

学 位 論 文 題 名

担癌モデルマウスにおける TGF- β の免疫抑制機序に関する研究

学位論文内容の要旨

悪性腫瘍患者において腫瘍の進展にともない免疫機能が低下する傾向が多くみられる。担癌宿主に免疫抑制状態を誘導する液性因子の探索、および腫瘍宿主の免疫抑制状態からの解除に関して既に多くの研究報告があり、抗腫瘍免疫増強の1つのターゲットとなっている。この免疫抑制状態を誘導する、いわゆる免疫抑制因子として、腫瘍あるいは宿主の産生するタンパク性因子がこれまでに数多く同定された。これらの中で、近年多種の腫瘍より産生されることが明らかとなった Transforming growth factor- β (TGF- β) が注目されている。本研究では、マウス胸腺細胞腫 EL4 担癌モデルマウスにおける腹水中 TGF- β の同定、さらに同担癌マウスにおけるマクロファージ機能抑制、および T 細胞サブセット変化に対する TGF- β の影響の解析を目的とする。本論文の要旨は以下の4点である。

1. マウス胸腺細胞腫 EL4 担癌モデルマウスの腹水中にマウスリンパ球、ミンク肺上皮細胞株、Mv1Lu の増殖を抑制する因子が存在すること、さらにこの増殖抑制活性が抗 TGF- β 抗体添加により阻害されることを見出した。また、抗 TGF- β 1 抗体を用いた ELISA 法、およびウェスタンブロッティング法といった生化学的手法により EL4 担癌マウス腹水中に TGF- β 1 が検出されることを示し、本因子が TGF- β 1 であることを明らかにした。

2. EL4 担癌マウスの腹腔内マクロファージにおいて、腫瘍移植後経日的な抗腫瘍エフェクター因子である TNF- α 、および一酸化窒素 (nitric oxide、NO) 産生能の低下、および EL4 細胞に対する *in vitro* 抗腫瘍活性の低下が認められた。抗 TGF- β 抗体腹腔内投与により EL4 担癌マウス腹水中の TGF- β が検出限界以下に中和されることを確認後、同抗体投与マウスマクロファージの NO、TNF- α 産生能、および抗腫瘍活性を検討した。その結果、抗 TGF- β 抗体投与マウス由来マクロファージの NO、TNF- α 産生が、抗体非投与マウス由来マクロファージに比べ著明に増加し、非担癌マウスマクロファージと同程度まで回復した。また、抗腫瘍活性の増強も認められた。

3. EL4 担癌マウス腹水中に TGF- β 以外に腫瘍進展にともなって interleukin-10 (IL-10) が増加しており、腹腔内マクロファージの IL-10 産生能が正常マウスに比べて亢進していることを見出した。RT-PCR 法により IL-10 mRNA レベルを解析したところ、EL4 腫瘍細胞には IL-10 mRNA は検出されず、宿主マクロファージに腫瘍移植後経日的な IL-10 mRNA レベルの増加が認められた。さらに *in vitro* において EL4 担癌マウスマクロファージは無刺激で IL-10 を産生し、LPS 刺激により IL-10 産生は促進され、IL-10 産生能亢進が認められた。EL4 担癌マウスに抗 TGF- β 抗体を投与

したところ、腹腔内マクロファージの *in vitro* IL-10 産生能、および IL-10 mRNA レベルは正常マウスレベルまで低下し、腹水中の IL-10 量も低下した。以上の結果から、EL4 移植マウスマクロファージは腫瘍由来 TGF- β により NO、TNF- α 産生能が低下し、逆に IL-10 産生能は亢進しており、宿主の免疫抑制状態の進展への関与が示唆された。

4. EL4 担癌マウス T 細胞に対する TGF- β 、および IL-10 の関与を解明すべく、抗 TGF- β 抗体、および抗 IL-10 抗体の投与を試みた。抗体投与に先立って EL4 担癌マウス T 細胞の抗 CD3 抗体刺激による増殖反応とサイトカイン産生パターンを解析した。この結果、EL4 担癌マウス T 細胞は抗 CD3 抗体刺激に対する増殖反応が著しく低下しており、IL-2 レセプター発現低下をともなった IL-4 依存性の増殖能を示した。またサイトカイン産生パターンは、Th1 型サイトカイン (IL-2、IFN- γ) 産生が著しく抑制されており、一方 Th2 型サイトカイン (IL-4、IL-6、IL-10) の産生が促進されていた。抗 TGF- β 抗体投与マウスの T 細胞は増殖抑制が解除されており、IL-2 レセプター発現も正常に誘導され IL-2 依存性を回復していた。さらにサイトカイン産生パターンは Th1 型サイトカイン産生の亢進と、Th2 型サイトカイン産生低下が認められた。また、抗 IL-10 抗体投与マウスにおいては、T 細胞増殖能低下の部分的解除と、Th2 型サイトカイン産生低下が認められた。しかし、抗 IL-10 抗体投与の効果は抗 TGF- β 抗体投与に比べ弱く、このことは T 細胞サブセットの変化には TGF- β の寄与の方が大きいことを示唆した。

