[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名　平野　康介

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。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。

これまでの研究により、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ともに、腫瘍内に骨髄由来抑制性細胞(MDSC)が誘導され、MDSC で産生される iNOS(一酸化窒素合成酵素)から産生される NO(一酸化窒素)と ROS(活性酸素種)により CTL が抑制されることがこれまでに明らかにされている。本研究は、CTL 移入療法により腫瘍内に誘導された MDSC を制御することにより CTL 移入療法の抗腫瘍効果の増強を試みたものである。また、これまでに 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が、負の共刺激分枝である PD-1 分子が CTL に発現し、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明らかにされている。本研究では、Adaptive resistance に着目し、この 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 細胞移入療法モデルであらたに形成される免疫抑制機構を明らかにし、さらにこの免疫抑制機構を解除することを試みたものである。下記の結果を得ている。

1. 先行研究の追試実験を行った。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、腫瘍内には大量の単核球が誘導されており、主に M-MDSC が誘導されていた。
2. 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を産生していることを細胞レベルで検証する実験を行った。CTL移入療法が実施された 3 日目のマウス腫瘍から磁気的に$CD11b^+$細胞を分離した。Diff-Quickで染色し、光学顕微鏡でMDSCの存在を確認した。また、この$CD11b^+$細胞を DAF-FM, CM-H_2DCFDA で染色し、CD11b,Gr1 に対する抗体で染色した。蛍光顕微鏡でCD11b、Gr1 ともに陽性の細胞はNOもROSも陽性であり、MDSCがNOとROSを産生していることが明らかになった。

3. 無治療マウス腫瘍内と CTL 移入療法が実施されたマウス腫瘍内に誘導された M-MDSC における iNOS や Arg I の発現の比較を定量 RT-PCR で行った。CTL 移入療法が実施された 3 日目のマウス腫瘍から細胞浮遊液を抽出し、各種抗体で染色したのち、フローサイトメーターで sorting により M-MDSC を分離した。分離した M-MDSC から cDNA を合成し RT-PCR を行った。無治療マウスに比べて、CTL 移入療法が実施されたマウス腫瘍内の M-MDSC の iNOS の発現が増強していた。ArgI は CTL 治療の有無にかかわらず上昇していた。
4. iNOS阻害剤(L-NMMA)とNO消去剤(C-PTIO)を投与しMDSCが制御可能かどうか、細胞増殖試験を行った。CTLは、Pmel-1 トランスジェニックマウス脾細胞から$CD8^+$細胞を磁気的に分離した。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。またCTL移入療法が実施された 3 日目のマウス腫瘍から$CD11b^+$細胞を磁気的に分離した。CTLとMDSCを共培養して 3 日目にフローサイトメーターでCTLの増殖率を測定した。CTLをペプチド下で培養すると 90%以上の増殖率を示すが、そこへMDSCを 1:0.3 の比率でCTLとともに培養すると 38%に増殖率が抑制された。そこでiNOS阻害剤であるL-NMMAとNO消去剤であるC-PTIOを投与すると、CTLの増殖率が 90%以上へ回復した。腫瘍内に誘導されたMDSCはiNOSを発現してNOを産生し、CTLを制御していることが細胞レベルで明らかになった。さらにiNOS阻害剤およびNO消去剤を投与することでMDSCを細胞レベルで制御できることが明らかになった。
5. B16メラノーマ担癌 C57BL/6 マウスを用いた腫瘍特異的 CTL 移入療法モデルに L-NMMA と C-PTIO をそれぞれ併用したところ、L-NMMA を投与しても CTL 移入療法の抗腫瘍効果を増強することができなかったが、C-PTIO を併用することにより CTL 移入療法の抗腫瘍効果を増強することができた。
6. CTL 移入療法が実施されたマウスと CTL 移入療法と C-PTIO を併用したマウス腫瘍内の環境を CTL 移入療法から 3 日目と 7 日目でフローサイトメーターを使って解析した。
   C-PTIOを併用した3日目のマウス腫瘍内のMDSCにおけるNO産生が低下しており、C-PTIO投与により腫瘍内 MDSC の NO 産生が実際に抑制されていた。
   7 日目の腫瘍内に浸潤した CTL の数が CTL 移入療法単独よりも C-PTIO 併用のほうが維持されていた。
   腫瘍内および腫瘍所属のリンパ節に浸潤した CTL の増殖能を BrdU 取り込み率で比較した。C-PTIO を併用すると、3 日目の腫瘍所属のリンパ節に浸潤した CTL の増殖能が有意に高まっており、3 日目の腫瘍内に浸潤した CTL の増殖能が、有意差はないが高まっていた。
   腫瘍内に浸潤した CTL のエフェクター活性を IFNγ および CD107a 産生率で比較すると、3 日目から 7 日目にかけて C-PTIO を併用したほうが維持されていた。
   C-PTIO を投与すると腫瘍内に浸潤した MDSC の NO 産生が制御され、腫瘍所属リンパ節に浸潤した CTL の増殖能および腫瘍内に浸潤した CTL の増殖能が高まり、3 日目から 7 日目にかけて CTL の数が維持されていた。同様に CTL のエフェクター活性も C-PTIO を併用することで 3 日目から 7 日目にかけて維持されていた。

7. CTL 移入療法が実施されたマウスと CTL 移入療法と C-PTIO を併用いたマウス腫瘍におけるエフェクター分子と免疫抑制性分子の発現を RT-PCR を行い比較した。
   3 日目から 7 日目にかけて C-PTIO を併用したほうが、エフェクター分子の発現が維持されていた。しかし、免疫抑制性分子の発現は C-PTIO 併用による影響を認めなかった。
8. C-PTIO を併用し CTL 移入療法の抗腫瘍効果を増強させることができたが、やはり一時的であり腫瘍は再び増殖した。そのため、あらたな免疫抑制機構を明らかにするため正負の共刺激分子の発現を解析した。
   腫瘍内に浸潤したCTLでは、投与 5 日目よりあらたにPD-1 分子が発現しており、その後も 14 日目まで発現が維持されていた。またCTL移入療法が実施されたマウス腫瘍内$CD45^-$細胞においてPD-L1 分子が発現していた。同様に腫瘍内に誘導されたMDSCにおいてPD-L1 分子が発現していた。CTL移入療法によりマウス腫瘍内ではあらたな免疫抑制機構として PD-1/PD-L1 経路が形成されていることが明らかになった。
9. そこで、CTL 移入療法に C-PTIO と抗マウス PD1 抗体を併用した。CTL 移入療法の抗腫瘍効果がさらに増強した。

以上、本論文は担癌マウスに対する腫瘍特異的 CTL 移入療法モデルを用いて、腫瘍内の免疫抑制性環境を制御することで抗腫瘍効果が増強されることが明らかになった。また腫瘍に治療を加えることであらたに形成された免疫抑制機構を明らかにし、その免疫抑制機構を解除することにより抗腫瘍効果が増強されることも明らかになった。臨床でも同様に化学療法や放射線照射による治療を加えることで、腫瘍内の免疫抑制性機構があらたに形成されると考えられ、今後臨床にもこの考え方が応用できると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。