* **25**, 1251-1259 (2019).
66. Menares, E. *et al.* Tissue-resident memory CD8(+) T cells amplify anti-tumor immunity by triggering antigen spreading through dendritic cells. *Nat Commun.* **10**, 4401 (2019).
67. Fu, C. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells cross-prime naive CD8 T cells by transferring antigen to conventional dendritic cells through exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **117**, 23730-23741 (2020).

Antibody	Clone	Company
anti-CD45 BV421	30-F11	eBioscience (San Diego, CA, USA)
anti-CD3 APC-Cy7	145-2C11	eBioscience
anti-CD4 AF488	GK1.5	eBioscience
anti-TIGIT PE	1G9	eBioscience
anti-TIM-3 PerCP-Cy5.5	B8.2C12	eBioscience
anti-CD11b PerCP/Cy5.5	M1/70	eBioscience
anti-CD40L PE	MR1	eBioscience
anti-Gr-1 PE	RB6-8C5	eBioscience
anti-MHC class II FITC	M5/114.15.2	eBioscience
anti-CD11c BV421	HL3	BD Biosciences (Tokyo, Japan)
anti-CD8α BV510	53-6.7	BD Biosciences
anti-CD45 APC	30F-11	TONBO (Fremont, CA, USA)
Zombie Yellow viability dye		BioLegend (Tokyo, Japan)
Flow cytometer		Company
EC800		SONY (Tokyo, Japan)
BD LSRFortessa X20 cell analyser		BD Biosciences
Immune adjuvant	dose	Company
Poly(I:C)	50 μg	InvivoGen (San Diego, CA, USA)
LAG3-Ig	1 μg	Adipogen (San Diego, CA, USA)
Peptide	Amino acid sequence	Company
Reps1	AQLANDVVL	SCRUM (Tokyo, Japan)
Adpgk	ASMTNMELM	SCRUM
Dpagt1	SIIVFNLL	SCRUM
Drug	clone	Company
Anti-PD-1 mAb	RMP1-14	BioXcell (Lebanon, NH, USA)
Software	Version	Company
FlowJo software	10.9.0	FlowJo LLC (Ashland, OR, USA)

Table 1 本研究で使用した試薬および機器

PE, phycoerythrin. APC, allophycocyanin. FITC, fluorescein isothiocyanate. AF488, Alexa Fluor 488. PerCP/Cy5.5, peridinin-chlorophyll-protein complex/cyanine5.5. APC-Cy7, allophycocyanin-cyanine7.

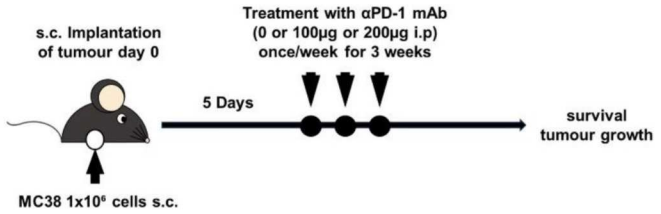
	Untreated		RD-αPD-1 mAb		Comb		RD-αPD-1 mAb + Comb	
	Clonotype	Clone size	Clonotype	Clone size	Clonotype	Clone size	Clonotype	Clone size
1	**CASSRTGGNQDTQYF****	40	CASSQTPGTGGYEQYF	10	CASSQVQGSAETLYF§	26	CTCSAGPANSDYTF†	47
2	CASSLELGGREQYF‡	35	CAWSRQGAHTEVFF	9	CASSRLGGRGDYAEQFF	21	CASSPGQANSDYTF	47
3	CASSRTGGEQDTQYF; **CASSRTGGNQDTQYF****	17	CASRRGQEGTLYF	8	**CASSRTGGNQDTQYF****	18	CAWSLGGQNTLYF	45
4	CASSQEQGGAETLYF	7	CASSWDWGVNYAEQFF	8	**CASSRLGPSAETLYF¶**	13	CASSDARAGNTLYF	40
5	**CASSRTGGNQDTQYF****	6	CASGKGWGISAETLYF	7	CASSQEGANTEVFF	9	CASSLRENTEVFF	31
6	CASSINWRAETLYF	6	CAWSPGYNSPLYF	7	CASSQDWGTSAETLYF	7	CAWSLGGNSPLYF	26
7	CTCSAGQANSDYTF†	6	CASSQVQGVGNTLYF§	6	CGATGQGSGNTLYF	7	CASSDAQWSTLYF	26
8	CAWSPQGAGTGQLYF	5	CASSRRTGVNSDYTF	6	CASSLELGGPEQYF‡	6	CASSQVQGGQDTQYF§	22
9	CASSPVGGRQDTQYF	5	CASSLNPGGTYEQYF	6	CASSERLGGRQNTLYF	6	CASSLELGGREQYF‡	21
10			**CASSRLGPSAETLYF¶**	5			CASSDGTGSTGQLYF	16
11			CASSIAAQGASGNTLYF	5			CASSQPGQNTEVFF	13
12			CASSQTPGTGGYEQYF	10			CASSWDWGGDTQYF	11
13			CAWSRQGAHTEVFF	9			CASSQALGGDTQYF	11
14							CASSQVQGSAETLYF§	10
15							CASSLTGGANQAPLF	10
16							CASSTRGREQYF	8
17							CASSLELGGLEQYF; CASSPGGASAETLYF‡	7
18							CASSLELGGLEQYF‡	7
19							CAWSRGYNSPLYF	6
20							CASSIRGRWDTQYF	6
21							CTCSAGQANSDYTF†	6
22							CTCSVTGGMATGQLYF	6
23							CTCSAGRDRAGERLFF	5
24							CASGEPRDFYEQYF	5

Table 2 拡大がみられた clone の $CD8^+$ T 細胞 T 細胞受容体レパトアのアミノ酸配列

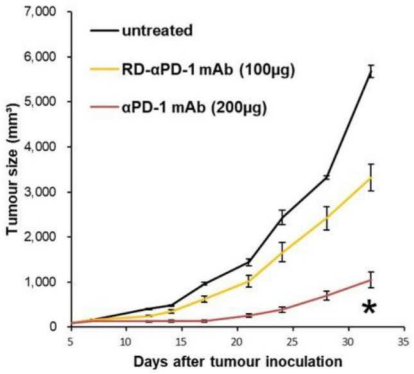
T 細胞受容体 β 鎖のアミノ酸配列で、クローンサイズが 5 以上のものを示す。GLIPH2 を使用し、同じまたは類似の抗原を認識する TCR を、それぞれの記号に一致したアミノ酸配列で示す。

略語: RD-αPD-1 mAb, reduced dose of anti-PD-1 monoclonal antibody; Comb, novel immune drug combination; **, CASSRTGGNQDTQYF; ¶, CASSRLGPSAETLYF; ‡, SLELGG*E; †, SAG*ANSD; §, QVQG.

