

氏 名	鶴岡 健二郎
(ふりがな)	(つるおか けんじろう)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第1166号
学位審査年月日	令和2年7月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Exacerbation of autoimmune myocarditis by an immune checkpoint inhibitor is dependent on its time of administration in mice (自己免疫性心筋炎モデルマウスにおける免疫チェックポイント阻害剤による増悪はその投与時期に依存する)
論文審査委員	(主) 教授 星賀 正明 教授 高井 真司 教授 根本 慎太郎

学位論文内容の要旨

《背景》

近年、抗 PD-1 抗体に代表される免疫チェックポイント分子と呼ばれる免疫応答を負に制御する分子に対するモノクローナル抗体（免疫チェックポイント阻害剤）が劇的な抗腫瘍効果を発揮している。悪性黒色腫、肺癌、腎細胞癌、Hodgkin リンパ腫、頭頸部癌など様々な癌種でこれまでの標準治療に対する優越性が示され臨床応用が進んでおり、今後も新規の薬剤の承認や、他の癌種への適応拡大が進むと考えられている。一方で、免疫チェックポイント阻害剤に特有の有害事象として、免疫関連有害事象（immune-related adverse events: irAE）という免疫の活性化に伴うものがあり、全身のあらゆる臓器に出現し、頻度の高い有害事象として、間質性肺炎、大腸炎、肝機能障害、内分泌障害などが挙げられ

る。心筋炎はそれほど頻繁では無いものの、しばしば致命的な経過をたどり重要な irAE として認識されている。また、自己免疫疾患を有する症例では irAE の頻度が高くなるという報告もあり、irAE の出現には治療前の自己免疫の程度に依存していると考えられているが、心臓における免疫チェックポイント阻害剤と irAE との関係については未だ明らかでない。

《目 的》

免疫チェックポイント阻害剤と心臓における irAE との関係を明らかにすることを目的とした。

《方 法》

一般に心臓における自己免疫疾患の検討には実験的自己免疫性心筋炎 (experimental autoimmune myocarditis: EAM) モデルマウスが広く用いられることから、本研究でも EAM モデルマウスを用いることとした。EAM モデルマウスは 7 週齢のオスの BALB/c に心筋ミオシン断片 MyHC α 614-629 (1mg/mL) 0.05mL とアジュバンド 0.05mL を混合したエマルジョンを Day0 および Day7 に皮下投与、さらに Day0 に百日咳毒素 (5 μ g/mL) 0.1mL を腹腔内投与することにより作製した。

作製した EAM モデルマウスに対し、Day14、16、18、20 (後投与群) と Day0、2、4、6 (前投与群) の異なる 2 つのタイミングで抗 PD-1 抗体 0.1mg を腹腔内投与し、心筋ミオシン断片の投与の有無、抗 PD-1 抗体の投与の有無により 4 つのグループに分け、Day21 に超音波検査にて心機能を示すパラメータを評価した後に心臓を摘出し、心体重比による心肥大の評価、HE 染色で炎症細胞浸潤の広がりスコアリングする EAM スコアによる心筋炎を起こしているマウスの割合の評価、qRT-PCR による炎症系サイトカイン (IL1 β 、IL6、Col1、PD-L1) の mRNA 発現のレベルが増加しているマウスの割合の評価、免疫染色による浸潤細胞数 (CD4 陽性細胞、CD8 陽性細胞、CD19 陽性細胞、F4/80 陽性細胞) の評価を行った。EAM スコアによる評価は、心臓断面における炎症細胞の浸潤面積の割合

に基づき、浸潤なしを Grade0、<25%の浸潤を Grade1、25-50%の浸潤を Grade2、50-75%の浸潤を Grade3、≥75%の浸潤を Grade4 とした。心筋ミオシン断片のコントロールには PBS 0.1mL、抗 PD-1 抗体のコントロールにはラット IgG 0.1mg を投与した。

