

学位論文題名

Immunosuppressive tumor-escape mechanisms in tumor-bearing state.

(担癌生体腫瘍内微小環境における免疫逃避機構に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

一般的に腫瘍組織は、様々なサイトカインを産生し自身の増殖に都合の良い環境を形成していることが知られている。例えば、腫瘍内微小環境は、様々な免疫抑制性サイトカインを産生し、癌特異的細胞傷害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTL) の誘導を阻害するばかりでなく、制御性 T 細胞 (regulatory T cells, Treg) を誘導することで、腫瘍細胞に対する T 細胞依存的抗免疫反応を阻害している。さらに、CD11b+Gr-1⁺ 未熟ミエロイド細胞 (immature myeloid cells, ImC) を誘導することによっても、抗腫瘍免疫の誘導を阻害されていることが報告されている。このような免疫抑制性サイトカインや抑制性細胞を制御することは、癌免疫療法を確立する上で不可欠である。

また、抗腫瘍免疫を効率的に誘導するためには、抗原提示細胞、中でも強力に T 細胞を活性化することが出来る樹状細胞 (dendritic cells, DC) が重要な役割を果たす。なぜなら、癌特異的 CTL を誘導するためには、DC 上の MHC class II 分子 (MHCII) や MHC class I 分子 (MHCI)、さらには DC から産生されるサイトカインなどが必要だからである。従って、担癌生体内において DC の機能を制御することは、抗腫瘍免疫を誘導する上で非常に重要な手段となりうる。

近年、IL-6 が STAT3 シグナルを介して DC の活性化を抑制するサイトカインとして報告された。この IL-6 は、様々な腫瘍細胞によって産生されることが知られており、事実多くに論文により、担癌マウスモデルおよび癌患者で著明に産生が増加していることが報告されている。しかしながら、担癌生体における免疫系への影響については不明な点が多い。

そこで本研究では、BALB/c マウス由来 IL-6 高産生腫瘍株である上皮性腫瘍 CMC-1 および間質系腫瘍 CMC-G4 を用い、ImC および DC が担癌生体腫瘍局所における免疫反応にどのような影響を与えるかについて検討し、担癌生体内における免疫抑制状態の機序について解明を行った。

【方法と結果】

まず始めに、CMC-1 担癌モデルを作製し、腫瘍内および脾臓、骨髄、末梢血中における ImC の割合について検討した。その結果、担癌 40 日後の各臓器において、ImC は異常に集積していることが明らかとなった。次に、脾細胞および腫瘍内浸潤細胞より ImC を単離し、これらの細胞群をアロのリンパ球混合反応 (mixed lymphocyte reaction, MLR) に添加し、MLR の抑制能について検討した。その結果、脾細胞由来 ImC は全く抑制能を示さなかったのに対し、腫瘍内浸潤 ImC は著明に MLR を抑制することが明らかとなった。この抑制機能獲得のメカニズムを解明するために、CMC-1 腫瘍細胞培養上清 (tumor-derived factors, TDF) を用いて脾細胞由来 ImC を培養した結果、新たにマクロファージのマーカーである F4/80 分子を発現し、食食能を有するマクロファージへと分化することが明らかとなった。この TDF を用いて培養した ImC は、著明に MLR を抑制した。そこで、いったい何の TDF が ImC の分化・抑制能獲得を制御しているかを検討するために、CMC-1 腫瘍細胞のサイトカイン産生能について詳細に解析した結果、IL-6 と TGF- β 1 を著明に産

生することが明らかとなった。そこで、脾細胞由来 ImC を IL-6 および TGF- β 1 を添加して培養した結果、IL-6/TGF- β 1 処理した ImC は、著明に MLR を抑制することが明らかとなった。このことは、腫瘍内浸潤 ImC が腫瘍組織由来 IL-6 および TGF- β 1 により、強い抑制機能を獲得していることを示唆している。