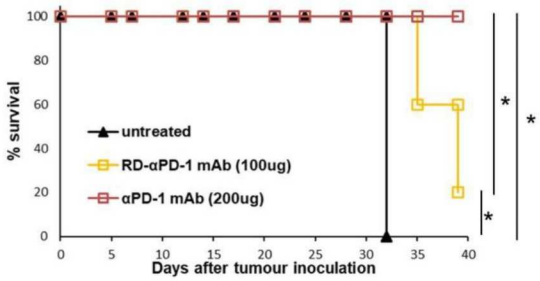
a



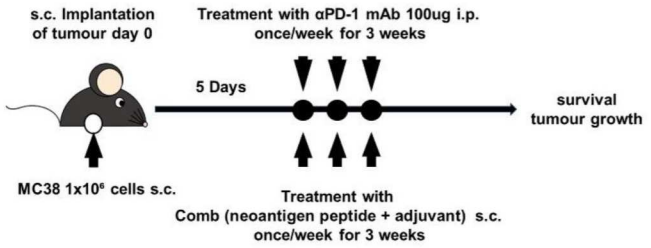
b <Tumour growth>



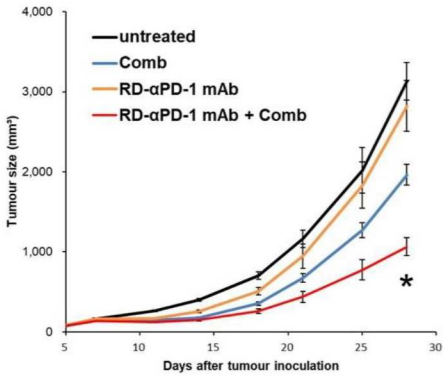
c <Survival>



d



e <Tumour growth>



f <Survival>

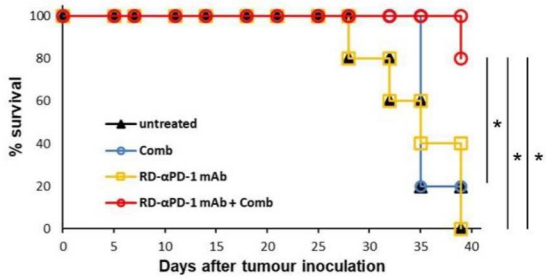


図 1

Comb は低用量抗 PD-1 モノクローナル抗体(αPD-1 mAb)の大腸癌に対する治療効果を増強する

(a) 実験の概要

MC38 を皮下移植したマウスに対し、抗 PD-1 モノクローナル抗体(αPD-1 mAb)を 2 種類の用量(100 μg/回または 200 μg/回) で、それぞれ 5 日目、12 日目、19 日目に投与した。

(b) 腫瘍増殖の評価

これら 3 群のマウスにおける腫瘍の増殖を、経時的に測定した。

(c) 生存率の評価

各群のマウスの生存率を評価した。

(d) Comb と RD-αPD-1 mAb を併用した実験の概要

MC38 を皮下移植したマウスに対し、RD-αPD-1 mAb 単剤、Comb 単剤、または RD-αPD-1 mAb と Comb の併用療法を、それぞれ 5 日目、12 日目、19 日目に投与した。

(e) 腫瘍増殖の評価

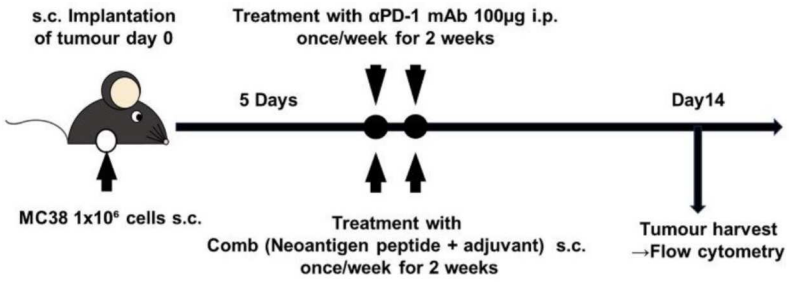
これら 4 群のマウスにおける腫瘍の増殖を、経時的に測定した(腫瘍体積は mm^3 で表記)。

(f) 生存率の評価

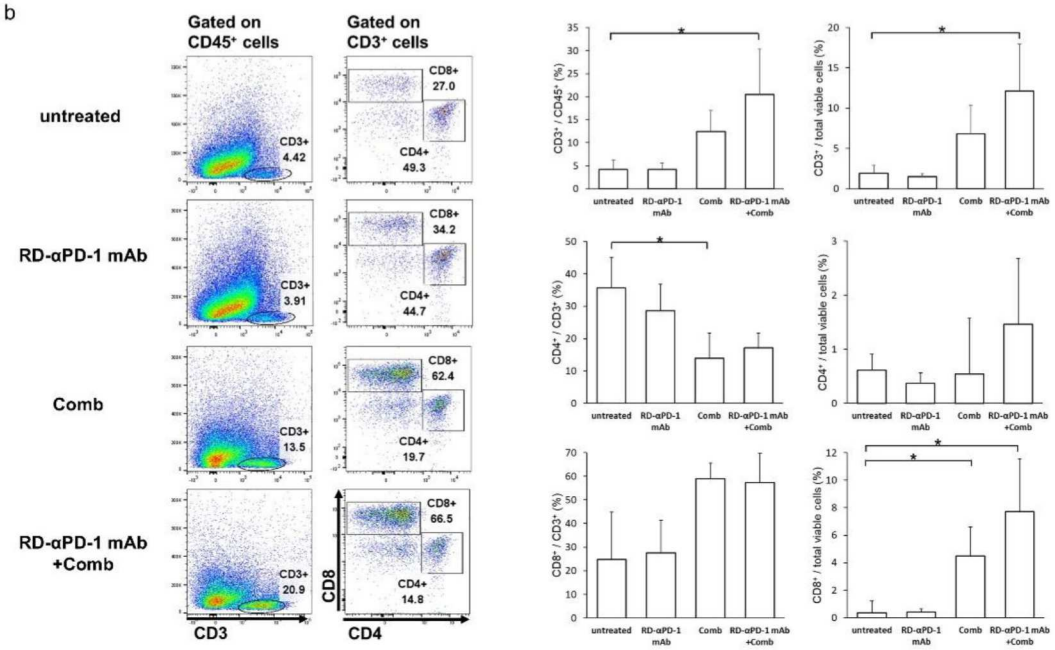
各群のマウスの生存率を評価した。

少なくとも2回の独立した実験の代表データを示した。*P＜0.05。

a


s.c. Implantation
of tumour day 0
Treatment with αPD-1 mAb 100μg i.p.
once/week for 2 weeks
5 Days
Day14
MC38 1x10⁶ cells s.c.
Treatment with
Comb (Neoantigen peptide + adjuvant) s.c.
once/week for 2 weeks
Tumour harvest
→Flow cytometry

b


Gated on
CD45⁺ cells
Gated on
CD3⁺ cells
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb
RD-αPD-1 mAb
+Comb
CD3+
4.42
CD8+
27.0
CD4+
49.3
CD3+
3.91
CD8+
34.2
CD4+
44.7
CD3+
13.5
CD8+
62.4
CD4+
19.7
CD3+
20.9
CD8+
66.5
CD4+
14.8
CD3
CD4
CD8
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb
RD-αPD-1 mAb +Comb

