

博士論文

腫瘍内の免疫抑制性環境の制御による抗腫瘍活性の増強法の
検討

平野 康介

目次

略語	4
要旨	5
序文	6
方法	21
1. 動物	21
2. 腫瘍細胞	21
3. ペプチド	22
4. 薬剤	22
5. CTL の調製	22
1) 樹状細胞の誘導	23
2) CTL の誘導	23
6. 動物実験モデル	24
7. フローサイトメトリーによる腫瘍内環境の解析	24
1) 細胞分離	24
2) フローサイトメトリーによる表面抗原解析	25
3) MDSC による NO \cdot ROS 産生	26
4) 細胞内 IFN- γ 細胞染色	27
5) 細胞表面 CD107a アッセイ	27

8. 細胞増殖試験(In vitro).....	28
9. 細胞増殖試験(In vivo).....	29
10. 定量 RT-PCR.....	29
11. 細胞診と免疫染色	31
12. 統計処理.....	31
結果.....	32
1. B16F10 担癌マウスモデルにおける腫瘍特異的 CTL 移入療法モデル(追試実験)	
2. 腫瘍内 CTL の数・比率の変化、エフェクター活性(IFN- γ)の変化(追試実験)	
3. 腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)数の変化と CD8 ⁺ 、NK の数・比率の変化(追試実験)	
4. 腫瘍内 MDSC、M-MDSC の数・比率の変化(追試実験)	
小括 1	
5. 腫瘍内 MDSC の NO,ROS 産生(蛍光顕微鏡、フローサイトメトリー)	
6. 腫瘍全体の iNOS、Arginase I 発現および腫瘍内 M-MDSC と腫瘍細胞の iNOS、 Arginase I 発現の比較	
7. 細胞増殖試験(In vitro)	
小括 2	
8. CTL 移入療法モデルに各種薬剤併用による抗腫瘍効果の検討	
1) L-NMMA 併用による抗腫瘍効果の検討	
2) C-PTIO 併用による抗腫瘍効果の検討	

小括 3

9. C-PTIO による腫瘍内 MDSC の NO 産生の制御

10. 腫瘍内 CTL に対する C-PTIO の作用

- 1) 腫瘍内 CTL 比率・数の変化
- 2) 腫瘍内 CTL 増殖能の変化
- 3) 腫瘍内 CTL エフェクター活性(IFN- γ)の変化
- 4) 腫瘍内 CTL エフェクター活性(CD107a)の変化

11. 腫瘍内 effector molecules および immunosuppressive molecules 発現の検討

小括 4

12. 腫瘍内 CTL の経時的な共刺激分子の検討

13. 腫瘍内 CD45⁺細胞の PD-L1 発現の検討

14. 腫瘍内 MDSC の PD-L1,PD-L2 発現の検討

小括 5

15. CTL 移入療法モデルに各種薬剤併用による抗腫瘍効果の検討

- 3) 抗マウス PD-1 抗体と C-PTIO の併用による抗腫瘍効果の検討

考察	75
謝辞	85
引用文献	86

略語

Arg I: arginase I
APC: antigen presenting cell
CAF: cancer associated fibroblast
CAR: chimeric antigen receptor
CCR2: C-C chemokine receptor type 2
COX2: cyclooxygenase-2
C-PTIO: carboxy-PTIO
CTL: cytotoxic T lymphocyte
CTLA4: cytotoxic T lymphocyte antigen-4
DC: dendritic cell
FasL: fas ligand
iNOS: inducible nitric oxide synthase
IDO: indoleamine 2,3-dioxygenase
L-NMMA: N^G-Monomethyl-L-arginine
MDSC: myeloid-derived suppressor cells
MHC-I: major histocompatibility complex-I
M-MDSC: monocytic MDSC
MMP9: matrix metalloproteinase 9
NK: natural killer cells
NO: nitric oxide
NOX2: NADPH oxidase(gp91)
ONOO⁻: peroxynitrite
PD-1: programmed cell death protein 1
PD-L1: PD1 ligand 1
PDE-5: phosphodiesterase-5
PGE2: prostaglandin E2
RNS: reactive nitrogen species
ROS: reactive oxygen species
TIL: tumor infiltrating cells
Tim3: T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3
TCR: T cell receptor
TDO: tryptophan 2,3-dioxygenase
TGF-β: transforming growth factor β
TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg: regulatory-T cell
VEGF: vascular endothelial growth factor

要旨

腫瘍内では、がん細胞以外に様々な細胞や分子が複雑に作用しあう免疫抑制性環境が形成されている。さらに腫瘍に対する治療が、免疫抑制性環境を増強する。B16メラノーマ担癌 C57BL/6 マウスを用いた腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)移入療法モデルの解析により、CTL が腫瘍内に浸潤し腫瘍の増殖を抑えると共に、腫瘍内に骨髄由来抑制性細胞(MDSC)を誘導した。更に MDSC が産生する一酸化窒素(NO)が CTL の機能を減弱させる事が明らかになった。そこで、NO 消去剤 C-PTIO を CTL に併用して、MDSC による CTL 抑制作用を解除することで、CTL の数と機能を増強させ、より強い抗腫瘍効果を得る事ができた。

序文

長年にわたり、生体内にはがんに対する免疫応答が存在することは認められていたが、それを積極的に治療に活用しようというがん免疫療法の効果に対しては、懐疑的な意見が多かった。2013年12月 Science 誌の Breakthrough of the Year に「Cancer Immunotherapy (がん免疫療法)」が選ばれたことは、腫瘍免疫学者以外の多くの腫瘍内科医や臨床医に驚きをもって迎えられた[1]。今や、様々ながん治療には腫瘍免疫が深くかかわっていることは広く認知され、効果的ながん免疫療法の開発が強く求められている。

胃がんや食道がんなどの消化器がんにおいて、手術や化学療法や放射線療法により治療効果は改善されているが[2-7]、進行再発がんの予後はいまだ不良である[8, 9]。既存の全身療法につぐ次世代の治療が待たれていたところにがん免疫療法が脚光を浴びており、従来はメラノーマや悪性リンパ腫などの血液がんなど限られた癌腫に対して実施されていた腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL)移入療法が固形がんにも応用できる可能性が広がってきた。

リンパ球ストレス監視機構を担う $\gamma\delta$ T 細胞は、皮膚、粘膜などの臓器に分布して生体防御と恒常性の維持に貢献している。一般にリンパ球は腫瘍組織適応抗原(MHC:major histocompatibility complex)に提示されたペプチドを認識するが、この $\gamma\delta$ T 細胞は、MHC に無関係に直接ピロリン酸モノエステルなどのリン酸化合物を認識す

る特殊な細胞である。がんの骨転移の治療薬としてパミドロン酸やゾレドロン酸などのアミノビスホスホネート製剤が広くがん治療の診療現場で使用されるようになり、 $\gamma\delta$ T 細胞の抗腫瘍活性を活用したがん治療が注目されるようになった。我々は、胃がん、食道がんに対して抗腫瘍活性をもった $\gamma\delta$ T 細胞を用いた免疫療法を実施している。腹水を貯留する胃がんに対する $\gamma\delta$ T 細胞移入療法においては、腹水の消失など、一部強い抗腫瘍活性を認めたが、肝転移巣などに対する効果は不十分であり、課題が残っている。

臨床的に検出される腫瘍内では、がん細胞以外に様々な細胞や分子が複雑に作用しあう免疫抑制性環境が形成されている(図 1)。がん抗原の消失した免疫原性の低いがん細胞が残り、腫瘍内には免疫抑制機能をもつ骨髄由来抑制性細胞(MDSC:myeloid-derived suppressor cells)や制御性 T 細胞(Treg:regulatory T cell)といった細胞の浸潤が認められる。また、IL-10 や TGF- β などの免疫抑制分子や、T 細胞を負に制御する免疫チェックポイント分子である CTLA-4 や PD-1 などの発現が強まっている。

さらに腫瘍に対する治療が、免疫抑制性環境を増強することがわかっている。CTL は、腫瘍細胞を認識・反応し IFN- γ を産生し抗腫瘍効果を発揮する。しかし CTL に負の共刺激分子である PD-1 分子が発現し、さらに腫瘍細胞に PD-1 のリガンドである PD-L1 分子が発現して、CTL のエフェクター活性が制御されることがこれまでに明らかになっている[10]。腫瘍内で CTL の PD-1、腫瘍細胞の PD-L1 との相互作用による PD-1/PD-L1 経路がすでに形成されていた場合、この免疫抑制機構を Innate resistance

と呼ぶ。また腫瘍に CTL を投与してあらたに腫瘍細胞に PD-L1 が発現して、投与された CTL に発現する PD-1 との相互作用による PD-1/PD-L1 経路による免疫抑制機構を Adaptive resistance と呼ぶ[11]。この Adaptive resistance に注目して、あらたに形成される免疫抑制機構を解除することが、がん免疫療法の改善に役立つと考えられている(図 2)。

これまでのがん免疫療法における課題をこの Adaptive resistance に注目して、がん免疫療法によりあらたに形成される免疫抑制機構を明らかにし、またその免疫抑制機構を解除してがん免疫療法の改善につなげることを目的に本研究を行った。本研究では、B16メラノーマ担癌 C57BL/6 マウスに腫瘍特異的 CTL 移入療法モデルを用いて、CTL 移入療法により腫瘍内に形成されるあらたな免疫抑制機構を明らかにして、その免疫抑制機構を解除するために併用薬剤についても検討を行った。

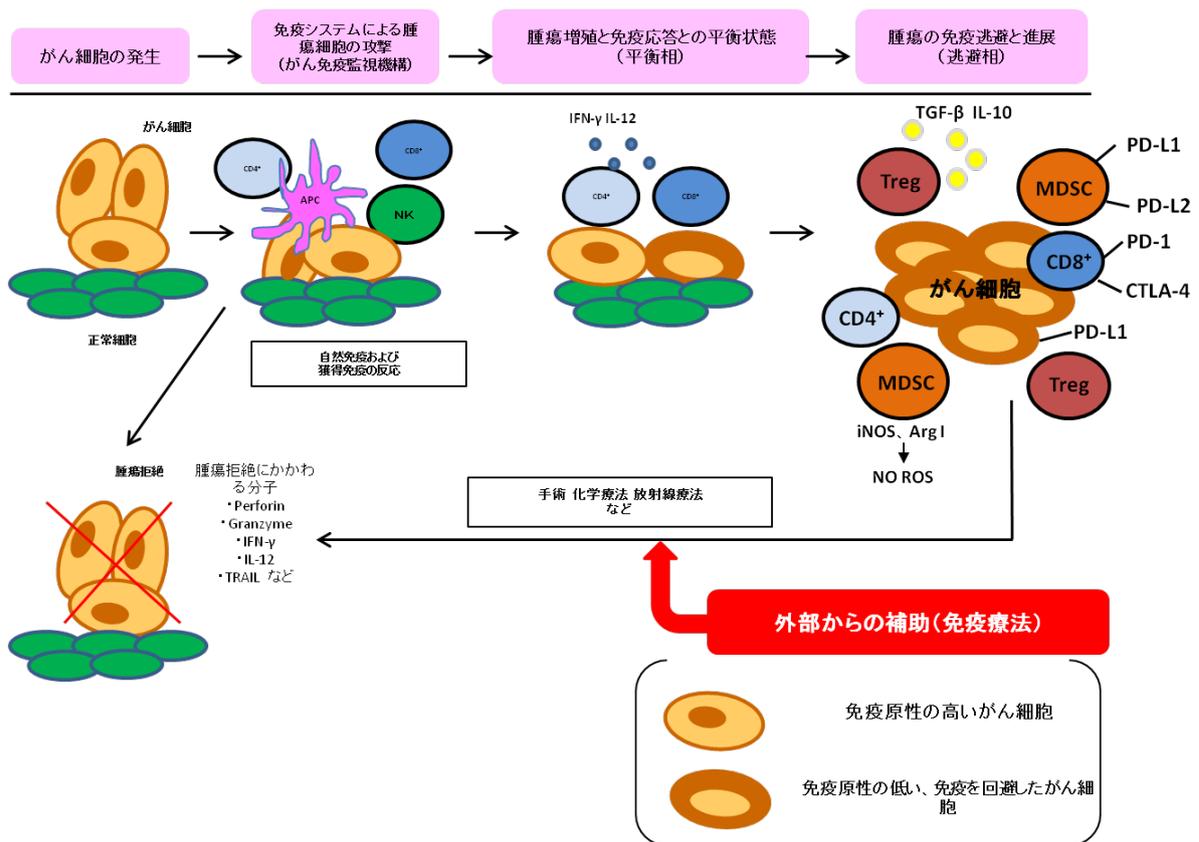
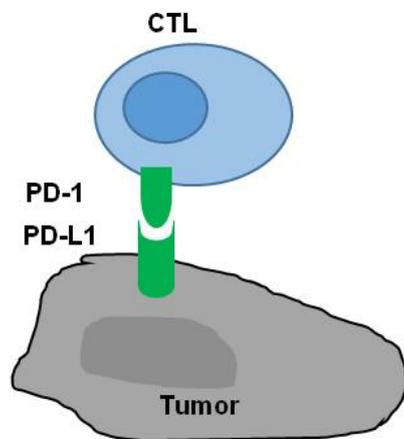


図1 がん形成過程におけるがんと免疫のかかわり

様々な要因により、正常細胞ががん細胞へと形質転換すると、NK、NKT細胞、マクロファージなどによる自然免疫系、およびT細胞をはじめとする獲得免疫系ががん細胞を感知する。様々な分子を介した免疫システムの攻撃により、がん細胞が拒絶される。しかし、これが不完全な場合はその後、がん細胞の増殖と免疫応答との平衡状態を経て、がんが臨床的に検出できるほどに大きくなった時には、担がん個体はすでに免疫逃避機構が成立し、通常の免疫応答ではもはや、がんを排除できない。腫瘍内では免疫抑制性環境が形成されており、がん抗原の消失した免疫原性の低いがん細胞が残り、腫瘍内には免疫抑制機能をもつ骨髄由来抑制性細胞 MDSC や制御性 T 細胞 Treg といった細胞の浸潤が認められる。また、IL-10 や TGF- β などの免疫抑制分子や、T 細胞を負に制御する免疫チェックポイント分子である CTLA-4 や PD-1 などの発現が強まっている。

Innate resistance



Adaptive resistance

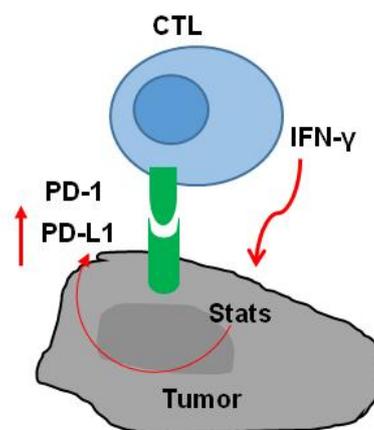


図2 Innate resistance と Adaptive resistance

腫瘍内免疫抑制性環境において、既に形成された免疫抑制機構を Innate resistance と呼ぶ。CTL に PD1 が発現し、腫瘍細胞(Tumor)には PD-L1 が発現し PD1/PD-L1 経路による免疫抑制機構が形成されている。一方、腫瘍に対して外部から治療を加える(CTL 移入療法など)ことで、この免疫抑制性環境にあらたに形成される免疫抑制機構を Adaptive resistance と呼ぶ。CTL 移入療法を行うと腫瘍内であらたに CTL に PD1 が発現し、腫瘍細胞に PD-L1 が発現しあらたに PD-1/PD-L1 経路による免疫抑制機構が形成される。この Adaptive resistance に注目して、あらたに形成された免疫抑制機構を解除することで、がん免疫療法の改善につながると言われている。

がん免疫療法の種類(図 3)

がんに対する治療法には外科療法、放射線療法、化学療法が3大療法として考えられており、第4の治療法としてがん免疫療法が考えられている。1900年頃に細菌を用いたColeyワクチンにはじまったがん免疫療法は、その後BCGやOK-432などの非特異的免疫賦活剤、IFNやIL-2などのサイトカイン、Her2やCD20などに対する抗腫瘍モノクローナル抗体、腫瘍抗原ワクチン、抗腫瘍T細胞や樹状細胞などの培養免疫細胞を用いた治療、免疫チェックポイント阻害剤(抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体)と開発されてきた。これまでがん免疫療法の治療効果に関して懐疑的な意見が多かったが、その中でも抗腫瘍モノクローナル抗体や抗腫瘍T細胞を用いた免疫療法は治療効果が明確に得られる事が明らかになってきた。

がん免疫療法には、患者体内で抗腫瘍免疫応答を誘導するワクチン治療などの能動免疫療法と、抗体などの最終エフェクターを投与する受動免疫療法、抗腫瘍培養T細胞などを投与する養子免疫療法、同種造血幹細胞移植などの同種抗原に対する免疫療法、などに分類することができる。いずれもがん細胞と正常細胞を識別し、がんを攻撃する免疫細胞の抗腫瘍活性を治療に用いるが、その際がん細胞の目印になるものが「腫瘍特異抗原(がん抗原)」である。加えて、免疫チェックポイント阻害剤治療も現在開発が進んでいる。

1991年にベルギーのBoon博士のグループによる細胞傷害性T細胞(CTL)の標的となる世界初のヒト腫瘍特異抗原であるMAGE-1遺伝子の同定により初めて、腫瘍抗原

の本態解明にむけての研究が始まった[12]。その後、腫瘍抗原遺伝子の探索技術やがんの遺伝子解析も進展し、すでに多くのヒト腫瘍抗原が同定されている。1990年代後半からは、これら抗原を標的にした能動免疫(ワクチン)療法や、受動免疫療法(養子免疫療法を含む)が試みられている。現在開発がすすんでいるがん免疫療法として、

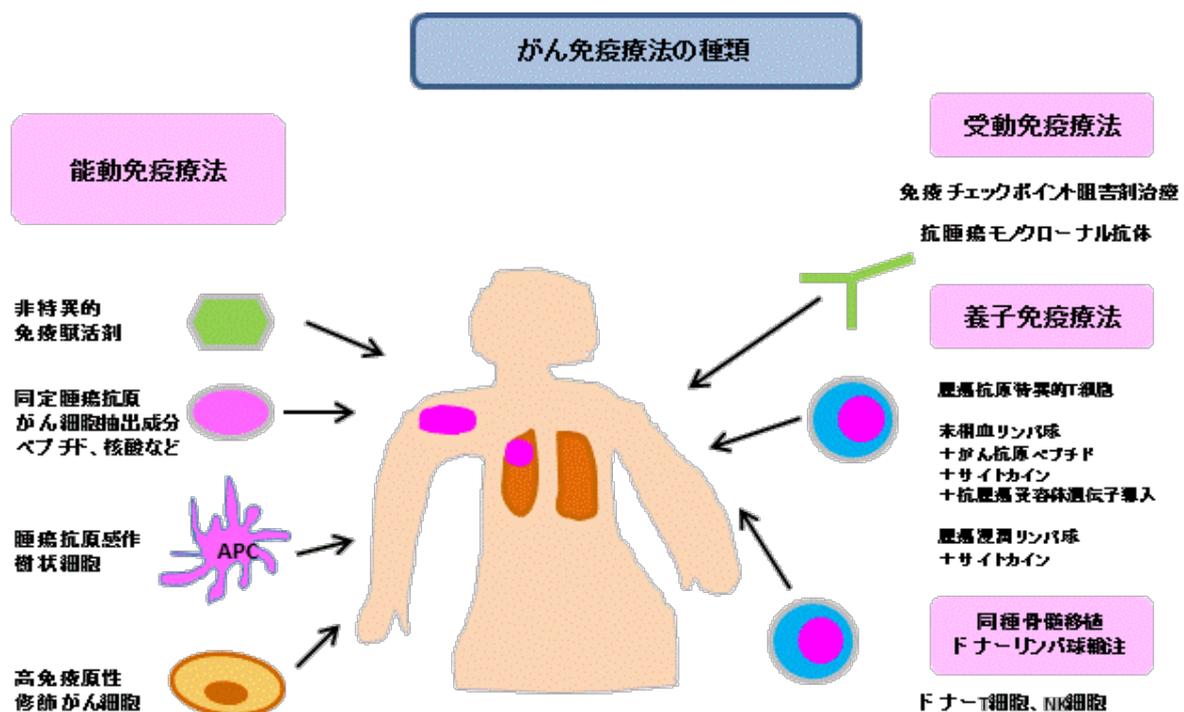


図3 がん免疫療法の種類

がん免疫療法は、その方法により、患者体内で抗腫瘍免疫応答を誘導する能動免疫療法と、抗体などの最終エフェクターを投与する受動免疫療法、抗腫瘍培養T細胞などを投与する養子免疫療法などに分けられる。

腫瘍特異的 T 細胞移入療法

腫瘍特異的なリンパ球を体外で刺激活性化させ、その細胞を再び患者に投与する特異的 T 細胞移入療法は、最も強力ながん免疫療法の一つである。2002 年に Rosenberg 博士のグループが、腫瘍特異的 T 細胞移入療法により 13 名の転移性メラノーマ患者のうち 6 名で部分的な腫瘍の縮小を認めたと報告し生体の持つ細胞性免疫応答が、実際に進行がんを制御し退縮させる能力を持っている事を証明した[13]。同様に 2012 年、Rosenberg 博士のグループが、進行期メラノーマ患者を対象とした T 細胞移入療法を実施し、93 例中 20 例で腫瘍が完全に退縮し、32 例で部分的退縮を認め、RECIST 基準での奏効率は 56%であったと報告した[14]。しかしこれらの腫瘍特異的 T 細胞移入療法は、切除された腫瘍から腫瘍特異的リンパ球を生体外で増殖させるため、なかには腫瘍特異的リンパ球の増殖が困難な患者が存在すること、メラノーマ以外のがん患者で腫瘍特異的リンパ球を増殖させるのが困難であるといった問題点があった。

また、腫瘍特異的 T 細胞移入療法をはじめた初期には臨床的な効果や移入した T 細胞の生存期間が限られているという結果が多かった。この原因として第 1 に、担がん生体における免疫抑制機構の存在が、第 2 に、移入する T 細胞のクオリティの問題が考えられた。第 1 の問題点の解決法の 1 つとして、Rosenberg 博士のグループは T 細胞移入療法実施患者に化学療法剤や放射線照射の前処置を加え、担がん生体の免疫抑制機構の解除を目指した。これらの前処置により、がん患者中の Treg や MDSC などの免疫抑制性細胞群が一時的に除去/活性阻害されるとともに、リンパ球数が減少し

た個体内で、移入されたリンパ球がホメオスタティックに活性化し増殖した[14, 15]。第2の問題の解決法として移入する T 細胞の *in vitro* での培養期間をできる限り短くした。それは、移入する T 細胞の *in vitro* での培養期間をできる限り短縮し、分裂回数少ない細胞を治療に用いることが有効であることが明らかになってきたからである。長期培養 T 細胞は *in vitro* におけるエフェクター機能は強いが、細胞分裂能が減弱し、生体内でのリンパ球の生存に劣り、結果として移入療法に用いた場合の抗腫瘍効果が弱い[15]ことが明らかとなった。

T 細胞受容体(TCR)遺伝子導入 T 細胞移入療法

2006 年 Rosenberg 博士のグループにより、腫瘍抗原を特異的に認識する T 細胞受容体(T cell receptor:TCR)遺伝子を末梢血 T 細胞に導入する遺伝子導入 T 細胞移入療法が報告され、メラノーマ患者 17 例中 2 例において移入 T 細胞の生体内長期生存と腫瘍縮小効果が報告された[16]。その後、より高親和性の TCR を用いることにより有効率を上げる試み(19~30%)が報告されている[17]。TCR 遺伝子を導入した T 細胞を用いることで、大腸がん、食道がん、滑膜肉腫など、メラノーマ以外の固形がんに対しても、腫瘍特異的な T 細胞を遺伝子導入技術によって調製することが可能となり、腫瘍特異的 T 細胞移入療法を行う事が可能となった。[18-20]

キメラ抗原受容体(CAR)遺伝子導入 T 細胞移入療法

近年、腫瘍を認識するために必要な受容体である T 細胞受容体の代わりにキメラ抗原受容体(Chimeric antigen receptor : CAR)を T 細胞に組み込み、投与する遺伝子導入 T 細胞移入療法が主に神経芽腫を有する小児患者、濾胞性リンパ腫と慢性リンパ性白血病患者に対して実施されている[21-25]。CAR 遺伝子導入 T 細胞移入療法は抗体の反応性を利用しているために、基本的に標的細胞表面に存在する抗原でないと認識できない。一方、有利な面としては、(1)CD8⁺T 細胞のみならず CD4⁺T 細胞や非 T 細胞にも機能を与えうる、(2)標的細胞の MHC 発現を必要としない、(3)一般の TCR に比較してはるかに親和性が高い、などがあげられる。Carl June 博士のグループにより、再発性難治性慢性リンパ性白血病患者 3 例に対し、化学療法後に CART-19 を単回投与したところ、CR は 2 例、PR は 1 例に認めたと報告されている[26]。