次に、CMC-G4 担癌モデルを作製し、腫瘍組織より産生される IL-6 が他の免疫系、特に腫瘍局所の DC にどのような影響を与えているかについて検討した。まず始めに、CMC-G4 担癌マウスに抗 IL-6 受容体 (IL-6R) 抗体を投与することによる腫瘍増殖に与える影響について検討した。その結果、抗 IL-6R 抗体を投与することで著明な腫瘍増殖抑制効果がみられたばかりでなく、T 細胞機能の著しい回復も認められた。そこで、この IL-6 シグナル遮断による抗腫瘍効果について検討するために、マウス骨髄細胞より DC を誘導し、IL-6 処理を行った。その結果、IL-6 処理 DC は、遺伝子レベル、蛋白レベルおよび酵素活性レベルにおいてアルギニン分解酵素である Arginase-1 (Arg-1) を著明に発現した。実際に担癌生体の DC においても Arg-1 を発現しているかどうかを検討した結果、担癌生体腫瘍局所の DC において著明に Arg-1 発現が上昇していた。しかしながら、抗 IL-6R 抗体投与により Arg-1 発現レベルが著明に低下したことにより、担癌生体における Arg-1 上昇は、腫瘍組織より産生される IL-6 依存的であることが示唆された。また、腫瘍内浸潤 DC の MHCII 発現レベルについても検討した結果、正常マウスに比べ、著明に MHCII 発現が低下していたのに対し、抗 IL-6R 抗体投与により MHCII 発現が完全に回復することが明らかとなった。Arg-1 はアルギニンを分解することで知られている。そこで、アルギニンの枯渇状態により DC の MHCII 発現が低下を誘導するかについて、アルギニン欠損培地を用いて DC の誘導を行った。その結果、アルギニン欠損培地を用いて誘導した DC は、MHCII の発現レベルのみを低下させ、他の分子には全く影響を与えないことが明らかとなった。さらに担癌生体において、Arginase 阻害剤 (nor-NOHA) や基質であるアルギニン自体を投与することによっても、腫瘍内浸潤 DC の MHCII 発現が回復することが明らかとなった。最後に、CMC-G4 担癌マウスに nor-NOHA を投与することによる腫瘍増殖に与える影響について検討した。その結果、nor-NOHA 投与マウスにおいて著明な腫瘍増殖抑制効果がみられたばかりでなく、腫瘍内浸潤 DC の MHCII 発現が著しく回復していた。また、その MHCII 発現増強に相関して、CD4⁺ T 細胞の機能も増強していた。従って、担癌生体において Arg-1 の発現を制御することは、腫瘍内浸潤 DC の MHCII 発現レベルを回復させ、CD4⁺ T 細胞の機能を増強させることにより、抗腫瘍免疫を誘導することが示唆された。

【考察と結論】

担癌生体では、腫瘍細胞により様々なサイトカインが産生され、免疫系が抑制される環境になっている。その環境下において ImC の異常増殖が起こり、更には、末梢において抑制能を持っていない ImC が、腫瘍内微小環境由来の IL-6 および TGF- β 1 により、強い T 細胞免疫抑制能を有する抑制性 ImC 及びマクロファージへの分化が促進するものと考えられる。また IL-6 は、腫瘍内浸潤 DC にも作用し、DC の Arg-1 発現レベルを増強させ、腫瘍局所でのアルギニンの枯渇状態を誘導する。このアルギニンの枯渇状態が腫瘍内浸潤 DC の MHCII 発現を低下させ、CD4⁺ T 細胞の機能を低下させることで抗腫瘍免疫を抑制していると考えられる。しかしながら、抗 IL-6R 抗体を用いて IL-6 シグナルを遮断することにより、ImC の免疫抑制能獲得の阻害の可能性、さらには腫瘍内浸潤 DC の機能増強による抗腫瘍効果が得られることを明らかとした。さらに、nor-NOHA やアルギニンを投与することによっても、腫瘍内浸潤 DC の MHCII 発現が回復し、抗腫瘍効果が得られる可能性を明らかとした。

従って、担癌生体における IL-6 シグナルを遮断することは、腫瘍内微小環境における強い免疫抑制状態を打破し、より有効な癌免疫療法の確立に繋がるものと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小野江 和 則

副 査 教 授 岩 永 敏 彦

副 査 教 授 西 村 孝 司

学 位 論 文 題 名

Immunosuppressive tumor-escape mechanisms in tumor-bearing state.

(担癌生体腫瘍内微小環境における免疫逃避機構に関する研究)

本研究は、担癌生体における CD11b⁺Gr-1⁺ 未熟ミエロイド細胞 (immature myeloid cells, ImC) および腫瘍内浸潤樹状細胞 (dendritic cells, DC) による免疫逃避機構への関与について詳細に検討したものである。申請者は、担癌マウスモデルおよび癌患者で著明に産生が亢進しているサイトカインである IL-6 に注目し、このサイトカインが担癌生体における免疫逃避機構の一翼を担っていることを証明した。

担癌生体における IL-6 による免疫逃避機構への関与については、これまで明らかにされていなかった。そこで本研究では、担癌生体で異常増殖している ImC に対し、IL-6 の作用機序解明について試みた。その結果、ImC は、腫瘍組織より産生される IL-6 および TGF- β 1 により、強い免疫抑制能を有する F4/80⁺ マクロファージ (macrophages, M Φ)、ならびに抑制性 ImC に分化制御されていることが明らかとなった。