c

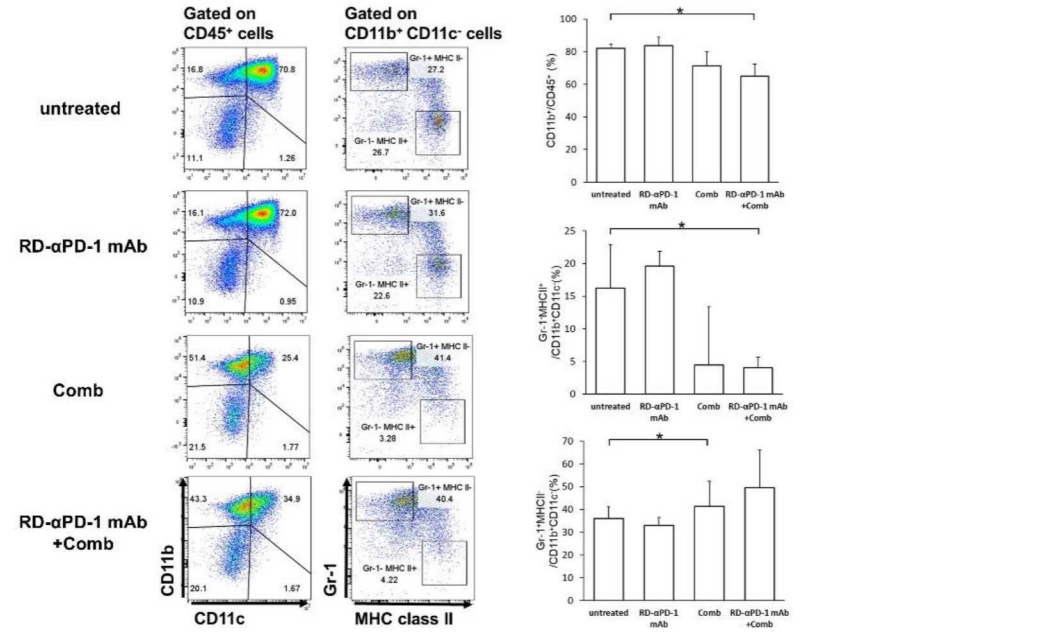

Gated on
CD45⁺ cells
Gated on
CD11b⁺ CD11c⁻ cells
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb
RD-αPD-1 mAb
+Comb
CD11b
CD11c
Gr-1
MHC class II
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb
RD-αPD-1 mAb +Comb

図 2

Comb は腫瘍内に多数の CD8$^+$ T 細胞を誘導し、腫瘍微小環境における骨髄細胞を調節する

(a) **実験の概要**

C57BL/6 マウスに対し MC38 を皮下移植した。5 日目および 12 日目に、RD-αPD-1 mAb、Comb 単剤、または RD-αPD-1 mAb と Comb の併用療法をそれぞれ投与した。14 日目に腫瘍組織から免疫細胞を採取し、フローサイトメトリーを実施した。

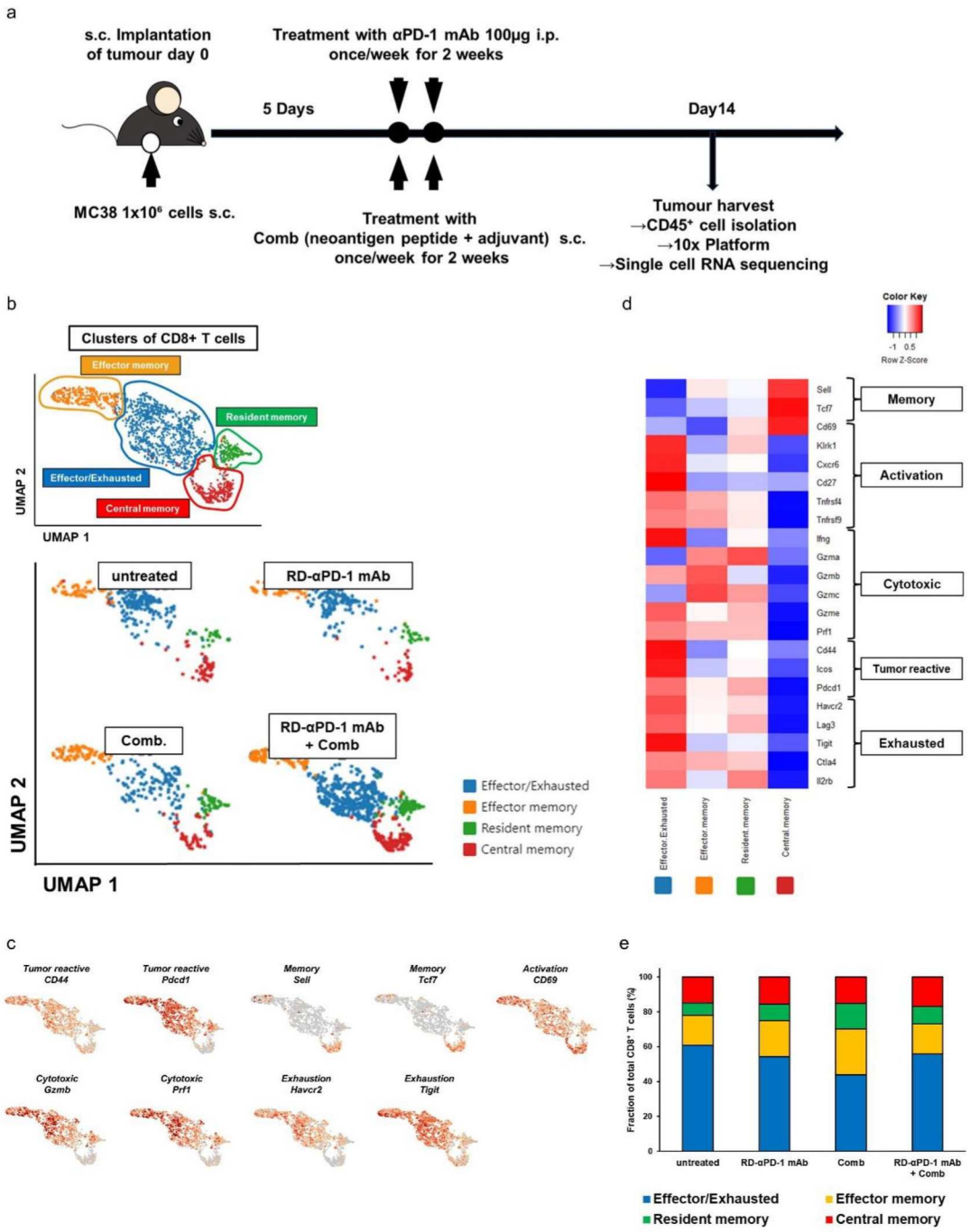
(b) **T 細胞の割合の評価**

CD3$^+$ T 細胞、CD4$^+$ T 細胞、および CD8$^+$ T 細胞の割合を評価し、代表的なフローサイトメトリーのデータを示した。データは平均値±標準偏差(SD)として表し(n=6)、結果を示した。

(c) **骨髄系細胞の割合の評価**

腫瘍内の骨髄系細胞の割合を評価し、代表的なフローサイトメトリーのデータを示した。データは平均値±標準偏差(SD)として表し(n=6)、結果を示した。

少なくとも 2 回の独立した実験の代表データを提示した。*P < 0.05。


a
s.c. Implantation of tumour day 0
Treatment with αPD-1 mAb 100μg i.p. once/week for 2 weeks
5 Days
Day14
MC38 1x10⁶ cells s.c.
Treatment with Comb (neoantigen peptide + adjuvant) s.c. once/week for 2 weeks
Tumour harvest →CD45⁺ cell isolation →10x Platform →Single cell RNA sequencing
b
Clusters of CD8+ T cells
Effector memory
Resident memory
Effector/Exhausted
Central memory
UMAP 2
UMAP 1
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb.
RD-αPD-1 mAb + Comb
Effector/Exhausted
Effector memory
Resident memory
Central memory
d
Color Key
Row Z-Score
Sell
Tcf7
Cd69
Klrk1
Cxcr6
Cd27
Tnfrsf4
Tnfrsf9
Ifng
Gzma
Gzmb
Gzmc
Gzme
Prf1
Cd44
Icos
Pdcd1
Havcr2
Lag3
Tigit
Ctla4
Il2rb
Memory
Activation
Cytotoxic
Tumor reactive
Exhausted
c
Tumor reactive CD44
Tumor reactive Pdcd1
Memory Sell
Memory Tcf7
Activation CD69
Cytotoxic Gzmb
Cytotoxic Prf1
Exhaustion Havcr2
Exhaustion Tigit
e
Fraction of total CD8⁺ T cells (%)
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb
RD-αPD-1 mAb + Comb
Effector/Exhausted
Effector memory
Resident memory
Central memory