免疫チェックポイント 阻害剤治療

がん細胞と免疫システムの相互作用のメカニズム解明が進むにつれて、がん細胞が抑制性シグナルを伝達する免疫チェックポイント分子を巧みに利用して免疫抑制環境を誘導し、がんに対する免疫監視機構から逃避している特性が明らかになってきた。そのような機序を標的として治療法が免疫チェックポイント 阻害剤治療であり、抗 CTLA-4 抗体が 2011 年、抗 PD-1 抗体が 2014 年に承認された。

CTLA-4 分子は活性化した T 細胞のみに発現し、生理的リガンドである CD80 およ

び CD86 分子と結合することで抑制性の共シグナルを伝達する。転移を有する悪性黒色腫患者に対する臨床試験において、イピリムマブ(抗 CTLA-4 抗体)の生存率が 1 年目で 45%、2 年目で 24%であり同じ病気患者の生存率よりも高かった[27]。

また、PD-1/PD-L1 分子に対する阻害抗体はがんの免疫逃避機構を解除するきわめて有望な免疫療法として、臨床開発が進められている。抗 PD-1 抗体について、悪性黒色腫にて 28%、非小細胞肺癌にて 18%、腎細胞がんにて 27%の奏効率が報告されている[28]。

腫瘍特異的 T 細胞移入療法はメラノーマや血液がんに対してはある一定の効果を認めたが、通常の固形がんに対する効果は未だ評価されておらず、今後の課題である。固形がんではがん細胞以外にさまざまな細胞が集まって、免疫抑制性環境を構築しており、その克服が必要である。がん細胞はその発生過程や治療経過中に免疫担当細胞の監視や CTL の攻撃から逃れるための様々な腫瘍免疫回避機構を獲得していく。こうして成立した腫瘍内では、さまざまな細胞と分子が複雑に相互作用することで、免疫抑制性環境が構築されている[29, 30]。がんは、がん細胞とがん間質と呼ばれる組織から成り立っている。がん間質は細胞外マトリックスに富み、そこにはがん関連線維芽細胞(CAF:cancer associated fibroblast)や炎症細胞や血管内皮細胞など種々の細胞が含まれている。がん間質に含まれる種々の細胞のなかでも CAF が、がん細胞の増殖に働くことが報告されている[31]。腫瘍細胞は T 細胞に発現する免疫チェックポイント分子

に対するリガンド (PD-L1, B7-H4, galectin9 など) を発現し、あるいは免疫応答を抑制する因子 (IL-10, TGF- β , galectin-1, gangliosides, PGE2, IDO, NO など) を産生する [32-34]。T 細胞を除去するプロアポトーシス経路に関連する因子 (FasL, TRAIL など) と同様に、Treg や MDSC など、誘導された免疫抑制性細胞もまた免疫抑制性環境の構築に主要な役割をはたしている [35]。腫瘍内の免疫抑制性環境が T 細胞の機能疲弊を誘導し、その結果抗腫瘍免疫の存在下においても、腫瘍の増大が起こっている [36]。従って多様な免疫抑制因子による障害を克服することが、がん免疫療法の成功の鍵となる [37]。

担がん時にがん局所のみならず脾臓、末梢血にも増加する免疫抑制性 CD11b⁺Gr-1⁺ 細胞が、担がんに伴う免疫抑制細胞として再認識され MDSC と呼称され広く受け入れられてきた。この細胞集団は、がん部位における炎症反応に伴いケモカイン CCL2 とその受容体 CCR2 依存的に組織浸潤した単球由来マクロファージと好中球であることが報告されている [38]。その後、国際的に MDSC には CD11b⁺Gr1^{high}Ly6G⁺Ly6C^{lo} (Granulocytic-MDSC) 好中球タイプと CD11b⁺Gr1^{int}Ly6G⁻Ly6C⁺ (Monocytic-MDSC) マクロファージタイプがあることが定説になっている [39]。

B16F10 メラノーマ細胞を C57BL/6 マウスに接種して作成した担癌マウスモデルを用いて、がんに対する CTL 移入療法に関する科学的な評価が解析されてきた。

先行研究である野地、細井らの報告と同様に [40, 41]、B16F10 メラノーマの皮下腫瘍に対して、B16 腫瘍特異的 CTL を投与する CTL 移入療法モデルにおいて、CTL は

腫瘍の増大を停止させることができるが、抗腫瘍効果が一時的であり、再び腫瘍が増大してしまうのが問題点であった。細井ら [41]は、CTL 移入療法により腫瘍内に大量の MDSC 特に M-MDSC(Monocytic MDSC)が誘導され、誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS:inducible nitric oxide synthase)の発現により一酸化窒素(NO:nitric oxide)及び活性酸素種(ROS:reactive oxygen species)が産生され、CTL が制御される事が原因の1つである事を明らかにした。同様に細井ら [41]の報告によると、M-MDSC で CCR2 分子が発現していた。また CCR2 のリガンドである CCL2、CCL7、CCL12 が腫瘍で発現しており、CTL 移入療法により CCL2、CCL7、CCL12 の発現が増していた。この結果から CTL 移入療法により腫瘍細胞で CCL2、CCL7、CCL12 の発現が増して、CCR2 を発現する M-MDSC が腫瘍内に誘導されると考えられた。そこで CCR2 ノックアウトマウスおよび野生型マウスにおいて CTL 移入療法を行った。CCR2 ノックアウトマウスにおいて CTL 投与3日目の腫瘍内には M-MDSC が10%ほどしか誘導されておらず、野生型マウスでは70%ほどの M-MDSC が誘導されていた。さらに、CTL 移入療法による抗腫瘍効果は野生型マウスよりも CCR2 ノックアウトマウスでさらに増していた。以上からも CCR2 を発現する M-MDSC が、CTL 移入療法により腫瘍細胞に発現した CCL2、CCL7、CCL12 により腫瘍内に誘導されていると考えられた。

このように、CTL 移入療法により腫瘍内に誘導される MDSC があたりに形成された免疫抑制機構を担っていることが明らかになっており、この MDSC を制御することにより、あたりに形成された免疫抑制機構を解除し CTL 移入療法の抗腫瘍効果の

増強につながるものと考えられた。

MDSC は、iNOS や Arginase I を産生し NO や ROS を産生し、CTL の抗腫瘍効果を阻害する(図 4)。そのため本研究では、MDSC が産生する免疫抑制分子である iNOS および NO に着目して iNOS 阻害剤である L-NMMA(N^G -Monomethyl-L-arginine)および NO 消去剤である C-PTIO を CTL 移入療法に併用する事とした。薬理的に MDSC を制御して免疫抑制性環境を制御する事により CTL 移入療法の抗腫瘍効果をさらに増強させるための治療法の開発がこの研究の目的である。

方法

1. 動物

雄 C57BL/6 マウス(6~8 週齢)を日本 SLC(Sizuoka, Japan)より購入し、樹状細胞(DC)の準備および細胞移入療法モデルのための腫瘍担癌マウスとして用いた。

Pmel-1-TCR トランスジェニックマウス[42]を Jackson 研究所(Bar Harbor, ME, USA)から入手した。このマウス細胞は Thy1.1(CD90.1)陽性であり、B16 メラノーマの腫瘍抗原 gp100(gp100 25-33)からの H-2D^b 制限エピトープ EGSRNQDWL を認識した。すべての動物は、実験動物施設で飼育し、東京大学医学部・大学院医学系研究科疾患生命工学センター・動物資源学部門のガイドラインに従って実験に用いた。

2. 腫瘍細胞株

B16F10 メラノーマ細胞は、gp100 陽性の野生型マウスメラノーマ細胞であり Dr.N.Restifo(National Cancer Institute, Bethesda, USA)から貰い受け、DMEM (Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)に 10%ウシ胎児血清(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)、100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycin(Wako Pure Chemical, Osaka, Japan)を添加した培地を用いて培養した。

3. ペプチド

H-2D^b-制限ペプチド ヒト gp 100(hgp100 25-33, KVPRNQDWL)は GenScript Japan(Tokyo, Japan)から購入した。

4. 薬剤

L-NMMA(N^G-Monomethyl-L-arginine)(iNOS inhibitor)は Dojindo(Kumamoto, Japan)から購入した。PBS(-)で溶解し、2mg/200 μ l をマウス腹腔内へ投与した。

Carboxy-PTIO(2-(4-Carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) (NO 除去剤)は Dojindo(Kumamoto, Japan)から購入した。PBS(-)で溶解し 2mg/200 μ l を 1 日 2 回マウス腹腔内へ投与した。

抗マウス PD-1 抗体(a-mPD1 mAb)は、竹田和由先生(順天堂大学医学部免疫学講座)より提供して頂いた。PBS(-)で溶解して 100 μ g/200 μ l をマウス腹腔内へ投与した。

5. CTL の調製

培地は、10%ウシ胎児血清添加 RPMI 1640 完全合成培地(12.5 mM HEPES, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol, 1×10^{-5} M sodium pyruvate, 1% nonessential amino acids, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin 添加)を使用した。腫瘍特異的 CTL は、pmel-1 マウス

脾細胞を H-2D^bhgp100₂₅₋₃₃(KVPRNQDWL)でペプチドパルスした樹状細胞で刺激する事で誘導した。

1) 樹状細胞(dendritic cell:DC)の誘導

C57BL/6 マウスの大腿骨および脛骨から回収した骨髓細胞を、20ng/ml 顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子(granulocyte macrophage colony-stimulating factor)(GM-CSF)(Pepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA)を添加した 10%ウシ胎児血清添加 RPMI1640 完全合成培地にて 8 日間培養し、未熟樹状細胞を誘導した[43]。

培養 8 日目の未熟樹状細胞を回収し、10ng/ml GM-CSF、10ng/ml IL-4(Pepro Tech, Rocky Hill, NJ, USA) 、1μg/ml lipopolysaccharide(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) を添加した 10%ウシ胎児血清添加 RPMI1640 完全合成培地で 16 時間培養し、成熟樹状細胞へ誘導した。培養 9 日目の成熟樹状細胞に対し、1μg/ml の hgp100 ペプチドパルスを 2 時間行った後、これを回収して CTL 刺激に用いた。

2) CTL の誘導

Pmel-1 TCRトランスジェニックマウスから分離した脾細胞 1×10^7 個を、50 U/ml IL-2(Chiron Corporation, Emeryville, CA, USA)存在下に、hgp100 ペプチドパルスした樹状細胞 2×10^5 個を用いて 3 日間刺激することにより、腫瘍特異的 CTL を誘導した。培養細胞の約 90%は CD3⁺CD8⁺CTL であった。

6. 動物実験モデル

C57BL/6 マウスの右後方背部に B16F10 メラノーマ細胞 1×10^6 個を皮内接種し、9 日目に 1×10^7 個/200 μ l(1%ウシ胎児血清添加 RPMI1640 培地)の CTL を尾静脈より投与した。L-NMMA は、CTL 投与 2 日目から 11 日目まで連日 1 日 1 回、2mg/PBS 200 μ l を腹腔内投与した。C-PTIO は、CTL 投与 1 日目から 10 日目まで連日 1 日 2 回、2mg/PBS 200 μ l を腹腔内投与した。抗マウス PD-1 抗体は、CTL 投与 1、4、7、10 日目に 1 日 1 回 100 μ g/PBS 200 μ l を腹腔内投与した。

各マウスに対し、2 日毎にノギス(Digital caliper 100mm,Shinwa rules, Niigata, Japan)を用いて腫瘍の長径(腫瘍の最大径)、短径(長径に直交する最大径)、高さ(皮膚に対する垂直方向での腫瘍の厚みとした)の計測を行い、腫瘍体積(mm^3)を $\pi/6 \times$ 長径(mm) \times 短径(mm) \times 高さ(mm)により算出した。

マウスは各実験の解析日に応じて犠牲死させ、腫瘍などを解析に用いた。

7. フローサイトメトリーによる腫瘍内環境の解析

1) 細胞分離

マウス腫瘍から、添付文書に従い tumor dissociation kit(Miltenyi Biotec Inc, Auburn CA, USA)を用いて細胞浮遊液を得た。マウスから摘出した腫瘍を、剪刀で細かく切断した後、enzyme mix(Miltenyi Biotec Inc, Auburn CA, USA) を含んだ gentle MACS C Tube に移し、Gentle MACS™ Dissociator(Miltenyi Biotec Inc, Auburn CA, USA) を用いて機械

的にサンプルを分断して、70 µm cell strainer(BD Falcon, BD Bioscience, New Jersey, USA)に通して細胞遊液を得た。

細胞数は、flow count beads (Beckman-Coulter, Galway, Ireland)を用いて測定した。

2) フローサイトメトリーによる表面抗原解析

細胞浮遊液は、Fixable Viability Dye eFluor®450(eBioscience, San Diego, CA, USA)あるいは Zombie Yellow(BioLegend, San Diego, CA, USA)で染めて死細胞を除き、anti-CD16/32 抗体(clone 2.4G2; BD Bioscience Pharmingen, New Jersey USA)を用いて FcReceptor-Block 処理を行った。以下の抗体を BioLegend(San Diego, CA, USA)より購入し解析に用いた。

a) Fluorescein isothiocyanate (FITC)標識抗体

抗 CD45 抗体、抗 CD90.1 抗体、抗 CD69 抗体

b) Phycoerythrin(PE)標識抗体

抗 CD11b 抗体、抗 CD8 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 4-1BB 抗体、抗 Tim3 抗体、抗 CTLA4 抗体

c) Peridinin-chlorophyll proteins/cyanine 5.5(PerCP-Cy5.5)標識抗体

抗 CD45 抗体

d) Phycoerythrin-cyanine 7(PE-Cy7)標識抗体

抗 Ly6C 抗体

e) Alexa fluor 647 標識抗体

抗 Thy1.1 抗体

f) Allophycocyanin/cyanine 7(APC-Cy7)標識抗体

抗 CD8 抗体

g) Allophycocyanin(APC)標識抗体

抗 IFN- γ 抗体、抗 CD107a 抗体、抗 NK1.1 抗体

h) Pacific Blue 標識抗体

抗 CD45 抗体

染色後の細胞浮遊液を、フローサイトメーター(GalliosTM flow cytometer)

(Beckman Coulter, San Diego, CA)で測定し、FlowJo software(version 7.6.5; Tree Star, Ashland, OR, USA)にて解析した。数は、腫瘍体積(g)あたりの細胞数で比較した。

3) MDSC による NO \cdot ROS 産生

細胞浮遊液を、HBSS で 3 回洗浄し、5 μ M DAF-FM(Diaminofluorescein-FM)

(SEKISUI MEDICAL, Tokyo, Japan)あるいは、0.625 μ M CM-H₂DCFDA

(5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ester) (Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA)で 37°C、30 分染色を行った。PBS(-)で 2 回洗浄し、Zombie

Yellow(BioLegend, San Diego, CA, USA)で 4°C、30 分染色を行った。その後

anti-Gr1/biotin 抗体で 4°C、30 分染色を行い、さらに anti-CD45/FITC 抗体、
anti-Ly6C/PE-Cy7 抗体、anti-APC/Streptavidin 抗体、anti-CD11b/APC-Cy7 抗体で 4°C、
30 分染色を行った。フローサイトメーターで DAF-FM、CM-H₂DCFDA による緑色蛍
光強度で測定し、MDSC の NO[•] ROS 産生を評価した。

4) 細胞内 IFN- γ 細胞染色

細胞浮遊液を、Fixable Viability Dye eFluor450、anti-CD45/PerCP-Cy5.5 抗体、
anti-CD8/APC-Cy7 抗体、anti-CD90.1/FITC 抗体で染色した。その後添付文書に従い
Intraprep permeabilization reagent(Immunotech, Marseille, France)を用いて細胞内 IFN- γ 細
胞染色を行った。細胞を anti-IFN- γ /APC 抗体あるいは isotype control(Rat IgG2a, κ ,
BioLegend, San Diego, CA, USA)抗体で 4°C、30 分染色した。また 1 μ g/ml hgp100 ペプ
チドで 4 時間刺激した後も同様の染色を行った。CD45⁺CD8⁺CD90.1⁺細胞である CTL
にゲートをかけて、IFN- γ 産生率を測定して CTL のエフェクター活性を評価した。

5) 細胞表面 CD107a アッセイ

細胞浮遊液を 0.4 μ l anti-CD107a/APC 抗体あるいは isotype control(Rat IgG2a, κ)抗
体を含む培養液下で 4 時間 1 μ g/ml hgp100 ペプチドで刺激を行う場合とペプチド刺激
を行わない場合にわけた。その後、Fixable Viability Dye eFluor450、anti-CD45
PerCP-Cy5.5 抗体、anti-CD8/APC-Cy7 抗体、anti-CD90.1/FITC 抗体で染色した。

CD45⁺CD8⁺CD90.1⁺細胞である CTL にゲート をかけて、CTL 表面における CD107a の発現を測定して、CTL の脱顆粒能を評価した。

8. 細胞増殖試験(In vitro)

pmel-1 TCRトランスジェニックマウスから脾細胞を採取した。CD8a⁺ T cell Isolation Kit II を用いて磁氣的に CD8⁺細胞を分離した。CD8⁺細胞を 3 回 HBSS で洗浄し、PBS/1% BSA、0.6μM CFSE(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester)(Dojindo, Kumamoto, Japan)で 5×10⁶/ml に溶解し、37°C、10 分静置して染色した。10%FCS 入りの氷冷 RPMI 2 倍量で反応を止めた。この CD8⁺細胞を CTL として用いた。

CD11b⁺細胞を、CTL 投与 3 日目のマウス腫瘍から採取した。腫瘍を tumor dissociation kit を用いて細胞浮遊液を得た。細胞浮遊液を低浸透圧性 1.077g/ml density solution Optiprep (AXIX-SHIELD PocAS, Oslo, Norway)を用いて遠心し、中間層から細胞を採取した。この過程で死細胞と顆粒球が除去された。さらに EasySep Mouse CD11b Positive Selection Kits(STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canada)を用いて磁氣的に CD11b⁺細胞を分離した。

CFSE でラベルした CD8⁺細胞(1.5×10⁵)を 96 穴 U 字型プレート (Greiner Japan, Tokyo, Japan)に播種した。CD11b⁺細胞は、播種しないで培養液を加える場合と、あるいは指定された比率で CD11b⁺細胞を播種した。

hgp100 ペプチド (1 μg/ml)で刺激する場合と刺激しない場合にわけて 72 時間培養を行った。また、培養液に薬剤を投与しない場合と、0.1mM C-PTIO あるいは 0.5mM

L-NMMA を培養液に投与する場合にわけて 72 時間の培養を行った。72 時間後、フローサイトメーターで CFSE の蛍光強度を測定した

9. 細胞増殖試験(In vivo)

CTL を投与してから 3 日目と 7 日目、マウスを犠牲死させる 16 時間前に 2mg の BrdU(5-bromon-2'-deoxyuridine)(Sigma, Saint Louis, MO, USA)をマウス腹腔内へ投与した。腫瘍を tumor dissociation kit を用いて細胞浮遊液を得た。Fixable Viability Dye eFluor450、anti-CD45/ APC-Cy7 抗体、 anti-CD8/ PE 抗体、anti-CD90.1/ AlexaFluor647 抗体で染色を行った。24°C、10 分 Permeabilizing Solution 2(BD Bioscience, New Jersey, USA)を用いて細胞の固定・膜融和を行った。100 U/ml DNaseI (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN), 0.15 M NaCl, 4.2 mM MgCl₂ で 37°C、60 分培養した。anti-BrdU/ FITC 抗体, isotype control(Rat IgG1a, κ , BioLegend(San Diego, CA, USA))抗体で 24°C、20 分染色しフローサイトメーターで CTL の BrdU 取り込み率を測定した。

10. 定量 RT-PCR

マウス腫瘍から、TRIZOL(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いて total RNA を抽出した。RNA 純度および濃度は、NanoDrop spectrophotometer(Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)を用いて測定した。RNA は SuperScript III First-Strand Synthesis System(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)により、製品プロトコールに従い cDNA に逆転

写した。PCR 反応は、Thermal Cycler Dice™ Real Time System TP800(Takara, Shiga, Japan)を用い 95°C2 分を 1 サイクル、95°C15 秒、60°C30 秒を 40 サイクル行った。

用いたプライマーは以下の通りである。

GAPDH: forward primer: 5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'

reverse primer: 5'-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3'

IFN- γ : forward primer: 5'-CTCAAGTGGCATAGATGTGGAAGA-3'

reverse primer: 5'-GAGATAATCTGGCTCTGCAGGATT-3'

Perforin: forward primer: 5'-CTGTTCCCTCCTGGGCCTTTT-3'

reverse primer: 5'-TGGCACGAACTTGTGCTTCT-3'

Granzyme B: forward primer: 5'-GAAGATCCTCCTGCTACTGCTG-3'

reverse primer: 5'-GCACAAAGTCCTCTCGAATAAGG-3'

FasL: forward primer: 5'-AATCTGTGGCTACCGGTGGTA-3'

reverse primer: 5'-TTCTGCAGGTGGAAGAGCTG-3'

iNOs: forward primer: 5'-AAAGCCACGAGGCTCTGACA-3'

reverse primer: 5'-GTGAGAGGCAAAGGAGGAGA-3'

Arginase I: forward primer: 5'-CAGAAGAATGGAAGAGTCAG-3'

reverse primer: 5'-CAGATATGCAGGGAGTCACC-3'

NOX2: forward primer: 5'-GGAAGTGGGCTGTGAATGAA-3'

reverse primer: 5'-GCTGACCCAAGGAGTTTTTCG-3'

MMP9: forwad primer: 5'-CAGGAGTCTGGATAAGTTGGG-3'

Reverse primer: 5'-TTGGAAACTCACACGCCAGAA-3'

VEGF: forwad primer: ATCTTCAAGCCGTCCTGTG-3'

Reverse primer: GCATTCACATCTGCTGTGCT-3

11. 細胞診と免疫染色

CD11b⁺細胞からスメアを準備し、風乾、Diff-quick(Sysmex, Kobe, Japan)で染色した。細胞形態を、光学顕微鏡(Canon EOS Kiss X4 digital camera 搭載 OLYMPUS BX41, OLYMPUS, Tokyo, Japan 倍率は 400×,1000×)で撮像した。CD11b⁺細胞を 37°C、30 分 5μM の DAF-FM、0.6μM の CM-H₂DCFDA で染色し、anti-Gr1/Biotin 抗体で染色、その後 anti-APC/Streptavidin 抗体, anti-CD11b/PE 抗体で 4°C、30 分染色した。CD11b⁺細胞を FLUOVIEW FV10i(OLYMPUS, Tokyo, Japan)で撮像した。

12. 統計処理

統計解析は JMP software, version11.1.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて行った。実験結果の数値は、平均±標準偏差で示した。グループ間の差異の評価は Student の t 検定を用い、p<0.05 を統計的に有意と判定した。

結果

1. B16F10 担癌マウスモデルにおける腫瘍特異的 CTL 移入療法モデル(追試実験)

先行研究の野地、細井らの報告と同様に[40, 41]、B16F10 担癌 C57BL/6 マウスへの CTL 移入療法モデルでは、CTL 移入療法によりある一定期間腫瘍の増大を停止させることができるが、その抗腫瘍効果は一時的であり、腫瘍が再び増大してしまう問題点がある。腫瘍体積が 600mm^3 を超えるのに無治療群マウスは 3.3 ± 0.2 日、CTL 治療群マウスは 7.7 ± 1.0 日を要した。CTL は、その後腫瘍の増大を抑制する事ができなかった(図 5)。