《結 果》

1、後投与群の結果

心臓超音波検査では、各群間で心機能を示すパラメータに有意な変化は認められなかった。心体重比は心筋ミオシン断片による免疫化は心体重比を増加させたが、抗 PD-1 抗体の投与による変化は認められなかった。HE 染色では心筋ミオシン断片を投与したグループにおいて、抗 PD-1 抗体を投与することにより EAM スコアが高いマウスの割合が増加した。qRT-PCR では心筋ミオシン断片を投与したグループにおいて、抗 PD-1 抗体を投与することにより IL18、IL6、Col1 の発現レベルの高いマウスの割合が増加した。免疫染色では心筋ミオシン断片を投与したグループにおいて、抗 PD-1 抗体を投与することにより CD4 陽性細胞、F4/80 陽性細胞の浸潤の増加を認めた。

2、前投与群の結果

心臓超音波検査では、各群間で心機能を示すパラメータに有意な変化は認められなかった。心体重比は心筋ミオシン断片による免疫化は心体重比を増加させたが、抗 PD-1 抗体の投与による変化は認められなかった。HE 染色では心筋ミオシン断片を投与したグループにおいて、抗 PD-1 抗体を投与しても EAM スコアが高いマウスの割合に有意差は認められなかった。qRT-PCR では心筋ミオシン断片を投与したグループにおいて、抗 PD-1 抗体を投与することにより IL18 の発現レベルの高いマウスの割合が低下した。免疫染色では心筋ミオシン断片を投与したグループにおいて、抗 PD-1 抗体を投与することにより CD4 陽性細胞の浸潤が有意に少なかった。

《考 察》

本研究では、後投与群において心筋炎の発症割合が有意に増加したが、前投与群におい

ては心筋炎の発症割合は増加しなかった。このことから、EAMモデルマウスにおいて、その心筋炎の発症過程のどの時期に抗 PD-1 抗体を投与するかによって、心筋炎の発症割合に変化をもたらすことを示した。

後投与群では免疫系はすでに賦活化されているが前投与群ではまだされていないものと考えられることから、抗 PD-1 抗体によって引き起こされる自己免疫性心筋炎の出現は、抗 PD-1 抗体投与時の心臓の自己免疫系の賦活化の程度に依存する可能性があることを示唆している。

《結 論》

免疫チェックポイント阻害剤投与後の心筋炎の発症は、投与前の心臓における自己免疫の程度に依存している可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

近年、免疫チェックポイント阻害剤が劇的な抗腫瘍効果を示し臨床応用が進んでいる。一方で、免疫チェックポイント阻害剤には免疫関連有害事象 (immune-related adverse events: irAE) という免疫の活性化に伴う副作用があり、全身のあらゆる臓器に出現する。中でも、免疫チェックポイント阻害剤による心筋炎は稀であるが、致死的な経過をたどることがあり、その予防戦略の確立が強く望まれている。

申請者は、心筋ミオシン断片の投与による実験的自己免疫性心筋炎 (experimental autoimmune myocarditis: EAM) モデルマウスに対して、心筋ミオシン断片の投与 2 週間後と心筋ミオシン断片投与と同時の異なる 2 つのタイミングで抗 PD-1 抗体を投与し、心臓における自己免疫に及ぼす変化を検討した。その結果、心筋組織染色において、心筋ミオシン断片の投与 2 週間後の抗 PD-1 抗体投与により、炎症細胞が広範囲に浸潤しているマウスの割合が有意に増加した。qRT-PCR にて、IL18、IL6、Col1 の発現レベルの高いマウスの割合、また免疫組織染色にて、CD4 陽性細胞、F4/80 陽性細胞の浸潤が有意に増加した。同様の解析を心筋ミオシン断片と抗 PD-1 抗体の同時投与群でも行い、炎症細胞浸潤の広がりには影響を及ぼさず、IL18 の発現レベルの高いマウスの割合、CD4 陽性細胞の浸潤が有意に低下するという結果を得た。

これらの結果から、免疫チェックポイント阻害剤による心筋炎の発症割合の増加はマウスへの投与時期に依存する、即ち免疫チェックポイント阻害剤により誘発される自己免疫性心筋炎の出現は免疫チェックポイント阻害剤投与前の自己免疫系の活動に関連している可能性が示唆される。そのメカニズムのさらなる解析は今後必要となるが、免疫チェックポイント阻害剤による心筋炎の予防戦略の一助となるものと考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

International Journal of Cardiology 313: 67-75, 2020 Aug

doi: 10.1016/j.ijcard.2020.04.033.