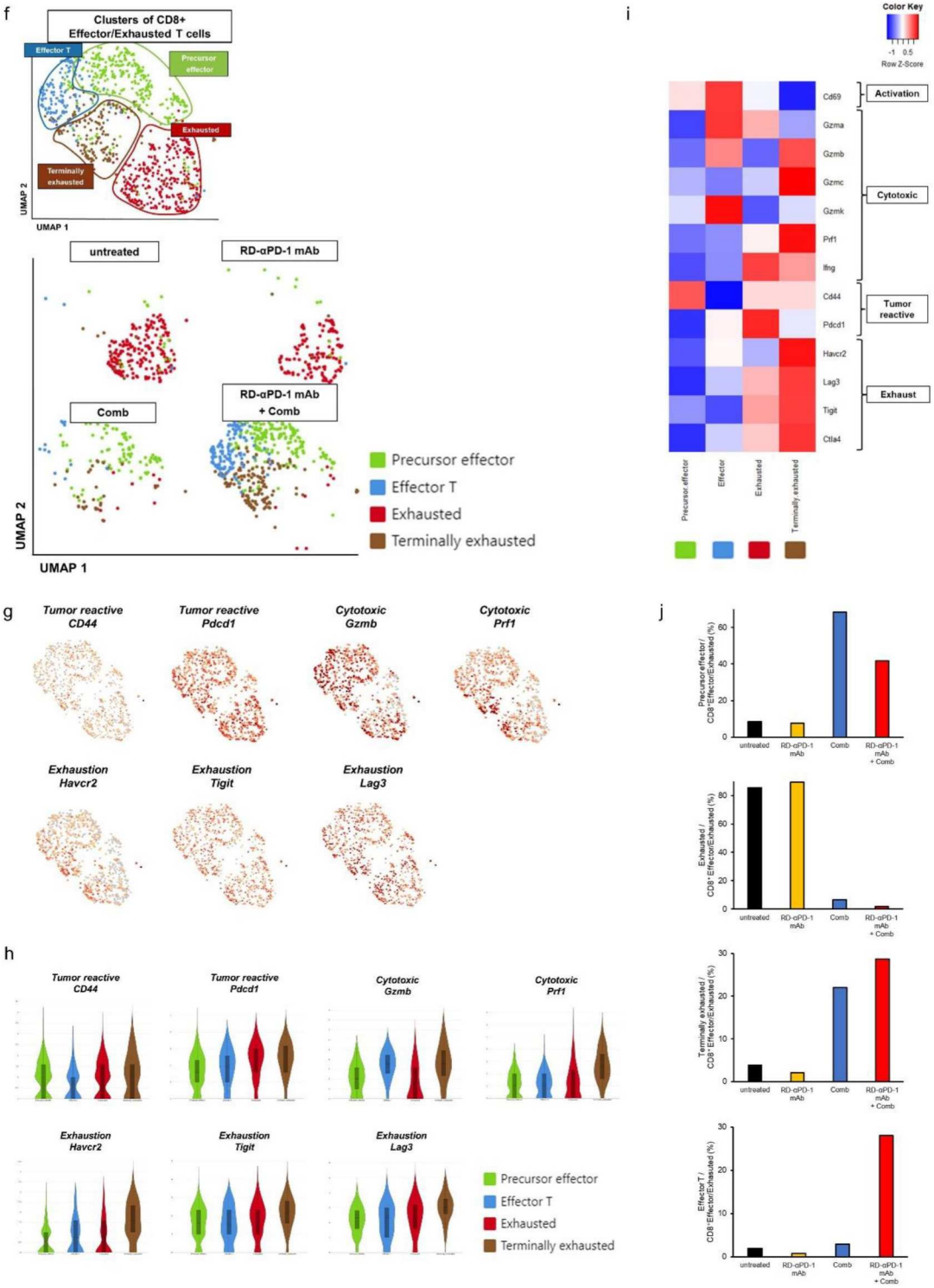

f
Clusters of CD8+ Effector/Exhausted T cells
Effector T
Precursor effector
Exhausted
Terminally exhausted
UMAP 2
UMAP 1
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb
RD-αPD-1 mAb + Comb
Precursor effector
Effector T
Exhausted
Terminally exhausted
i
Color Key
-1 0.5
Row Z-Score
Cd69
Gzma
Gzmb
Gzmc
Gzmk
Prf1
Ifng
Cd44
Pdcd1
Havcr2
Lag3
Tigit
Ctla4
Activation
Cytotoxic
Tumor reactive
Exhaust
g
Tumor reactive CD44
Tumor reactive Pdcd1
Cytotoxic Gzmb
Cytotoxic Prf1
Exhaustion Havcr2
Exhaustion Tigit
Exhaustion Lag3
h
j
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb
RD-αPD-1 mAb + Comb

図 3

RD-αPD-1 mAb と Comb の併用による CD8⁺腫瘍浸潤リンパ球の疲弊プロファイルへの影響

(a) 実験の概要(single cell RNA sequence: scRNA-seq)

C57BL/6 マウスに対し、MC38 を皮下移植した。5 日目および 12 日目に、RD-αPD-1 mAb 単剤、Comb 単剤、または RD-αPD-1 mAb と Comb の併用療法をそれぞれ行った。14 日目に腫瘍組織から免疫細胞を採取し、scRNA-seq を実施した。

