

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 平野康介

序文

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ことがわかっている。すでに腫瘍内で形成された免疫抑制機構を Innate resistance、腫瘍に治療を加えることであらたに形成される免疫抑制機構を Adaptive resistance と呼ばれている。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が、がん免疫療法の改善に役立つと考えられている。

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て、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 マウスを用いた腫瘍特異的細胞傷害性 T 細胞(CTL:cytotoxic T lymphocyte)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。

先行研究である野地、細井らの報告と同様にこの 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、その抗腫瘍効果は一時的であり再び腫瘍が増大してしまう問題点があった。細井らは、CTL 移入療法により腫瘍内に骨髄由来抑制性細胞(MDSC:myeloid-derived suppressor cells)が誘導され、MDSC に誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS: inducible nitric oxide synthase)が発現し、一酸化窒素(NO:nitric oxide)および活性酸素種(ROS: reactive oxygen species)が産生され CTL が制御されることが原因の 1 つであることを明らかにした。

本研究では、MDSC が産生する免疫抑制分子 iNOS および NO に注目した。iNOS 阻害剤 L-NMMA および NO 消去剤 carboxy-PTIO(C-PTIO)を CTL 移入療法に併用することで、CTL の抗腫瘍効果をさらに増強させることを検討した。

結果

この CTL 移入療法モデルで、CTL は腫瘍の増殖を停止するが、その抗腫瘍効果は一時的であり、再び腫瘍が増大した。

そこで腫瘍内に浸潤した CTL の解析を行った。CTL は投与して 5 日目、腫瘍内浸潤リンパ球の 15% を占めていたが、10 日目には 2% に減っていた。また CTL のエフェクター活性 (IFN- γ) を投与 3 日目に認めたが、5 日目以降は低下していた。CTL は、はじめ腫瘍内に浸潤しエフェクター活性を発揮するが、後にその数もエフェクター活性も低下してしまうことが明らかになった。

また CTL 移入療法により腫瘍内に大量の単核球が浸潤していた。CTL に加え CD8⁺ 細胞、CD4⁺ 細胞、NK 細胞などのリンパ球が浸潤していたが、細井らの報告と同様、MDSC が大部分を占めていた。MDSC の中で、主に Monocytic MDSC (M-MDSC) が認められた。

CTL 移入療法マウス腫瘍 (CTL 投与 3 日目) から CD11b⁺ 細胞を採取して、CD11b、Gr1、NO、ROS の抗体で染色した。蛍光顕微鏡およびフローサイトメーターで、CD11b⁺Gr1⁺ 細胞 (MDSC) は、NO および ROS を産生していることが細胞レベルで明らかになった。

無治療マウスと CTL 移入療法マウスの腫瘍内における iNOS の発現を比較した。CTL 移入療法により腫瘍内および M-MDSC の iNOS の発現が高まっていた。CTL 移入療法により腫瘍内に誘導された M-MDSC が分子レベルで iNOS を発現することがあきらかになった。

ここまでの結果をまとめると、CTL 移入療法により、CTL は腫瘍内に浸潤し腫瘍細胞を認識・反応し、IFN- γ を産生し抗腫瘍効果を発揮して腫瘍の増殖を停止させた。しかし、腫瘍内 CTL はいずれその数・エフェクター活性が低下するため抗腫瘍効果は一時的であり、腫瘍は再び増大した。腫瘍内には大量の MDSC が誘導され、iNOS を発現し NO や ROS を産生していた。

そこで、CTL と CD11b⁺ 細胞 (CTL 投与 3 日目の CTL 移入療法マウスの腫瘍から採取した) を共培養し CTL の増殖・分裂を測定した。CD11b⁺ 細胞は CTL の増殖・分裂を抑制した。MDSC が産生する iNOS または NO を制御する L-NMMA または C-PTIO を投与すると、CD11b⁺ 細胞存在下でも、CTL の増殖・分裂が回復した。腫瘍内に誘導された MDSC は CTL の増殖・分裂を抑制し、MDSC が産生する iNOS や NO を制御すると、MDSC の CTL 抑制機能が解除されることが細胞レベルで明らかになった。腫瘍内に誘導された MDSC は iNOS を発現して NO を産生することで CTL の増殖・分裂を制御していることが明らかになった。

そこで、CTL 移入療法モデルで CTL に L-NMMA および C-PTIO を併用した。L-NMMA は CTL 移入療法の抗腫瘍効果を増強させなかったが、C-PTIO は CTL 移入療法の抗腫瘍効果を増強させた。

C-PTIO による腫瘍内環境への影響を、CTL 移入療法マウスと CTL/C-PTIO 併用マウスで解析した。C-PTIO 投与により、腫瘍内 MDSC の NO 産生が制御されていた。また腫瘍内 CTL の増殖能が高まり、エフェクター活性も高まっていることが明らかになった。

また、C-PTIO を併用すると、腫瘍内の Perforin、IFN- γ 、Granzyme B などのエフェクター分子の発現が高まっていたが、免疫抑制分子である iNOS や Arginase I や NOX2 の発現には影響しないことが明らかになった。

CTL 移入療法に C-PTIO を併用しても、その抗腫瘍効果は一時的であり、再び腫瘍が増大した。腫瘍内浸潤 CTL の正負の共刺激分子を解析すると、PD-1 が発現していた。腫瘍細胞と MDSC には PD-L1 が発現していた。

このモデルでは CTL 移入療法により Adaptive resistance としてあらたに PD-1/PD-L1 経路が免疫抑制機構として形成されていることが明らかになった。そこで、Adaptive resistance としてあらたに形成された免疫抑制機構である、PD-1/PD-L1 経路を解除するために、抗マウス PD-1 抗体を CTL 移入療法に併用した。CTL 移入療法に C-PTIO と抗 PD-1 抗体を同時に併用して、抗腫瘍効果が増強した。

考察

腫瘍内では、様々な細胞と分子が複雑に相互作用する事で、免疫抑制性環境が構築されている。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を発現し、あるいは免疫応答を抑制する因子を産生する。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と同様に、制御性 T 細胞(regulatory T cells: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。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共存と腫瘍の増大が起こっている。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。

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機構以外にも腫瘍には多様な免疫抑制機構が存在する。これまでのがん免疫療法の問題点をまとめると 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 の活性化の低下、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)免疫抑制性環境の構築、である。本研究では、主に(5)免疫抑制性環境の構築に注目して免疫抑制性細胞である MDSC の制御、PD-1/PD-L1 経路の解除により抗腫瘍活性を増強させることに成功した。

臨床では、一人ひとりの患者ごとに、腫瘍に対する免疫応答を阻害する因子は異なっており、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ことが必要であると考えられる。

本研究で CTL 移入療法を行うと、腫瘍内への MDSC の誘導および、あらたに PD-1/PD-L1 経路が形成され、腫瘍内免疫抑制性環境にあらたな免疫抑制機構が形成されていることを明らかにした。これら CTL 移入療法により免疫抑制性環境にあらたに形成された免疫抑制機構である Adaptive resistance に注目して、MDSC 産生 NO を C-PTIO で消去し、PD-1/PD-L1 経路を抗マウス PD-1 抗体で解除することで CTL 移入療法の抗腫瘍効果を増強することができることを本研究で明らかにすることができた。

胃がんや食道がんなどの消化器がんに対して化学療法や放射線療法が行われるが、本研究で明らかにした Adaptive resistance として、腫瘍内にあらたな免疫抑制機構が形成されることが明らかになっている。今後臨床で、化学療法や放射線療法による腫瘍内における Adaptive resistance に注目して、より抗腫瘍効果を高められるようにがん治療に携わりたいと考える。