

学位論文題名

# TIM-4 blockade augments therapeutic efficacy of Cancer therapy by immune-mediated mechanisms

(TIM-4阻害は免疫介在性メカニズムによって癌治療効果を増強する)

## 学位論文内容の要旨

### 【Background】

Antigen-presenting cells (APCs) play a central role in regulating both innate and adaptive immunity and have a major role in the initiations of immune responses against tumor. However, it is now clear that APCs within tumor microenvironment are characterized by functional deficiencies associated with impaired antitumor response. Thus, it is critically important to understand the mechanisms by which APCs interact with the tumor microenvironment in order to improve the clinical output of cancer therapy.

The T-cell immunoglobulin domain and mucin domain (*TIM*) family of genes consists of Type I cell surface molecules with a unique structure and important broad immune functions that include the regulation of allergy and asthma, and also the regulation of autoimmunity, transplantation immunity, and tumor immunity. Recent studies have revealed TIM-3 as a negative regulator of antitumor immunity, which blockade enhances immune responses against tumor.

TIM-4 is expressed exclusively in APCs, and regulates of engulfment of apoptotic cells by APCs through interaction with phosphatidylserine on apoptotic cells. Recent analysis of TIM-4-deficient mice has demonstrated that TIM-4 serves as a negative regulator of inflammation and autoimmunity. However, the role of TIM-4 in regulating antitumor immunity remains unknown.

### 【Purpose】

In this study we evaluate the role of TIM-4 in regulating APCs-mediated antitumor immunity. We also examine the impact of TIM-4 blockade on the therapeutic effects of cancer therapy. Finally, we evaluate the therapeutic effects of the combined blockade of TIM-3 and TIM-4 on enhancing antitumor immunity to produce durable clinical responses.

### 【Methods】

To explore a potential role for TIM-4 in regulating antitumor responses of APCs at the tumor microenvironment, we examined the expression of TIM-4 in dendritic cells and macrophages isolated from murine tumors or cancer patients. To evaluate the role of TIM-4 on the key functions

of APCs, we utilized a monoclonal antibody (RMT4-53) which targets and blocks the functional IgV domain of TIM-4, and examined the impact of TIM-4 blockade on cytokine production (IL-12, IL-10) and tumor-derived antigen presentation to CD8<sup>+</sup> effector T cells in TIM-4<sup>+</sup> DCs or macrophages. We also evaluate the impact of TIM-4 blockade on the therapeutic effects of cancer therapy through the combination between anti-TIM-4 mAbs and anticancer drugs like cisplatin, doxorubicin or dacarbazine, or through the combination with cancer vaccines like irradiated Flt3L secreting B16 tumor cells (FVAX), and DNA vaccines which encodes tumor-associated antigens sequences against established tumors. Finally, we asked if the combined blockade of TIM-3 and TIM-4 could further enhance antitumor immunity to produce durable clinical responses.

### **【Results】**

TIM-4 was found to be highly induced in tumor-infiltrating DCs and macrophages in the tumor microenvironment by tumor-derived immunosuppressive factors such as IL-10 and VEGF-A. The expression of TIM-4 in tumor-infiltrating DCs and macrophages was found to induce the production of anti-inflammatory cytokine IL-10, while it suppresses the production of pro-inflammatory cytokine IL-12. TIM-4 expressing APCs were also shown to have impaired presentation of tumor-derived antigens to CD8<sup>+</sup> effector T cells.

The blockade of TIM-4 with a monoclonal antibody was found to enhance the production of IL-12, inhibit IL-10 production, and increase the capacity of TIM-4<sup>+</sup> DCs or macrophages to induce tumor-specific T cells immune response. The treatment with anti-TIM-4 mAb synergizes with cytotoxic chemotherapy or cancer vaccine to suppress the *in vivo* growth of established tumors by triggering effective cross-priming of antigen-specific CTLs.

Additionally, we found that the combined blockade of TIM-3 and TIM-4 mAbs has markedly increased vaccine-induced antitumor responses against established B16 melanoma. TIM-3 blockade mainly stimulated antitumor effector activities via NK cell-dependent mechanisms, while CD8<sup>+</sup> T cells served as the main effectors induced by anti-TIM-4 mAbs.

### **【Discussion & Conclusions】**

In this study we identified TIM-4 as a critical factor for repressing antitumor immune responses mediated by antigen-presenting cells upon treatment with cytotoxic chemotherapy or cancer vaccines. TIM-4 blockade synergizes with cytotoxic chemotherapy or cancer vaccines to suppress the *in vivo* growth of established tumors by CD8<sup>+</sup> T cells-mediated mechanisms.

TIM-3 blockade was also found to enhance the therapeutic efficacies of cancer vaccines via NK cell-dependent mechanisms. Furthermore, the combination between anti-TIM-3 and anti-TIM-4 has markedly increased vaccine-induced antitumor responses against established B16 melanoma.

In summary, we have unveiled distinct roles for TIM-3 and TIM-4 in the regulation of innate and adaptive antitumor immunity. The molecular targeting of TIM-3 and TIM-4 provides a new therapeutic strategy to augment antitumor efficacy of immunotherapy and eradicate therapy-difficult tumors through the coordinated activation of innate and adaptive antitumor immune responses in tumor microenvironments.