(b) $CD8^+$ T 細胞の UMAP プロット

各治療群における腫瘍内の $CD8^+$ T 細胞の分布を、UMAP で可視化した。

(c) $CD8^+$ T 細胞の遺伝子発現プロファイル

$CD8^+$ T 細胞で発現している特定の遺伝子を UMAP 上に重ね合わせて示した。

(d) $CD8^+$ T 細胞における遺伝子発現ヒートマップ

代表的な遺伝子(行) の発現量を、各 $CD8^+$ T 細胞集団(列)間で比較し、ヒートマップとして可視化した。

(e) 各 $CD8^+$ T 細胞プロファイルの割合

各治療群における CD8⁺ T 細胞の各プロファイルの割合を比較した。

(f) CD8⁺ Effector/Exhausted T 細胞の UMAP

各治療群における腫瘍内の CD8⁺ Effector/Exhausted T 細胞の分布を UMAP で可視化した。

(g) CD8⁺ Effector/Exhausted T 細胞の遺伝子発現プロファイル

CD8⁺ Effector/Exhausted T 細胞で発現している特定の遺伝子を UMAP プロット上に重ね合わせて示した。

(h) CD8⁺ Effector/Exhausted T 細胞の遺伝子発現バイオリンプロット

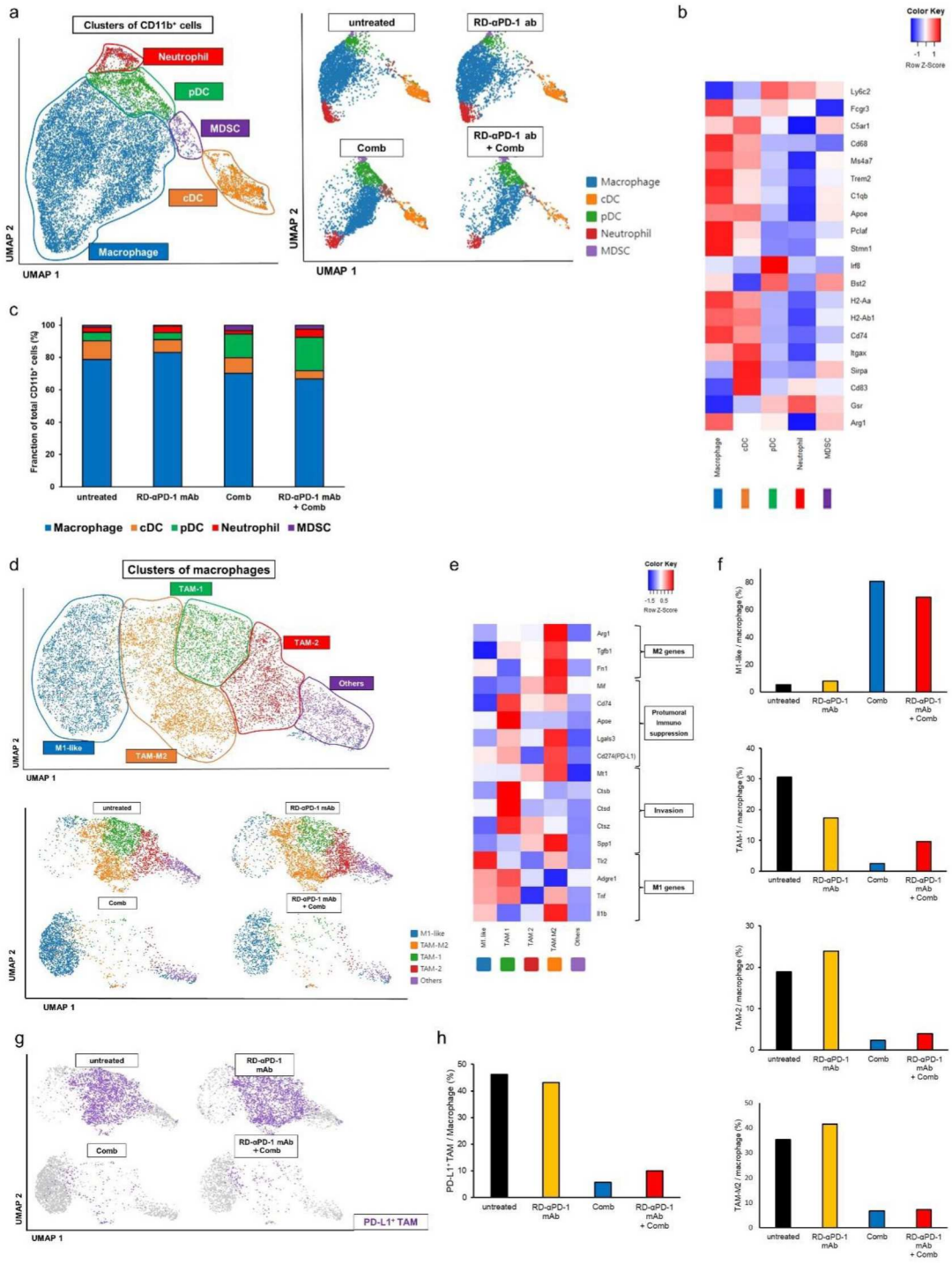
各 CD8⁺ Effector/Exhausted T 細胞集団における選択した遺伝子の発現量を、バイオリンプロットで示した。

(i) CD8⁺ Effector/Exhausted T 細胞の遺伝子発現ヒートマップ

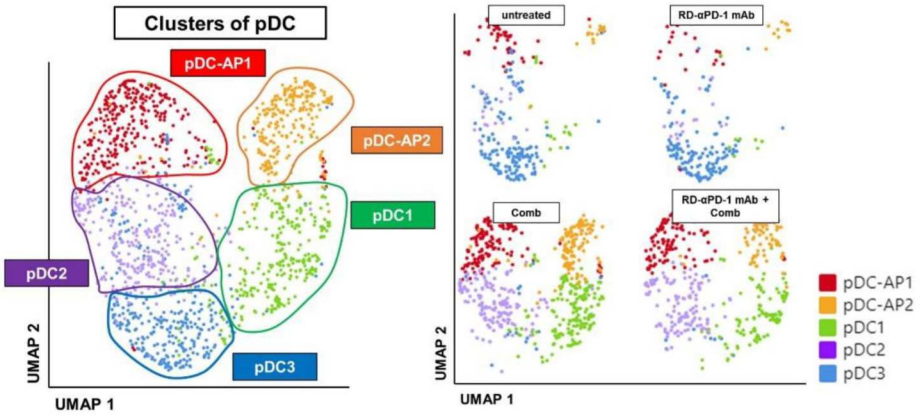
各 CD8⁺ Effector/Exhausted T 細胞集団における選択した遺伝子の発現量を比較し、ヒートマップとして可視化した。

(j) CD8⁺ Effector/Exhausted T 細胞の各集団の割合

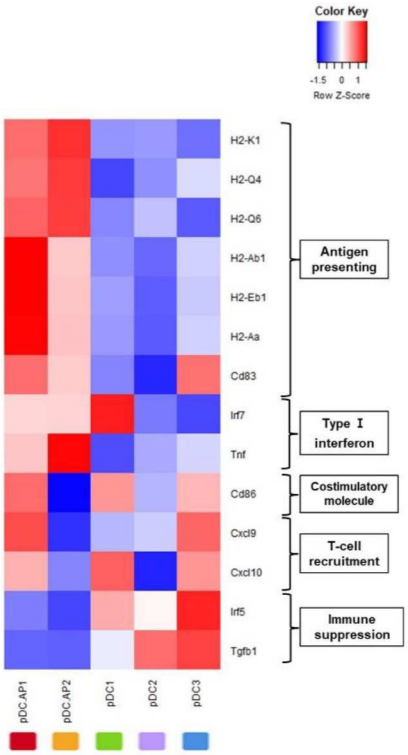
各治療群における CD8⁺ Effector/Exhausted T 細胞の個々の細胞集団の割合を比較した。


a
Clusters of CD11b⁺ cells
Neutrophil
pDC
MDSC
cDC
Macrophage
UMAP 2
UMAP 1
untreated
RD-αPD-1 ab
Comb
RD-αPD-1 ab + Comb
Macrophage
cDC
pDC
Neutrophil
MDSC
b
Color Key
Row Z-Score
Ly6c2
Fcgr3
C5ar1
Cd68
Ms4a7
Trem2
C1qb
Apoe
Pclaf
Stmn1
Ifi6
Bst2
H2-Aa
H2-Ab1
Cd74
Itgax
Sirpa
Cd83
Gsr
Arg1
Macrophage
cDC
pDC
Neutrophil
MDSC
c
Franction of total CD11b⁺ cells (%)
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb
RD-αPD-1 mAb + Comb
Macrophage
cDC
pDC
Neutrophil
MDSC
d
Clusters of macrophages
TAM-1
TAM-2
Others
M1-like
TAM-M2
UMAP 2
UMAP 1
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb
RD-αPD-1 mAb + Comb
M1-like
TAM-M2
TAM-1
TAM-2
Others
e
Color Key
Row Z-Score
Arg1
Tgfb1
Fn1
Mif
Cd74
Apoe
Lgals3
Cd274(PD-L1)
Mt1
Ctsb
Ctsd
Ctsz
Spp1
Tlr2
Adgre1
Tnf
Il1b
M2 genes
Protumoral Immuno suppression
Invasion
M1 genes
M1 like
TAM 1
TAM 2
TAM M2
Others
f
M1-like / macrophage (%)
TAM-1 / macrophage (%)
TAM-2 / macrophage (%)
TAM-M2 / macrophage (%)
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb
RD-αPD-1 mAb + Comb
g
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb
RD-αPD-1 mAb + Comb
PD-L1⁺ TAM
UMAP 2
UMAP 1
h
PD-L1⁺ TAM / Macrophage (%)
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb
RD-αPD-1 mAb + Comb

