

学位論文題名

Suppressing the induction of IL-10 and
Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells is mandatory for
Pam2-lipopeptide anti tumor therapy

(Pam2-lipopeptideによる抗腫瘍治療において、IL-10とFoxp3+CD25+CD4+
制御性T細胞の誘導を制御する事は、必須である。)

学位論文内容の要旨

背景: Pam2-lipopeptide (16 S-[2,3-bis(palmitoyl)propyl]cysteine (Pam2Cys) lipopeptide、以下 Pam2 リポペプチド) は、Toll like receptor (TLR) 2/6 のリガンドである。Pam2 リポペプチドは、異なったペプチド配列が付着した2つのパルミトイル塩基を有し、そのペプチド部分が、TLR2 に対するアゴニスト活性を有する。TLR2 は、グラム陽性菌の菌体成分に加えて、様々な細菌のリポ蛋白やリポペプチドの認識に関わっている。TLR2 は、TLR1 や TLR6 とヘテロダイマーを形成している。TLR2/TLR6 がそれらを認識すると、TLR3 以外の共通のアダプター分子である MyD88 と結合する。そのシグナル伝達経路は最終的に NF- κ B を核内へ移行させ、炎症性サイトカインの産生を誘導する。これらの応答は、短時間で誘導され、感染防御に働いている一方、樹状細胞を刺激し、獲得免疫を始動する。感染に対する免疫応答のみならず、TLR のようなパターン認識受容体に対するアジュバントにより樹状細胞などの免疫担当細胞が活性化し、効果的な抗腫瘍免疫を誘導することが知られている。これまでに Pam2 リポペプチドが樹状細胞を活性化し、ナチュラルキラー細胞から IFN- γ を産生させ、殺細胞活性を *in vitro* で誘導するという報告や、また RGDS ペプチドと Pam2 リポペプチドを融合した P2C-RGDS を腫瘍周辺へ、腫瘍からの抽出物と共に局所注射し、腫瘍成長を阻害するということが報告されている。*in vitro* や腫瘍周囲への皮下投与で効果的な抗腫瘍免疫を認めることから、*in vivo* での Pam2 リポペプチドによる腫瘍退縮効果について検討した。ナチュラルキラー細胞に感受性のある B16 メラノーマを接種したマウスに Pam2 リポペプチドを全身投与したが、樹状細胞は活性化していたにもかかわらず、腫瘍退縮効果は発現しなかった。抗腫瘍免疫を抑制する上で、重要な役割を果たしている細胞に、制御性 T 細胞がある。制御性 T 細胞は、末梢 CD4+T 細胞の 5~10% を占める細胞であり、高い IL-2 の親和性をもつ受容体 (CD25) と転写因子である Foxp3 を有する細胞で、坂口らにより発見された。Foxp3 は、制御性 T 細胞の機能や分化に重要な役割を担っている。ヒトの FOXP3 の変異により IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) を発症する。IPEX は、自己免疫性腸炎、糖尿病、甲状腺炎、溶血性貧血、血小板減少症など様々な自己免疫疾患を有し、食事アレルギーや皮膚炎に罹患する。また、他の自己免疫性疾患において、制御性 T 細胞が、欠損しているという報告もある。Foxp3 は、制御性 T 細胞の特異的なマーカーと考えられている。Foxp3 の発現誘導には IL-2 や TGF- β 、レチノイン酸が関わっている。また Foxp3 の発現維持には IL-10 が重要であるとの報告もある。制御性 T 細胞は、あらゆる免疫担当細胞の誘導、増殖、機能を抑制し、その結果広く免疫応答

を抑制する。自己抗原に対する免疫応答や非自己抗原による過剰な免疫応答を抑制するため、同細胞が欠如する場合は、重篤な自己免疫疾患や炎症性腸疾患、アレルギーを引き起こす。一方制御性 T 細胞を増やすことで、その免疫抑制効果を利用して、造血幹細胞移植後の移植片対宿主病や臓器移植における移植片拒絶を抑制することも可能である。

以上の様に、制御性 T 細胞の存在は、腫瘍にとって好都合である。制御性 T 細胞は直接腫瘍に浸透し、エフェクター細胞を抑制する。制御性 T 細胞は、樹状細胞より誘導される TGF- β によって、非制御性 T 細胞より直接誘導もされる。また、抗 CD25 抗体によって、制御性 T 細胞を除去することにより効果的な抗腫瘍効果を誘導する事もできる。その効果は抗 CTLA4 抗体や抗 GITR 抗体によって制御性 T 細胞の機能を抑制する事によっても誘導される。Foxp3 の上流にジフテリアトキシン受容体を発現しているマウスを使用すると、制御性 T 細胞のみを特異的に除去する事もでき、それにより腫瘍の増殖を抑制する事が出来る。以上から効果的な抗腫瘍免疫を誘導するために、制御性 T 細胞が引き起こす腫瘍免疫を抑えるような免疫寛容をいかに除去するかという戦略が求められている。

目的： *In vivo* において B16 メラノーマ接種マウスに対して Pam2 リポペプチドを全身投与した結果、腫瘍退縮効果が発現しなかったメカニズムについて検討する。

