

学 位 論 文 題 名

Two distinct mechanisms of augmented antitumor activity by modulation of immunostimulatory/inhibitory signals.

(免疫亢進／抑制シグナル調節による異なる
2つのメカニズムを介した抗腫瘍効果の増強)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 がん細胞内に含まれるがん抗原および自己抗原に対して生体内の免疫システムは免疫応答を誘導し、がんを排除していることが解明され、新しいがん免疫療法に対する期待が高まっている。とりわけ 1991 年ヒトメラノーマに特異的に発現している腫瘍抗原遺伝子の存在が報告されて以来、これらの腫瘍特異抗原を標的としたがんワクチン療法が注目を集めている。しかし、これらのがんワクチン療法では免疫応答は誘導されるものの、ごく一部の患者でしか腫瘍縮小等の臨床効果がみられないのが現状である。これは、腫瘍抗原の大半が自己由来であり、強力な CD4、CD8 の反応を惹起できないことがひとつの原因であると考えられている。この問題を解決するために、T 細胞上の共刺激分子や抑制系の分子シグナルを調節することが必要である。 CTL-associated antigen-4 (CTLA-4)は免疫抑制シグナル分子であり、活性化した T 細胞および CD4⁺CD25⁺制御性 T 細胞 (Tregs) に発現している。マウスモデルにおいて、CTLA-4 分子シグナルを抗体によりブロックすることで、T 細胞性の腫瘍縮小をもたらす事が報告されている。また治療抵抗性悪性黒色腫患者において臨床的効果を認められたことが報告され、今後臨床応用されることが期待されている。

一方、自己免疫反応を抑制する役割としてもともと発見された CD4⁺CD25⁺ Tregs もまた、抗腫瘍免疫反応を制御することが報告されている。前述のしたように Tregs は常に細胞表面に CTLA-4 を発現しており、そのシグナルを抑制することで Tregs の抑制機能をブロックすることが報告されている。しかしながら、CTLA-4 シグナルのブロックは CD8⁺ T 細胞のみならず、Tregs をも増殖させることが明らかになっており、効果的ながん免疫療法には Tregs 機能を調節する分子との併用の必要性が示唆される。

Glucocorticoid-induced TNF receptor family related gene (GITR)はタイプ I 膜貫通型タンパク質で TNF 受容体ファミリーの一つである。元来、T cell receptor (TCR)に誘導されるアポトーシスを抑制する分子として報告された。GITR は免疫共刺激分子でもあり、休止期の T 細胞にも弱く発現しているが、活性化すると発現レベルが上昇する。また、GITR は Tregs にも恒常的に高レベルで発現している。GITR の刺激はエフェクター T 細胞に関しては Tregs の抑制活性をブロックすることが報告されているが、その細かな作用機序等はいまだ検討されている段階である。

今回、我々は CTLA-4 シグナルの抑制に、GITR の刺激による Tregs 抑制活性のコント

ロールを組み合わせることにより、抗腫瘍効果が増強するかの検討とその抗腫瘍活性のメカニズムについて解析した。

【材料と方法】

BALB/cマウス由来のメチルコラントレン誘発線維肉腫CMS5と大腸癌細胞株CT26を用いた。さらに、それぞれにヒトがん・精巢抗原NY-ESO-1を発現させた腫瘍、CMS5-NY-ESO-1 CT26-NY-ESO-1を作成し、抗原特異的CD8+T細胞を検討するために用いた。NY-ESO-1マウスモデルに関しては、MHC class I エピトープを同定し、そのテトラマーを作成することで、抗原特異的CD8+T細胞を検出できる系を確立した（現在論文投稿中）。それぞれの腫瘍を7-9週令のメスのBALB/cマウスに担癌し、さまざまなタイミングで抗CTLA-4抗体、抗CD25抗体、抗GITR抗体を単独もしくは2つ組み合わせて投与した。腫瘍径は2-3日ごとに計測し、長径×短径で表示した。解析はそれぞれのマウスから、脾臓、所属リンパ節、腫瘍局所を採取し、FACSによる解析、MHC class I テトラマー、細胞内サイトカイン染色、細胞増殖試験、ELISA、免疫組織染色等を施行した。

【統計】

腫瘍曲線はoneway ANOVA with a Bonferroni multiple comparison post test.で行った。2グループ間の比較はtwo-sided Student's t test.で行った。P values < 0.05 を有意差ありと判定した。

【結果】

抗 CTLA-4 抗体、抗 GITR 抗体単独投与では腫瘍増殖を遅くする効果が認められたが、完全に腫瘍を拒絶することはできなかった。抗 CD25 抗体単独では我々の投与プロトコル（治療プロトコル）では抗腫瘍活性を認められなかった。抗 CTLA-4 抗体/ 抗 CD25 抗体併用による治療効果の増強は認められなかった。抗 CTLA-4 抗体/ 抗 GITR 抗体による併用治療はそれぞれの抗体治療単独よりもはるかに強力な抗腫瘍効果を発揮し、腫瘍接種 5 日後で腫瘍が 150 mm² に達した腫瘍に対しても腫瘍拒絶効果が認められた。しかし、担癌 7 日目以降に治療を開始した群では腫瘍増殖を遅くするものの、腫瘍拒絶は見られなかった。この強い抗腫瘍活性は、抗 CTLA-4 抗体によるエフェクターT細胞の増殖、抗 GITR 抗体によるサイトカイン（IFN γ ）産生能の増強によるものであった。また抗 GITR 抗体投与によりエフェクター細胞は Tregs への抵抗性を獲得しており、これはCD25の発現上昇と関連していた。