i


Clusters of pDC
pDC-AP1
pDC-AP2
pDC1
pDC2
pDC3
UMAP 2
UMAP 1
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb
RD-αPD-1 mAb + Comb
pDC-AP1
pDC-AP2
pDC1
pDC2
pDC3

j


Color Key
-1.5 0 1
Row Z-Score
H2-K1
H2-Q4
H2-Q6
H2-Ab1
H2-Eb1
H2-Aa
Cd83
Irf7
Tnf
Cd86
Cxcl9
Cxcl10
Irf5
Tgfb1
Antigen presenting
Type I interferon
Costimulatory molecule
T-cell recruitment
Immune suppression
pDC.AP1
pDC.AP2
pDC1
pDC2
pDC3

k

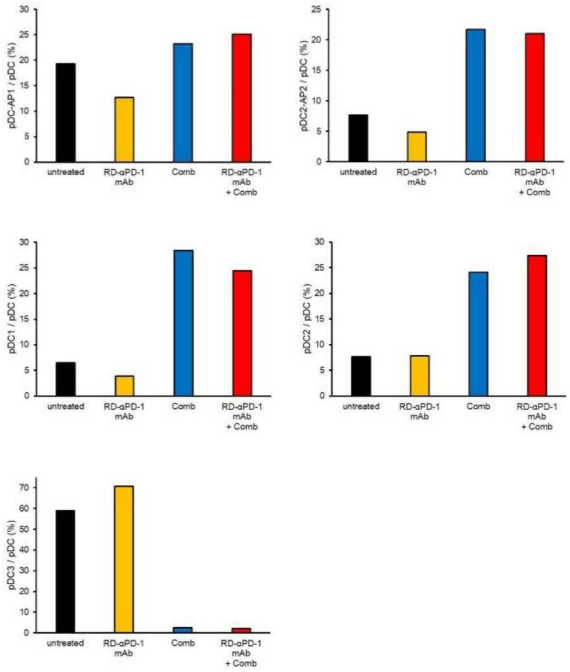

pDC-AP1 / pDC (%)
pDC2-AP2 / pDC (%)
pDC1 / pDC (%)
pDC2 / pDC (%)
pDC3 / pDC (%)
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb
RD-αPD-1 mAb + Comb

図 4

Comb は腫瘍微小環境を再構築する

(a) itgam^{+} 細胞の UMAP

各治療群における itgam^{+} 細胞の分布を、UMAP で可視化した。

(b) 骨髄系細胞サブセットの同定に用いた代表的な遺伝子の発現を示すヒートマップ

特定の骨髄系細胞サブセットを同定するための代表的な遺伝子の発現量をヒートマップとして可視化した。

(c) 各治療群における骨髄系細胞の割合

各治療群におけるマクロファージ、古典的樹状細胞(cDC)、形質細胞様樹状細胞(pDC)、好中球、および骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)の割合を比較した。

(d) マクロファージの UMAP

各治療群におけるマクロファージの分布を UMAP プロットで可視化した。

(e) 5 つのマクロファージの細胞集団における遺伝子発現を示すヒートマップ

各マクロファージの細胞集団における選択した遺伝子の発現量を比較し、ヒートマップとして可視化した。

(f) 各治療群におけるマクロファージサブセットの割合

M1 様マクロファージ、腫瘍関連マクロファージ(TAM1、TAM2、TAM-M2)の割合を各治療群間で比較した。

(g) PD-L1^{+} TAM の UMAP

TAM クラスター内における PD-L1^{+} TAM の分布を UMAP プロットで可視化した。

(h) 各治療群における PD-L1^{+} TAM の割合

PD-L1 を発現する TAM の割合を各治療群間で比較した。

(i) pDC の UMAP プロット

各治療群における pDC の分布を UMAP プロットで可視化した。

(j) pDC の細胞集団ごとの遺伝子発現ヒートマップ

各 pDC の細胞集団における選択した遺伝子の発現量を比較し、ヒートマップとして可視化した。

(k) 各治療群における pDC サブセットの割合

各治療群における pDC-AP1、pDC-AP2、pDC1、pDC2、および pDC3 の割合を比較した。

cDC(conventional dendritic cell、古典的樹状細胞)、MDSC(myeloid-derived immunosuppressive cell、骨髄由来免疫抑制細胞)、pDC(plasmacytoid dendritic cell、形質細胞様樹状細胞)、TAM(tumour-associated macrophage、腫瘍関連マクロファージ)。