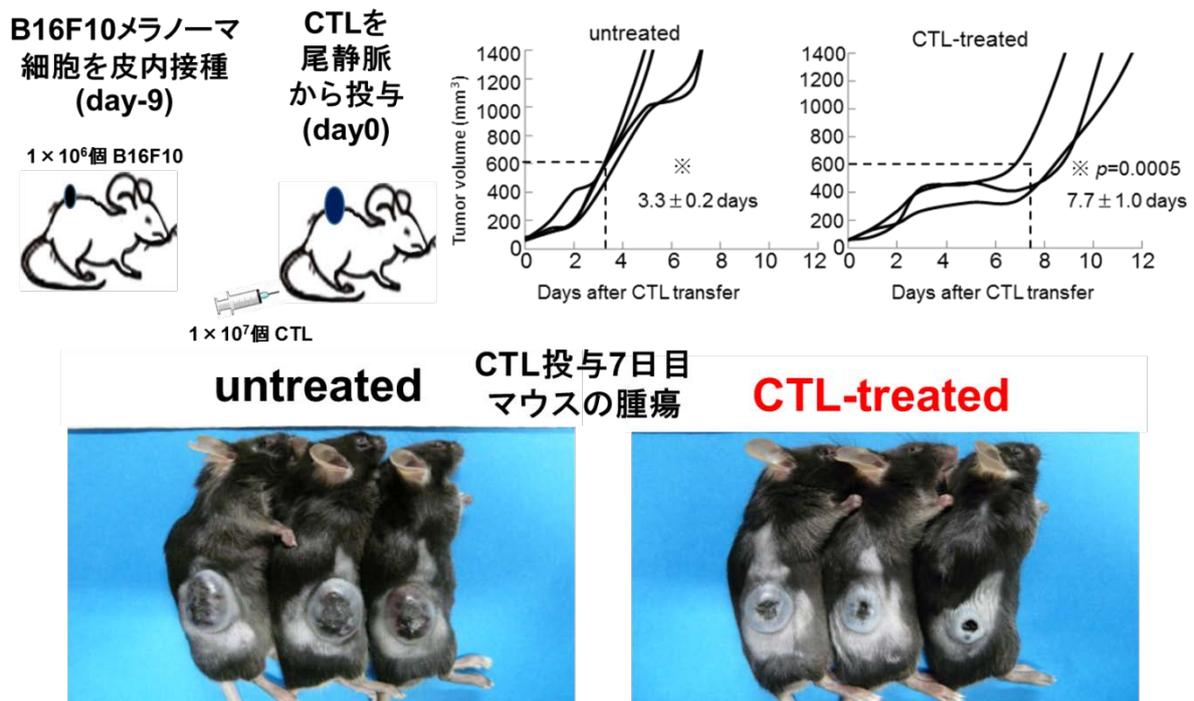


図 5 B16F10 メラノーマ担癌マウスにおける CTL 移入療法の抗腫瘍効果

B16F10 メラノーマ接種後 9 日目に 1×10^7 個の CTL を尾静脈から投与した(Day0)。腫瘍径を 2 日毎に計測し、腫瘍体積(mm^3)を $\pi/6 \times$ 長径(mm) \times 短径(mm) \times 高さ(mm)により算出し、無治療群(n=4)と CTL 移入療法群(n=3)における腫瘍増殖曲線を描いた。CTL 投与 7 日目の無治療マウス腫瘍と CTL 移入療法マウス腫瘍には明らかな腫瘍体積の差を認めるが、CTL 移入療法マウス腫瘍は再び増大するのが問題となっている。

2.腫瘍内 CTL の数・比率の変化、エフェクター活性(IFN- γ)の変化(追試実験)

そこで腫瘍内に浸潤した CTL の比率・数、エフェクター活性(IFN- γ 産生)を経時的に解析した。

2-1 腫瘍内に浸潤した CTL の比率・数の経時的な変化

腫瘍内に浸潤したリンパ球に対する CTL の比率は、CTL 投与から 5 日目で $15.6 \pm 4.4\%$ と高く、CTL の数も $2.22 \pm 1.1 \times 10^6$ 個と多いものの、10 日目では $2.3 \pm 1.1\%$ 、 $2.4 \pm 1.5 \times 10^5$ 個と明らかに比率も数も低下していた(図 6)。

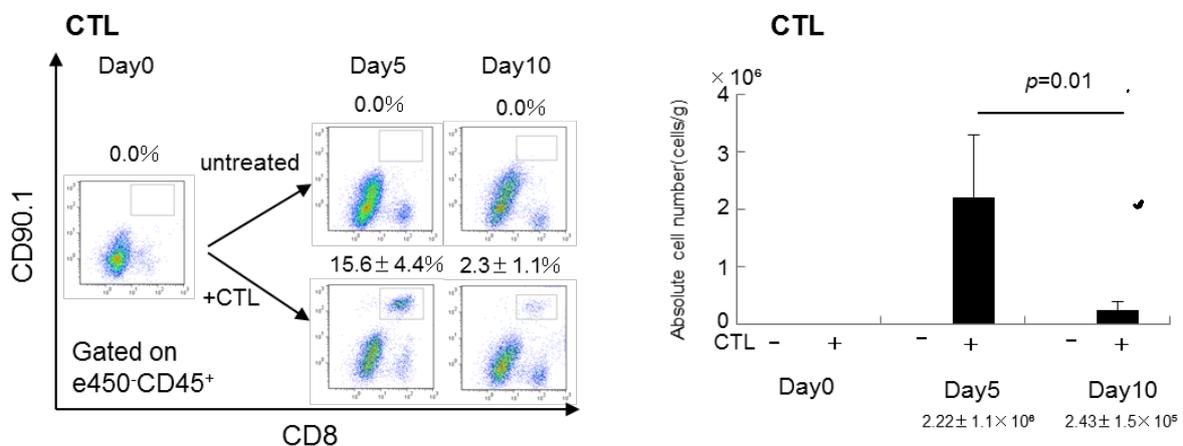


図 6 腫瘍内浸潤 CTL の比率と数

無治療マウスおよび CTL 移入療法マウスから CTL 投与 0,5,10 日目に腫瘍を摘出し tumor dissociation kit を用いて細胞浮遊液を得た。死細胞を fixable viability dye efluor450 で染色し、次に anti-CD45/PerCP-Cy5.5 抗体、anti-CD90.1/FITC 抗体、anti-CD8/APC-Cy7 抗体で染色した。フローサイトメーターで、e450⁻CD45⁺CD8⁺CD90.1⁺である CTL の比率・数を測定した。

2-2 腫瘍内に浸潤した CTL のエフェクター活性の経時的な変化

腫瘍内に浸潤した CTL の中で実際に、腫瘍細胞を認識・反応し、IFN- γ を産生する CTL の比率を経時的に検討した。

CTL が認識する抗原である gp100 ペプチドの刺激がない場合、IFN- γ を産生する CTL の比率は腫瘍内に浸潤した CTL のなかで実際に腫瘍細胞を認識・反応し、IFN- γ を産生する CTL の比率をあらわす。

CTL 投与 3 日目は $25.2 \pm 3.4\%$ であったのに対して、5 日目は $6.4 \pm 1.4\%$ と明らかに低下していた。すなわち、投与 3 日目の CTL は、腫瘍内に浸潤後、腫瘍細胞を認識・反応して IFN- γ を産生できるが、5 日目には IFN- γ の産生が低下していることがわかった。その後 7 日目、17 日目でも IFN- γ 産生率は低下したままであった。

次にペプチド刺激した場合、CTL の IFN- γ 産生率は CTL の潜在的な IFN- γ 産生能を示しており、投与 3 日目 ($74.2 \pm 3.6\%$) から 5 日目 ($52.6 \pm 1.4\%$) にかけて保たれていた CTL の IFN- γ 産生能は、7 日目 ($25.0 \pm 5.0\%$) 以降はさらに低下し 17 日目 ($33.8 \pm 7.1\%$) も低下したままであった (図 7)。

これらのことから、腫瘍内に浸潤した CTL は、移入して 7 日目以降には抗原刺激がある状態でも、その IFN- γ 産生能が低下してしまうことが明らかになった。

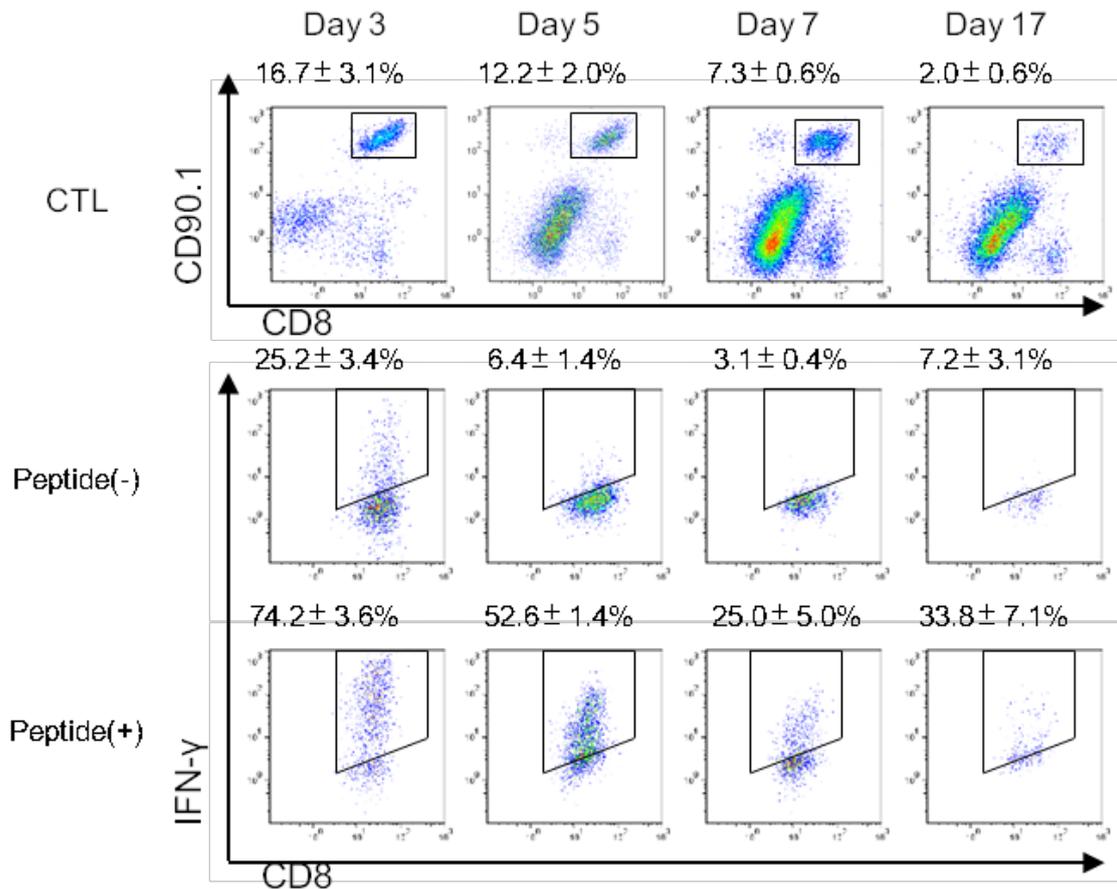


図7 腫瘍内浸潤 CTL のエフェクター機能(IFN- γ 産生)の経時的な変化[44]

CTLを投与したマウスから CTL 投与 3 日目、5 日目、7 日目、17 日目に腫瘍を摘出し、tumor dissociation kit を用いて細胞浮遊液を得た。1 $\mu\text{g/ml}$ の hgp100 peptide で 4 時間刺激した場合と、刺激しない場合にわけた。死細胞を fixable viability dye efluor450 で染色し、次に anti-CD45/PerCP-Cy5.5 抗体、anti-CD90.1/FITC 抗体、anti-CD8/APC-Cy7 抗体で細胞表面を染色した。さらに、Intraprep permeabilization reagent で処理し、anti-IFN- γ /PE-Cy7 抗体で染色し CTL の IFN- γ 産生率をフローサイトメーターで測定した。

3.腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)数の変化と CD8⁺、NK の数・比率の変化(追試実験)

CTL 移入療法当日の腫瘍内浸潤リンパ球数(TIL)は 7.9×10^6 個であるが、CTL 移入療法を行うと、CTL 投与 5 日目 CTL 移入療法マウスの TIL は $1.4 \pm 0.36 \times 10^7$ 個と増加し、多数のリンパ球が誘導されていた。CTL 投与 10 日目 TIL は $1.0 \pm 0.07 \times 10^7$ 個と減少に転じていた(図 8)。腫瘍内には、CTLに加えて、CD8⁺T 細胞(図 9)、NK 細胞(図 10)など多数のリンパ球が浸潤していた。

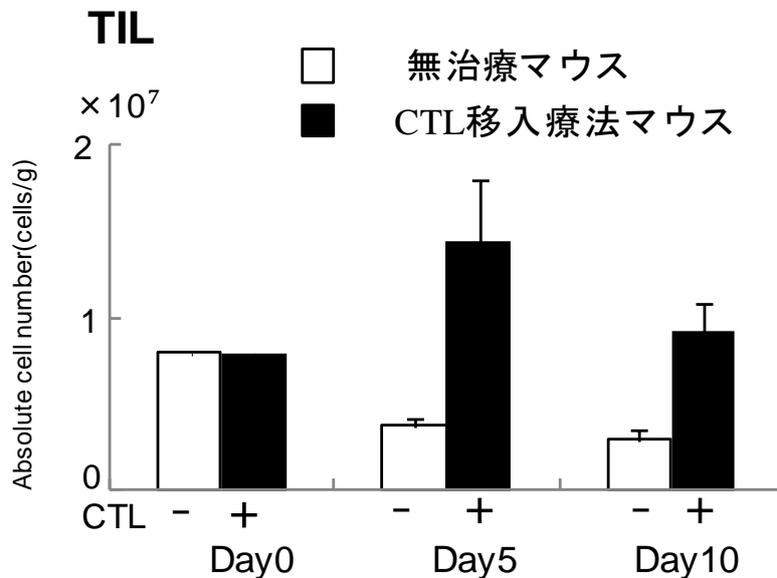


図 8 腫瘍内浸潤リンパ球数(TIL)

無治療マウスおよび CTL 移入療法マウスから CTL 投与 0 日目、5 日目、10 日目に腫瘍を摘出し tumor dissociation kit を用いて細胞浮遊液を得た。死細胞を fixable viability dye efluor450 で染色し、次に anti-CD45/PerCP-Cy5.5 抗体で染色した。フローサイトメーターで、e450⁻CD45⁺である TIL の数を測定した。

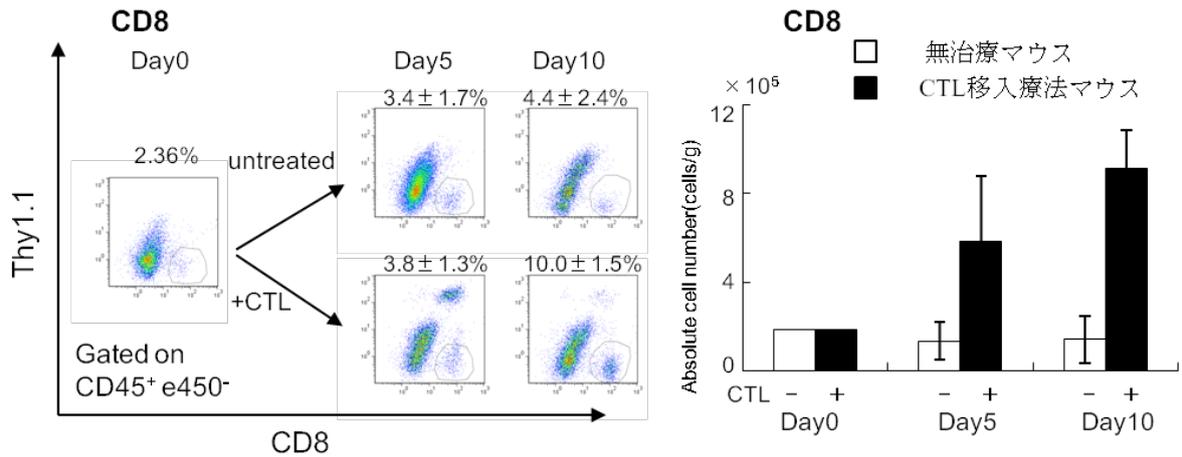


図9 腫瘍内浸潤 CD8⁺細胞の比率と数

無治療マウスおよび CTL 移入療法マウスから投与 0 日目、5 日目、10 日目に腫瘍を摘出し tumor dissociation kit を用いて細胞浮遊液を得た。死細胞を fixable viability dye efluor450 で染色し、次に anti-CD45/PerCP-Cy5.5 抗体、anti-CD90.1/FITC 抗体、anti-CD8/APC-Cy7 抗体で染色した。フローサイトメーターで、CD8⁺CD90.1⁺である CD8 の比率・数を測定した。

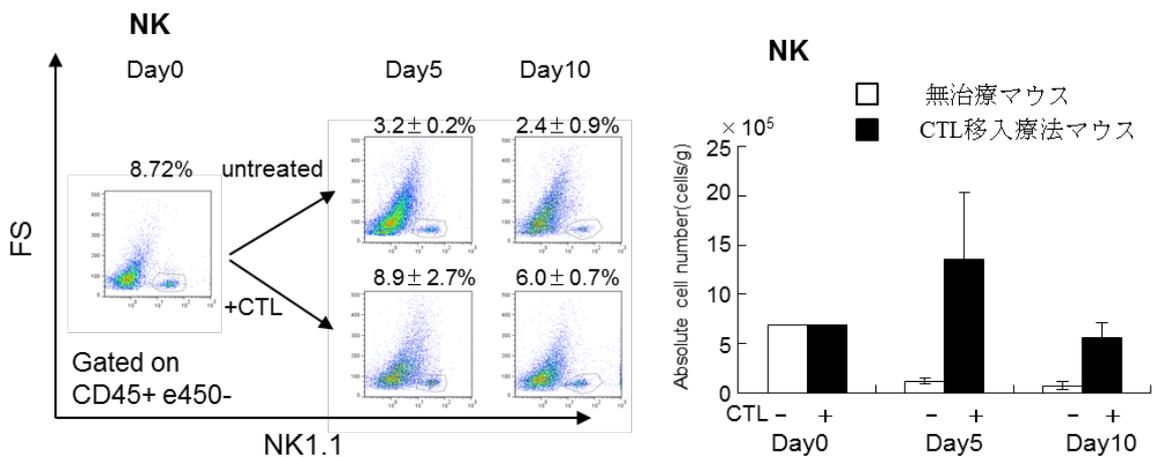


図10 腫瘍内浸潤 NK の比率と数

無治療マウスおよび CTL 移入療法マウスから投与 0 日目、5 日目、10 日目に腫瘍を摘出し tumor dissociation kit で処理し細胞浮遊液を得た。死細胞を fixable viability dye efluor450 で染色し、次に anti-CD45/PerCP-Cy5.5 抗体、anti-NK1.1/APC 抗体で染色した。フローサイトメーターで、CD8⁺NK1.1⁺である NK の比率・数を測定した。

4.腫瘍内 MDSC、M-MDSC の数・比率の変化(追試実験)

先行研究の報告通り [41]、CTL 移入療法に伴い腫瘍内 TIL の大部分を占めているのは CD11b⁺Gr1⁺骨髄由来抑制性細胞 (MDSC)であった。

MDSC の TIL に占める比率は無治療マウスと CTL 移入療法マウスで CTL 投与 5 日目、10 日目いずれでも差を認めなかった。

MDSC の数は、CTL 移入療法当日 4.7×10^6 個であった。無治療マウスでは、CTL 投与 5 日目 ($2.7 \pm 0.29 \times 10^6$ 個)、10 日目 ($2.1 \pm 0.51 \times 10^6$ 個)と数に差を認めなかった。

CTL 移入療法マウスでは、CTL 投与 5 日目は $8.3 \pm 1.7 \times 10^6$ 個と明らかに腫瘍内 MDSC の数が増加していた。CTL 投与 10 日目は $5.9 \pm 0.9 \times 10^6$ 個とやや減少するも無治療マウスに比べれば増加していた(図 11)。

さらに、CD11b⁺Gr1⁺細胞は Gr1 によりさらに CD11b⁺Gr1^{high}Ly6C⁺(granulocytic MDSC)、CD11b⁺Gr1^{int}Ly6C⁺(monocytic MDSC)、CD11b⁺Gr1^{low}Ly6C⁺(TAM)の 3 群に分けることができ、CTL 移入療法により腫瘍内に誘導された MDSC の中でも、特に monocytic MDSC が数多く浸潤していた(図 12)。

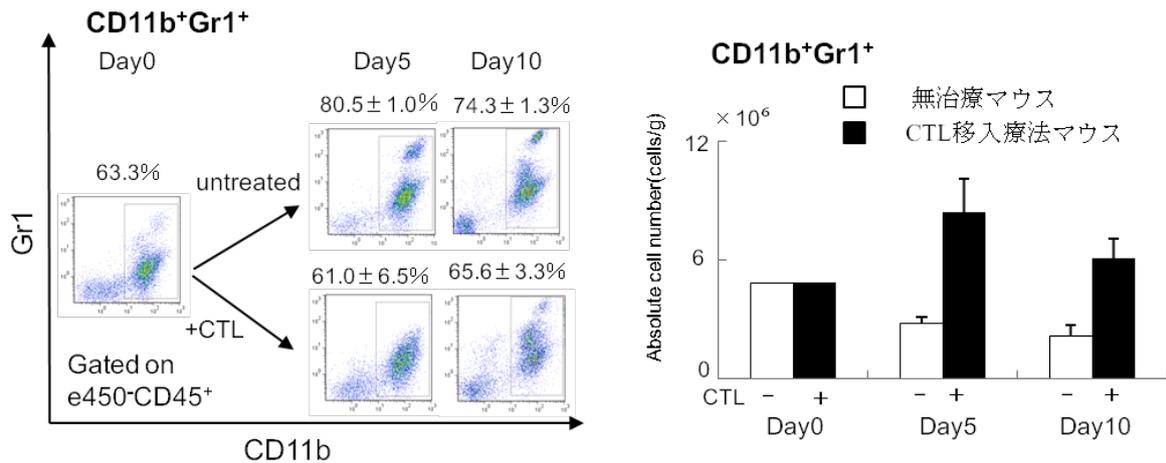


図 11 腫瘍内浸潤 MDSC の比率と数

無治療マウスおよび CTL 移入療法マウスから投与 0 日目、5 日目、10 日目に腫瘍を摘出し tumor dissociation kit を用いて細胞浮遊液を得た。死細胞を fixable viability dye efluor450 で染色し、次に anti-CD45/PerCP-Cy5.5 抗体、anti-CD11b/APC-Cy7 抗体、anti-Gr1/APC 抗体で染色した。フローサイトメーターで、CD11b⁺Gr1⁺である MDSC の比率・数を測定した。

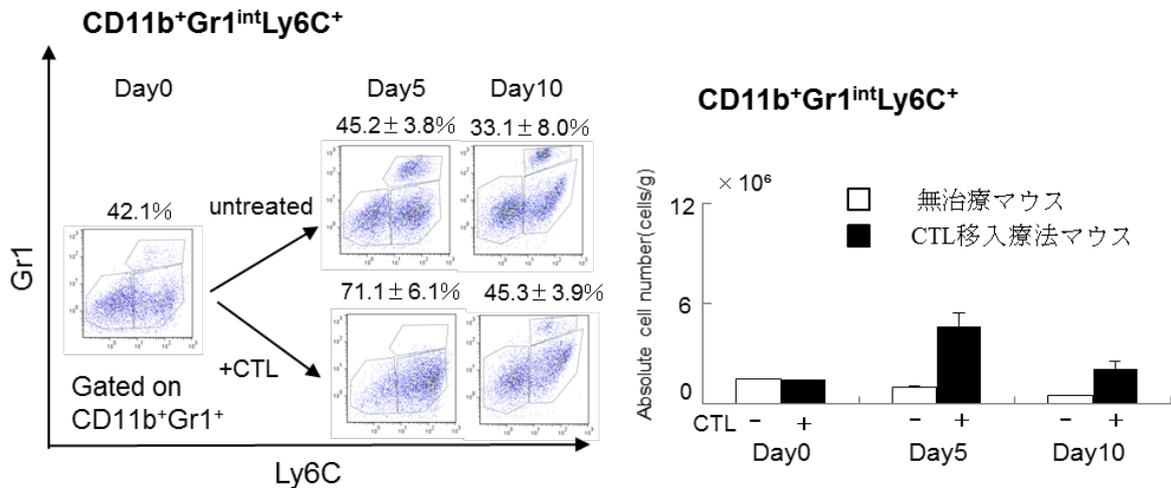


図 12 腫瘍内浸潤 M-MDSC の比率と数

無治療マウスおよび CTL 移入療法マウスから投与 0 日目、5 日目、10 日目に腫瘍を摘出し tumor dissociation kit を用いて細胞浮遊液を得た。死細胞を fixable viability dye efluor450 で染色し、次に anti-CD45/PerCP-Cy5.5 抗体、anti-CD11b/APC-Cy7 抗体、anti-Gr1/APC 抗体、anti-Ly6C/PE-Cy7 抗体で染色した。フローサイトメーターで、CD11b⁺Gr1^{int}Ly6C⁺である M-MDSC の比率・数を測定した。