以上、腫瘍由来 TGF- β による宿主免疫抑制状態増悪の 1 つのメカニズムが明らかにされたとともに、担癌宿主の免疫抑制状態の改善における TGF- β の作用阻害、いわゆる TGF- β アンタゴニストの有用性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 東 市 郎

副 査 教 授 谷 口 和 彌

副 査 教 授 菊 池 九二三

副 査 講 師 劉 永 春

学 位 論 文 題 名

担癌モデルマウスにおける TGF- β の免疫抑制機序に関する研究

担癌宿主には一般的に免疫機能の低下がみとめられ、その原因として腫瘍細胞より産生される免疫抑制因子の関与が考えられている。担癌宿主における免疫抑制状態を誘導する液性因子の探索、および腫瘍宿主の免疫抑制状態からの解除に関して既に多くの研究報告があり、抗腫瘍免疫増強の1つのターゲットとなっている。この免疫抑制状態を誘導する、免疫抑制因子として、腫瘍あるいは宿主の産生するタンパク性因子がこれまでに数多く同定された中で、近年多種の腫瘍より産生されることが明らかとなったTransforming growth factor- β (TGF- β) が注目されている。本研究では、マウス胸腺細胞腫EL4担癌モデルマウスにおける腹水中TGF- β の同定、さらに同担癌マウスにおけるマクロファージ機能抑制、およびT細胞サブセット変化に対するTGF- β の影響を解析した。本論文の重要な結果は以下の4点である。

1. マウス胸腺細胞腫EL4担癌マウスの腹水中にマウスリンパ球、ミンク肺上皮細胞株、Mv1Luの増殖を抑制する因子が存在すること、さらにこの増殖抑制活性が抗TGF- β 抗体添加により阻害されることを見出した。また、抗TGF- β 1抗体を用いたELISA法、およびウェスタンブロッティング法により、本因子がTGF- β 1であることを明らかにした。

2. EL4担癌マウスの腹腔内マクロファージにおいて、腫瘍移植後経日的な抗腫瘍エフェクター因子である一酸化窒素(NO)、およびTumor necrosis factor- α (TNF- α)産生能の低下、およびEL4細胞に対する*in vitro*抗腫瘍活性の低下が認められた。そこで抗TGF- β 抗体の腹腔内投与によるマクロファージのNO、TNF- α 産生能、および抗腫瘍活性の変化を検討した結果、抗TGF- β 抗体投与マウス由来マクロファージのNO、TNF- α 産生が、非担癌マウスマクロファージと同程度まで回復し、抗腫瘍活性の増強も認められ、EL4担癌マウスマクロファージはTGF- β により機能低下が誘導されているものと思われた。

3. EL4担癌マウス腹水中に腫瘍進展に伴ってTGF- β 以外にinterleukin-10 (IL-10)が増加しており、腹腔内マクロファージの*in vitro* IL-10産生能亢進、およびIL-10 mRNA発現増強が認められた。そこで、EL4担癌マウスに抗TGF- β 抗体を投与した結果、腹腔内マクロファージの*in vitro* IL-10産生能、およびIL-10 mRNAレベルは正常マウスレベルまで低下し、腹水中のIL-10量も低下した。以上の結果から、EL4担癌マウスマクロファージは、腫瘍由来TGF- β によりIL-10産生能が亢進しており、宿主の免疫抑制状態の進展への関与が示唆された。

4. EL4担癌マウス脾臓T細胞の抗CD3抗体刺激による増殖反応とサイトカイン産生パターンを解析した結果、IL-2依存性増殖反応の著明な低下が認められ、またTh1型サイトカイン(IL-2、IFN- γ)産生能の低下、さらにTh2型サイトカイン(IL-4、IL-6、IL-10)の産生促進が認められた。そこでEL4担癌マウスT細胞に対するTGF- β 、およびIL-10の関与を解明すべく、抗TGF- β 抗体、

および抗IL-10抗体投与によるT細胞反応性の変化を解析した。その結果、抗TGF- β 抗体投与マウスT細胞にIL-2依存性増殖能の回復、さらにTh1型サイトカイン産生亢進と、Th2型サイトカイン産生低下が認められた。また、抗IL-10抗体投与マウスにおいては、T細胞増殖能低下の部分的解除と、Th2型サイトカイン産生低下が認められた。以上の結果からEL4担癌マウスにおけるTh2型反応の亢進はTGF- β とそれにより誘導されるIL-10によるものであることが示唆された。また、抗TGF- β 抗体、および抗IL-10抗体併用投与によりEL4担癌マウスに明らかな延命効果が認められ、免疫抑制状態の改善が直接担癌宿主の延命につながることを示された。

以上、申請者は腫瘍由来TGF- β によるマクロファージ機能異常を伴った宿主免疫抑制状態増悪の1つのメカニズムが明らかにするとともに、担癌宿主の免疫抑制状態の改善におけるTGF- β の作用阻害、いわゆるTGF- β アンタゴニストの有用性が示された。これらの成果は担癌宿主の免疫病態の機構解明に大きく寄与するものと高く評価される、審査員一同は申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。