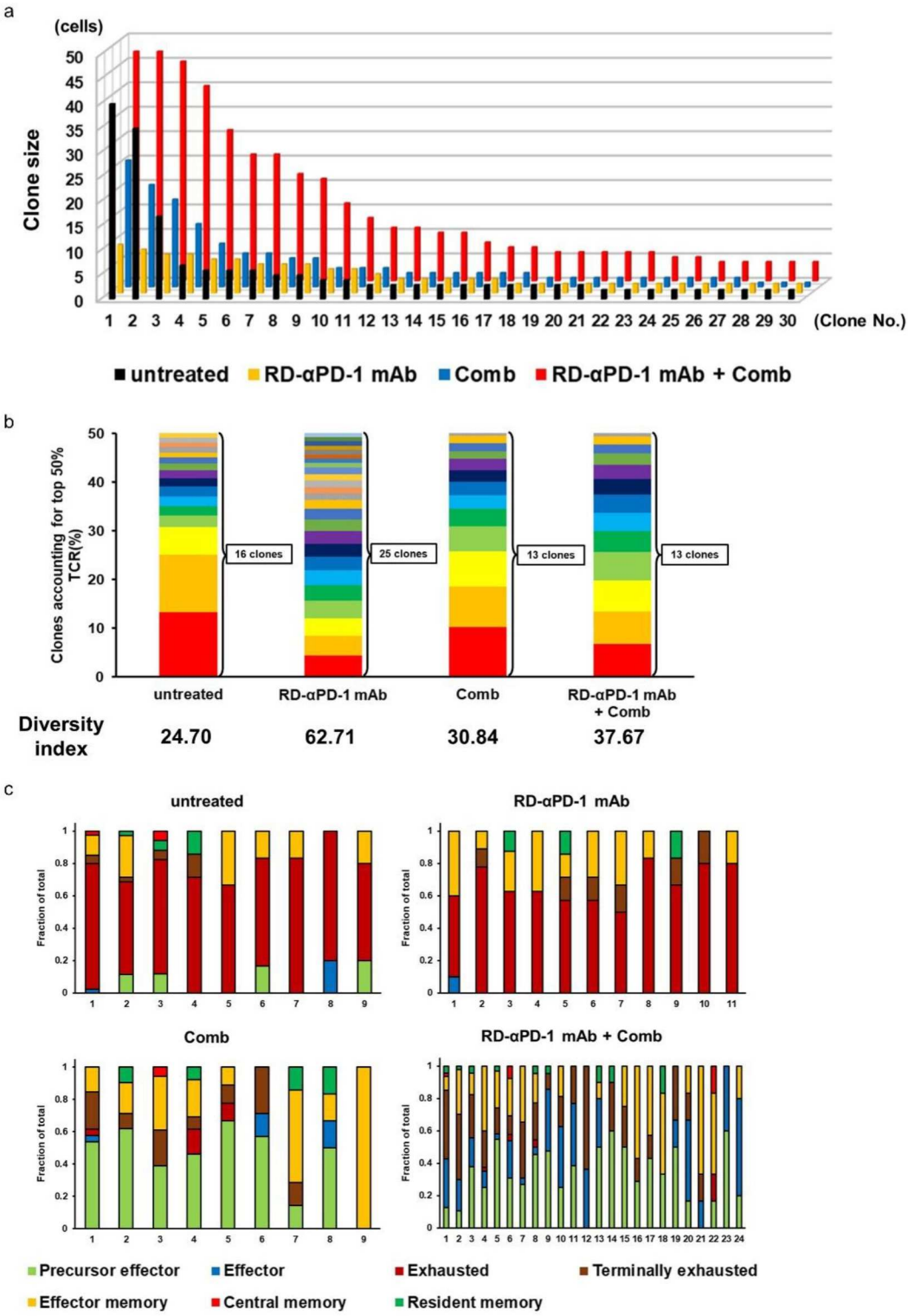

a
(cells)
Clone size
(Clone No.)
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb
RD-αPD-1 mAb + Comb
b
Clones accounting for top 50% TCR(%)
16 clones
25 clones
13 clones
13 clones
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb
RD-αPD-1 mAb + Comb
Diversity index
24.70
62.71
30.84
37.67
c
untreated
RD-αPD-1 mAb
Comb
RD-αPD-1 mAb + Comb
Fraction of total
Precursor effector
Effector
Exhausted
Terminally exhausted
Effector memory
Central memory
Resident memory

図 5

RD-αPD-1 mAb と Comb の併用は、多様なプロファイルを有する $CD8^+$ 腫瘍浸潤リンパ球(TILs) のオリゴクローナルな増殖を誘導する

(a) 各治療群における TCR クローンの上位 30 種のクローン拡大を示す棒グラフ

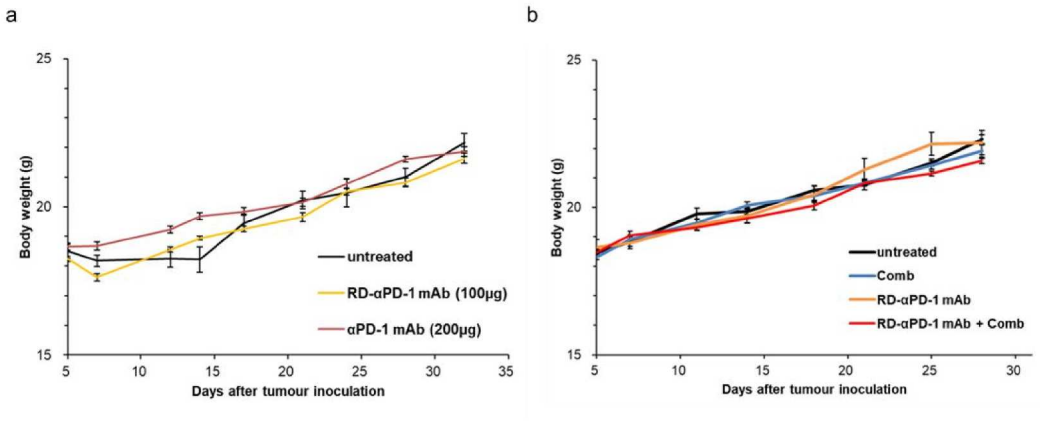
各治療群におけるクローン拡大した $CD8^+$ T 細胞のうち、T 細胞受容体(TCR) クローン数が最も多い 30 種について、棒グラフを用いて可視化した。

(b) 上位 50%の TCR を構成するクローン数および TCR の多様性評価（Simpson’s 指数）

$CD8^+$ T 細胞において、TCR クローン数の上位 50%を占めるクローンの総数を算出し、TCR の多様性を Simpson’s 指数を用いて評価した。

(c) 各治療群における TCR クローンが 5 細胞以上の単一クローンに属する細胞のプロファイルの相対割合

各治療群において、5 細胞以上の単一 TCR クローンに属する細胞を抽出し、それぞれの細胞プロファイルの相対割合を比較した。

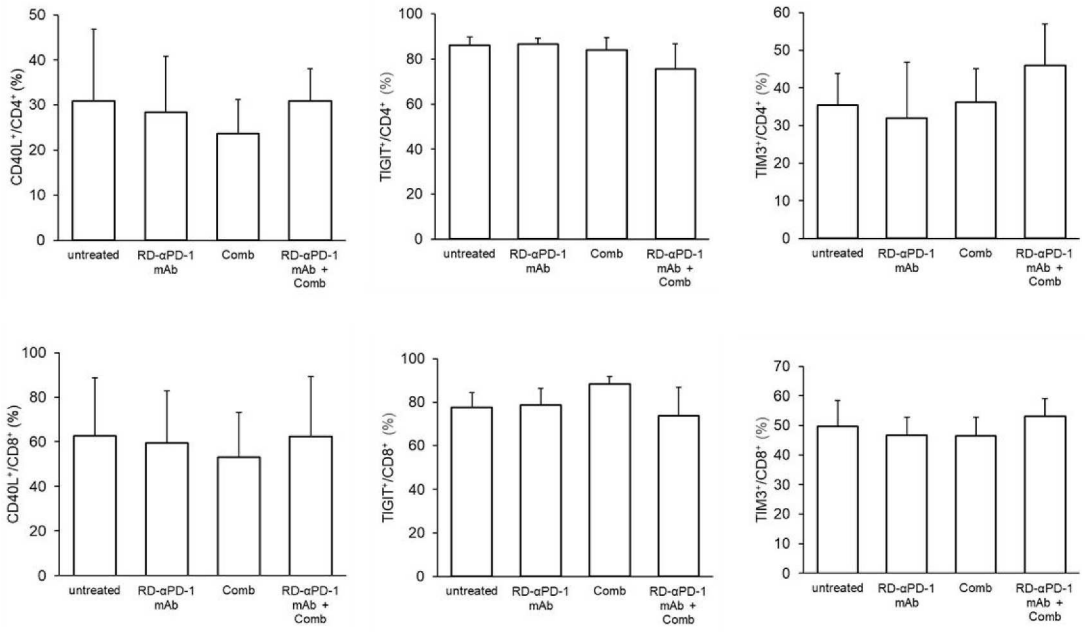


補足図 1

各群における体重の経過

(a) MC38 を皮下移植したマウスに対し、抗 PD-1 モノクローナル抗体(αPD-1 mAb)を 100 μg または 200 μg の投与量で、それぞれ 5 日目、12 日目、19 日目に投与した。これら 3 群のマウスの体重を経時的に測定した。