小括 1

先行研究の報告通り、この CTL 移入療法モデルで、投与された CTL は抗腫瘍効果を発揮するが、その効果は一時的であり、再び腫瘍は増大した。CTL 移入療法が実施されて 3、5 日目は投与された CTL は腫瘍内に浸潤して、腫瘍細胞を認識・反応して IFN- γ を産生して抗腫瘍効果を発揮するが、その後 7 日目以降はその比率・数・エフェクター活性がともに低下していた。CTL が腫瘍内に浸潤すると同時に、腫瘍内には大量のリンパ球が誘導されており、主に MDSC が誘導されていた。MDSC の中でも特に M-MDSC が誘導されていた。そこで、次に CTL 移入療法が実施されたマウス腫瘍内に誘導された MDSC が実際に NO と ROS を産生しているかどうかを細胞レベルで確認する実験を行った。さらに CTL 移入療法が実施されたマウス腫瘍内あるいは、M-MDSC における iNOS や Arg I の分子レベルで発現しているかどうかを定量 RT-PCR で確認する実験を行った。その後 iNOS 阻害剤である L-NMMA や NO 消去剤である C-PTIO を細胞レベルで MDSC に投与することにより CTL に対する抑制機能を解除することが可能かどうかを細胞増殖試験で確認する実験を行った。

5.腫瘍内 MDSC の NO,ROS 産生(蛍光顕微鏡、フローサイトメトリー)

CTL 移入療法 3 日目のマウス腫瘍より EasySep Mouse CD11b Positive Selection

Kits を用いて磁氣的に CD11b⁺細胞を分離した。CD11b⁺細胞からスメアを作成し、風乾し、Diff-quick で染色し、細胞の形態を光学顕微鏡で観察した。典型的な MDSC は、大きな細胞質に偏心性に存在するインゲン豆の形をした核を有していた(図 13A)。

また、CD11b⁺細胞を DAF-FM, CM-H₂DCFDA で染色し、anti-Gr1/Biotin 抗体、anti-CD11b/PE 抗体、Streptavidin-APC 抗体で染色し 蛍光顕微鏡で撮像した。CD11b⁺Gr1⁺である MDSC は NO、ROS である緑色の蛍光を発しており NO、ROS を産生していることが明らかになった。、CD11b⁺Gr1⁻である細胞は、逆に緑の蛍光を発しておらず NO や ROS を産生していないことが明らかになった(図 13B,C)。

また、CD11b⁺Gr1⁺細胞の NO、ROS の緑の蛍光強度をフローサイトメーターで測定すると、NO や ROS を産生していることが明らかになった(図 13D,E)。

これらの結果から、CTL 移入療法を実施されたマウスの腫瘍内に誘導された MDSC は NO や ROS を産生していることが細胞レベルで確認することができた。

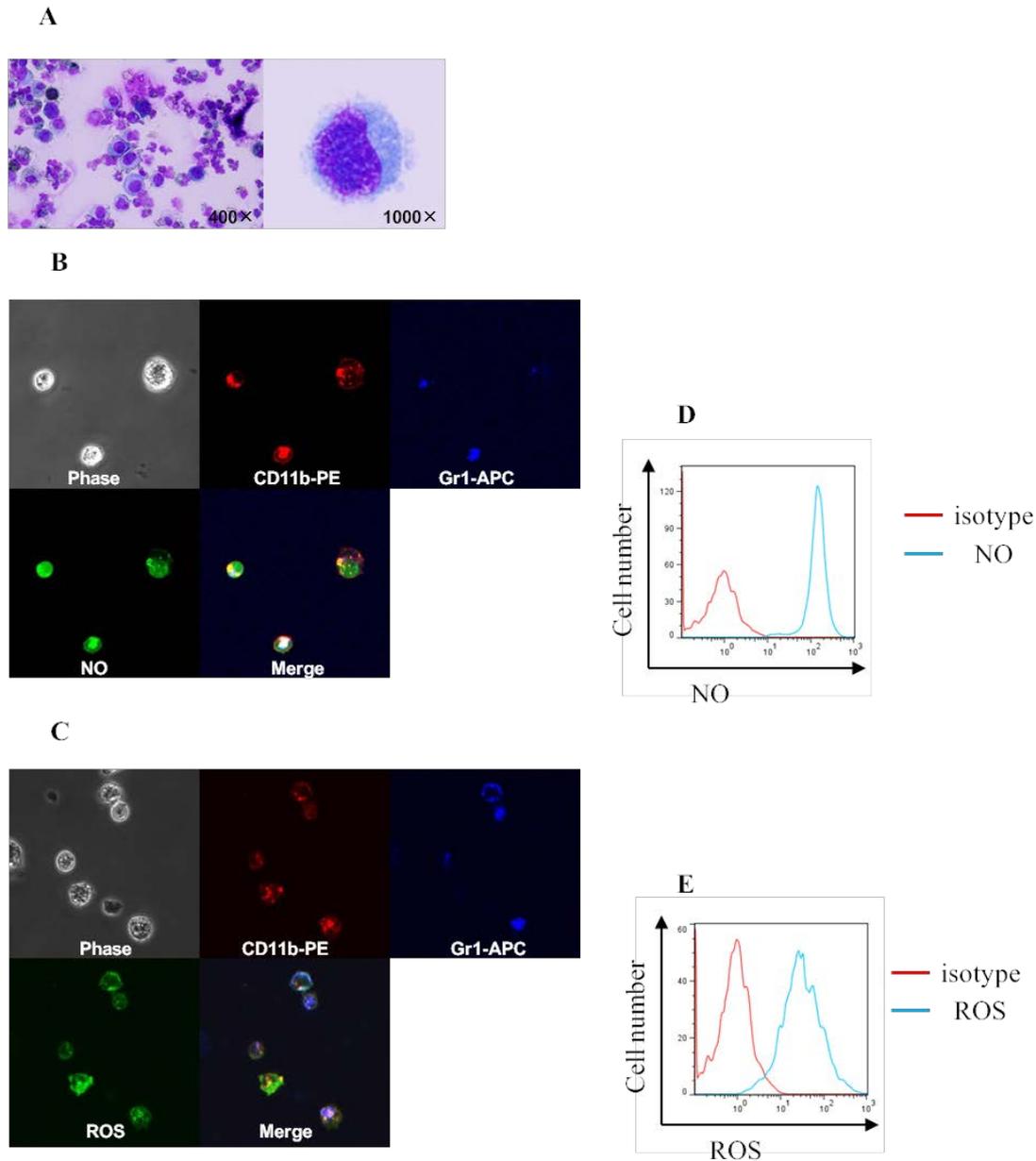


図 13 CD11b⁺細胞の NO、ROS 産生 (蛍光顕微鏡、フローサイトメトリー)

C57BL/6 マウスに B16 メラノーマを接種して 9 日目に CTL を投与した。CTL 投与 3 日目に、マウス腫瘍から CD11b⁺細胞を分離した。A: CD11b⁺細胞を Diff-quick で染色し、形態を光学顕微鏡で撮像した。左: 400 倍、右: 1000 倍。また CD11b⁺細胞を DAF-FM, CM-H₂DCFDA で染色し, anti-Gr1/Biotin 抗体、anti-CD11b/PE 抗体、Streptavidin-APC 抗体で染色し 蛍光顕微鏡で撮像した。フローサイトメーターで NO、ROS の緑色蛍光強度を測定した。

B: CD11b⁺Gr1⁺である MDSC は NO を表す緑色蛍光を発していた。C: CD11b⁺Gr1⁺である MDSC は ROS を表す緑色蛍光を発していた。D: CD11b⁺Gr1⁺MDSC は、NO を産生していた。E: CD11b⁺Gr1⁺MDSC は、ROS を産生していた。

6.腫瘍全体の iNOS、Arginase I 発現および腫瘍内 M-MDSC と腫瘍細胞の iNOS、

Arginase I 発現の比較

無治療マウスおよび CTL 移入療法マウス腫瘍における、CTL 投与 3 日目、5 日目、7 日目の iNOS と Arginase I の発現を定量 RT-PCR で解析した。

CTL 移入療法マウスで明らかに腫瘍全体の iNOS と Arginase I の発現が上昇していた(図 14)。

さらに無治療マウスおよび CTL 移入療法マウスより、CTL 投与 3 日目に腫瘍を摘出し、腫瘍をコラゲナーゼ D と Dnase I で処理し細胞浮遊液を得た。各種表面抗体で染色した後、M-MDSC と CD45⁺ tumor cells を sorting により分離した。各々より RNA を抽出し、cDNA 合成を行い同様に iNOS と Arginase I の発現を定量 RT-PCR で解析した。

CTL 移入療法マウスの M-MDSC は無治療マウスに比較して明らかに iNOS の発現が高まっていた。Arginase I は CTL 投与の有無にかかわらず M-MDSC では発現が高まっていた(図 15)。

以上の結果から、CTL は腫瘍内に浸潤して腫瘍細胞を認識・反応し、IFN- γ を産生し腫瘍を攻撃する。同時に腫瘍内に大量の MDSC が誘導される。MDSC は、iNOS を発現し NO や ROS を産生し CTL を抑制していることが明らかになった。そこで、iNOS 阻害剤 L-NMMA や NO 消去剤 C-PTIO を使用する事で、MDSC の CTL 抑制機能を制御可能かどうか、まずは *in vitro* で検討することとした。

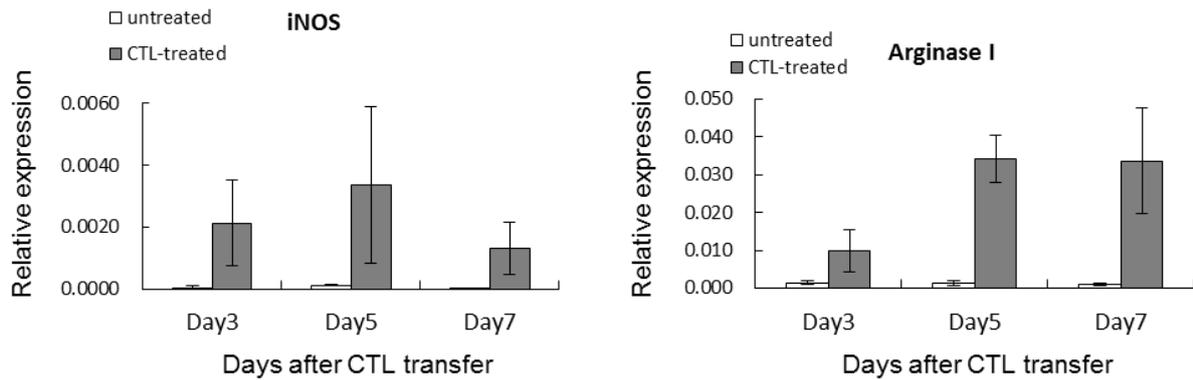


図 14 無治療マウス、CTL 移入療法マウスの腫瘍における iNOS と Arginase I 発現
 無治療マウス及び CTL 移入療法マウスから CTL 投与 3、5、7 日に腫瘍を摘出し、RNA を抽出した。RNA を cDNA に逆転写し、iNOS と Arginase I の発現を定量 RT-PCR で解析した。iNOS は CTL 移入療法マウス腫瘍内で発現していた。Arginase I は CTL 移入療法マウス腫瘍内で発現していた。

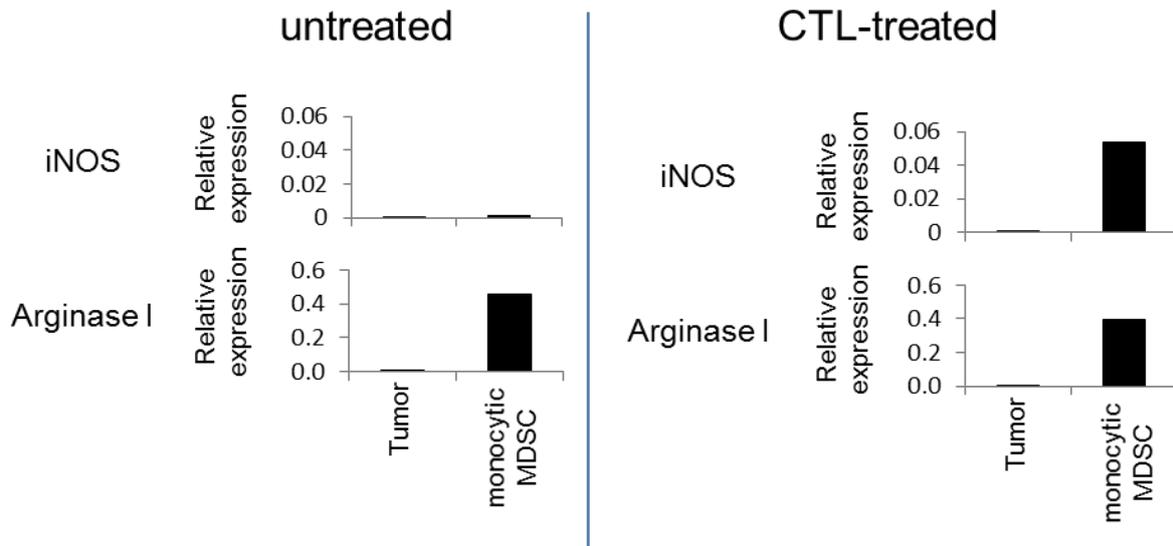


図 15 CD45⁻ tumor cells と M-MDSC の iNOS と Arginase I 発現

無治療マウス及び CTL 移入療法マウスから CTL 投与 3 日目に腫瘍を摘出した。腫瘍組織をコラゲナーゼ D と Dnase I で処理し細胞浮遊液を得た。死細胞を fixable viability dye efluor450 で染色した。次に anti-CD45/FITC 抗体、anti-CD11b/APC-Cy7 抗体、anti-Gr1/APC 抗体、anti-Ly6C/PE-Cy7 抗体で染色し CD45⁻ tumor cells、GR1^{int}Ly6C⁺ monocytic MDSC を sorting により分離した。分離した細胞から RNA を抽出し、cDNA に逆転写後、iNOS と Arginase I の発現を定量 RT-PCR で解析した。腫瘍細胞は、iNOS、Arginase I とともに発現していなかった。CTL 移入療法を行うと、monocytic MDSC で iNOS の発現が高まっていた。Arginase I は CTL 投与の有無にかかわらず発現が高まっていた。

7.細胞増殖試験(In vitro)(図 16)

MDSC を iNOS 阻害剤 L-NMMA および NO 消去剤 carboxy-PTIO で制御可能かどうか *in vitro* の実験で確かめた。

C57BL/6 マウスに B16F10 メラノーマ細胞を接種し、9 日目に CTL を投与した。CTL 投与 3 日目のマウス 12 匹より腫瘍を採取し tumor dissociation kit を用いて、細胞浮遊液を準備した。細胞浮遊液の中から、EasySep Mouse CD11b Positive Selection Kits を用いて磁氣的に CD11b⁺細胞を分離した。

pmel-1 TCRトランスジェニックマウスから脾細胞を採取し、CD8a⁺ T cell Isolation Kit II を用いて磁氣的に CTL を分離した。細胞分裂に応じて蛍光が減弱することから細胞分裂・増殖を評価できる CFSE で CTL を標識した。

図 16 中に表示された比率で CTL と CD11b⁺細胞を、hgp100 ペプチドで刺激した場合と刺激しない場合にわけて培養した。さらに培養液に薬剤を投与しない場合と、carboxy-PTIO あるいは L-NMMA を培養液に投与する場合に分けて培養を行った。

CTL はペプチド刺激がないと増殖しないが、ペプチド刺激により $94.6 \pm 0.4\%$ が分裂した。そこへ 1: 0.3 で CD11b⁺細胞である MDSC とともに CTL を培養すると $38.7 \pm 7.5\%$ と分裂が抑制された。この結果から、CTL 移入療法が実施されたマウス腫瘍内に誘導された MDSC は、CTL の増殖を制御していることが明らかになった。

そこで、iNOS や NO は MDSC で産生される免疫抑制分子と考えられるため、NO 消去剤である carboxy-PTIO および iNOS 阻害剤である L-NMMA を培養液中に投与し

て培養を行ったところ、MDSC の CTL 増殖抑制機能が完全に妨げられ、 $97.6\pm 0.3\%$ あるいは $99.4\pm 0.1\%$ の CTL が MDSC の存在下にも関わらず分裂することができた。この結果から、B16 担癌マウス腫瘍特異的 CTL 移入療法モデルにおいて、NO は MDSC の CTL の抑制に関与していることが示された。さらに、NO を制御することで MDSC の CTL 制御機構を解除して、CTL の増殖能を回復できると考えられた。

そこで、B16メラノーマ担癌 C57BL/6 マウスを用いた腫瘍特異的 CTL 移入療法モデルを用いて、実際に CTL 移入療法に iNOS 阻害剤 L-NMMA および NO 消去剤 carboxy-PTIO を併用することによって、抗腫瘍効果の検討を行った。

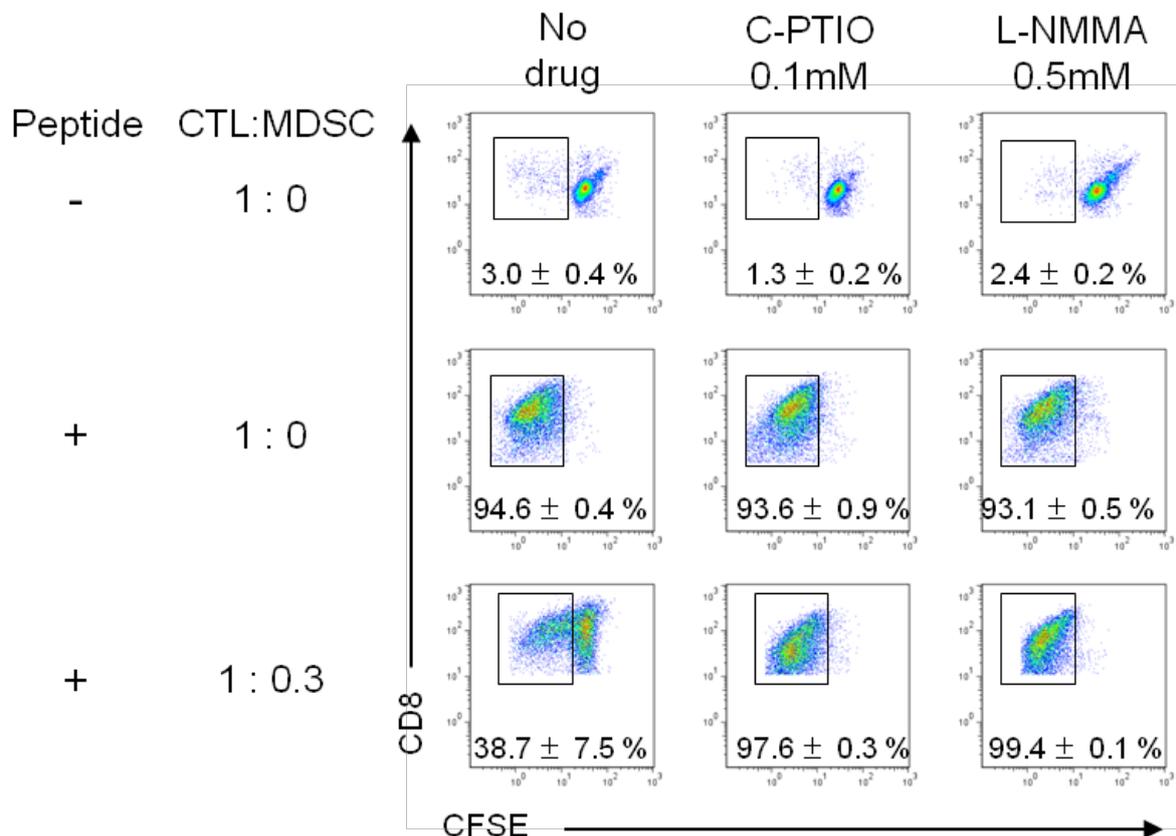


図 16 MDSC は NO 産生を介して腫瘍特異的 CTL の増殖を制御する

C57BL/6 マウスに B16 メラノーマ細胞を接種して 9 日目に CTL を投与した。CTL 投与 3 日目の 12 匹のマウスより tumor dissociation kit を用いて細胞浮遊液を採取した。CD11b⁺細胞を EasySep Mouse CD11b Positive Selection Kits を用いて採取した。細胞分裂・増殖を評価できる CFSE でラベルした pme1-1 CTL を上記の比率で CD11b⁺細胞とともに hgp100 ペプチドを用いて刺激した場合と刺激しない場合にわけて 72 時間培養を行った。さらに、培養液に薬剤を加えない場合と、carboxy-PTIO あるいは L-NMMA を投与する場合にわけて培養を行った。フローサイトメーターを用いて CTL の CFSE 蛍光強度を測定し、CTL の増殖・分裂を解析した。上記フローサイトメーター画像内の数字はゲートされた比率(平均±標準偏差)を示している。

小括 2

CTL 移入療法が実施されたマウス腫瘍内に誘導された MDSC が、細胞レベルで NO と ROS を産生している事が蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーで明らかになった。また、CTL 移入療法が実施されたマウス腫瘍では、免疫抑制性分子である iNOS と Arg I が発現していた。さらに、CTL 移入療法が実施されたマウス腫瘍内の M-MDSC で iNOS と Arg I が発現していた。そこで、iNOS 阻害剤である L-NMMA と NO 消去剤である C-PTIO を MDSC に投与することで CTL に対する抑制機能を解除できることが細胞増殖試験で明らかになった。MDSC は iNOS と NO による経路を用いて CTL を抑制する機能を発揮していることが明らかになった。次に実際の CTL 移入療法モデルに L-NMMA と C-PTIO を併用する事により、CTL の抗腫瘍効果が増強されるかどうかを確かめる実験を行った。

8. CTL 移入療法モデルに各種薬剤併用による抗腫瘍効果の検討

1) L-NMMA 併用による抗腫瘍効果の検討(図 17)

C57BL/6 マウスの右後方背部に B16F10 メラノーマ細胞 1×10^6 個を皮内接種して 9 日目(day0)に 1×10^7 個の CTL 投与を行った。B16 担癌マウスは次の 3 グループに分けた

- ① 無治療群 (n=4)
- ② CTL 移入療法群 (n=4) 1×10^7 個の CTL を投与する。
- ③ CTL/L-NMMA 併用群 (n=4) CTL 投与に加えて day2 から day11 まで連日 L-NMMA2mg を腹腔内に投与する。

各マウスは、2 日毎に腫瘍のサイズを測定し腫瘍増殖曲線を描いた。

CTL 移入療法群と CTL/L-NMMA 併用群の CTL 投与 11 日目の腫瘍体積の平均±標準偏差は、それぞれ $1643 \pm 883 \text{ mm}^3$ 、 $984 \pm 462 \text{ mm}^3$ ($p=0.29$)と L-NMMA 併用のほうが腫瘍体積は小さいが有意差を認めなかった。

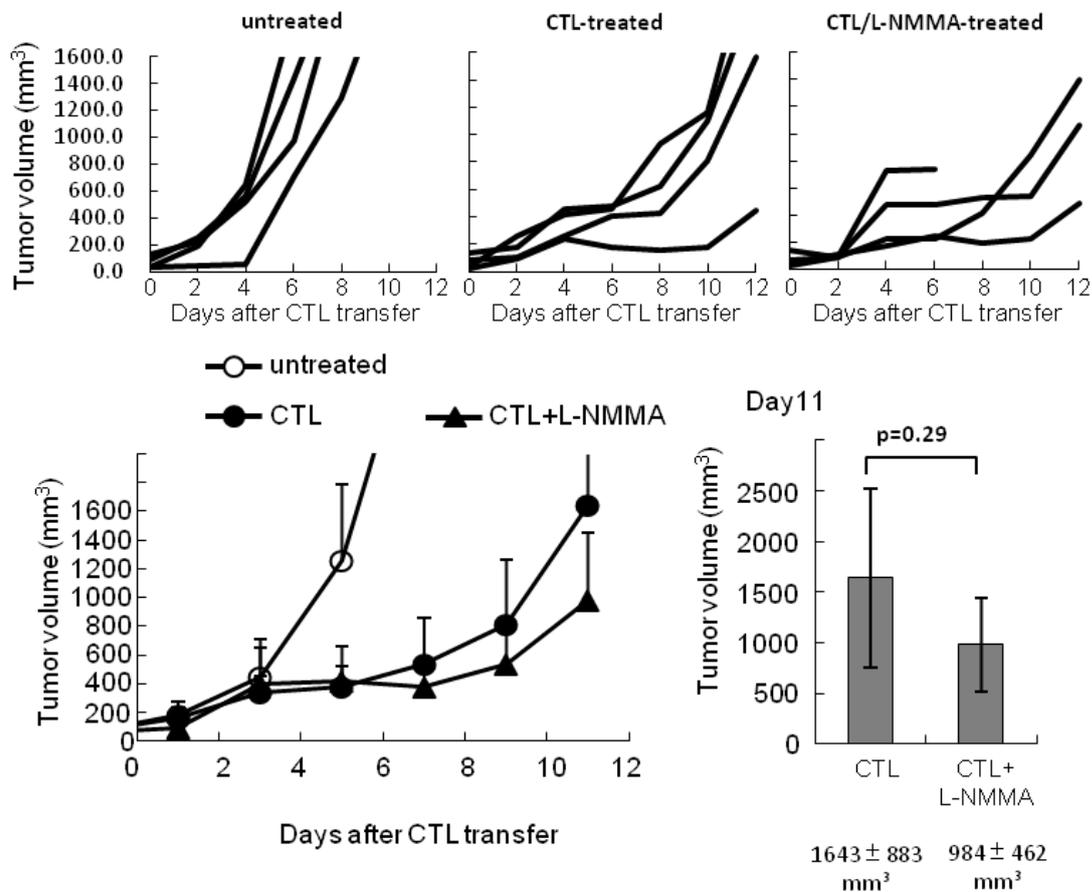


図 17 CTL/L-NMMA 併用治療による抗腫瘍効果

C57BL/6 マウスに 1×10^6 個の B16 メラノーマ細胞を皮内接種した。無治療群(4 匹)、CTL 移入療法群(4 匹)、CTL/L-NMMA 併用群(4 匹)の 3 群に分けた。接種して 9 日目に 1×10^7 個の CTL を投与した。L-NMMA を CTL 投与 2 日目から 11 日目まで毎日 1 日 1 回 2mg/PBS200 μ l 腹腔内投与した。2 日毎に腫瘍の大きさを測定して腫瘍増殖曲線を描いた。