結果：

- 1) B16 メラノーマを接種したマウスに、Pam2 リポペプチドを全身投与したが、腫瘍退縮効果は発現しなかった。
- 2) Pam2 リポペプチドを腹腔内投与した後のマウス脾臓由来樹状細胞は、その活性化マーカーである CD86、CD40 の高い発現を認めた。以上より *in vivo* においても Pam2 リポペプチドにより樹状細胞は活性化された。
- 3) Pam2 リポペプチドにより刺激されたマウス脾臓由来樹状細胞から、制御性 T 細胞に関わる因子の発現を検討した結果、IL-10 と Retinoic acid dehydrogenase 2 の mRNA が高発現していた。TGF- β は高発現していなかった。
- 4) Pam2 リポペプチドで刺激した骨髄由来樹状細胞から TLR2 依存的に IL-10 が産生された。同様にナチュラルキラー細胞や CD4 陽性 T 細胞からも IL-10 が産生された。
- 5) Pam2 リポペプチドを投与したマウスの脾臓とリンパ節において、TLR2 と IL-10 依存的に CD4+細胞に対する Foxp3+CD4+制御性 T 細胞の占める割合が増加した。
- 6) Pam2 リポペプチドを投与したマウスより採取した制御性 T 細胞は、対照群と比較しても免疫抑制活性は低下せず維持していた。
- 7) 抗 CD25 抗体(PC61)投与することで制御性 T 細胞を除去した後、B16 メラノーマを接種したマウスに、Pam2 リポペプチドを腹腔内投与したところ Pam2 リポペプチドを単独投与したマウスよりも腫瘍が退縮した。

結論：

- 1) *in vivo* において、Pam2 リポペプチドを腹腔内から全身投与することにより、IL-10 の産生や、制御性 T 細胞が誘導され、*in vitro* で認められた抗腫瘍免疫は抑制された。
- 2) 今後、抗癌ワクチンを検討する際には、IL-10 の産生や制御性 T 細胞の機能を促進しないアジュバントを開発する必要があると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 出 利 光
副 査 教 授 西 村 孝 司
副 査 教 授 豊 嶋 崇 徳
副 査 教 授 瀬 谷 司

学位論文題名

Suppressing the induction of IL-10 and Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells is mandatory for Pam2-lipopeptide anti tumor therapy

(Pam2-lipopeptideによる抗腫瘍治療において、IL-10とFoxp3+CD25+CD4+
制御性T細胞の誘導を制御する事は、必須である。)

本研究で、*in vitro* において抗腫瘍免疫を誘導した Pam2 リポペプチドが、*in vivo* において、効果的な抗腫瘍免疫を誘導しえなかった機序について詳細に検討した。まず、Pam2 リポペプチドを投与したマウスの脾臓由来樹状細胞において CD86、CD40 の発現が上昇していた事から、Pam2 リポペプチドにより樹状細胞は活性化されていることがわかった。そこで、抑制性因子について検討した結果、Pam2 リポペプチドにより刺激を受けた樹状細胞において、IL-10 と RALDH2 の mRNA の発現の上昇を確認した。IL-10 に関しては、蛋白レベルでの産生も認められ、TLR2 依存的事であることが判明した。その IL-10 の産生は、樹状細胞のみならず、NK 細胞や CD4 陽性 T 細胞にも認められた。次に制御性 T 細胞についての検討を行った結果、Pam2 リポペプチドを投与すると CD4 陽性細胞中の制御性 T 細胞の割合が増加しており、TLR2 や IL-10 依存的な増加であることが判明した。次に Pam2 リポペプチドで増幅された制御性 T 細胞の抑制活性を評価した。Pam2 リポペプチドを投与したマウスより採取した制御性 T 細胞は、対照群と比較しても免疫抑制活性は低下せず維持されていた。最後に、抗 CD25 抗体 (PC61) 投与することで制御性 T 細胞を除去した後、B16 メラノーマを接種したマウスに、Pam2 リポペプチドを腹腔内投与したところ Pam2 リポペプチドを単独投与したマウスよりも腫瘍が退縮した。これらの結果から、*in vivo* において、Pam2 リポペプチドを全身投与することにより、IL-10 の産生や、制御性 T 細胞が誘導され、*in vitro* で認められた抗腫瘍免疫が抑制されたと結論づけた。以上から今後、抗癌ワクチンを検討する際には、IL-10 の産生や制御性 T 細胞の機能を惹起しないアジュバントを開発する必要があると考察した。

発表後、副査の豊嶋教授より、学位論文題名に IL-10 を含める必要性について、*in vivo* の実験において抗 IL-10 抗体を用いた実験を施行したかどうかについて、抗体投与が、場合により皮下投与、あるいは腹腔内投与にした理由について、図 3-1 の表示内容について、IL-10 mRNA の発現の上昇はわずかに見えるのでその結果の妥当性について、IL-10 の産生実験について TNF- α や IL-6 の産生を検討しているか、NK 感受性腫瘍を使用しているが、その他の非感受性腫瘍をした場合の予想される結果についての質問があった。副査の西村

教授より、Pam2 リポペプチドを免疫抑制剤として使用することについて、Pam2CSK4 を頻回に投与した場合の IL-10 の産生量について、Treg の誘導において、IL-10 以外の重要な因子 (TGF- β 等) の関与についての質問があった。主査の上出教授からは、Pam2 リポペプチドから Treg が誘導されることを証明は出来ていたが、図 2 において PBS 群とあまり変わりがない程度であったことから、その抑制効果としては弱い印象があるとのコメントがあった。副査の瀬谷教授から、この現象は、NK 感受性腫瘍でのみ起こる、Pam2 リポペプチドの chemical structure を変えると作用する細胞を変化させる事が出来る、また抗 IL-10 抗体を使った実験が必要であるとのコメントがあった。

申請者は、いずれの質問に対しても、自身の実験結果や関連する文献、これまでに得られている知見などを引用して、適切に回答した。本研究は、がん患者に免疫療法を実施する際に、期待に反して抑制性の免疫反応を惹起する危険性を警告しており、今後免疫療法を開発する上で、留意すべき結果と言える。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、これまでの大学院博士課程における研鑽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。