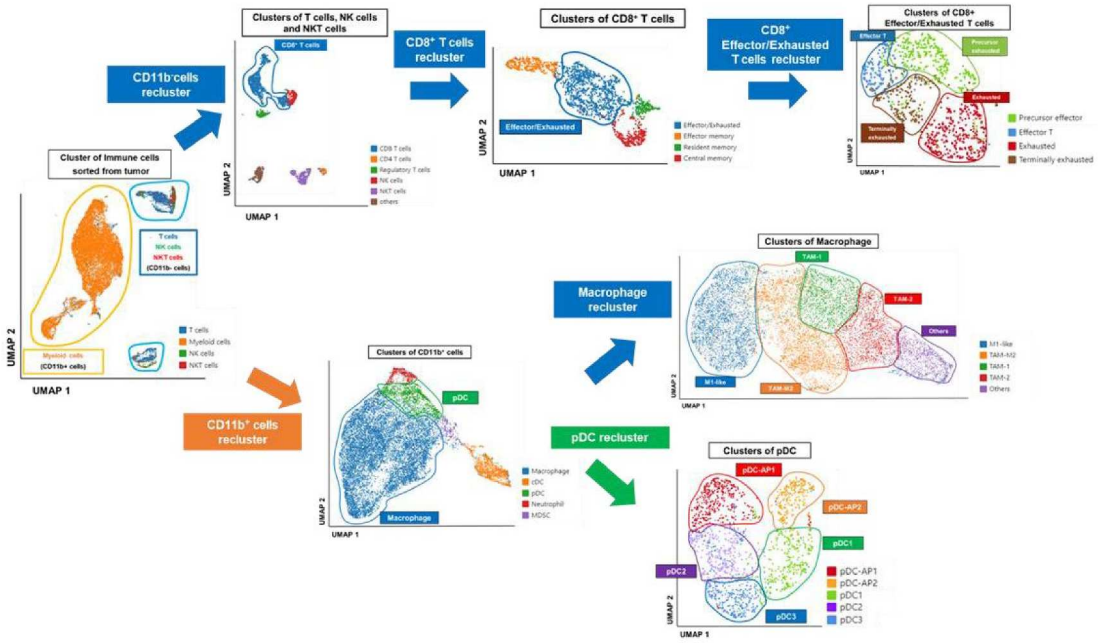
(b) MC38 を皮下移植したマウスに対し、無治療、低用量の抗 PD-1 モノクローナル抗体(RD-αPD-1 mAb) 単剤、新規複合免疫製剤(Comb)単剤、および RD-αPD-1 mAb と Comb の併用療法の 3 種類の治療を、それぞれ 5 日目、12 日目、19 日目に行った。これら 4 群のマウスについて、経時的に体重を測定した。



補足図 2

腫瘍浸潤リンパ球(TILs) における CD4⁺ T 細胞および CD8⁺ T 細胞の CD40L、TIGIT、TIM-3 の発現

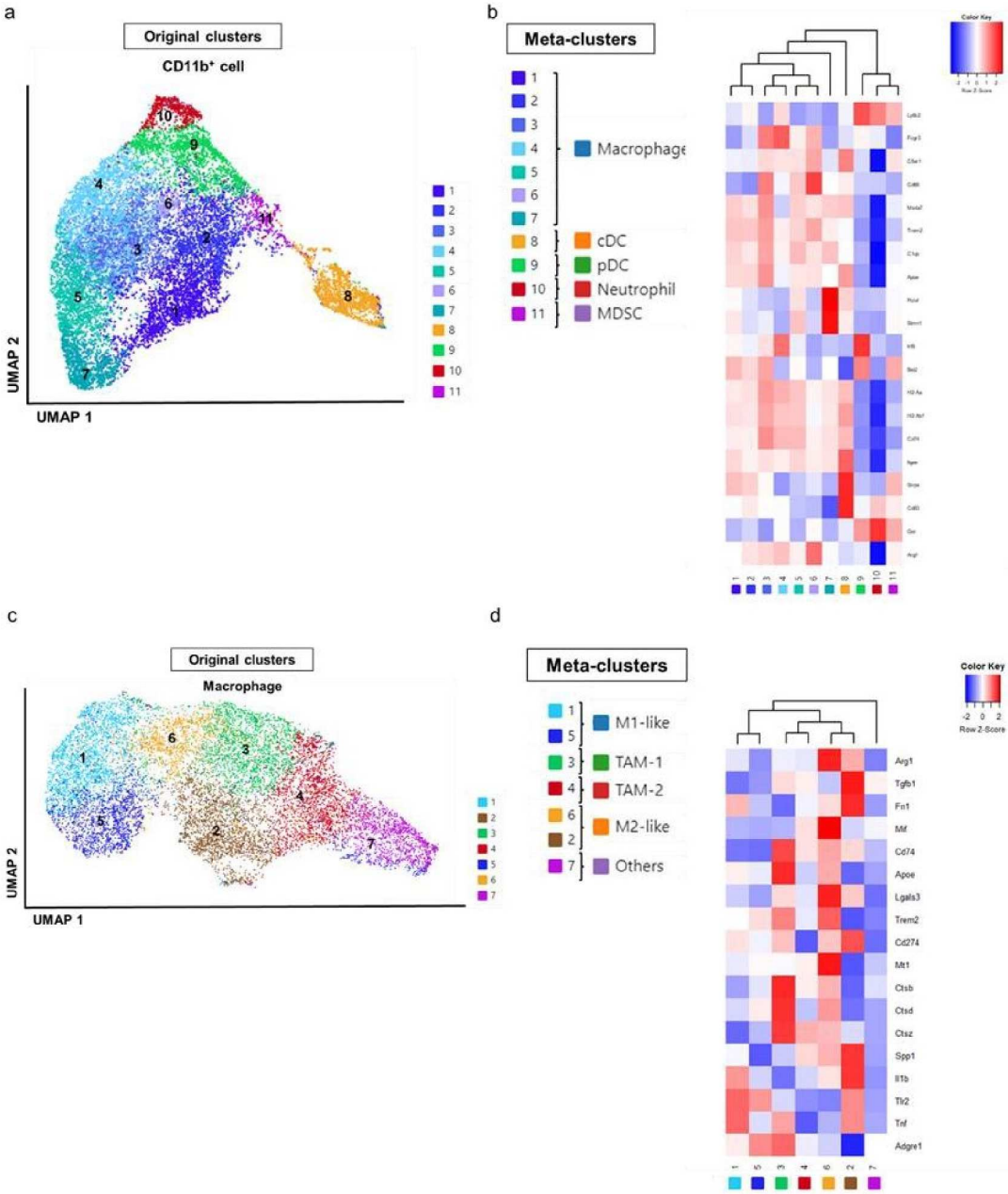
C57BL/6 マウスに対し MC38 を皮下移植し、5 日目および 12 日目に低用量の抗 PD-1 モノクローナル抗体(RD-αPD-1 mAb)単剤、新規複合免疫製剤(Comb)単剤、RD-αPD-1 mAb と Comb の併用療法をそれぞれ投与した。14 日目に腫瘍浸潤免疫細胞を採取し、フローサイトメトリー解析を実施した。CD4⁺ T 細胞および CD8⁺ T 細胞における CD40L、TIGIT、TIM-3 の発現を評価した。データは平均値 ± 標準偏差 (SD) として示し(n=6)、少なくとも 2 回の独立した実験の代表データを提示した。*P < 0.05。



補足図 3

UMAP の全体フローチャート。cDC(conventional dendritic cell、古典的樹状細胞)、MDSC(myeloid-derived immunosuppressive cell、骨髄由来免疫抑制細胞)、pDC(plasmacytoid dendritic cell、形質細胞様樹状細胞)

腫瘍浸潤免疫細胞の代表的なマーカーに基づく UMAP のクラスタリング過程に関してフローチャートの全体を示す。フローチャートの通り、免疫細胞を骨髄系細胞(itgam^{+}) とリンパ球系細胞(itgam^{-})に分類し、それぞれクラスタリングを行い詳細に分類した。



補足図 4

メタクラスターの階層的関係に基づく分類

cDC(conventional dendritic cell、古典的樹状細胞)、

MDSC(myeloid-derived immunosuppressive cell、骨髄由来免疫抑

制細胞)、pDC(plasmacytoid dendritic cell、形質細胞様樹状細胞)

(a) UMAP を用いて同定された itgam^{+} 骨髄系細胞の 11 のクラスターを示す。解析の過程でリンパ球系細胞を除いた後の結果を示した。

(b) 階層的関係に基づき、11 のクラスターを 5 つのメタクラスターに分類した。

(c) UMAP プロットを用いて同定されたマクロファージの 7 つのクラスターを示す。

(d) 階層的関係に基づき、7 つのクラスターを 5 つのメタクラスターに分類した。