上の段: 左から無治療マウス、CTL 移入療法マウス、CTL/L-NMMA 併用マウスの 1 匹ずつの腫瘍増殖曲線が描かれている。

下の段(左): 各群腫瘍増殖曲線の腫瘍体積の平均±標準偏差を示した。

下の段(右): CTL 移入療法 11 日目の CTL 移入療法マウスおよび CTL/L-NMMA 併用マウスの腫瘍体積の平均±標準偏差を比較した。

2) C-PTIO 併用による抗腫瘍効果の検討(図 18)

B16 担癌 C57BL/6 マウスを次の 4 グループに分けた(各群 5-7 匹)。

- ① 無治療群
- ② C-PTIO 治療群 day1 から day10 まで連日 1 日 2 回 C-PTIO 2mg を腹腔内に投与する
- ③ CTL 移入療法群 1×10^7 個の CTL を投与する
- ④ CTL/C-PTIO 併用群 CTL 投与に加えて②の方法で C-PTIO を併用する

C-PTIO 治療単独では、無治療群と同様に腫瘍増殖の抑制は認められなかった。無治療群と C-PTIO 治療群でそれぞれ腫瘍体積が 600 mm^3 を越える日数が 3.6 ± 1.2 日、 4.2 ± 1.2 日と変わらなかった。CTL 移入療法群は、一時的に腫瘍の増殖が抑制されるが、CTL 移入療法へ C-PTIO を併用すると、さらなる腫瘍の増殖抑制が認められた。腫瘍体積が 600 mm^3 を越える日数は CTL 移入療法群が 9.3 ± 1.3 日、CTL/C-PTIO 併用群が 14.4 ± 2.4 日であった。CTL 投与から 11 日目の CTL 移入療法群の腫瘍体積が $1199 \pm 480 \text{ mm}^3$ 、CTL/C-PTIO 併用群の腫瘍体積はわずか $321 \pm 90 \text{ mm}^3$ であった。これらの結果から、C-PTIO 治療は CTL の抗腫瘍効果を増強していることが示された。

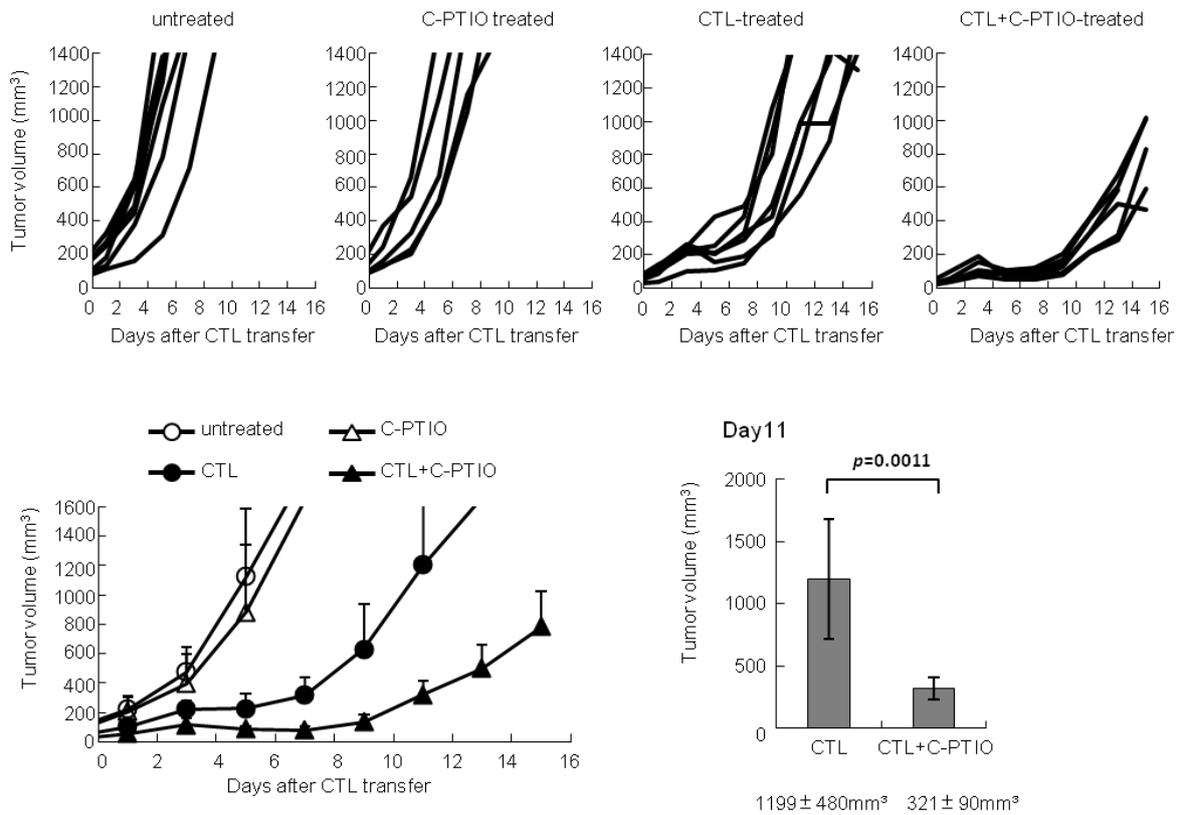


図 18 CTL/C-PTIO 併用治療による抗腫瘍効果

C57BL/6 マウスに 1×10^6 個の B16メラノーマ細胞を皮内接種した。無治療群、C-PTIO 治療群、CTL 移入療法群、CTL/C-PTIO 併用群の 4 群に分けた(各群 5-7 匹)。接種して 9 日目に 1×10^7 個の CTL を投与した。C-PTIO を CTL 投与 1 日目から 10 日目まで毎日 1 日 2 回 2mg/PBS200 μ l 腹腔内投与した。2 日毎に腫瘍の大きさを測定して腫瘍増殖曲線を描いた。

上の段：左から 無治療マウス、C-PTIO 投与マウス、CTL 移入療法マウス、CTL/C-PTIO 併用マウスの 1 匹ずつの腫瘍増殖曲線が描かれている。

下の段(左)：各群腫瘍増殖曲線の腫瘍体積の平均 \pm 標準偏差を示した。

下の段(右)：CTL 移入療法 11 日目の CTL 移入療法マウスおよび CTL/C-PTIO 併用マウスの腫瘍体積の平均 \pm 標準偏差を比較した。

小括 3

CTL 移入療法モデルに、iNOS 阻害剤 L-NMMA を併用したが CTL の抗腫瘍効果は増強しなかった。また、NO 消去剤である C-PTIO を併用すると CTL の抗腫瘍効果が明らかに増強された。そこで、CTL 移入療法マウス腫瘍および CTL/C-PTIO 併用マウス腫瘍を比較し、腫瘍内環境を解析し抗腫瘍効果が増強された原因を明らかにする実験を行った。

9. C-PTIO による腫瘍内 MDSC の NO 産生の制御(図 19)

C-PTIO が MDSC の NO 産生を制御していることを確かめるために、CTL 投与から 3 日目のマウス腫瘍から細胞浮遊液を採取し、 $CD11b^+Gr1^+$ MDSC の NO 産生を DAF-FM 染色の平均蛍光強度(MFI)で評価した。CTL 移入療法マウス MDSC の DAF-FM 染色の MFI は 68.9 ± 11.1 であるのに比べて、CTL/C-PTIO 併用マウスの MDSC では MFI が 43.6 ± 7.8 に減少していた($p=0.03$)。これらの結果から、マウスに投与された C-PTIO は、実際に CTL 移入療法マウス MDSC の NO 産生を制御していることが明らかになった。

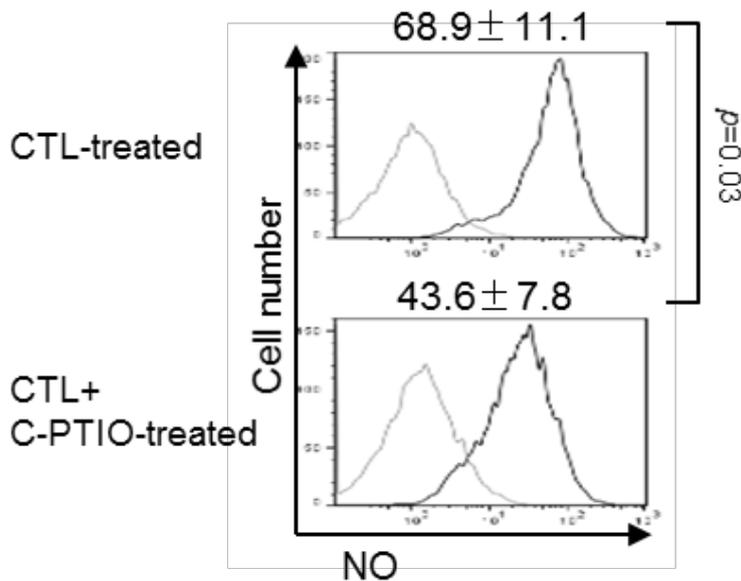


図 19 C-PTIO 投与による腫瘍内 MDSC の NO 産生の制御

C57BL/6 マウスに 1×10^6 個の B16 メラノーマ細胞を接種して 9 日目に 1×10^7 個の CTL を投与した。CTL 移入療法群と、CTL 移入療法に C-PTIO を、CTL 投与 1 日目、2 日目に 2mg ずつ 1 日 2 回腹腔内投与した群をそれぞれ、3 匹ずつ CTL 投与 3 日目に腫瘍から細胞浮遊液を採取して $CD11b^+Gr1^+$ 細胞である MDSC の NO 産生をフローサイトメーターで測定し CTL 治療群と CTL/C-PTIO 併用群で比較した。

灰色線: isotype、黒線: NO

10. 腫瘍内 CTL に対する C-PTIO の作用

C57BL/6 マウスに B16F10 メラノーマ細胞を接種し 9 日目に CTL を投与した。CTL 移入療法マウスと CTL/C-PTIO 併用マウスで、CTL 投与 3 日目と 7 日目にマウスを犠牲死させて腫瘍から細胞浮遊液を準備し、フローサイトメーターで測定した。

1) 腫瘍内 CTL 比率・数の変化(図 20A)

CTL の比率は C-PTIO 投与の有無に関わらず、CTL 投与 3 日目、7 日目いずれでも差を認めなかった。しかし、CTL の数は、投与 3 日目は差を認めないが、7 日目は C-PTIO 併用群のほうが多かった。

2) 腫瘍内 CTL の増殖能の変化(図 20B)

CTL の増殖能力を調べるために、CTL 投与 3 日目、7 日目に犠牲死させる 16 時間前に 2mg の BrdU をマウス腹腔内に投与した。

CTL 投与 3 日目、7 日目の腫瘍内 CTL の BrdU 取り込み率の比較

CTL 投与 3 日目、CTL 移入療法マウスの腫瘍内 CTL の $3.1 \pm 1.3\%$ に BrdU が取り込まれていた。CTL 投与 3 日目、CTL/C-PTIO 併用マウスの腫瘍内 CTL の $12.2 \pm 6.5\%$ に BrdU が取り込まれていた。 $p=0.07$ と有意差はないが、C-PTIO を併用すると、腫瘍内 CTL の増殖能力が高まると考えられた。

CTL 投与 7 日目、CTL 移入療法マウスと CTL/C-PTIO 併用マウスで腫瘍内 CTL の BrdU 取り込み率に差を認めなかった。

CTL 投与 3 日目、7 日目の所属リンパ節浸潤 CTL の BrdU 取り込み率の比較

CTL 投与 3 日目、CTL 移入療法マウスの所属リンパ節浸潤 CTL の $13.7 \pm 6.1\%$ に BrdU が取り込まれていた。CTL 投与 3 日目、CTL/C-PTIO 併用マウスの所属リンパ節浸潤 CTL の $27.4 \pm 5.0\%$ に BrdU が取り込まれていた。C-PTIO を併用すると、所属リンパ節浸潤 CTL の増殖能力が高まっていると考えられた。

CTL 投与 7 日目、CTL 移入療法マウスと CTL/C-PTIO 併用マウスで所属リンパ節浸潤 CTL の BrdU 取り込み率に差を認めなかった。

以上より、C-PTIO は MDSC の NO 産生を制御することにより、マウス体内に投与された CTL の増殖能力を増加させていると考えられた。

3)腫瘍内 CTL エフェクター活性(IFN- γ)の変化(図 20C,D)

C-PTIO による CTL のエフェクター活性の変化を調べるため CTL 投与 3 日目、7 日目の腫瘍内 CTL の IFN- γ 陽性率を調べた。

ペプチド刺激をしない CTL の IFN- γ 陽性率は生体内で腫瘍を認識・反応し IFN- γ を産生する能力を示す。一方、ペプチド刺激をした CTL の IFN- γ 陽性率は、潜在的な IFN- γ 産生能力を示している。

CTL 投与 3 日目、7 日目の CTL 移入療法マウスと CTL/C-PTIO 併用マウスの CTL の IFN- γ 陽性率の比較

CTL 投与 3 日目、ペプチド 刺激しない場合の腫瘍内 CTL の IFN- γ 陽性率は CTL 移入療法マウスが $25.2 \pm 3.4\%$ 、CTL/C-PTIO 併用マウスが $21.4 \pm 4.0\%$ と 差を認めなかった。

ペプチド 刺激した場合の腫瘍内 CTL の IFN- γ 陽性率は、CTL 移入療法マウスが $74.2 \pm 3.6\%$ 、CTL/C-PTIO 併用マウスが $75.7 \pm 2.6\%$ と 差を認めなかった。

CTL 投与 7 日目、CTL 移入療法マウスのペプチド 刺激しない場合とした場合の腫瘍内 CTL の IFN- γ 陽性率はそれぞれ $5.4 \pm 1.4\%$ 、 $50.4 \pm 10.4\%$ であった。CTL 投与 3 日目の CTL 移入療法マウスの腫瘍内 CTL の IFN- γ 陽性率より低下していた。

CTL 投与 7 日目、CTL/C-PTIO 併用マウスのペプチド 刺激しない場合とペプチド 刺激した場合の腫瘍内 CTL の IFN- γ 陽性率はそれぞれ $6.6 \pm 1.5\%$ 、 $67.8 \pm 10.6\%$ であった。CTL 投与 3 日目の CTL/C-PTIO 併用マウスの腫瘍内 CTL の IFN- γ 陽性率より低下していた。

CTL 投与 7 日目の腫瘍内 CTL の IFN- γ 陽性率は、CTL/C-PTIO 併用マウスのほうが CTL 移入療法マウスに比べて高いことが分かった。

CTL 投与 3 日目、7 日目の CTL 移入療法マウスと CTL/C-PTIO 併用マウスの腫瘍内 CTL の IFN- γ 陽性細胞数の比較

CTL 投与 3 日目、ペプチド 刺激しない場合と刺激した場合の腫瘍内 IFN- γ 陽性 CTL

の数は C-PTIO の有無に関わらず差を認めなかった。

CTL 投与 7 日目、CTL/C-PTIO 併用マウスのほうがペプチド 刺激しない場合もした
場合も、より多くの IFN- γ 陽性 CTL を認めた。

これらの結果から、IFN- γ を産生する CTL の能力は、CTL 移入療法マウスでは CTL
投与 3 日目から 7 日目にかけて減弱していた。しかし、C-PTIO を投与して NO を除
去することで CTL/C-PTIO 併用マウスのほうが、より IFN- γ を産生する CTL の能力が
維持されていることが明らかになった。

4)腫瘍内 CTL エフェクター活性(CD107a)の変化(図 20E,F)

CTL の細胞障害活性を CD107a 表面化アッセイで解析した。

CTL 投与 3 日目、CTL 移入療法マウスも C-PTIO/CTL 併用マウスも CD107a 陽性
CTL の比率に差を認めなかった。

CTL 投与 7 日目、C-PTIO/CTL 併用マウスのほうが CD107a 陽性 CTL の比率は CTL
移入療法マウスよりも高かった。同様に CTL 投与 7 日目の CD107a 陽性 CTL の数は
C-PTIO/CTL 併用マウスのほうが多かった。

3)と 4)の結果から、NO 消去剤である C-PTIO は、腫瘍内で MDSC の免疫抑制作用に
より制御されてしまう、CTL のエフェクター活性を維持させることが明らかになっ
た。

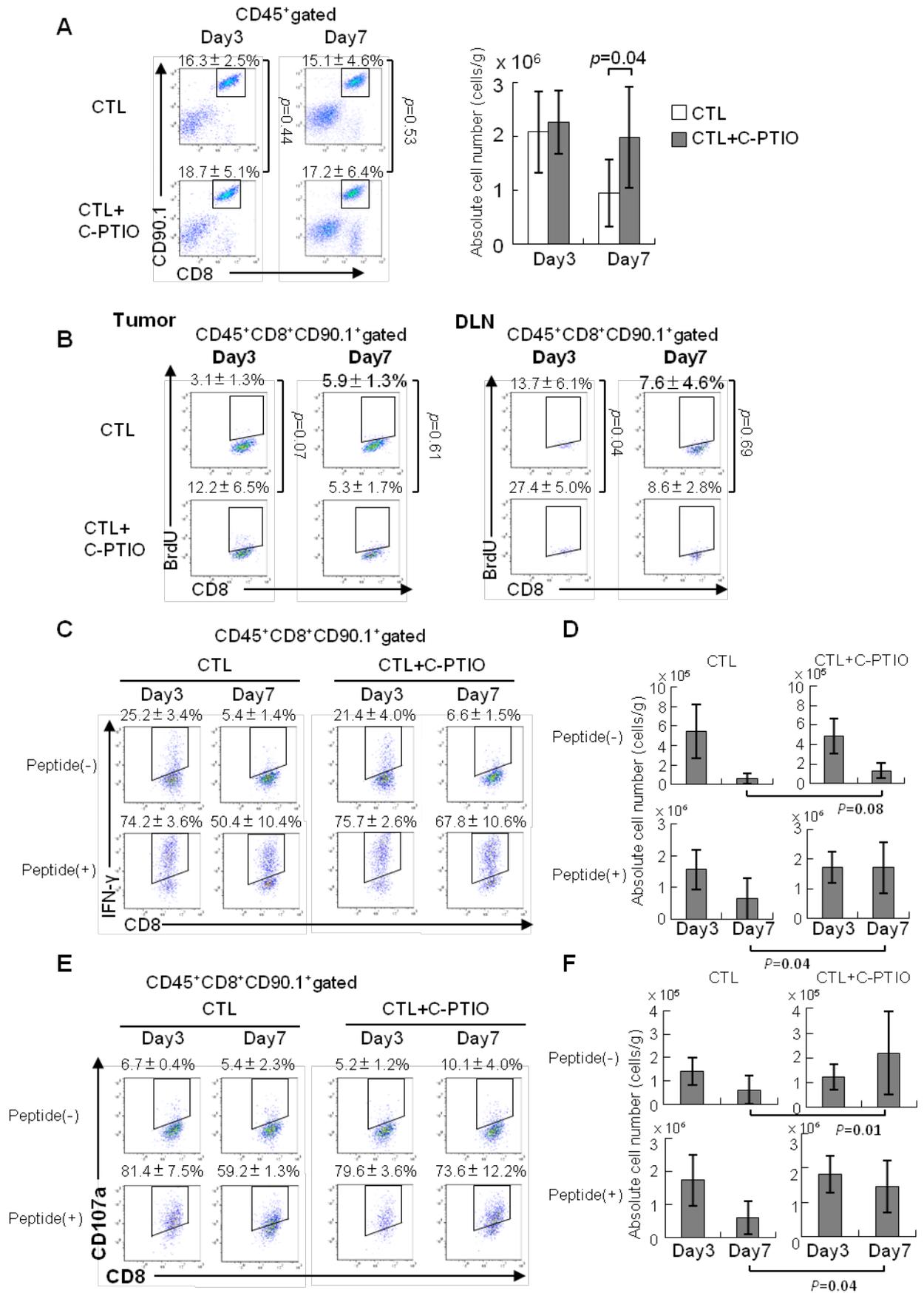


図 20 NO 消去剤である C-PTIO は CTL の機能を維持させた

C57BL/6 マウスに B16 メラノーマ細胞を接種して 9 日目に CTL を投与した。図 16 の説明通りに C-PTIO を投与した。CTL 投与 3 日目、7 日目に CTL 移入療法マウスおよび CTL/C-PTIO 併用マウス腫瘍より細胞浮遊液を採取した。A 左:腫瘍内 CTL の比率をフローサイトメーターで測定した。A 右:腫瘍内 CTL の数を計算した。B:方法で記載した通り、CTL 投与 3 日目と 7 日目の腫瘍内 CTL および所属リンパ節内 CTL の BrdU 取り込み率をフローサイトメーターで測定した。C,D:CTL 投与 3 日目 7 日目のペプチド刺激した場合と刺激しない場合の腫瘍内 CTL の IFN- γ 産生率および IFN- γ 陽性 CTL の数をフローサイトメーターで測定した。E,F:CTL 投与 3 日目 7 日目のペプチド刺激した場合と刺激しない場合の腫瘍内 CTL の CD107a 陽性率および CD107a 陽性 CTL の数をフローサイトメーターで測定した。

11. 腫瘍内 effector molecules および immunosuppressive molecules 発現の検討(図 21)

NO 消去剤である C-PTIO は、CTL のエフェクター活性を回復させることを細胞レベルで確認できたが、さらに分子レベルで評価した。

CTL 投与 3 日目、7 日目の CTL 移入療法マウスあるいは C-PTIO/CTL 併用マウスの腫瘍から抽出した mRNA を用いて定量 RT-PCR を行った。エフェクター分子として IFN- γ 、Perforin、granzyme B、FasL そして免疫抑制分子として iNOS、arginase I、NOX2、MMP9、VEGF の mRNA を CTL 投与 3 日目、7 日目で比較した。

CTL 移入療法マウスでは、CTL 投与 3 日目から 7 日目にかけて IFN- γ 、perforin、granzyme B、FasL の発現は低下していた。CTL/C-PTIO 併用マウスでは CTL 投与 3 日目から 7 日目にかけて IFN- γ 、perforin、granzyme B、FasL の発現は、同じかあるいは増加していた。

これらの結果から、免疫抑制分子の発現により CTL の機能は腫瘍内では減弱するが、NO 消去剤である C-PTIO の投与により、CTL の抗腫瘍活性は維持されることが分子レベルでも明らかになった。

反して、免疫抑制分子である iNOS、Arginase I、NOX2、MMP9、VEGF の mRNA 発現は CTL 投与 3 日目、7 日目で CTL 移入療法マウスと CTL/C-PTIO 併用マウスで差を認めなかった。これは C-PTIO は他の因子に影響を与えずに、直接 NO の免疫抑制作用を制御して CTL の抗腫瘍作用を回復させたものと考えられた。