次に、腫瘍内浸潤 DC に対し、IL-6 の作用機序解明について試みた。CMC-G4 担癌マウスに抗 IL-6 受容体 (IL-6R) 抗体を投与することによる腫瘍増殖に与える影響について検討したところ、著明な腫瘍増殖抑制効果がみられたばかりでなく、腫瘍内浸潤 DC の Arginase-1 (Arg-1) 発現レベルが著明に低下したことより、担癌生体における Arg-1 上昇は、腫瘍組織より産生される IL-6 依存的であることが示唆された。また、腫瘍内浸潤 DC の MHCII 発現レベルについても検討したところ、正常マウスに比べ、著明に MHCII 発現が低下していたのに対し、抗 IL-6R 抗体投与により MHCII 発現が完全に回復することが明らかとなった。さらに担癌生体において、Arginase 阻害剤 (nor-NOHA) や、基質であるアルギニン自体を投与することによって、腫瘍内浸潤 DC の MHCII 発現が回復することが明らかとなった。最後に、CMC-G4 担癌マウスに nor-NOHA を投与し、腫瘍増殖に与える影響について検討したところ、nor-NOHA 投与マウスにおいて著明な腫瘍増殖抑制効果がみられたばかりでなく、腫瘍内浸潤 DC の MHCII 発現が著しく回復していた。また、その MHCII 発現増強に相関して、CD4⁺ T 細胞の機能も増強していた。つまり、担癌生体において Arg-1 の発現を制御することは、腫瘍内浸潤 DC の MHCII 発現レベルを回復させ、CD4⁺ T 細胞の機能を増強させることにより、有効な抗腫瘍免疫を誘導することを示した。

従って、担癌生体における IL-6 シグナルを遮断することは、腫瘍内微小環境における強い免疫抑制状態を打破し、より有効な癌免疫療法の確立に繋がるものと考えられた。

学位論文発表後、副査である岩永敏彦教授から、担癌生体内より単離後すぐの ImC および免疫抑制能を獲得した抑制性 ImC の形態学的差異についての質問があった。それに対し申請者は、既に予備的実験をしていたデータ結果を元に、担癌生体内より単離後すぐの ImC は未熟な好中球様の核を持った細胞群であり、抑制性 ImC は成熟した好中球様とマクロファージ様の細胞群が入り

交じっているヘテロな集団であると回答した。この回答に対し、岩永教授からはギムザ染色により細胞内顆粒の観察および電子顕微鏡による詳細な解析が必要ではないかという適切な指摘を頂いた。また、免疫抑制因子をしてなぜ Arg-1 に着目したかという質問に対しては、免疫抑制すると既に報告されている種々の因子について網羅的に解析した結果、その中で Arg-1 が非常に高い発現を示したことを説明した。

次に主査である小野江和則教授から、アルギニン枯渇により DC の MHCII のみを選択的に低下させるメカニズムについての質問があった。その質問に対しては、既に予備的実験をしていたデータを元に、アルギニンの枯渇により MHCII の mRNA レベルも低下しており、MHCII を転写レベルで低下させている可能性があるかと答えた。また、ImC の免疫制御活性を検討する実験系でなぜ、アロの MLR を使用しているかという質問に対しては、既に実験をしていたデータを元に、OVA 特異的 TCR をもったトランスジェニックマウスを用いた系でも、抗 CD3 抗体を用いた系でも同様の結果が得られていることを説明した。最後に、抗 TGF- β 抗体投与により TGF- β シグナルを遮断すると免疫抑制状態を打破できるのかという質問に対しては、過去の論文結果を引用し、担癌生体における抑制性細胞の一種である制御性 T 細胞も制御できるため、腫瘍増殖の抑制効果が期待できると回答した。

最後に副査である西村孝司教授から、癌免疫療法への応用に関する展望についての質問があった。これに対しては、現在の癌免疫療法は宿主の強い免疫抑制状態により期待されていたほどの効果を上げていない文献を引用し、いかに免疫抑制状態を打破し、有効な癌免疫療法を行うかが重要だと回答した。最後に、ImC 研究で世界を牽引している Gabrilovich D.らと申請者の研究の違いについて質問があった。その質問に対しては、現在 ImC と定義されている CD11b 陽性 Gr-1 陽性の細胞群をさらに詳細に細分化し、各々の細胞群について詳細に解析していくことが重要であると述べた。

この論文は、担癌生体における IL-6 シグナルより免疫抑制機序を世界で初めて示した点で高く評価され、今後、癌治療に対する臨床応用が十分期待される。

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単位取得なども併せ、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。