【考察】

抗 CTLA-4 抗体/ 抗 GITR 抗体による強力な抗腫瘍効果は、(a)抗 CTLA-4 抗体で治療することによる CD8+T 細胞の腫瘍局所での増加、(b) 抗 GITR 抗体で治療することにより、CD8+T 細胞のサイトカイン産生が上昇すること、並びに、CD25 を強発現することで Tregs への抵抗性が増すこと、が要因と考えられた。CD25 高発現と Tregs への抵抗性に関しては、IL-2 の競合が考えられたが、そのメカニズムについては今後さらなる検討が必要である。

【結語】

今回の研究で、抗 CTLA-4 抗体/ 抗 GITR 抗体によるコンビネーション治療の今後の臨床応用の可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 秋 田 弘 俊

副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

Two distinct mechanisms of augmented antitumor activity by modulation of immunostimulatory/inhibitory signals.

(免疫亢進／抑制シグナル調節による異なる

2つのメカニズムを介した抗腫瘍効果の増強)

がん細胞内に含まれるがん抗原および自己抗原に対して生体内の免疫システムは免疫応答を誘導し、がんを排除していることが解明され、新しいがん免疫療法に対する期待が高まっている。しかし、現在のがんワクチン療法では免疫応答は誘導されるものの、ごく一部の患者でしか腫瘍縮小等の臨床効果がみられないのが現状である。これは、腫瘍抗原の大半が自己由来であり、強力な CD4、CD8 の反応を惹起できないことがひとつの原因であると考えられている。この問題を解決するために、T 細胞上の共刺激分子や抑制系の分子シグナルを調節することが必要である。 CTL-associated antigen-4 (CTLA-4)は免疫抑制シグナル分子であり、マウスモデルにおいて、CTLA-4 分子シグナルを抗体によりブロックすることで、T 細胞性の腫瘍縮小をもたらす事が報告されている。また治療抵抗性悪性黒色腫患者において臨床効果を認めたことが報告され、今後臨床応用されることが期待されている。

一方、自己免疫反応を抑制する役割としてもともと発見された CD4⁺CD25⁺ 制御性 T 細胞 (Tregs) は、抗腫瘍免疫反応も制御することが報告されている。CTLA-4 シグナルのブロックは CD8⁺T 細胞のみならず、Tregs をも増殖させることが明らかになっており、効果的ながん免疫療法には Tregs 機能を調節する分子との併用の必要性が示唆される。Glucocorticoid-induced TNF receptor family related gene (GITR)は免疫共刺激分子の一つであり、その刺激によりエフェクター T 細胞は Tregs の働きを抑制することが報告されているが、作用機序等はいまだ検討されている段階である。今回、我々は CTLA-4 シグナルの抑制に、GITR の刺激による Tregs 抑制活性のコントロールを組み合わせることにより、抗腫瘍効果が増強するかの検討とその抗腫瘍活性のメカニズムについて解析した。BALB/c マウス由来の線維肉腫 CMS5 と大腸癌細胞株 CT26 を用いた。さらに、CT26 にヒトがん・精巢抗原 NY-ESO-1 を発現させた腫瘍、CT26-NY-ESO-1 を作成し、抗原特異的 CD8⁺T 細胞を検討するために用いた。NY-ESO-1 マウスモデルに関しては、MHC class I エピトープを同定し、そのテトラマーを作成することで、抗原特異的 CD8⁺T 細胞を検出できる系を確

立した。それぞれの腫瘍を 7-9 週令のメスの BALB/c マウスに担癌し、さまざまなタイミングで抗 CTLA-4 抗体、抗 CD25 抗体、抗 GITR 抗体を単独もしくは 2 つ組み合わせて投与した。抗 CTLA-4 抗体、抗 GITR 抗体単独投与では治療効果はほとんどなかったが、抗 CTLA-4 抗体、抗 GITR 抗体の両者を投与したマウスにおいて、強力な腫瘍抑制効果を発揮した。抗 CTLA-4 抗体/ 抗 GITR 抗体による強力な抗腫瘍効果は、(a) 抗 CTLA-4 抗体で治療することによる CD8⁺T 細胞の腫瘍局所での増加、(b) 抗 GITR 抗体で治療することにより、CD8⁺T 細胞のサイトカイン (IFN- γ) 産生が上昇すること、並びに、CD25 を強発現することで Tregs への抵抗性が増すこと、が要因と考えられた。CD25 強発現と Tregs への抵抗性に関しては、IL-2 の競合が考えられたが、そのメカニズムについては今後さらなる検討が必要である。今回の研究で、抗 CTLA-4 抗体/ 抗 GITR 抗体によるコンビネーション治療の今後の臨床応用の可能性が示唆された。

口頭発表に続き副査秋田弘俊教授より CD8⁺T 細胞の制御性 T 細胞に対する抵抗性のメカニズムについて、抗 CTLA-4/GITR 抗体に加えて抗 CD25 抗体を使用した場合について、今後の臨床応用について質問があった。続いて副査近藤哲教授より抗体治療と CD4⁺T に関して、臨床的な投与方法について質問があった。最後に主査今村雅寛教授より抗 CTLA-4/GITR 抗体を組み合わせた理由について、CTLA-4 をブロックすることで細胞数が増えるメカニズムについて de novo の系やウィルス発癌の系ではどうなるかの質問があった。

いずれの質問に対しても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。

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と判定した。