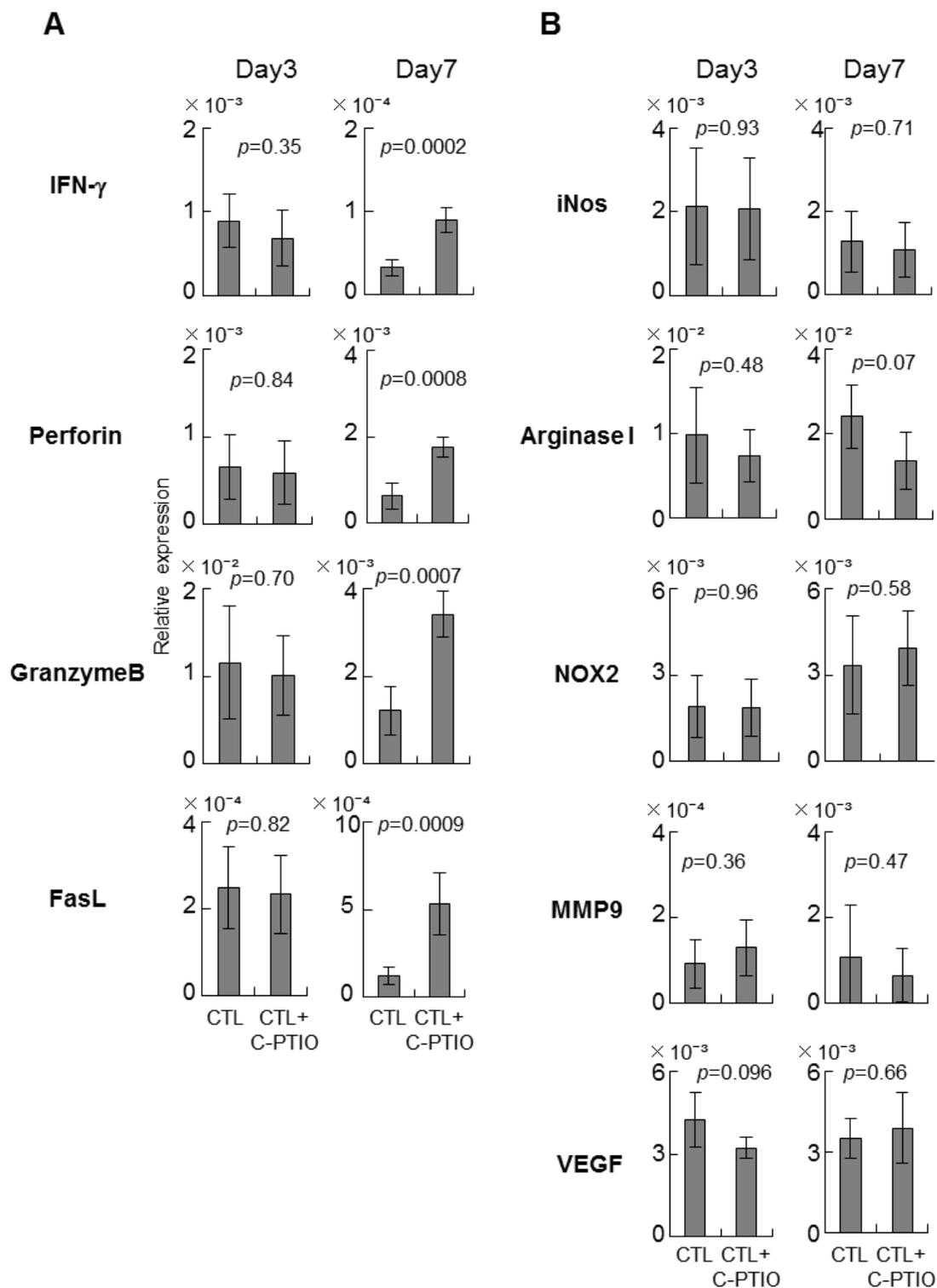


図 21 エフェクター分子と免疫抑制分子にかかわる遺伝子の発現

C57BL/6 マウスに B16 メラノーマ細胞を接種して 9 日目に CTL を投与した。図 16 の説明通りに C-PTIO を投与した。CTL 投与 3 日目、7 日目に CTL 移入療法マウスおよび CTL/C-PTIO 併用マウス腫瘍より細胞浮遊液を採取し mRNA を抽出し、定量 RT-PCR を行った。

抄括 4

CTL 移入療法に NO 消去剤である C-PTIO を併用することにより、CTL 投与 3 日目の腫瘍所属リンパ節内 CTL の増殖能力が増強した。その結果、CTL 投与 7 日目 C-PTIO 併用マウス腫瘍内における CTL の数が CTL 移入療法マウス腫瘍内の CTL の数に比べて維持されていた。また、C-PTIO 併用により CTL のエフェクター活性も維持されていた。以上の結果より CTL 移入療法モデルで C-PTIO 併用により抗腫瘍効果が増強したと考えられた。しかしながら、それでもその抗腫瘍効果は一時的であり再び腫瘍が増大した。腫瘍内で形成された免疫抑制性環境を評価するため、腫瘍内に浸潤した CTL の経時的な正負の共刺激分子の発現を検討する実験を行った。

12. 腫瘍内 CTL の経時的な正・負の共刺激分子の検討(図 22)

CTL を投与したマウスから CTL 投与 3 日目、5 日目、7 日目、10 日目、14 日目に腫瘍を摘出し、tumor dissociation kit を用いて細胞浮遊液を得た。CD45 陰性細胞と浸潤リンパ球(CD45 陽性) に分けてその共刺激分子を解析するために、死細胞を fixable viability dye efluor450 で染色し、anti-CD45/PerCP-Cy5.5 抗体、anti-CD90.1/Alexa647 抗体、anti-CD8/APC-Cy7 抗体、anti-CD69/FITC 抗体、anti-4-1BB/PE 抗体、anti-PD-1/PE 抗体、anti-Tim3/PE 抗体、anti-CTLA4/PE 抗体で染色した。フローサイトメーターで経時的な CTL の比率と、CTL 表面に発現する CD69、4-1BB、PD-1、Tim3、CTLA4 を解析した。

正の共刺激分子である 4-1BB は CTL 投与 3 日目にピークとなった。また負の共刺激分子である PD-1 は CTL 投与 5 日目から発現し、以後も発現が維持されていた。PD-1/PD-L1 経路をさらに検討する事とした。

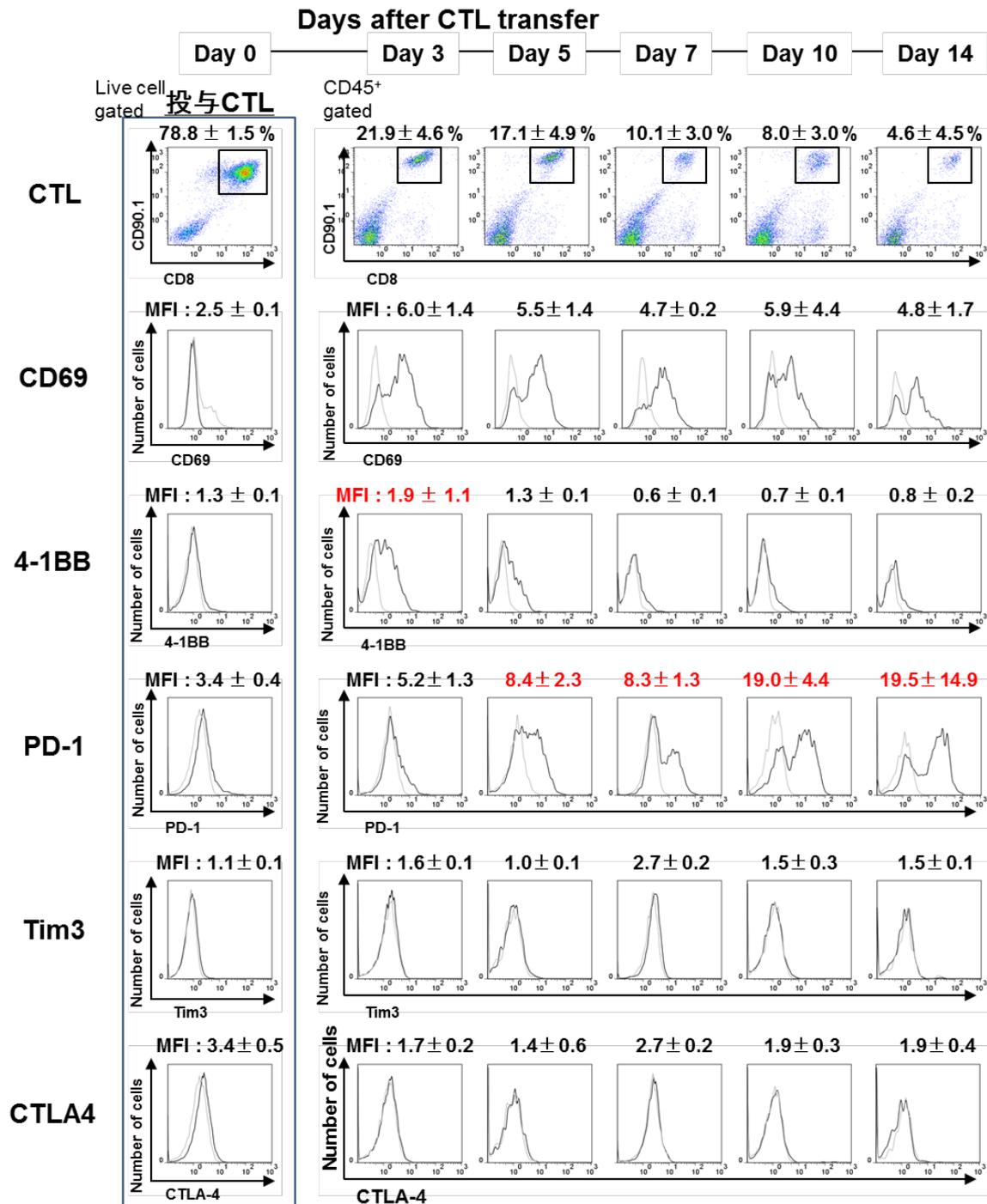


図 22 CTL の正・負の共刺激分子

CTLを投与したマウスから投与3日目、5日目、7日目、10日目、14日目に腫瘍を摘出し、tumor dissociation kitを用いて細胞浮遊液を得た。死細胞を fixable viability dye efluor450 で染色し、anti-CD45/PerCP-Cy5.5 抗体、anti-CD90.1/Alexa647 抗体、anti-CD8/APC-Cy7 抗体、anti-CD69/FITC 抗体、anti-4-1BB/PE 抗体、anti-PD-1/PE 抗体、anti-Tim3/PE 抗体、anti-CTLA4/PE 抗体で染色した。フローサイトメーターで、経時的な CTL の比率と、CTL に発現する CD69、4-1BB、PD-1、Tim3、CTLA4 の発現を解析した。灰色線： isotype、黒線：各共刺激分子

13. 腫瘍内 CD45⁺細胞の PD-L1 発現の検討

CTL 表面に PD-1 の発現を認めたため、リガンドである PD-L1 の発現を腫瘍内 CD45⁺細胞で検討した。CD45⁺細胞は、腫瘍細胞と間質細胞である線維芽細胞や血管内皮細胞や炎症細胞などが含まれていると考えられる。

無治療マウス及び CTL 移入療法マウスから、CTL 投与 0 日目、5 日目、10 日目に腫瘍を摘出した。腫瘍を tumor dissociation kit を用いて細胞浮遊液を得た。死細胞を fixable viability dye efluor450 で染色し、次に anti-CD45/APC-Cy7 抗体、anti-PD-L1/PE 抗体で染色し、腫瘍内 CD45⁺細胞と培養 B16 メラノーマ細胞の PD-L1 発現をフローサイトメーターで測定した(図 23)。

培養中の B16 メラノーマには PD-L1 を発現しておらず、C57BL/6 マウスに B16 メラノーマを接種して 9 日目の無治療腫瘍内 CD45⁺細胞は、わずかに PD-L1 を発現していた。その後も無治療マウスの細胞は、CTL 投与 5 日目も 10 日目も PD-L1 をわずかに発現していた。

CTL 移入療法マウスの腫瘍内 CD45⁺細胞では、CTL 投与 5 日目 PD-L1 の発現が顕著に高まっていた。CTL 投与 10 日目、PD-L1 の発現は現弱していたが、無治療マウスに比べれば発現は高かった。

CTL が腫瘍内に浸潤し腫瘍細胞を認識・反応し IFN- γ を産生し腫瘍を攻撃する。CTL 投与 5 日目、腫瘍細胞は CTL の攻撃から逃避するために PD-L1 を最大限に発現し CTL に発現する PD-1 と相互作用して CTL を制御しようと試みていることが考えられた。

CTL 投与 10 日目、CTL の数が減少し、エフェクター活性も低下するため腫瘍への攻撃は弱まる。そのため、腫瘍細胞の PD-L1 発現が現弱していたものと考えられた。

また、無治療マウス及び CTL 移入療法マウスから CTL 投与 5 日目に腫瘍を摘出し、PI(青)、抗 PD-L1 抗体(緑)、抗 CD90.1 抗体(赤) で免疫組織染色を行った(図 24)。CTL 投与マウスの腫瘍内では CTL の浸潤とともに周囲の腫瘍(腫瘍細胞およびがん間質細胞)の PD-L1 が著明に発現していた。反して、無治療群マウスの腫瘍では全く PD-L1 の発現を認めなかった。

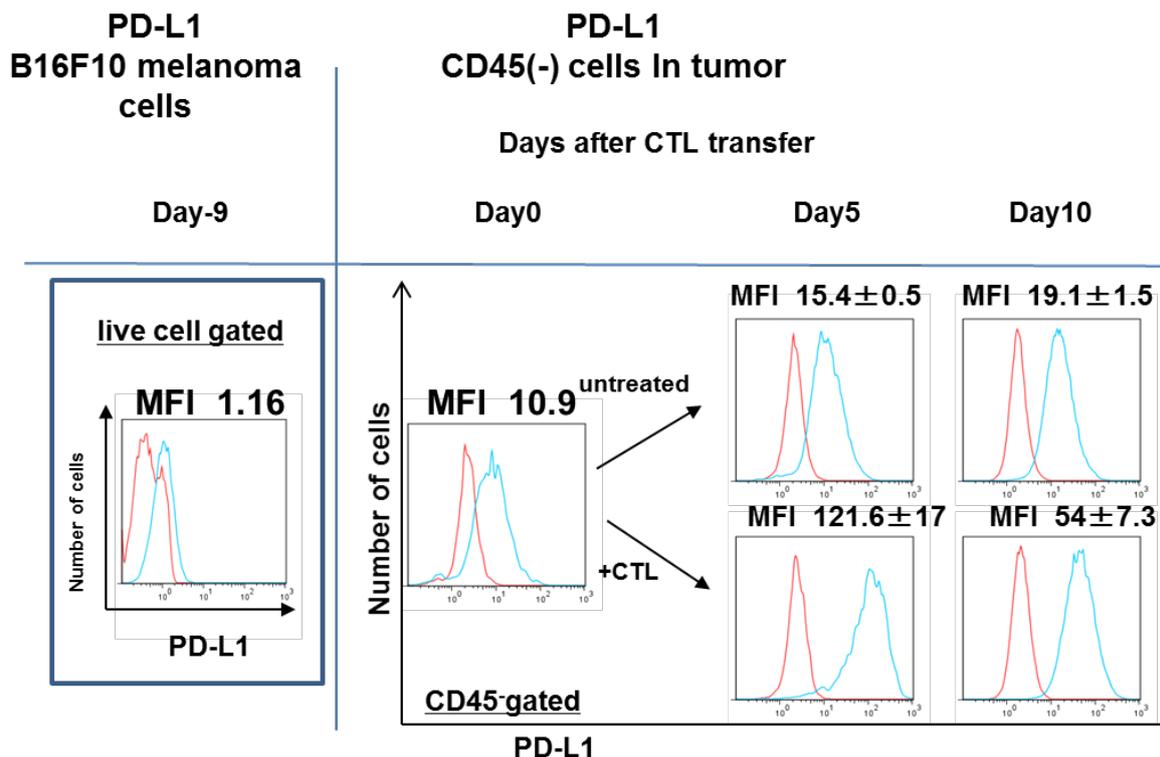


図 23 腫瘍内 CD45⁻細胞の PD-L1 発現

無治療マウス及び CTL 移入療法マウスから、CTL 投与 0 日目、5 日目、10 日目に腫瘍を摘出した。腫瘍を tumor dissociation kit を用いて細胞浮遊液を得た。死細胞を fixable viability dye efluor450 で染色し、次に anti-CD45/APC-Cy7 抗体、anti-PD-L1/PE 抗体で染色した。腫瘍内 CD45⁻細胞と培養中 B16 メラノーマ細胞の PD-L1 発現をフローサイトメーターで測定した。赤線： isotype、水色線： PD-L1

CTL投与5日目の腫瘍免疫組織染色

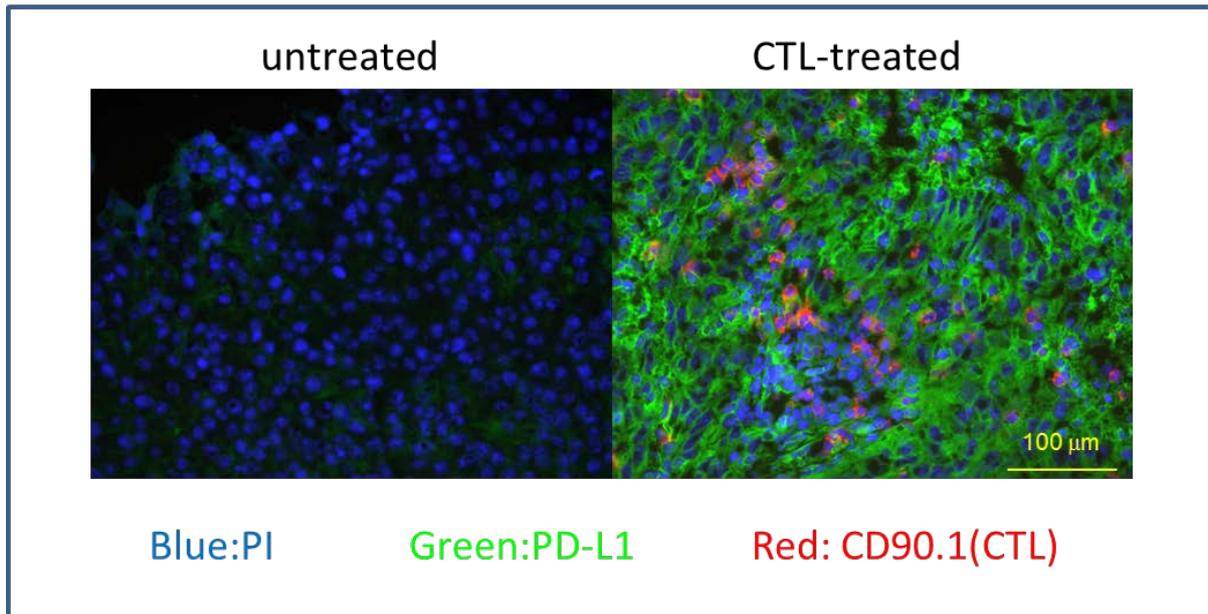


図 24 無治療及び CTL を投与したマウスから投与 5 日後に腫瘍を摘出し、PI (青)、抗 PD-L1 抗体 (緑)、抗 CD90.1 抗体 (赤) で免疫組織染色を行った。CTL 移入療法マウスでは、CTL が腫瘍内に浸潤して周囲の腫瘍細胞と間質細胞で PD-L1 が顕著発現していた。無治療マウスでは、腫瘍細胞と間質細胞で PD-L1 はほとんど発現していなかった。

14. 腫瘍内 MDSC の PD-L1,PD-L2 発現の検討(図 25)

CTL 移入療法により、腫瘍内に CTL が浸潤すると MDSC が誘導される。MDSC 表面の PD-L1 あるいは PD-L2 発現の検討を行った。

無治療マウス及び CTL 移入療法マウスから CTL 投与 0 日目、5 日目、10 日目に腫瘍を摘出し、tumor dissociation kit を用いて細胞浮遊液を得た。死細胞を fixable viability dye efluor450 で染色し、次に anti-CD45/FITC 抗体、anti-PD-L1/PE 抗体、anti-PD-L2/PE 抗体、anti-CD11b/APC-Cy7 抗体、anti-Gr1/APC 抗体、anti-Ly6C/PE-Cy7 抗体で染色しフローサイトメーターで測定した。

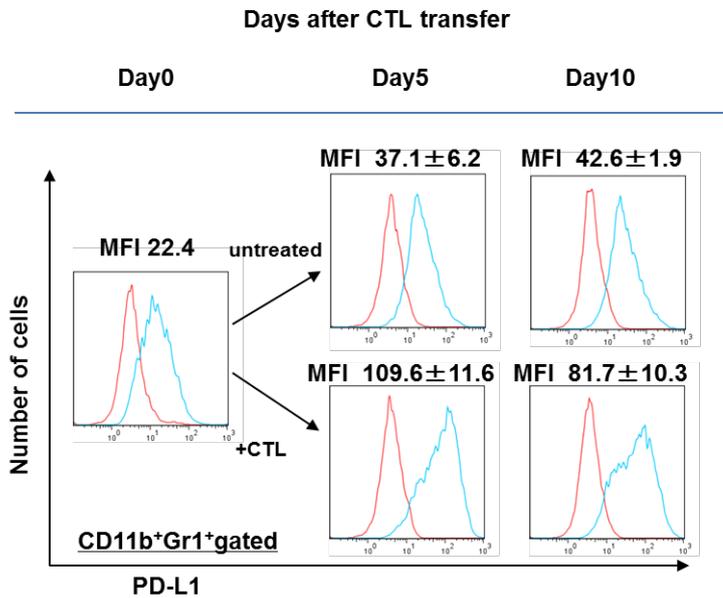
C57BL/6 マウスに B16 メラノーマを接種して 9 日目のマウスの腫瘍内に浸潤している MDSC は、わずかに PD-L1 を発現していた。その後も CTL 投与 5 日目、10 日目、無治療マウスの腫瘍内 MDSC はわずかに PD-L1 を発現していた。

CTL 投与 5 日目、CTL 移入療法マウスの腫瘍内に浸潤した MDSC では明らかに PD-L1 の発現が高まっていた。CTL 投与 10 日目も PD-L1 の発現は高まっていた。PD-L2 は、無治療マウス、CTL 移入療法マウスいずれでも発現を認めなかった。

CTL 移入療法に C-PTIO を併用することで CTL の抗腫瘍効果の増強を認めたが、やはり腫瘍の再増大という問題があった。これまでの実験結果から PD-1/PD-L1 経路が、CTL を制御する免疫抑制機構の 1 因子と考えられたため、C-PTIO 投与に加えて抗マウス PD-1 抗体も併用することとした。

A

**PD-L1
MDSC in tumor**



B

**PD-L2
MDSC in tumor**

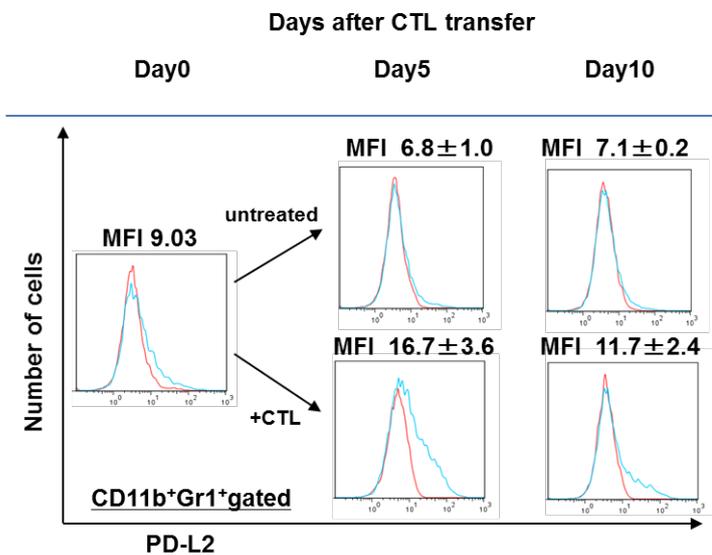


図 25 MDSC の PD-L1/PD-L2 発現

無治療マウス及び CTL 移入療法マウスから CTL 投与 0 日目、5 日目、10 日目に腫瘍を摘出し、tumor dissociation kit を用いて細胞浮遊液を得た。死細胞を fixable viability dye efluor450 で染色し、次に anti-CD45/FITC 抗体、anti-PD-L1/PE 抗体、anti-PD-L2/PE 抗体、anti-CD11b/APC-Cy7 抗体、anti-Gr1/APC 抗体、anti-Ly6C/PE-Cy7 抗体で染色しフローサイトメーターで測定した。(A)MDSC の PD-L1 発現。(B)MDSC の PD-L2 発現。赤線: isotype、水色線: PD-L1 あるいは PD-L2