## 学位論文審査の要旨

主査	教授	西村	孝司
副査	教授	上出	利光
副査	教授	秋田	弘俊
副査	教授	瀬谷	司

### 学位論文題名

## TIM-4 blockade augments therapeutic efficacy of Cancer therapy by immune-mediated mechanisms

(TIM-4阻害は免疫介在性メカニズムによって癌治療効果を増強する)

進行期の腫瘍においては癌細胞の影響により抗癌免疫を担う細胞が抑制される一方で、寛容系の細胞が浸潤してきて、癌の増殖や転移に都合が良い微小環境を作る。中でも、樹状細胞やマクロファージを含む抗原提示細胞の機能不全は抗腫瘍免疫応答を大きく障害すること、癌治療による治療効果にも大きい影響を与えることが良く知られている。TIM4 は樹状細胞やマクロファージのサブセットに発現して、免疫寛容の維持に重要な分子であることが判明しているが、腫瘍免疫応答に及ぼす役割については不明である。本研究では樹状細胞やマクロファージにおいてTIM4 が免疫抑制的な役割を演じる可能性を仮定し、腫瘍に対する影響を検証した。腫瘍微小環境におけるTIM4 の発現を検討するために、メラノーマ、肺癌、大腸癌などマウス固形癌モデルを対象として、腫瘍組織に浸潤している樹状細胞やマクロファージを分離し、脾臓など正常組織と発現パターンを比較した。その結果、脾臓に由来する細胞と比較して、腫瘍に浸潤している細胞ではTIM4 発現が極めて高発現することが判明した。癌細胞によるTIM4 の発現誘導を検証したところ、腫瘍細胞株の培養上清に樹状細胞やマクロファージにおけるTIM4 の誘導活性が認められた。TIM4 が樹状細胞やマクロファージの機能に与えるインパクトを明らかにするため、TIM4 陽性及びTIM4 陰性の骨髄細胞に由来する樹状細胞やマクロファージを対象としてCD8<sup>+</sup>T 細胞への抗原提示能を比較した。その結果、TIM4 陰性に比べてTIM4 陽性細胞が抗原提示低下を示して、抗TIM4 阻害抗体を投与すると抗原提示能が改善されることがわかった。更に、マウスにおける腫瘍に浸潤した樹状細胞やマクロファージを対象とした検証においても、TIM4 が抗原提示能を負に抑制することで腫瘍特異的CTL 誘導を障害すること、抗TIM4 抗体を投与すると抗原提示が改善され、腫瘍特異的CTL 活性化することが明らかになった。これらの結果より、TIM4 の治療的な阻害が抗癌剤や癌ワクチンによる抗腫瘍効果を高めることが期待された。

め、マウス腫瘍の皮下移植モデルを対象に抗癌剤や癌ワクチンと併用した抗 TIM4 抗体の抗腫瘍効果を検証した。その結果、抗 TIM4 抗体は抗癌剤や癌ワクチンによる抗腫瘍効果を有意に改善することが明らかになった。抗 TIM4 抗体による抗腫瘍効果に必要なエフェクター細胞を同定するために、NK 細胞と CD8<sup>+</sup>T 細胞の関与を検証した。その結果、抗体により NK 細胞を除去したマウスにおいても TIM4 の阻害による相乗的な抗腫瘍効果が認められたことに対して、獲得免疫能を欠失した免疫不全マウスや、抗体により CD8<sup>+</sup>T 細胞を除去したマウスにおいて TIM4 の阻害による抗腫瘍効果が認められなかったため、抗 TIM4 抗体による抗腫瘍効果は自然免疫細胞によるものではないこと、獲得免疫のエフェクター細胞である CD8<sup>+</sup>T 細胞によるものであることが示唆された。更に、腫瘍に対する自然免疫応答を活性化させる抗 TIM3 抗体と、本研究では新たに解明した獲得免疫応答を活性化させる抗 TIM4 抗体と併用すると、癌治療効果を最大に高めることから、抗 TIM3 抗体と抗 TIM4 抗体は癌治療に方向性と可能性を与えることが期待される。

スライドを用いた口頭発表後、副査の上出利光教授より TIM4 を誘導する腫瘍由来因子、抗癌剤抵抗性腫瘍と感受性腫瘍における腫瘍内ミエロイド細胞における TIM4 発現の変化、抗 TIM4 抗体の長期的な効果の検証について、副査の瀬谷司教授より抗体の至適使用条件、ミエロイド細胞以外の免疫細胞における TIM4 発現誘導、TIM3 による自然免疫の抑制機構について、副査の秋田弘俊教授より免疫細胞サブセットにおける TIM4 発現、TIM4 によるシグナル伝達の分子機構について、主査の西村孝司教授より TIM4 のリガンド、TIM4 による免疫抑制機構、CD4<sup>+</sup>T 細胞の関与について質問があった。申請者はその主旨をよく理解し、自らの研究内容と文献的考察を混じえて適切に回答した。ただし、TIM4 発現を誘導する因子の同定や TIM4 によるシグナル伝達の分子機構については、今後の課題として検討の必要性を強調した。

本論文は、腫瘍微小環境における樹状細胞やマクロファージでの TIM4 発現動態や抗腫瘍免疫機構を解明したこと、抗 TIM4 抗体が既存の抗癌剤による抗腫瘍効果の増強効果を有することを明らかにした点で高く評価された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。