抄括 5

この CTL 移入療法モデルでは、先行研究で報告された腫瘍内への MDSC の誘導による免疫抑制機構以外に、腫瘍内に浸潤した CTL に負の共刺激分子である PD-1 が発現し、PD-1 のリガンドである PD-L1 が腫瘍細胞および MDSC に発現していることが明らかになりあらたに免疫抑制機構として PD-1/PD-L1 経路があらたに形成されていることが明らかになった。そこで、この Adaptive resistance としてあらたに形成された PD-1/PD-L1 経路を解除するため CTL 移入療法に抗マウス PD1 抗体を併用する実験を行った。

15. CTL 移入療法モデルに各種薬剤併用による抗腫瘍効果の検討

3) 抗マウス PD-1 抗体と C-PTIO の併用による抗腫瘍効果の検討(図 26)

B16 担癌マウスを次の 4 群に分けた(各群 5 匹)。

(1) 無治療群

(2) CTL 治療群 1×10^7 個の CTL を投与する

(3) CTL/a-mPD1 mAb 併用群 1×10^7 個の CTL を投与する。a-mPD1 mAb 100 μ g を CTL 投与 1 日目、4 日目、7 日目、10 日目に腹腔内へ投与した。

(4) CTL/a-mPD1 mAb/C-PTIO 併用群 CTL 投与と a-mPD1 mAb 投与に加えて C-PTIO を CTL 投与 1 日目から 10 日目まで連日 2mg を 1 日 2 回腹腔内へ投与した。

CTL 投与後 13 日後の腫瘍体積は、(1)群は $5563.5 \pm 1683.5 \text{mm}^3$ 、(2)群は $1335.5 \pm 291.7 \text{mm}^3$ 、(3)群は $1035.8 \pm 724.4 \text{mm}^3$ 、(4)群は $561.6 \pm 669.1 \text{mm}^3$ であった。CTL 投与による腫瘍の増殖抑制を認め、そして CTL 投与に a-mPD1 mAb を併用しても抗腫瘍効果は増強しなかったが、CTL 投与に a-mPD1 mAb と C-PTIO を同時に併用することで抗腫瘍効果が有意に増強された。

腫瘍接種後、腫瘍体積が 600mm^3 に達するまでの日数は、(1)群は 3.9 ± 1.2 日、(2)群は 10.3 ± 1.1 日、(3)群は 12.2 ± 3.5 日、(4)群は 16.6 ± 3.5 日であり、増殖抑制期間の延長も認められた。

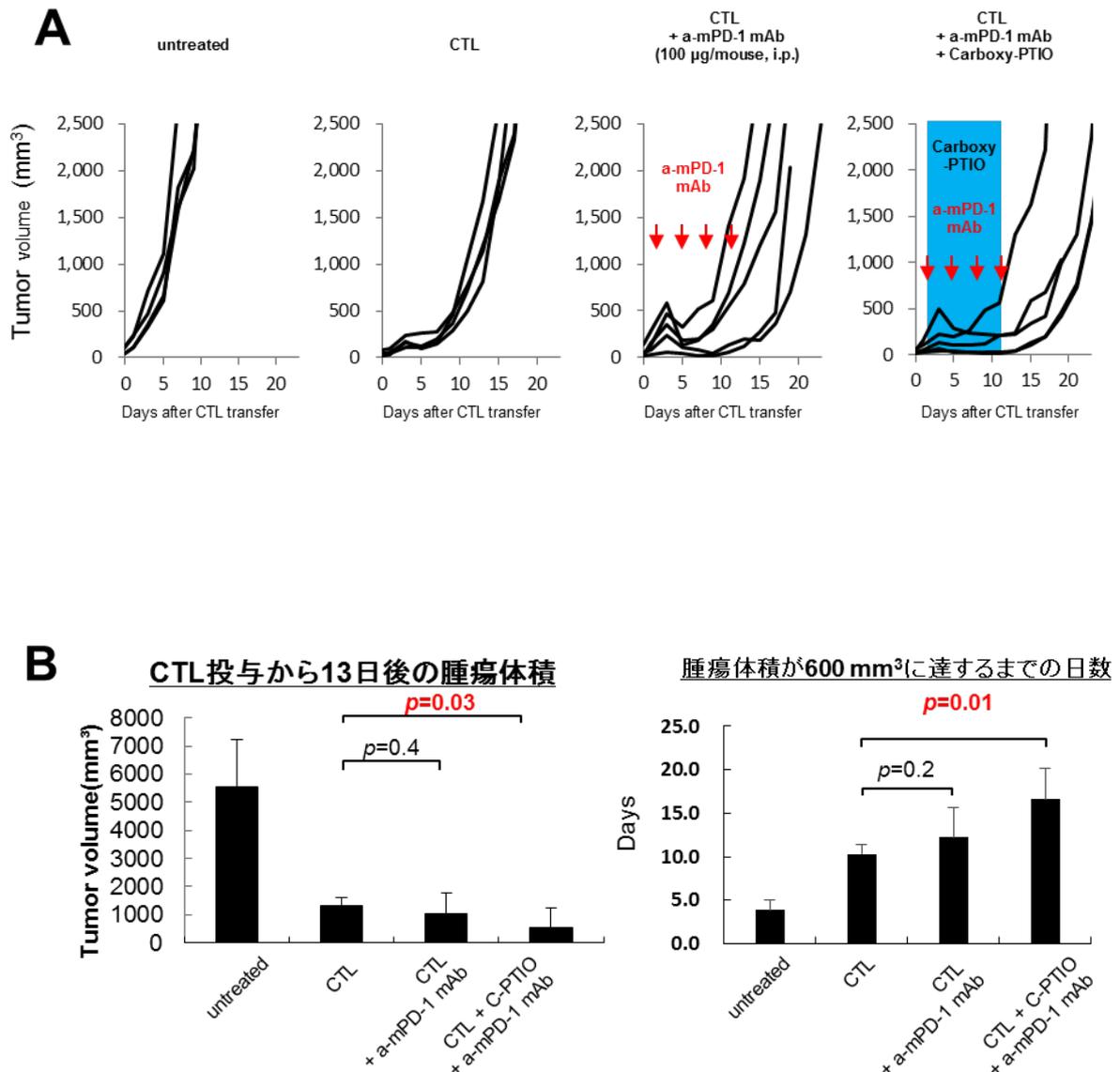


図 26 B16を接種したマウスを4群(各群5匹)に分け、無治療群、CTL 移入療法群、CTL+a-mPD1 mAb 併用群、CTL+a-mPD1 mAb+C-PTIO 併用群に分けた。a-mPD1 mAb は、100µg を CTL 投与 1、4、7、10 日後に腹腔内投与した。C-PTIO は、2mg を 1 日 2 回、CTL 投与 1 日目から 10 日目にかけて連日腹腔内投与した。2 日毎に腫瘍のサイズを測定し腫瘍増殖曲線を描いた。

A:左から無治療マウス、CTL 移入療法マウス、CTL/a-mPD1 mAb 併用マウス、CTL/C-PTIO/a-mPD1 mAb 併用マウスの 1 匹ずつの腫瘍増殖曲線が描かれている。

B(左): CTL 投与 13 日目の各群マウス腫瘍体積の平均±標準偏差を比較した。

B(右): CTL を投与してから各群腫瘍体積が 600mm³ に達するまでの日数の平均±標準偏差を比較した。

考察

CTL 移入療法は強力かつ一定の抗腫瘍効果を発揮できる。しかしながら、腫瘍内に浸潤した CTL は IFN- γ を産生し抗腫瘍活性を発揮するが、同時に CTL は M-MDSC を腫瘍内に誘導し正反対の免疫抑制機構を誘導してしまう。また、腫瘍細胞表面における免疫抑制分子 PD-L1 分子の発現を増強させてしまう。我々は、B16メラノーマ担癌 C57BL/6 マウス腫瘍特異的 CTL 移入療法モデルを用いて、腫瘍内の CTL の数が時間とともに減少し、M-MDSC がさらに誘導され CTL の機能に悪影響を与えることを報告した(図 6,7,11-15)。M-MDSC が免疫抑制を担うといった以前の報告[45]に一致して、我々は MDSC が産生する NO が CD8⁺T 細胞の増殖と機能を阻害し、腫瘍の増大につながることを示した(図 16)。腫瘍内での CTL の数や機能の低下を防ぐために、CTL 移入療法に NO 消去剤である C-PTIO や iNOS 阻害剤である L-NMMA を併用した。C-PTIO 投与により NO を消去することが、CTL の増殖能力やエフェクター活性を維持させ、腫瘍増大の制御につながった(図 18-21)。

MDSC はほとんどのマウス腫瘍モデル[46]および担癌状態のヒト末梢血[47]で認められる。さらに、MDSC の存在が担癌状態のヒトで病期に関連する[48]。MDSC には 2 つの主要なタイプがある、granulocytic CD11b⁺Gr1⁺Ly6G⁺Ly6C^{lo} (G-MDSC) と monocytic CD11b⁺Gr1^{int}Ly6G⁻Ly6C⁺ (M-MDSC)である[49]。一般的に、G-MDSC は増大

した癌において循環する MDSC の大部分を占める[49]。腫瘍において、MDSC の 75% が G-MDSC で、残りの 25%が M-MDSC である[39]。しかし、CTL 移入療法を行うと、腫瘍に誘導されるのは M-MDSC で、G-MDSC より数が多かった[41]。我々は、MDSC が腫瘍内に浸潤する際に必要であるケモカインレセプターである CCR2ノックアウトマウスで CTL の抗腫瘍活性が増強することを明らかにした[41]。

がん治療で MDSC を制御するには様々な方法が考えられた。

1)機能を阻害する(PDE-5 阻害剤[50]、NO-アスピリン[51-53]、COX2 阻害剤[54, 55]、本研究で用いた L-NMMA,C-PTIO)、2)成熟骨髄細胞に分化させる(ATRA[56, 57]、vitamin A、vitamin D3[58]、IL-12[59, 60])、3)発生を阻害する(ゾレドロン酸[61, 62]、JAK2/STAT3 阻害剤[63, 64]、VEGF 阻害剤[65])、4)MDSC そのものを除去する(gemcitabine[66]、doxorubicin[67]、docetaxel[68]、5-FU[69]、IL-6R blocker など)に分類される[70]。

臨床では、PDE-5 阻害剤を頭頸部癌および多発性骨髄腫患者に投与することで、抗腫瘍免疫反応の増強に成功した[71-73]。腫瘍内浸潤リンパ球を投与する養子免疫療法は、制御性 T 細胞や MDSC を含めた免疫抑制性細胞を除去する骨髄非破壊的リンパ球除去化学療法により大いに改善した。がんワクチンにおいては、我々は、sunitinib が血液循環 MDSC の頻度を低下させることにより転移性腎臓がん患者において樹状細胞を用いた免疫治療の効果を、高めることを報告した[74]。転移性メラノーマ患者

では、ipilimumab で CTLA-4 を阻害すると、MDSC の頻度が減少し MDSC が CTLA-4 阻害治療の効果予測バイオマーカーとなる可能性が考えられた[75, 76]。本研究では 1)機能を阻害することに着目して、MDSC が産生する免疫抑制分子 NO を薬理的に除去することにより、MDSC の免疫抑制性活性を減弱させることができた。

G-MDSC は主に活性酸素種(ROS)を産生し、M-MDSC は主に活性窒素種(RNS)を産生することにより、G-MDSC と M-MDSC は異なる経路で、抗原特異的あるいは非特異的な抗腫瘍免疫反応を阻害している[39, 49, 77-79]。

M-MDSC が産生する iNOS と Arginase 1(ARG1)は ROS と NO を産生し、NO と ROS から peroxynitrite(ONOO⁻、ペルオキシ酢酸)のような RNS が産生される[49, 78, 80, 81]。Peroxynitrite は T 細胞受容体-CD8 複合体のニトロ化[82]あるいは腫瘍細胞の MHC 分子へのペプチド結合部位のニトロ化[83]を誘導する。いずれも CTL による腫瘍抗原の認識を減弱させる(図 4)。

さらに、ニトロ化されたケモカインは腫瘍への T 細胞の誘導を損なうが、MDSC は誘導されることが報告されている[52]。

従って、われわれは腫瘍内の M-MDSC による peroxynitrite のような RNS の産生を阻害するために NO を標的にした(図 4)。

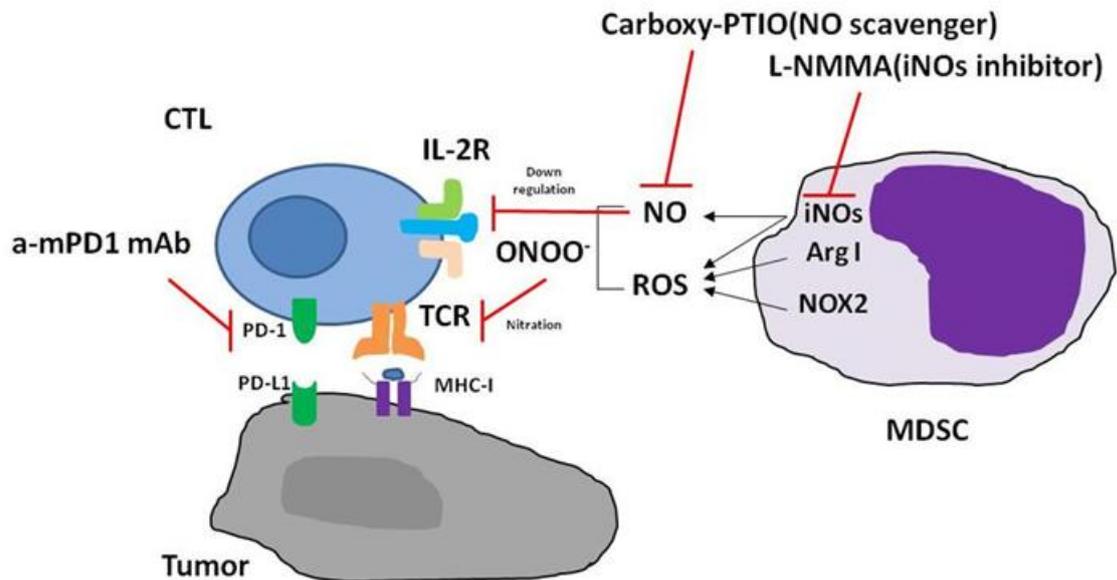


図4 CTL,MDSC,Tumor の相互関係

腫瘍内に浸潤した CTL は腫瘍細胞で提示された MHC-I を TCR(T 細胞受容体)で認識・反応して IFN- γ を産生して腫瘍細胞を攻撃する。しかし、同時に腫瘍内に大量の MDSC が誘導される。この MDSC には iNOS や Arg I や NOX2 が産生され NO や ROS が産生され、さらに ONOO⁻(ペルオキシ硝酸)が産生される。NO は CTL 上の IL-2R(IL-2 受容体)を down regulation し、ONOO⁻は TCR をニトロ化させて、CTL の TCR による MHC-I の認識を阻害して CTL を阻害する。また CTL 表面に負の共刺激分子である PD-1、腫瘍細胞表面に PD-L1 が発現し、PD-1/PD-L1 経路により CTL が制御される。

iNOS 阻害剤である L-NMMA と NO 消去剤である C-PTIO は両薬剤ともに *in vitro* で CTL の増殖を回復させることができた(図 16)。NO は MDSC による CTL 活性の阻害に関与していることが示唆された。われわれは、C-PTIO が腫瘍内の CTL の増殖能力とエフェクター活性を維持させたこと(図 20、図 21)、CTL 移入療法に C-PTIO を併用することにより、CTL の抗腫瘍効果を増強させること(図 18)を明らかにした。

一方、iNOS 阻害剤併用により、CTL の抗腫瘍効果を増強させることはできなかつ

た(図 17)。iNOS 阻害が抗腫瘍効果増強につながらなかった理由は今後明らかにしなければならぬ。しかし、C-PTIO は iNOS の活性そのものに影響を及ぼさず、iNOS から NO を直接識別して制御したことが関係しているかもしれない。対照的に、iNOS 阻害剤である L-NMMA は、NO とともに重要な生理学的機能を調節する NO 関連代謝産物の産生を阻害する作用をしめした[84, 85]。C-PTIO により、より選択的に NO を制御したことが、*in vivo* でよりよい結果につながったと考えられた。NOS には、恒常的に発現している血管内皮型 eNOS と神経型 nNOS および、炎症などにより誘導される誘導型 iNOS が存在する。L-NMMA は非選択的 NOS 阻害剤であるため、腫瘍内の MDSC に発現した iNOS を阻害する前に、eNOS や nNOS を阻害することにより血管系や神経系に対する副作用のため抗腫瘍効果を示さなかった可能性が考えられた。従って、選択的 iNOS 阻害剤である L-NIL を併用して iNOS を選択的に阻害する事で、抗腫瘍効果が増強できた可能性が考えられた。また、別の実験では L-NMMA を 2mg から 5mg に増量して CTL 移入療法に併用したが、明らかな抗腫瘍効果の増強を認めなかった。DDS(ドラッグデリバリーシステム)を用いて、L-NMMA が効率的に腫瘍内に到達すれば、CTL 移入療法による抗腫瘍効果の増強が得られた可能性が考えられた。

図 20B の結果で、CTL 移入療法に C-PTIO を併用すると腫瘍内 CTL の増殖能力は明らかに増加せず、腫瘍所属リンパ節内 CTL の増殖能力が増加した。CTL は、腫瘍内に浸潤するとエフェクター細胞となりエフェクター機能が増強し、そのかわり増殖

能力が低下する。一方、腫瘍所属リンパ節内 CTL のエフェクター機能は未熟であり、増殖能に富んでいる。従って、腫瘍内 CTL の増殖能力はすでに低下しているため、C-PTIO を投与しても改善しなかったが、腫瘍所属リンパ節内 CTL は増殖能力に富んでおり、C-PTIO 投与を投与して、より増殖能力が高まったと考えられた。

以上より、C-PTIO による NO 除去は CTL 機能を維持させたが、効果は一時的であった。CTL の数が減少するとともに機能も減弱した。CTL を投与して 10 日目以降には腫瘍の再増大を認めた(図 18)。

腫瘍は免疫監視機構から逃避するために多彩な戦略を用いている。T 細胞における負の共刺激分子と他の細胞との相互作用だけでなく、免疫抑制因子やプロアポトーシス経路に関連する因子が全て、免疫抑制性環境に関与している。

先に述べたように、Pardoll らは PD-1/PD-L1 間において、腫瘍に発現する PD-L1 と T 細胞上の PD-1 の関係が重要であり、元々腫瘍に発現している PD-L1 からの免疫学的逃避機構を Innate resistance、活性化した T 細胞が産生する IFN- γ 産生により Stat シグナルを通じて発現が惹起された PD-L1 による T 細胞上の PD-1 を介した免疫逃避機構を Adaptive resistance と表現している [11]。我々の腫瘍モデルでは、腫瘍に浸潤した CTL は投与 5 日目から PD-1 を発現してそれ以降も発現が維持されていた(図 22)。

B16F10 メラノーマ細胞は全く PD-L1 を発現してなかった。また、CD45⁺細胞は正確にはがん間質に含まれる細胞を表しており、がん細胞以外にも先で述べたがん関連繊維芽細胞(CAF)や炎症細胞や血管内皮細胞など種々の細胞が含まれている。B16 メラ

ノーマ細胞を C57BL/6 マウスに接種して 9 日目の腫瘍では、腫瘍細胞はわずかに PD-L1 を発現していた。その後も CTL 投与 5 日目、10 日目無治療マウス腫瘍内の腫瘍細胞では PD-L1 がわずかに発現しており Innate resistance と考えられた。そこへ CTL 移入療法を行うと、CTL 投与 5 日目の CTL 移入療法マウス腫瘍内の腫瘍細胞では PD-L1 の発現が著明に高まっており、その後 10 日目も PD-L1 の発現は高まっていた。また、腫瘍内に誘導された MDSC でも PD-L1 の発現が高まっていた。このように CTL 移入療法により、あらたに PD-1/PD-L1 経路による免疫抑制機構が形成されており、Pardoll らの呼ぶ Adaptive resistance と考えられた。

従って、この PD-1/PD-L1 経路を解除する事で、CTL 移入療法を増強できると考えられた。抗マウス PD-1 抗体を CTL/C-PTIO 併用療法にさらに併用することが、さらに CTL 移入療法の抗腫瘍効果を増強させると考えられた。実際、C-PTIO と抗マウス PD-1 抗体を CTL 移入療法に併用することにより、CTL の抗腫瘍活性の増強につながった(図 26)。

本研究で取り扱った MDSC や PD-1/PD-L1 経路を介した免疫抑制以外にも腫瘍には多彩な免疫抑制メカニズムが存在する。これまでのがん免疫治療の問題点をまとめると図 25 に示したような 5 つの問題点がある。(1)がん抗原の消失あるいは発現低下、(2)樹状細胞の抗原取り込み、プロセッシング、成熟の低下、(3)リンパ節における CTL 活性化の低下・ CTL の数の低下、(4)CTL のがん組織へのホーミングがうまくいかな

い、(5)免疫抑制環境の構築である[36]。今回の研究では(5)免疫抑制環境の構築における腫瘍内の免疫抑制因子である MDSC の制御のために、MDSC が産生するエフェクター分子である NO を標的とした C-PTIO を用いることで CTL の抗腫瘍効果の増強に成功した。また CTL に発現する PD-1 と腫瘍や MDSC に発現している PD-L1 との結合を阻害する抗マウス PD-1 抗体を投与することで、さらに抗腫瘍効果の増強につながった。しかし、図 25 で示したように他の問題点も今後解決すべき課題であると考ええる。

本研究では CTL 移入療法を行うと腫瘍内の免疫抑制性環境が増強されていた。CTL が腫瘍内に浸潤し腫瘍細胞を認識・反応し IFN- γ を産生して、抗腫瘍効果を発揮すると同時に、腫瘍内に MDSC が誘導された。MDSC が産生する NO が CTL の機能を制御していた。また腫瘍内に浸潤した CTL に PD-1 が発現し、腫瘍細胞と MDSC には PD-L1 が発現して PD-1/PD-L1 経路があらたに形成され CTL の機能を制御していた。我々は、CTL 移入療法により、免疫抑制性環境であらたに形成された免疫抑制機構であるこれらの Adaptive resistance に注目した。この Adaptive resistance に注目して、C-PTIO を投与し NO を消去して、さらに PD-1/PD-L1 経路を抗マウス PD-1 抗体で解除することで CTL の抗腫瘍効果を増強することが可能なことが本研究で明らかにすることができた。

腫瘍に対する免疫応答を阻害する因子は一人ひとりの患者ごとに異なっており、そのメカニズムを明らかにして対応する事が求められる。がん免疫療法は、複合的免疫療法であり、個別化免疫療法となる必要があると考えられる。

我々は、胃がんや食道がんなどの消化器がんに対して手術療法だけでなく、化学療法や放射線療法を実施している。本研究で、CTL 移入療法により腫瘍内に新たな免疫抑制機構が形成される Adaptive resistance が免疫抑制性環境で起こっていることを我々が明らかにしたように、化学療法や放射線療法そのものが CTL 移入療法のように腫瘍内に新たな免疫抑制機構を形成することが報告されている[86-89]。従って、本研究で Adaptive resistance に注目し、その免疫抑制機構を解除することで抗腫瘍効果の増強につながったように、今後臨床でも化学療法や放射線療法によって腫瘍内にもたらされる Adaptive resistance に注目して、より抗腫瘍効果を高められるようがん治療に携わりたいと考える。

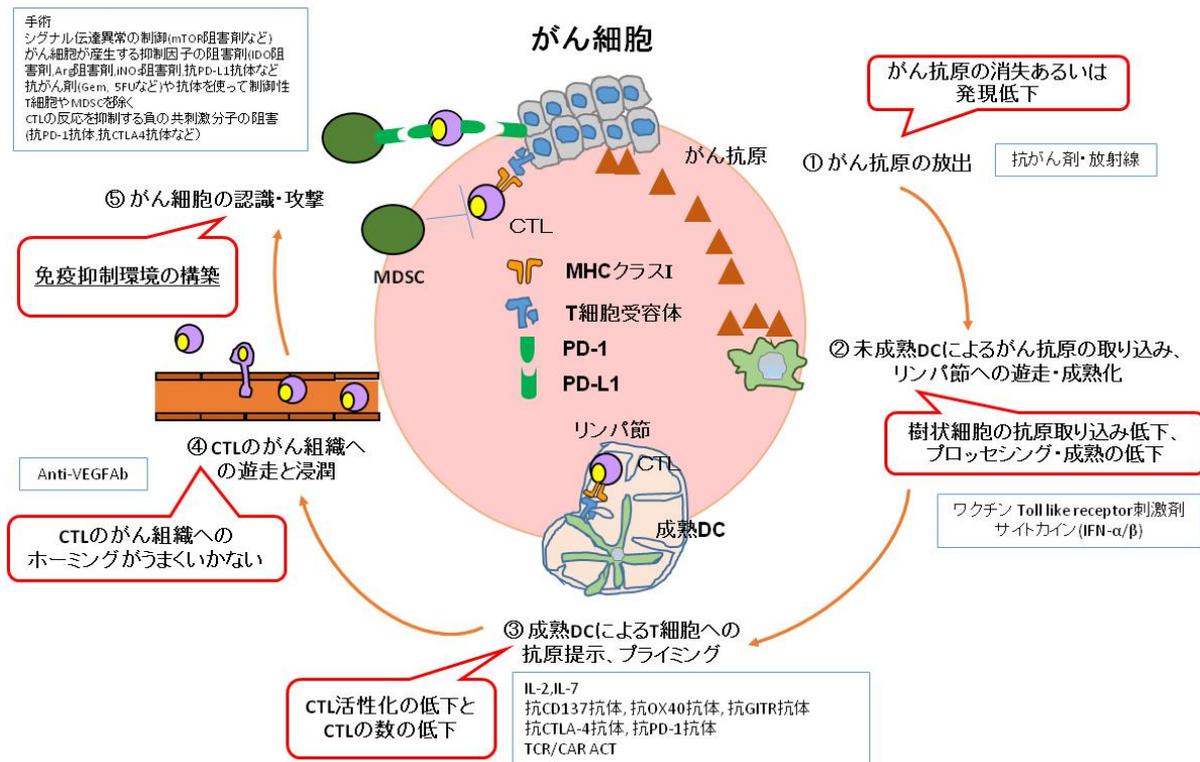


図 25 がん免疫のサイクル

がんを攻撃する免疫応答の誘導には(1)がん抗原の放出、(2)未成熟 DC によるがん抗原の取り込みおよびリンパ節への遊走・成熟化、(3)成熟 DC による T 細胞への抗原提示とプライミング、(4)CTL のがん組織への遊走と浸潤、(5)CTL によるがん細胞の認識と攻撃というサイクルが回ることが重要である。

謝辞

本研究をすすめるにあたり、東京大学大学院医学系研究科外科学専攻消化管外科学講座 瀬戸泰之教授にはひとかたならず御指導・御鞭撻を賜りました。謹んで御礼申し上げます。

また、免疫細胞治療学講座 垣見和宏特任教授には、本研究の遂行にあたり、研究の進め方、具体的な実験方法、実験手技の習得、データの解釈、論文の書き方など、多岐にわたる詳細な御指導を頂きました。さらに実際の実験に際して、免疫細胞治療学講座 細井亮宏先生には多大なるご協力を頂きました。また本論文の作成にあたり、免疫細胞治療学講座 松下博和特任講師には貴重な御助言を頂きました。

また様ざまな点で本研究の遂行に御尽力くださった免疫細胞治療学講座の皆様
に深謝致します。

引用文献

- 1 McNutt M: Cancer immunotherapy; Science. 2013, vol 342, pp 1417.
- 2 Fujita H, Kakegawa T, Yamana H, Shima I, Toh Y, Tomita Y, Fujii T, Yamasaki K, Higaki K, Noake T, et al.: Mortality and morbidity rates, postoperative course, quality of life, and prognosis after extended radical lymphadenectomy for esophageal cancer. Comparison of three-field lymphadenectomy with two-field lymphadenectomy. Ann Surg 1995;222:654-662.
- 3 Ando N, Kato H, Igaki H, Shinoda M, Ozawa S, Shimizu H, Nakamura T, Yabusaki H, Aoyama N, Kurita A, Ikeda K, Kanda T, Tsujinaka T, Nakamura K, Fukuda H: A randomized trial comparing postoperative adjuvant chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil versus preoperative chemotherapy for localized advanced squamous cell carcinoma of the thoracic esophagus (jcog9907). Ann Surg Oncol 2012;19:68-74.
- 4 Kleinberg L, Gibson MK, Forastiere AA: Chemoradiotherapy for localized esophageal cancer: Regimen selection and molecular mechanisms of radiosensitization. Nat Clin Pract Oncol 2007;4:282-294.
- 5 Koizumi W, Narahara H, Hara T, Takagane A, Akiya T, Takagi M, Miyashita K,

Nishizaki T, Kobayashi O, Takiyama W, Toh Y, Nagaie T, Takagi S, Yamamura Y, Yanaoka K,

Orita H, Takeuchi M: S-1 plus cisplatin versus s-1 alone for first-line treatment of advanced

gastric cancer (spirits trial): A phase iii trial. *Lancet Oncol* 2008;9:215-221.

6 Sasako M, Sano T, Yamamoto S, Kurokawa Y, Nashimoto A, Kurita A, Hiratsuka M,

Tsujinaka T, Kinoshita T, Arai K, Yamamura Y, Okajima K, Group JCO: D2

lymphadenectomy alone or with para-aortic nodal dissection for gastric cancer. *N Engl J Med*

2008;359:453-462.

7 Meza-Junco J, Au HJ, Sawyer MB: Trastuzumab for gastric cancer. *Expert Opin Biol*

Ther 2009;9:1543-1551.

8 Mariette C, Piessen G, Triboulet JP: Therapeutic strategies in oesophageal

carcinoma: Role of surgery and other modalities. *Lancet Oncol* 2007;8:545-553.

9 Mori K, Yamagata Y, Seto Y: [current topics on neoadjuvant chemotherapy for

resectable esophageal cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho* 2012;39:863-865.

10 Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ,

Ahmed R: Restoring function in exhausted cd8 t cells during chronic viral infection. *Nature*

2006;439:682-687.

- 11 Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, Chen S, Klein AP, Pardoll DM, Topalian SL, Chen L: Colocalization of inflammatory response with b7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 2012;4:127ra137.
- 12 van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T: A gene encoding an antigen recognized by cytolytic t lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991;254:1643-1647.
- 13 Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA: Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 2002;298:850-854.
- 14 Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA: Adoptive immunotherapy for cancer: Harnessing the t cell response. *Nat Rev Immunol* 2012;12:269-281.
- 15 Gattinoni L, Powell DJ, Jr., Rosenberg SA, Restifo NP: Adoptive immunotherapy for cancer: Building on success. *Nat Rev Immunol* 2006;6:383-393.

16 Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, Royal RE, Topalian SL, Kammula US, Restifo NP, Zheng Z, Nahvi A, de Vries CR, Rogers-Freezer LJ, Mavroukakis SA, Rosenberg SA: Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 2006;314:126-129.

17 Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, Kammula US, Royal RE, Sherry RM, Wunderlich JR, Lee CC, Restifo NP, Schwarz SL, Cogdill AP, Bishop RJ, Kim H, Brewer CC, Rudy SF, VanWaes C, Davis JL, Mathur A, Ripley RT, Nathan DA, Laurencot CM, Rosenberg SA: Gene therapy with human and mouse t-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* 2009;114:535-546.

18 Parkhurst MR, Yang JC, Langan RC, Dudley ME, Nathan DA, Feldman SA, Davis JL, Morgan RA, Merino MJ, Sherry RM, Hughes MS, Kammula US, Phan GQ, Lim RM, Wank SA, Restifo NP, Robbins PF, Laurencot CM, Rosenberg SA: T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis. *Mol Ther* 2011;19:620-626.

19 Morgan RA, Chinnasamy N, Abate-Daga D, Gros A, Robbins PF, Zheng Z, Dudley ME, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Phan GQ, Hughes MS, Kammula US, Miller AD,

Hessman CJ, Stewart AA, Restifo NP, Quezado MM, Alimchandani M, Rosenberg AZ, Nath A, Wang T, Bielekova B, Wuest SC, Akula N, McMahon FJ, Wilde S, Mosetter B, Schendel DJ, Laurencot CM, Rosenberg SA: Cancer regression and neurological toxicity following anti-mage-a3 tcr gene therapy. *J Immunother* 2013;36:133-151.

20 Robbins PF, Morgan RA, Feldman SA, Yang JC, Sherry RM, Dudley ME, Wunderlich JR, Nahvi AV, Helman LJ, Mackall CL, Kammula US, Hughes MS, Restifo NP, Raffeld M, Lee CC, Levy CL, Li YF, El-Gamil M, Schwarz SL, Laurencot C, Rosenberg SA: Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with ny-eso-1. *J Clin Oncol* 2011;29:917-924.

21 Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, June CH: T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 2011;3:95ra73.

22 Kochenderfer JN, Dudley ME, Feldman SA, Wilson WH, Spaner DE, Maric I, Stetler-Stevenson M, Phan GQ, Hughes MS, Sherry RM, Yang JC, Kammula US, Devillier L, Carpenter R, Nathan DA, Morgan RA, Laurencot C, Rosenberg SA: B-cell depletion and remissions of malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-cd19 chimeric-antigen-receptor-transduced t cells. *Blood* 2012;119:2709-2720.

- 23 Brentjens RJ, Rivière I, Park JH, Davila ML, Wang X, Stefanski J, Taylor C, Yeh R, Bartido S, Borquez-Ojeda O, Olszewska M, Bernal Y, Pegram H, Przybylowski M, Hollyman D, Usachenko Y, Pirraglia D, Hosey J, Santos E, Halton E, Maslak P, Scheinberg D, Jurcic J, Heaney M, Heller G, Frattini M, Sadelain M: Safety and persistence of adoptively transferred autologous cd19-targeted t cells in patients with relapsed or chemotherapy refractory b-cell leukemias. *Blood* 2011;118:4817-4828.
- 24 Till BG, Jensen MC, Wang J, Qian X, Gopal AK, Maloney DG, Lindgren CG, Lin Y, Pagel JM, Budde LE, Raubitschek A, Forman SJ, Greenberg PD, Riddell SR, Press OW: Cd20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both cd28 and 4-1bb domains: Pilot clinical trial results. *Blood* 2012;119:3940-3950.
- 25 Louis CU, Savoldo B, Dotti G, Pule M, Yvon E, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Diouf O, Liu E, Liu H, Wu MF, Gee AP, Mei Z, Rooney CM, Heslop HE, Brenner MK: Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive t cells in patients with neuroblastoma. *Blood* 2011;118:6050-6056.
- 26 Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH: Chimeric antigen receptor-modified t cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 2011;365:725-733.

- 27 Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbé C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ: Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:711-723.
- 28 Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M: Safety, activity, and immune correlates of anti-pd-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366:2443-2454.
- 29 Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011;144:646-674.
- 30 Quail DF, Joyce JA: Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 2013;19:1423-1437.
- 31 Murata T, Mizushima H, Chinen I, Moribe H, Yagi S, Hoffman RM, Kimura T,

Yoshino K, Ueda Y, Enomoto T, Mekada E: Hb-egf and pdgf mediate reciprocal interactions of carcinoma cells with cancer-associated fibroblasts to support progression of uterine cervical cancers. *Cancer Res* 2011;71:6633-6642.

32 Zou W: Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005;5:263-274.

33 Mellman I, Coukos G, Dranoff G: Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 2011;480:480-489.

34 Pardoll DM: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12:252-264.

35 Lindau D, Gielen P, Kroesen M, Wesseling P, Adema GJ: The immunosuppressive tumour network: Myeloid-derived suppressor cells, regulatory t cells and natural killer t cells. *Immunology* 2013;138:105-115.

36 Chen DS, Mellman I: Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013;39:1-10.

37 Pardoll DM: Immunology beats cancer: A blueprint for successful translation. *Nat*

Immunol 2012;13:1129-1132.

38 Sawanobori Y, Ueha S, Kurachi M, Shimaoka T, Talmadge JE, Abe J, Shono Y, Kitabatake M, Kakimi K, Mukaida N, Matsushima K: Chemokine-mediated rapid turnover of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Blood* 2008;111:5457-5466.

39 Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI: Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 2008;181:5791-5802.

40 Noji S, Hosoi A, Takeda K, Matsushita H, Morishita Y, Seto Y, Kakimi K: Targeting spatiotemporal expression of cd137 on tumor-infiltrating cytotoxic t lymphocytes as a novel strategy for agonistic antibody therapy. *J Immunother* 2012;35:460-472.

41 Hosoi A, Matsushita H, Shimizu K, Fujii S, Ueha S, Abe J, Kurachi M, Maekawa R, Matsushima K, Kakimi K: Adoptive cytotoxic t lymphocyte therapy triggers a counter-regulatory immunosuppressive mechanism via recruitment of myeloid-derived suppressor cells. *Int J Cancer* 2014;134:1810-1822.

42 Overwijk WW, Theoret MR, Finkelstein SE, Surman DR, de Jong LA, Vyth-Dreese FA, DelleMijn TA, Antony PA, Spiess PJ, Palmer DC, Heimann DM, Klebanoff CA, Yu Z, Hwang LN, Feigenbaum L, Kruisbeek AM, Rosenberg SA, Restifo NP: Tumor regression and

autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive cd8+ t cells. J Exp Med 2003;198:569-580.

43 Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G: An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. J Immunol Methods 1999;223:77-92.

44 Hirano K, Hosoi A, Matsushita H, Iino T, Ueha S, Matsushima K, Seto Y, Kakimi K: The nitric oxide radical scavenger carboxy-ptio reduces the immunosuppressive activity of myeloid-derived suppressor cells and potentiates the anti-tumor activity of adoptive cytotoxic t lymphocyte immunotherapy. OncoImmunology

45 Mazzone A, Bronte V, Visintin A, Spitzer JH, Apolloni E, Serafini P, Zanovello P, Segal DM: Myeloid suppressor lines inhibit t cell responses by an no-dependent mechanism. J Immunol 2002;168:689-695.

46 Ostrand-Rosenberg S, Sinha P: Myeloid-derived suppressor cells: Linking inflammation and cancer. J Immunol 2009;182:4499-4506.

47 Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC, Carbone DP, Gabrilovich DI: Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: A

mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 2001;166:678-689.

48 Diaz-Montero CM, Salem ML, Nishimura MI, Garrett-Mayer E, Cole DJ, Montero AJ: Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:49-59.

49 Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V: Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 2012;12:253-268.

50 Serafini P, Meckel K, Kelso M, Noonan K, Califano J, Koch W, Dolcetti L, Bronte V, Borrello I: Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med* 2006;203:2691-2702.

51 De Santo C, Serafini P, Marigo I, Dolcetti L, Bolla M, Del Soldato P, Melani C, Guiducci C, Colombo MP, Iezzi M, Musiani P, Zanovello P, Bronte V: Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:4185-4190.

52 Molon B, Ugel S, Del Pozzo F, Soldani C, Zilio S, Avella D, De Palma A, Mauri P, Monegal A, Rescigno M, Savino B, Colombo P, Jonjic N, Pecanic S, Lazzarato L, Fruttero R,

Gasco A, Bronte V, Viola A: Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific t cells. *J Exp Med* 2011;208:1949-1962.

53 Fiorucci S, Santucci L, Cirino G, Mencarelli A, Familiari L, Soldato PD, Morelli A: Il-1 beta converting enzyme is a target for nitric oxide-releasing aspirin: New insights in the antiinflammatory mechanism of nitric oxide-releasing nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J Immunol* 2000;165:5245-5254.

54 Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S: Prostaglandin e2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 2007;67:4507-4513.

55 Talmadge JE, Hood KC, Zobel LC, Shafer LR, Coles M, Toth B: Chemoprevention by cyclooxygenase-2 inhibition reduces immature myeloid suppressor cell expansion. *Int Immunopharmacol* 2007;7:140-151.

56 Kusmartsev S, Cheng F, Yu B, Nefedova Y, Sotomayor E, Lush R, Gabrilovich D: All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer Res* 2003;63:4441-4449.

57 Mirza N, Fishman M, Fricke I, Dunn M, Neuger AM, Frost TJ, Lush RM, Antonia S,

Gabrilovich DI: All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res* 2006;66:9299-9307.

58 Lathers DM, Clark JI, Achille NJ, Young MR: Phase 1b study to improve immune responses in head and neck cancer patients using escalating doses of 25-hydroxyvitamin d3. *Cancer Immunol Immunother* 2004;53:422-430.

59 Steding CE, Wu ST, Zhang Y, Jeng MH, Elzey BD, Kao C: The role of interleukin-12 on modulating myeloid-derived suppressor cells, increasing overall survival and reducing metastasis. *Immunology* 2011;133:221-238.

60 Kerkar SP, Goldszmid RS, Muranski P, Chinnasamy D, Yu Z, Reger RN, Leonardi AJ, Morgan RA, Wang E, Marincola FM, Trinchieri G, Rosenberg SA, Restifo NP: IL-12 triggers a programmatic change in dysfunctional myeloid-derived cells within mouse tumors. *J Clin Invest* 2011;121:4746-4757.

61 Melani C, Sangaletti S, Barazzetta FM, Werb Z, Colombo MP: Amino-biphosphonate-mediated mmp-9 inhibition breaks the tumor-bone marrow axis responsible for myeloid-derived suppressor cell expansion and macrophage infiltration in tumor stroma. *Cancer Res* 2007;67:11438-11446.

- 62 Porembka MR, Mitchem JB, Belt BA, Hsieh CS, Lee HM, Herndon J, Gillanders WE, Linehan DC, Goedegebuure P: Pancreatic adenocarcinoma induces bone marrow mobilization of myeloid-derived suppressor cells which promote primary tumor growth. *Cancer Immunol Immunother* 2012;61:1373-1385.
- 63 Bill MA, Fuchs JR, Li C, Yui J, Bakan C, Benson DM, Jr., Schwartz EB, Abdelhamid D, Lin J, Hoyt DG, Fossey SL, Young GS, Carson WE, 3rd, Li PK, Lesinski GB: The small molecule curcumin analog flll32 induces apoptosis in melanoma cells via stat3 inhibition and retains the cellular response to cytokines with anti-tumor activity. *Mol Cancer* 2010;9:165.
- 64 Lu P, Yu B, Xu J: Cucurbitacin b regulates immature myeloid cell differentiation and enhances antitumor immunity in patients with lung cancer. *Cancer Biother Radiopharm* 2012;27:495-503.
- 65 Ko JS, Zea AH, Rini BI, Ireland JL, Elson P, Cohen P, Golshayan A, Rayman PA, Wood L, Garcia J, Dreicer R, Bukowski R, Finke JH: Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res* 2009;15:2148-2157.
- 66 Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM: Gemcitabine selectively

eliminates splenic gr-1+/cd11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res* 2005;11:6713-6721.

67 Alizadeh D, Trad M, Hanke NT, Larmonier CB, Janikashvili N, Bonnotte B, Katsanis E, Larmonier N: Doxorubicin eliminates myeloid-derived suppressor cells and enhances the efficacy of adoptive t-cell transfer in breast cancer. *Cancer Res* 2014;74:104-118.

68 Kodumudi KN, Woan K, Gilvary DL, Sahakian E, Wei S, Djeu JY: A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: Suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clin Cancer Res* 2010;16:4583-4594.

69 Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, Martin F, Apetoh L, Rebe C, Ghiringhelli F: 5-fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced t cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res* 2010;70:3052-3061.

70 Wesolowski R, Markowitz J, Carson WE: Myeloid derived suppressor cells - a new therapeutic target in the treatment of cancer. *J Immunother Cancer* 2013;1:10.

71 Noonan KA, Ghosh N, Rudraraju L, Bui M, Borrello I: Targeting immune suppression with pde5 inhibition in end-stage multiple myeloma. *Cancer Immunol Res*

2014;2:725-731.

72 Weed DT, Vella JL, Reis IM, De la Fuente AC, Gomez C, Sargi Z, Nazarian R, Califano J, Borrello I, Serafini P: Tadalafil reduces myeloid-derived suppressor cells and regulatory t cells and promotes tumor immunity in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2015;21:39-48.

73 Califano JA, Khan Z, Noonan KA, Rudraraju L, Zhang Z, Wang H, Goodman S, Gourin CG, Ha PK, Fakhry C, Saunders J, Levine M, Tang M, Neuner G, Richmon JD, Blanco R, Agrawal N, Koch WM, Marur S, Weed DT, Serafini P, Borrello I: Tadalafil augments tumor specific immunity in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2015;21:30-38.

74 Matsushita H, Enomoto Y, Kume H, Nakagawa T, Fukuhara H, Suzuki M, Fujimura T, Homma Y, Kakimi K: A pilot study of autologous tumor lysate-loaded dendritic cell vaccination combined with sunitinib for metastatic renal cell carcinoma; *J immunother cancer*. England, 2014, vol 2, pp 30.

75 Meyer C, Cagnon L, Costa-Nunes CM, Baumgaertner P, Montandon N, Leyvraz L, Michielin O, Romano E, Speiser DE: Frequencies of circulating mdsc correlate with clinical

outcome of melanoma patients treated with ipilimumab. *Cancer Immunol Immunother* 2014;63:247-257.

76 Pico de Coaña Y, Poschke I, Gentilcore G, Mao Y, Nyström M, Hansson J, Masucci GV, Kiessling R: Ipilimumab treatment results in an early decrease in the frequency of circulating granulocytic myeloid-derived suppressor cells as well as their arginase1 production. *Cancer Immunol Res* 2013;1:158-162.

77 Movahedi K, Guillemins M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, De Baetselier P, Van Ginderachter JA: Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct t cell-suppressive activity. *Blood* 2008;111:4233-4244.

78 Gabrilovich DI, Nagaraj S: Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009;9:162-174.

79 Dolcetti L, Peranzoni E, Ugel S, Marigo I, Fernandez Gomez A, Mesa C, Geilich M, Winkels G, Traggiai E, Casati A, Grassi F, Bronte V: Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by gm-csf. *Eur J Immunol* 2010;40:22-35.

80 Raber PL, Thevenot P, Sierra R, Wyczechowska D, Halle D, Ramirez ME, Ochoa AC, Fletcher M, Velasco C, Wilk A, Reiss K, Rodriguez PC: Subpopulations of myeloid-derived suppressor cells impair t cell responses through independent nitric oxide-related pathways. *Int J Cancer* 2014;134:2853-2864.

81 Kusmartsev S, Nefedova Y, Yoder D, Gabrilovich DI: Antigen-specific inhibition of cd8+ t cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol* 2004;172:989-999.

82 Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, Herber DL, Schneck J, Gabrilovich DI: Altered recognition of antigen is a mechanism of cd8+ t cell tolerance in cancer. *Nat Med* 2007;13:828-835.

83 Lu T, Ramakrishnan R, Altiok S, Youn JI, Cheng P, Celis E, Pisarev V, Sherman S, Sporn MB, Gabrilovich D: Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic t cells in mice. *J Clin Invest* 2011;121:4015-4029.

84 Akaike T, Yoshida M, Miyamoto Y, Sato K, Kohno M, Sasamoto K, Miyazaki K, Ueda S, Maeda H: Antagonistic action of imidazolineoxyl n-oxides against endothelium-derived relaxing factor/.No through a radical reaction. *Biochemistry*

1993;32:827-832.

85 Maeda H, Akaike T, Yoshida M, Suga M: Multiple functions of nitric oxide in pathophysiology and microbiology: Analysis by a new nitric oxide scavenger. *J Leukoc Biol* 1994;56:588-592.

86 Ding ZC, Munn DH, Zhou G: Chemotherapy-induced myeloid suppressor cells and antitumor immunity: The janus face of chemotherapy in immunomodulation. *Oncoimmunology* 2014;3:e954471.

87 Ding ZC, Lu X, Yu M, Lemos H, Huang L, Chandler P, Liu K, Walters M, Krasinski A, Mack M, Blazar BR, Mellor AL, Munn DH, Zhou G: Immunosuppressive myeloid cells induced by chemotherapy attenuate antitumor cd4+ t-cell responses through the pd-1-pd-l1 axis. *Cancer Res* 2014;74:3441-3453.

88 Xu J, Escamilla J, Mok S, David J, Priceman S, West B, Bollag G, McBride W, Wu L: Csf1r signaling blockade stanches tumor-infiltrating myeloid cells and improves the efficacy of radiotherapy in prostate cancer. *Cancer Res* 2013;73:2782-2794.

89 Guo Q, Lv Z, Fu Q, Jiang C, Liu Y, Lai L, Chen Q, Shen J, Wang Q: Ifn-gamma producing t cells contribute to the increase of myeloid derived suppressor cells in

tumor-bearing mice after cyclophosphamide treatment; *Int immunopharmacol. Netherlands*,

2011 Elsevier B.V, 2012, vol 12, pp 425-432.